



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΩΝ ΖΩΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ  
*Schizochytrium* sp. ΣΤΟ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ ΑΙΓΩΝ ΣΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΕ ΟΡΙΣΜΕΝΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ  
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

*ΜΑΥΡΟΜΜΑΤΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ*

Εξεταστική επιτροπή:

Τσιπλάκου Ελένη Αν. Καθηγήτρια

Φεγγερός Κωνσταντίνος Καθηγητής

Φλεμετάκης Εμμανουήλ Αν. Καθηγητής

Λάμπρου Νικόλαος Καθηγητής

Χαδιώ-Μάντζαρη Στυλιανή Καθηγήτρια

Σωτηράκογλου Κυριακή Καθηγήτρια

Παπαδομιχελάκης Γεώργιος Επ. Καθηγητής

Αντικατάσταση του Ομ. Καθηγητή κ. Γ. Ζέρβα από την Καθηγήτρια κ. Κ. Σωτηράκογλου με βάση την Απόφαση της Συνέλευσης του Τμήματος Ε.Ζ.Π. (72<sup>η</sup> Συνεδρίαση 5/5/2019), σύμφωνα με την Παράγραφο 2, Άρθρο 41, Ν. 4485/2017.

Αθήνα, 2019

AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS  
SCHOOL OF ANIMAL BIOSCIENCES  
DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE  
LABORATORY OF NUTRITIONAL PHYSIOLOGY AND FEEDING

DOCTORAL THESIS

THE EFFECT OF SUPPLEMENTATION WITH MICROALGAE  
*Schizochytrium sp.* IN GOATS' DIET, IN MILK AND BLOOD  
BIOCHEMICAL PARAMETERS.

*MAVROMMATIS ALEXANDROS*

Examination Committee:

Tsiplakou Eleni Assoc. Professor

Feggeros Konstantinos Professor

Flemetakis Emmanouil Assoc. Professor

Labrou Nikolaos Professor

Chadio-Mantzari Stiliani Professor

Sotirakoglou Kiriaki Professor

Papadomichelakis George Asst. Professor

Athens, 2019

## Περίληψη

### **Επίδραση της ενσωμάτωσης του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* στο σιτηρέσιο αιγών στα παραγωγικά χαρακτηριστικά και σε ορισμένες βιοχημικές παραμέτρους.**

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Ιερά Οδός 75, Βοτανικός, Τ.Κ. 11855, E-mail: eltsiplakou@aua.gr

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών στη διατροφή του ανθρώπου αφού παρέχουν ενέργεια, υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεΐνες, απαραίτητα ανόργανα στοιχεία και βιταμίνες. Ωστόσο, η υψηλή συμμετοχή των κορεσμένων λιπαρών οξέων στο λίπος του γάλακτος συσχετίζεται θετικά με την εκδήλωση σύγχρονων, δυτικού τύπου, ασθενειών του ανθρώπου-καταναλωτή όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις κ.ά. Στον αντίποδα, τα ακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το βασσενικό και το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ, φαίνεται να είναι υπέρμαχοι της υγείας του καταναλωτή, συμβάλλοντας στην πρόληψη δημιουργίας αθηρωματικών πλακών, στη ρύθμιση της ινσουλίνης και της λιπογένεσης, καθώς επίσης συνδέονται με ευεργετικές ιδιότητες στο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα προαναφερθέντα στοιχεία αποτελούν πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα για περισσότερα από 20 χρόνια, με σκοπό την τροποποίηση του μικροβιώματος της μεγάλης κοιλίας με κύρια κατεύθυνση τον εμπλουτισμό των γαλακτοκομικών προϊόντων με βιο-λειτουργικά μόρια, ευεργετικά της υγείας του καταναλωτή. Ωστόσο, την τρέχουσα δεκαετία, όπου η κλιματική αλλαγή επιδεικνύει έντονα την παρουσία της, το μικροβίωμα της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών αποκτά και περιβαλλοντική διάσταση. Συγκεκριμένα, είδη βακτηρίων που αποικούν τη μεγάλη κοιλία, παράγουν ένα από τα ισχυρότερα αέρια του θερμοκηπίου, το μεθάνιο, με δυναμική 26 φορές μεγαλύτερη από αυτή του διοξειδίου του άνθρακα. Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο εμπλουτισμός του γάλακτος μέσω του σιτηρεσίου σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, με παράλληλη βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος των γαλακτοπαραγωγών ζώων και την ταυτόχρονη μείωση των αποβαλλόμενων από τα μηρυκαστικά ζώα αερίων του θερμοκηπίου. Η επίτευξη των προαναφερθέντων μελετάται με την προσθήκη τροφών πλούσιων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ιδίως DHA και EPA στη διατροφή των μηρυκαστικών ζώων. Για τη μελέτη αυτή επελέγη η χρησιμοποίηση του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε DHA λιπαρά οξέα (22%) και φυσικά

αντιοξειδωτικά, καθώς και της αιμόφρας και αποδοτικότητας ετεροτροφικής καλλιέργειάς του.

Για τη μελέτη των παραπάνω σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε το πρώτο πείραμα με σκοπό τη διερεύνηση του βέλτιστου επιπέδου ενσωμάτωσης του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* μέσω τριών επιπέδων α) στη χημική σύσταση του γάλακτος, β) στο προφίλ των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας, του πλάσματος του αίματος και του γάλακτος, γ) σε επιλεγμένα γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και δ) στο προφίλ των μικροοργανισμών που αποικούν τη μεγάλη κοιλία. Για το σκοπό του πρώτου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 24 αίγες φυλής Alpine διασταυρωμένες με εγχώριες, ηλικίας 3<sup>ov</sup> ως 4<sup>ov</sup> ετών, μέσου σωματικού βάρους 47,6±5,9 Kg, στο μέσο της γαλακτοπαραγωγής. Τα ζώα χωρίστηκαν σε τέσσερις ισοδύναμες ομάδες με βάση τη διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγή, το σωματικό τους βάρος και τη γαλακτική τους περίοδο: α) την ομάδα **CON** (μάρτυρας: 0 g DHAgold™/ζώο/ημέρα), β) την ομάδα **ALG20** (χαμηλής συμμετοχής: 20 g DHAgold™/ζώο/ημέρα), γ) την ομάδα **ALG40** (μέσης συμμετοχής: 40 g DHAgold™/ζώο/ημέρα), και δ) την ομάδα **ALG60** (υψηλής συμμετοχής: 60 g DHAgold™/ζώο/ημέρα). Τα σιτηρέσια των ομάδων καταρτίστηκαν έτσι ώστε να είναι ισοενεργειακά και ισοαζωτούχα. Τα ζώα διατρέφονταν ατομικά με σιτηρέσιο αποτελούμενο από 1 Kg μείγματος συμπυκνωμένων ζωοτροφών και 1 Kg σανό μηδικής (**XZ/ΣZ=50/50**).

Όσον αφορά τη χημική σύσταση και το προφίλ των λιπαρών οξέων του αίματος και του γάλακτος τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι, η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος μειώθηκε σημαντικά για τις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με αυτή της ομάδας του μάρτυρα. Στο πλάσμα του αίματος τα C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, C<sub>18:1 cis-9</sub> και C<sub>18:2n6 cis</sub> μειώθηκαν σημαντικά και τα C<sub>18:1 trans</sub>, C<sub>18:2n6 trans</sub>, C<sub>22:2</sub>, C<sub>18:1 trans-11</sub> και C<sub>22:6</sub> αυξήθηκαν (P<0,05) στις διατροφικές επεμβάσεις σε σχέση με αυτά της ομάδας του μάρτυρα. Οι αναλογίες των μεσαίας αλύσου και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά ενώ των μακράς αλύσου και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα μειώθηκαν (P<0,05) στο γάλα των αιγών των διατροφικών επεμβάσεων σε σχέση με αυτές της ομάδας του μάρτυρα. Σχετικά με την οξειδωτική κατάσταση, η FRAP αυξήθηκε (P<0,05) στο πλάσμα του αίματος για τις τρεις ομάδες σε σχέση με την ομάδα CON, ενώ μειώθηκε (P<0,05) στο γάλα για την ομάδα ALG60. Ωστόσο, η ABTS αυξήθηκε (P<0,05) για την ομάδα ALG40 σε σχέση με το μάρτυρα στο γάλα. Η

MDA αυξήθηκε ( $P < 0,05$ ) στο γάλα και το πλάσμα του αίματος στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με το μάρτυρα. Η δραστηριότητα των ενζύμων GSTs, GR, GPx, SOD αυξήθηκε ( $P < 0,05$ ) για τις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με το μάρτυρα στο πλάσμα του αίματος. Στο ανοσοποιητικό σύστημα, η σχετική έκφραση των *TLR4* και *MYD88* στα μονοκύτταρα μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες που έγινε η ενσωμάτωση των μικροφύκων σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Αντιθέτως, το μονοπάτι *TRIF/TRAF3* παρουσίασε σημαντική αύξηση στην ομάδα ALG60 σε σχέση με την ομάδα ALG40. Επιπροσθέτως, η σχετική έκφραση των *MAPK*, *IRF3* και *IFNg* μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες που ενσωματώθηκε το μικροφύκος σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Αποτέλεσμα της μείωσης των προαναφερθέντων ήταν η αποκλιμάκωση της σχετικής έκφρασης των προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, TNFa) και χημειοκινών (CCL-5 και CXCL-16). Τέλος, για τον πρώτο πειραματισμό, ο πληθυσμός των Αρχαίων στη μεγάλη κοιλία της ομάδας ALG60 αυξήθηκε σημαντικά ( $P < 0,05$ ) σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες ενώ τα ολικά μεθανοβακτήρια παρουσίασαν σημαντική μείωση ( $P < 0,05$ ) στις ομάδες ALG20 και ALG40 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Ο πληθυσμός των *R. Flavofaciens*, των *Methanobrevibacter sp.* και των *M. formicicum* μειώθηκε στις ομάδες που έγινε η προσθήκη του μικροφύκου σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Ο πληθυσμός των *B. proteoclasticus* μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG40 σε σχέση με την ομάδα ALG20 και την ομάδα του μάρτυρα. Ο πληθυσμός των *F. succinogenes* μειώθηκε στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα ενώ το *M. mobile* αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG60 σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

Εν συνεχεία, καθώς ο λόγος  $XZ/\Sigma Z$  επηρεάζει εξίσου τα ζυμωτικά φαινόμενα στη μεγάλη κοιλία και ως εκ τούτου το προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος, καθώς επίσης και η εποχιακή διαθεσιμότητα των ζωοτροφών στα συνηθέστερα παραγωγικά συστήματα δύναται να επηρεάζει τη σύσταση του σιτηρεσίου σε  $XZ/\Sigma Z$ , κρίθηκε σκόπιμη η συνέχιση των πειραματισμών με την ταυτόχρονη ενσωμάτωση των δύο βέλτιστων επιπέδων του μικροφύκου και δύο διαφορετικών λόγων  $XZ/\Sigma Z$ . Για το σκοπό του δευτέρου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 22 αίγες φυλής Alpine διασταυρωμένες με εγχώριες, ηλικίας 3<sup>ov</sup> ως 4<sup>ov</sup> ετών μέσου σωματικού βάρους 50,6 $\pm$ 6,1 Kg στο μέσο της γαλακτοπαραγωγής. Τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ισοδύναμες ομάδες (n=11) με βάση τη διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγή, το σωματικό τους βάρος και τη γαλακτική τους περίοδο: α) την

ομάδα **A** (20 g DHAgold <sup>TM</sup>/ζώο/ημέρα και ΧΖ/ΣΖ=60/40) και β) την ομάδα **B** (20 g DHAgold <sup>TM</sup>/ζώο/ημέρα και ΧΖ/ΣΖ =40/60) (Φάση Ι). Μετά το πέρας του πειραματισμού ακολούθησε άλλος ένας πειραματισμός (Φάση ΙΙ) χρησιμοποιώντας τα ίδια ζώα σε κάθε ομάδα με τις επεμβάσεις να αποτελούνται: από την ομάδα **Γ** (40 g DHAgold <sup>TM</sup>/ζώο/ημέρα και ΧΖ/ΣΖ=60/40) και την ομάδα **Δ** (40 g DHAgold <sup>TM</sup>/ζώο/ημέρα και ΧΖ/ΣΖ=40/60). Τα σιτηρέσια των ομάδων καταρτίστηκαν έτσι ώστε να είναι ισοενεργειακά και ισοαζωτούχα. Τα ζώα διατρέφονταν ομαδικά με σιτηρέσιο αποτελούμενο από μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών, σανό μηδικής και άχυρο σίτου.

Όσον αφορά τη χημική σύσταση και το προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος η λιποπεριεκτικότητα μειώθηκε σημαντικά για την ομάδα Γ και Δ σε σχέση με την ομάδα Α. Τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλύσου αυξήθηκαν στο γάλα της ομάδας Γ σε σχέση με αυτά της ομάδας Β και Δ, τα μακράς αλύσου μειώθηκαν στο γάλα της ομάδας Δ σε σχέση με αυτά των ομάδων Α και Β, ενώ τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα παρουσίασαν σημαντική αύξηση στο γάλα των ομάδων Γ και Δ σε σχέση με αυτά των Α και Β. Τέλος, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα αυξήθηκαν ( $P<0,05$ ) στο γάλα της ομάδας Δ σε σχέση με τις ομάδες Α και Β. Επιπλέον, η συγκέντρωση των  $C_{18:1 trans}$  λιπαρών οξέων αυξήθηκε ενώ αντίθετα αυτή του  $C_{18:1 cis-9}$  μειώθηκε σημαντικά ( $P<0,05$ ) στο γάλα της ομάδας Δ σε σχέση με αυτά των ομάδων Α και Β. Τέλος, η συγκέντρωση του DHA αυξήθηκε σημαντικά στο γάλα των ομάδων Γ και Δ. Σχετικά με την οξειδωτική κατάσταση, η δραστηριότητα της SOD αυξήθηκε σημαντικά στο πλάσμα των ομάδων Γ και Δ, ενώ η CAT αυξήθηκε στο πλάσμα της ομάδας Β έναντι της ομάδας Γ. Όσον αφορά τους οξειδωτικούς δείκτες του πλάσματος παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση της MDA και των PC στις ομάδες Γ και Δ έναντι των ομάδων Α και Β. Επιπρόσθετα, η δραστηριότητα της SOD μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά ( $P<0,05$ ) στο γάλα των αιγών των ομάδων Γ και Δ σε σχέση με αυτή των ομάδων Α και Β. Την ίδια εικόνα εμφάνισε και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των οξειδωτικών δεικτών (MDA και PC) αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά στο γάλα των αιγών των ομάδων Γ και Δ σε σύγκριση με αυτές των ομάδων Α και Β. Στο υγρό της μεγάλης κοιλίας παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των μεθανοβακτηρίων στις ομάδες προσθήκης των 40 g έναντι αυτών με τα 20 g. Ο πληθυσμός των *R. flavefaciens*, των *Methanobrevibacter sp.*, των *M. formicicum* και των *S. bovis* μειώθηκε σημαντικά ( $P<0,05$ ) στις ομάδες προσθήκης των 40 g. Ο

πληθυσμός των *R. albus* μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες με λόγο 40/60 ενώ το *M. formicicum* αυξήθηκε.

Συμπερασματικά, η προσθήκη 20 g του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* στο σιτηρέσιο αιγών, αύξησε σημαντικά την περιεκτικότητα του γάλακτος σε πολυάκορεστα λιπαρά οξέα και συγκεκριμένα σε CLA, DHA και DPA χωρίς να επηρεάσει τη χημική του σύσταση. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν τα πρώτα στοιχεία αποτελεσματικότητας των εν λόγω λιπαρών οξέων σε γαλακτοπαραγωγές αίγες. Επιπλέον, αυτά τα επιρρεπή στην οξείδωση PUFA δεν επηρέασαν την οξειδωτική κατάσταση είτε του αίματος είτε του γάλακτος λόγω της πιθανής διατήρησης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας οφειλόμενη στα αντιοξειδωτικά του μικροφύκου και στην απάντηση του οργανισμού μέσω των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η πλειοψηφία της σχετικής έκφρασης των προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών μειώθηκαν με πιθανό αντίκτυπο την αποτελεσματικότερη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς επίσης προέκυψαν σημαντικά στοιχεία σχετικά με τα γονιδιακά μονοπάτια που εκφράζουν τις εν λόγω πρωτεΐνες. Οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την παραγωγή μεθανίου μειώθηκαν σημαντικά χωρίς να επηρεαστούν σημαντικά τα βακτήρια που εμπλέκονται στα ζυμωτικά φαινόμενα της μεγάλης κοιλίας, καταδεικνύοντας την προσθήκη των μικροφυκών στη διατροφή των αιγών ως μια αποτελεσματική στρατηγική μείωσης του εκπεμπόμενου μεθανίου. Τέλος, η εφαρμογή της ολιστικής αλληλούχησης του μικροβιώματος της μεγάλης κοιλίας ανοίγει το δρόμο για μία νέας γενιάς μελέτη αυτού του δυναμικού οικοσυστήματος.

**Επιστημονικό πεδίο:** Ζωική Παραγωγή

**Λέξεις κλειδιά:** Αίγες, Μικροφύκη, Αίγειο γάλα, Αντιοξειδωτικό σύστημα, Ανοσοποιητικό σύστημα, Μεγάλη κοιλία



## Abstract

### **The effect of supplementation with microalgae *Schizochytrium* sp. in goats' diet, in milk and blood biochemical parameters.**

Department of Nutritional Physiology and Feeding, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos street, GR-11855, Athens, Greece [eltsiplakou@aua.gr](mailto:eltsiplakou@aua.gr)

Milk and dairy products are recognized as an importance nutrient source in human nutrition, which supplement with energy, high bioavailable proteins, vitamins and minerals. However, the high proportion of saturated fatty acid in milk fat, increase the risk of human cardiovascular diseases. On the other hand, the minority of milk fatty acid, the polyunsaturated, such us vaccenic and conjugated linoleic fatty acid, contributed to atherogenicity prevention, regulation of insulin, lipogenesis and immune system. The aforementioned evidences, challenge the scientific society more than 20 years, targeting the rumen microorganism manipulation in order to enrich ruminant milk with bio-functional molecules, beneficial for human consumption. In addition, nowadays, where the climate change strongly demonstrates its present, the rumen microbiome acquires an environmental viewpoint. Specifically, methane, which produced in rumen by specific microorganisms, emitted into the atmosphere and contributed 26-fold stronger than the carbon dioxide to greenhouse gases.

Take into account the above, the aim of the present study was the dietary enrichment of goats' milk with unsaturated fatty acid with a simultaneous immune system improvement and the mitigation of greenhouse emissions from ruminants. The achievement of the above was investigated with the inclusion of feeds, rich in PUFA and especially DHA and EPA in ruminants' diet. For the present study, the microalgae *Schizochytrium* sp. was chosen due to its high DHA (22%) and natural antioxidants content, but also due to its sustainable and efficient heterotrophic cultivation.

For the experimental purpose was design and implemented the first experiment which aim to investigate the optimum *Schizochytrium* sp. supplementation level in goats' diet on a) milk chemical composition, b) fatty acid profile in rumen, blood plasma and milk, c) several genes involved in immune system, and d) rumen microbiome.

Twenty-four crossbred dairy goats [Alpine x Local (Greek) breeds], of comparable age (3 to 4 years old), at mid lactation and body weight (BW)  $47.6 \pm 5.9$  kg, were maintained at the livestock facilities of the Agricultural University of Athens. Throughout the

experimental period each animal was fed individually according to its requirements with alfalfa hay and concentrates. The daily intake for each goat was 1 kg alfalfa hay and 1 kg concentrates with a Forage/Concentrate ratio 50/50. The concentrates of the control (*CON*) group had no microalgae while that of the treated groups supplemented daily with 20 (*ALG20*), 40 (*ALG40*) and 60 (*ALG60*) g *Schizochytrium sp.* /kg concentrates. The rations were isoenergetic and isonitrogenous since the percentage of the supplement into the concentrate and its chemical composition was such that did not significantly change the energy and protein content of the diets.

Milk fat content was decreased significantly in ALG40 and ALG60 compared with the control group. In blood plasma, the concentration of C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, C<sub>18:1 cis-9</sub> and C<sub>18:2n6 cis</sub> were decreased, while C<sub>18:1 trans</sub>, C<sub>18:2n6 trans</sub>, C<sub>22:2</sub>, C<sub>18:1 trans-11</sub> and C<sub>22:6</sub> were enhanced significantly in microalgae treated groups compared to the control groups. The medium chain and polyunsaturated fatty acid increased significantly, while the long chain and monounsaturated fatty acid were decreased in microalgae groups. In antioxidant status, the total antioxidant capacity according to FRAP was increased (P<0.05) in blood plasma in ALG20 and ALG40 while was decreased in ALG60. However, ABTS was increased in only in ALG40. MDA concentration in blood plasma was increased in ALG40 and ALG60 compared with control. The activity of antioxidant enzymes GSTs, GR, GPx, SOD was increased in ALG40 and ALG60 compared with control in blood plasma. In immune system, the relative transcript levels of *TLR4* and *MYD88* were decreased in microalgae treated groups compared to CON group. In contrast the *TRIF/TRAF3* pathway shown an increase in ALG60 compared to ALG40 group. In addition, the relative transcript levels of *MAPK*, interferon regulator factor 3 and interferon  $\gamma$  were decreased in microalgae treated groups. As a result, the majority of the determined proinflammatory cytokines (*IL-1 $\beta$* , *IL-2*, *IL-8*, *TNF $\alpha$* ) and chemokines (*CCL-5* and *CXCL-16*) relative transcript levels were decreased significantly. In conclusion for the first experiment, the relative abundance of *Archaea* in rumen was increased in ALG60 compared with the other groups while the *Methanogens* were decreased in ALG20 and ALG40 compared with the control group. The relative abundance of *R. flavefaciens*, *Methanobrevibacter sp* and *M. formicicum* were decreased (P<0.05) in microalgae treated groups compared with the control. *B. proteoclasticus* was decreased only in ALG40 group compared with ALG20 and control groups. *F. succinogenes* was decreased in ALG40 and ALG60 compared with

the control group while *M. mobile* was increased in ALG60 compared with the other groups.

Afterwards, it is well established that F/C ratio affects the rumen fermentation process and as a result the milk fatty acid profile, in addition, the feedstuff seasonal availability also affects the diet F/C ratio. For these reasons, it was considered appropriate to continue the experiments with the simultaneously supplementation with the two optimums microalgae levels and two different F/C ratios.

For this purpose, twenty-two crossbred dairy goats [Alpine x Local (Greek) breeds], of comparable age (3 to 4 years old), at mid lactation and body weight (BW)  $50,6 \pm 6,1$  kg, were divided into two homogenous subgroups (n=11) according to fat corrected milk yield and body weight in group **A** (20 g DHAgold™/goat/day and F/C =60/40) and group **B** (20 g DHAgold™/goat/day and F/C =40/60) (Phase I). After the completion of this experiment, the same animals-groups repeat the experiment (Phase II) with the groups as follow, **C** (40 g DHAgold™/goat/day and F/C =60/40) and group **D** (40 g DHAgold™/goat/day and F/C =40/60). Throughout the experimental period each animal was fed according to its requirements with alfalfa hay, wheat straw and concentrates. The rations were isoenergetic and isonitrogenous since the percentage of the supplement into the concentrate and its chemical composition was such that did not significantly change the energy and protein content of the diets.

Regarding to milk chemical composition and fatty acid profile, fat content was decreased significantly in C and D groups compared with A group. Medium chain fatty acids were increased in group C milk compared with B and D groups, long chain fatty acids were decreased in group D milk compared with A and B groups while polyunsaturated fatty acids displayed significant increased in group C and D compared with A and B groups. The unsaturated fatty acids were increased ( $P < 0.05$ ) in D milk group compared with A and C. Additionally, the concentration of  $C_{18:1 \text{ trans}}$  fatty acid was increased while  $C_{18:1 \text{ cis-9}}$  was decreased in D group milk, compared with A and B groups. Finally, DHA concentration was increased in C and D milk. Regarding the oxidative status, SOD activity was increased significantly in C and D blood plasma, while CAT increased in B group compared with C. MDA and CP concentration, were increased in C and D groups, compared with A and B groups. In addition, the SOD activity in milk was decreased significantly in C and D groups, compared with A and

B. MDA and CP following the same trend as blood, specifically, their concentrations were increased in C and D groups, compared with A and B groups

In rumen fluid microbiome, was observed a significant increase in *Methanogens* in 40 g groups (C and D) against those with 20 g (A and B). The relative abundance of *R. flavefaciens*, *Methanobrevibacter sp.*, *M. formicicum* and *S. bovis* were decreased significantly in 40 g microalgae groups (C and D). The population of *R. albus* was decrease in 40/60 groups (B and D) while *M. formicicum* was increased in those groups.

In conclusion, the supplementation with 20 g microalgae *Schizochytrium sp.* in goats' diets, increased significantly the milk PUFA proportion and mainly the CLA, DHA and DPA without any side effect in chemical composition. These results are the first data concerning DHA and DPA transfer efficiency in goats. In addition, these prone to oxidation PUFAs did not affect the oxidative stability either in blood or milk due to the potential balance between oxidants and antioxidants. The majority of proinflammatory cytokines and chemokines relative expression were decreased with a potential positive impact on the immune system. In addition, the present thesis provides important evidence concerning the genes network which regulate the immune system. The microalgae inclusion leads the rumen microorganism which contribute to methane emission to decrease, without any significant effect to those related to feedstuff fermentation in rumen. These results, nominate the microalgae supplementation in goats' diet as an effective methane mitigation strategy. Last but not least, the application of the whole bacteria, genome sequences in rumen microbiome shows a new generation in understanding this dynamic ecosystem.

**Scientific field:** Animal production

**Key words:** goats, microalgae, goat milk, antioxidant system, immune system, rumen

## Ευχαριστίες

Θεωρώ υποχρέωσή μου, αλλά και παράλληλα συναισθηματική ανάγκη, να ευχαριστήσω θερμά όλους αυτούς που βοήθησαν να πραγματοποιηθεί η παρούσα μελέτη αλλά και αυτούς που υποστήριξαν οικονομικά και ψυχικά να φτάσω εδώ.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα μου, Αν. Καθηγήτρια, κα. Ελένη Τσιπλάκου που μου έδωσε απλόχερα την ευκαιρία να μελετήσω μαζί της πλήθος ερευνών και να αποκομίσω μια σπουδαία ερευνητική εμπειρία. Η κα. Τσιπλάκου στάθηκε στο πλευρό μου σε κάθε δυσκολία, προβληματισμό, ακαδημαϊκό και μη, και απετέλεσε καθοριστικό παράγοντα για την ολοκλήρωση των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον ομότιμο Καθηγητή, κ. Γεώργιο Ζέρβα, ο οποίος απετέλεσε για εμένα έμπνευση ώστε να εξερευνήσω τον κόσμο της έρευνας. Θεωρώ δώρο το ότι υπήρξα μαθητής του.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή του εργαστηρίου, Καθηγητή, κ. Κωνσταντίνο Φεγγερό για τις πολύ εποικοδομητικές του παρατηρήσεις κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστίες εκφράζονται στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και τον Αν. Καθηγητή, κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη καθώς και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή και φίλο μου κ. Δημήτριο Σκληρό για τις συμβολές τους όσον αφορά τις μοριακές τεχνικές που εφαρμόστηκαν.

Ευχαριστίες εκφράζονται στο εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας και ιδιαίτερα στον Καθηγητή κ. Νικόλαο Λάμπρου για την απλόχερη βοήθειά του και την πολύ σημαντική συμβολή του όσον αφορά την ενζυμολογία. Ευχαριστώ θερμά την Επ. Καθηγήτρια, κα. Ευαγγελία Χρονοπούλου για την αμέριστη βοήθειά της.

Ευχαριστίες εκφράζονται στην Καθηγήτρια κα. Στυλιανή Χαδιώ-Μάντζαρη πρωτίστως για την εξέταση της παρούσας μελέτης και δευτερευόντως για τις σημαντικές της υποδείξεις καθ'όλη την προπτυχιακή και μεταπτυχιακή μου σταδιοδρομία.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια, κα. Κυριακή Σωτηρακογλου για τη σημαντική συνεισφορά της στην εκμάθηση στατιστικής επεξεργασίας και τον Επ. Καθηγητή κ. Γεώργιο Παπαδομιχελάκη για τις σημαντικές παρατηρήσεις του και την εξέταση της παρούσας μελέτης.

Επιπλέον, θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στον Επ. Καθηγητή κ. Γεώργιο Θεοδώρου για τη συνεργασία μας σχετικά με το ανοσοποιητικό σύστημα της παρούσας διατριβής αλλά και της κοινωνικής/ακαδημαϊκής σχέσης που αναπτύχθηκε και διεύρυνε τα ερευνητικά μου ενδιαφέροντα.

Όσον αφορά την ακαδημαϊκή κοινότητα, θεωρώ χρέος μου να ευχαριστήσω θερμά έναν άνθρωπο, του οποίου η βοήθεια απετέλεσε θεμέλιο λίθο για τη διεκπεραίωση της έρευνας μου, το μέλος ΕΤΕΠ κα. Μαρία Γεωργιάδου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου Νικόλαο και Αλεξάνδρα και τον αδελφό μου Κωνσταντίνο, που πάντοτε στέκονταν δίπλα μου σε κάθε απόφαση ακόμα και όταν διαφωνούσαν με αυτές.

Τέλος, ευχαριστίες εκφράζονται στους Θείους μου, Άγγελο και Άννα για τη στήριξή τους και την οικονομική συμβολή τους στην έκδοση των αντίτυπων της παρούσας διατριβής.

Στους γονείς μου  
Αλεξάνδρα και Νικόλαο...

	Περίληψη	
	Abstract	
<b>1.</b>	Εισαγωγή	1
<b>2.</b>	Μεγάλη κοιλία και βιοϋδρογόνωση λιπαρών οξέων	2
<b>2.1.</b>	Ανατομία προστομάχων	2
<b>2.2.</b>	Εισαγωγή στη μεγάλη κοιλία	2
<b>2.3.</b>	Μικροοργανισμοί στη μεγάλη κοιλία	5
<b>2.3.1.</b>	Βακτήρια στη μεγάλη κοιλία	6
<b>2.3.2.</b>	Μεθανοβακτήρια	8
<b>2.3.3.</b>	Πρωτόζωα	9
<b>2.3.4.</b>	Μύκητες στη μεγάλη κοιλία	11
<b>2.3.5.</b>	Βακτηριοφάγοι στη μεγάλη κοιλία	12
<b>2.4.</b>	Μεταβολισμός θρεπτικών συστατικών στη μεγάλη κοιλία	12
<b>2.4.1.</b>	Μεταβολισμός υδατανθράκων	13
<b>2.4.2.</b>	Μεταβολισμός αζωτούχων ουσιών	15
<b>2.4.3.</b>	Μεταβολισμός λιπών	17
<b>2.5.</b>	Βιοϋδρογόνωση	19
<b>3.</b>	Επίδραση της συμπλήρωσης της διατροφής των μηρυκαστικών με PUFA	25
<b>3.1.</b>	Επίδραση των PUFA στη χημική σύσταση και το προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος	26
<b>3.2.</b>	Επίδραση των PUFA στο προφίλ των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας	36
<b>3.3.</b>	Επίδραση των PUFA στην οξειδωτική κατάσταση του ζώου και του γάλακτος	43
<b>3.4.</b>	Επίδραση των PUFA στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος	53
<b>4.</b>	Υλικά και μέθοδοι	60
<b>4.1.</b>	Σκοπός του πρώτου πειράματος	60
<b>4.1.1.</b>	Πειραματικό σχέδιο	61
<b>4.1.2.</b>	Δειγματοληψίες πρώτου πειράματος	65
<b>4.2.</b>	Αναλύσεις ζωοτροφών	68
<b>4.2.1.</b>	Προσδιορισμός ξηράς ουσίας	68
<b>4.2.2.</b>	Προσδιορισμός τέφρας	68
<b>4.2.3.</b>	Προσδιορισμός αζωτούχων ουσιών	69
<b>4.2.4.</b>	Προσδιορισμός λιπαρών ουσιών	70
<b>4.2.5.</b>	Προσδιορισμός ινωδών ουσιών	71
<b>4.2.6.</b>	Προσδιορισμός λιπαρών οξέων ζωοτροφών	71
<b>4.2.7.</b>	Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του DHAgold™	71
<b>4.3.</b>	Αναλύσεις λιπαρών οξέων	72
<b>4.3.1.</b>	Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας	72
<b>4.3.2.</b>	Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο πλάσμα του αίματος	72
<b>4.3.3.</b>	Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο γάλα	73
<b>4.3.4.</b>	Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στον αέριο χρωματογράφο και επεξεργασία αποτελεσμάτων	73
<b>4.4.</b>	Αναλύσεις χημικής σύστασης γάλακτος	74
<b>4.4.1.</b>	Ο προσδιορισμός της σύστασης του γάλακτος	74
<b>4.5.</b>	Αναλύσεις αντιοξειδωτικού συστήματος	75



4.5.1.	Αντιοξειδωτικά ένζυμα	75
4.5.2.	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα	80
4.5.3.	Οξειδωτικοί δείκτες	82
4.5.4.	NADPH οξειδάση	82
4.6.	Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα	83
4.7.	Γονιδιωματική ανάλυση των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας	92
4.7.1.	Γονιδιωματική ανάλυση των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας με Real-Time PCR	94
4.7.2.	Μεταγονιδιωματική ανάλυση των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας με τη χρήση αλληλούχισης νέας γενιάς και την τεχνολογία Ion Torrent	99
4.8.	Στατιστική ανάλυση	101
5.	Αποτελέσματα 1 <sup>ου</sup> πειράματος	103
5.1.	Σωματικό βάρος αιγών	103
5.2.	Κατανάλωση τροφής	103
5.3.	Ημερήσια παραγωγή γάλακτος και χημική σύσταση	105
5.4.	Προφίλ λιπαρών οξέων	107
5.4.1.	Προφίλ λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας	107
5.4.2.	Προφίλ λιπαρών οξέων πλάσματος αίματος	111
5.4.3.	Προφίλ λιπαρών οξέων γάλακτος	115
5.5.	Αντιοξειδωτικό σύστημα	126
5.5.1.	Αντιοξειδωτικό σύστημα αίματος	126
5.5.2.	Αντιοξειδωτικό σύστημα γάλακτος	133
5.6.	Ανοσοποιητικό σύστημα	138
5.7.	Μικροοργανισμοί στη μεγάλη κοιλία	155
6.	Σχολιασμός αποτελεσμάτων 1 <sup>ου</sup> πειράματος	166
6.1.	Σωματικό βάρος αιγών	166
6.2.	Κατανάλωση τροφής	166
6.3.	Ημερήσια παραγωγή γάλακτος και χημική σύσταση	166
6.4.	Προφίλ λιπαρών οξέων	170
6.4.1.	Προφίλ λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας	170
6.4.2.	Προφίλ λιπαρών οξέων πλάσματος αίματος	171
6.4.3.	Προφίλ λιπαρών οξέων γάλακτος	173
6.5.	Αντιοξειδωτικό σύστημα	176
6.5.1.	Αντιοξειδωτικό σύστημα αίματος	176
6.5.2.	Αντιοξειδωτικό σύστημα γάλακτος	180
6.6.	Ανοσοποιητικό σύστημα	182
6.7.	Μικροοργανισμοί στη μεγάλη κοιλία	190
7.	Πειραματικό σχέδιο 2 <sup>ου</sup> πειράματος	196
7.1.	Σκοπός του πειράματος	196
7.2.	Πειραματικό σχέδιο	197
7.2.1.	Δειγματοληψίες δευτέρου πειράματος	199
8.	Αποτελέσματα	200
8.1.	Σωματικό βάρος αιγών	200
8.2.	Κατανάλωση τροφής	200
8.3.	Ημερήσια παραγωγή γάλακτος και χημική σύσταση	203
8.4.	Προφίλ λιπαρών οξέων	208
8.4.1.	Προφίλ λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας	208

<b>8.4.2.</b>	Προφίλ λιπαρών οξέων πλάσματος αίματος	215
<b>8.4.3.</b>	Προφίλ λιπαρών οξέων γάλακτος	222
<b>8.5.</b>	Αντιοξειδωτικό σύστημα	238
<b>8.5.1.</b>	Αντιοξειδωτικό σύστημα αίματος	238
<b>8.5.2.</b>	Αντιοξειδωτικό σύστημα γάλακτος	242
<b>8.6.</b>	Μικροοργανισμοί στη μεγάλη κοιλία	246
<b>9.</b>	Σχολιασμός αποτελεσμάτων 2 <sup>ου</sup> πειράματος	270
<b>9.1.</b>	Κατανάλωση τροφής	270
<b>9.2.</b>	Ημερήσια παραγωγή γάλακτος και χημική σύσταση	270
<b>9.3.</b>	Προφίλ λιπαρών οξέων	271
<b>9.3.1.</b>	Προφίλ λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας	271
<b>9.3.2.</b>	Προφίλ λιπαρών οξέων πλάσματος αίματος	273
<b>9.3.3.</b>	Προφίλ λιπαρών οξέων γάλακτος	274
<b>9.4.</b>	Αντιοξειδωτικό σύστημα	278
<b>9.4.1.</b>	Αντιοξειδωτικό σύστημα αίματος	278
<b>9.4.2.</b>	Αντιοξειδωτικό σύστημα γάλακτος	279
<b>9.5.</b>	Μικροοργανισμοί στη μεγάλη κοιλία	280
<b>10.</b>	Γενικός σχολιασμός	284
<b>11.</b>	Συμπεράσματα	288
<b>12.</b>	Προοπτικές	290
<b>13.</b>	Βιβλιογραφία	291
<b>14.</b>	Παράρτημα	311

## Συντομογραφίες

4-HNE=4-υδροξυνονέναλ

ABTS= 2,2'-azino-di (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid

ADF=Acid Detergent Fiber (NDF – ημικυτταρίνες)

AI= Atherogenicity index, Αθηρωματικός δείκτης

ATP= Τριφωσφορική αδενοσίνη

BSCFA= Διακλαδισμένης αλύσου καρβοξυλικά οξέα

CAT= Catalase, καταλάση

CDS= Κωδικοποιητική αλληλουχία

CHUK = Κινάσες-αναστολείς του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, η υπομονάδα-α (IKK-α) γνωστοί και ως διατηρημένη ουβικινόνη κινάση έλικα-βρόχου-έλικα

CLA = Συζευγμένο λινελαϊκό οξύ

COXs= Cyclooxygenases, κυκλοξυγενάσες

CP= Carbonyls Protein, πρωτεϊνικά καρβονύλια

CYPs= Cytochrome, κυτόχρωμα P450

CXCL-5= C-X-C χημοκίνη 5

CXCL-16= C-X-C χημοκίνη 16

DHA= Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ

DPA= Εικοσιδιπεντανοϊκό οξύ

DPPH= Diphenylpicrylhydrazyl

EPA= Εικοσιπεντανοϊκό οξύ

Fe<sup>2+</sup>=Ανιόντα δισθενή σιδήρου

Fe<sup>3+</sup>= Ανιόντα τρισθενή σιδήρου

FRAP= Ferric Reducing Antioxidant Power

GAPDH= Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης

GP-x= Glutathione Peroxidase, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης,

GSH= Glutathione, γλουταθειόνη (ανηγμένη μορφή)

GSSG= Glutathione oxidized, γλουταθειόνη (οξειδωμένη μορφή)

GST= Glutathione transferase, μεταφοράση της γλουταθειόνης

GR= Glutathione Reductase, αναγωγή της γλουταθειόνης

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= Υπεροξείδιο του υδρογόνου

HETE =Εικοσατετρανοϊκά οξέα

HHE=4- υδροξυ-εξέναλ

HPETE= Υπεροξυ εικοσατετρανοϊκά οξέα  
HPI= Health Promoting Index, Δείκτης υγείας  
HPRT= Υποξανθίνη-γουανίνη φωσφοριβομεταφοράση  
IRF3= Ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης 3  
IRF5= Ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης 5  
INFγ= Ιντερφερόνη γ  
IL-1β= Ιντερλευκίνη-1 β  
IL-2= Ιντερλευκίνη-2  
IL-6= Ιντερλευκίνη-6  
IL-8= Ιντερλευκίνη-8  
IL-10= Ιντερλευκίνη-10  
iNOS= Συνθετάση του νιτρικού οξέος  
JUND= Μεταγραφικός παράγοντας JunD  
MAPK1=MAP κινάσες 1  
MYD88= Διαφοροποιητής της πρώτης απάντησης των μυελοειδών 88  
LA= Linoleic Acid, λινελαϊκό οξύ  
LCFA= Long Chain Fatty Acid, μακράς αλύσου λιπαρά οξέα  
LNA= Linolenic Acid, λινολενικό οξύ  
LT =Λευκοτριένια  
LPS =Λιποπολυσακχαριτών  
LOOH=Λιπιδικές ρίζες υπεροξειδίου  
LOXs= Λιποξυγενάσες  
MCFA= Medium Chain Fatty Acid, μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα  
MDA= Μηλονική αλδεΐδη  
MFD= Milk fat depression, σύνδρομο μείωσης της λιποπεριεκτικότητας  
MUFA= Monounsaturated Fatty Acid, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα  
NADPH= Φωσφορική δινουκλεοτιδική νικοτιναμυδική αδενίνη (ανηγμένη μορφή),  
NADP+= Φωσφορική δινουκλεοτιδική νικοτιναμυδική αδενίνη (οξειδωμένη μορφή),  
NDF= Neutral Detergent Fiber (ημικυτταρίνες + κυτταρίνη + λιγνίνη + κουτίνη + πυριτικά άλατα + πρωτεΐνες κυτ. Τοιχωμάτων)  
NGS=Next Generation Sequencing, Αλληλούχιση νέας γενιάς  
NFκB= Μεταγραφικός πυρηνικός παράγοντας κάππα-B  
NOX= NADPH οξειδάση  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>= Ανιόν του υπεροξειδίου

OA= Oleic Acid, ελαϊκό οξύ  
OBCFA= Μονής και διακλαδισμένης αλύσου λιπαρά οξέα  
OCFA= Μονής αλύσου λιπαρά οξέα  
OH= Ρίζες υδροξυλίου  
PA= Palmitic Acid, παλμιτικό οξύ  
PG =Prostaglandins, προσταγλανδίνες  
PUFA= Polyunsaturated Fatty Acid, πολυάκορεστα λιπαρά οξέα  
ROOR= Οργανικά υπεροξειδία,  
ROH=Αλκοόλες,  
ROS= Δραστικές ρίζες οξυγόνου  
SCFA= Short Chain Fatty Acid, μικρής αλύσου λιπαρά οξέα  
SFA= Saturated Fatty Acid, κορεσμένα λιπαρά οξέα  
SEM: Standard Error of Mean, Τυπικό σφάλμα των μέσων  
STAT3= Ο μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3  
SOD= Superoxide Dismutase, δεσμουτάση του υπεροξειδίου  
TANK= Ο TRAF ενεργοποιητής του μεταγραφικού παράγοντα NFκB  
TI= Thrombotic Index, Δείκτης θρόμβωσης  
TLR4= Υποδοχείς τύπου Toll 4  
TNFa= Παράγοντας νέκρωσης όγκων-α  
TRAF3= TNF υποδοχείς 3  
TRIF = Τομέας TIR επαγωγής της ιντερφερόνης β  
USFA= Unsaturated Fatty Acid, ακόρεστα λιπαρά οξέα  
VA= Vaccenic Acid, βασσενικό οξύ  
YWHAZ= η πρωτεΐνη ενεργοποίησης της μονοξυγενάσης 3 της τυροσίνης/μονοξυγενάση 5 της τρυπτοφάνης, το ζήτα πολυπεπίδιο  
I.O.= Ινώδεις ουσίες  
Λ.Ο. = Λιπαρές ουσίες  
ΞΟ= Ξηρά ουσία  
Ο.Α.Ο. = Ολικές αζωτούχες ουσίες  
ΣΖ= Συμπυκνωμένες ζωοτροφές  
ΧΖ= Χονδροειδής ζωοτροφές

## Κατάλογος σχημάτων

### Κεφάλαιο 2.

Σχήμα 2.1. Ταξινόμηση βακτηρίων μεγάλης κοιλίας ως προς τη μορφολογία τους και τη σχέση τους με το οξυγόνο (Nagaraja, 2016).

Σχήμα 2.2. *In vitro* επώαση βακτηρίων υγρού μεγάλης κοιλίας σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Σχήμα 2.3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά Α) ολοτριχίων (holotrichs) και Β) ενδοδηνιομορφιδίων (entodiniomorphid) (Nagaraja, 2016).

Σχήμα 2.4. Με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά οι μύκητες ταξινομούνται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες, τους ζυμομύκητες και τους μυκηλιακούς.

Σχήμα 2.5. Μεταβολισμός των υδατανθράκων στα μηρυκαστικά ζώα (Nagaraja, 2016).

Σχήμα 2.6. Η τύχη του πυροσταφυλικού στα μηρυκαστικά ζώα (Nagaraja, 2016).

Σχήμα 2.7.. Μεταβολισμός αζωτούχων ουσιών στα μηρυκαστικά (Nagaraja, 2016).

Σχήμα 2.8. Μεταβολισμός λιπών στη μεγάλη κοιλία (Nagaraja, 2016).

Σχήμα 2.9. Λιπόλυση των λιπιδίων της τροφής και βιοϋδρογόνωση των ελεύθερων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Buccioni *et al.*, 2012).

Σχήμα 2.10. Βιοϋδρογόνωση του λινελαϊκού οξέος (Buccioni *et al.*, 2012).

Σχήμα 2.11. Βιοϋδρογόνωση των ισομερών του λινολενικού οξέος (Buccioni *et al.*, 2012).

Σχήμα 2.12. Βιοϋδρογόνωση του λινολενικού οξέος και παραγωγή trans-10 C18:1 (Buccioni *et al.*, 2012).

Σχήμα 2.13. Βιοϋδρογόνωση του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος (Chilliard *et al.*, 2007).

### Κεφάλαιο 3.

Σχήμα 3.1. Απεικόνιση της ισορροπίας αντιοξειδωτικών και οξειδωτικών (Frank, 2003)

Σχήμα 3.2. Απεικόνιση της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας αποτελούμενη από το σύμπλοκο I: NADH αφυδρογονάση, σύμπλοκο II: αφυδρογονάση του ηλεκτρικού, σύμπλοκο III: ουβικινόνη-κυτοχρωμική οξειδωαναγωγή, σύμπλοκο IV: κυτοχρωμική οξειδάση και το σύμπλοκο V: ATP συνθετάση. Τροποποιημένη από Bellance *et al.*, (2009).

Σχήμα 3.3. Σχηματική απεικόνιση του συμπλέγματος του ενζύμου NADPH οξειδάσης: αριστερά η μη ενεργοποιημένη κατάσταση, δεξιά το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα προς παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου (McCann & Roulston, 2013).

Σχήμα 3.4. Απλουστευμένη ολιστική αναπαράσταση του αντιοξειδωτικού συστήματος (Garrel *et al.*, 2010).

Σχήμα 3.5. Μεταβολισμός αραχιδονικού οξέος από τη δράση των κυκλοοξυγενασών και λιποοξυγενασών σε παράγωγα προφλεγμονωδών χημικών αγγελιοφόρων (Calder 2001).

## Κεφάλαιο 4.

Σχήμα 4.1. Γραφική αναπαράσταση της μεθόδου Kjeldahl (1883).

## Κεφάλαιο 5.

Σχήμα 5.1. Διαχωριστική απεικόνιση των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60).

Σχήμα 5.2. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60).

Σχήμα 5.3. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με Α) το σύνολο των λιπαρών οξέων του αίματος και Β) τα μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης.

Σχήμα 5.4. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης των δειγμάτων γάλακτος της ομάδας του μάρτυρα (CON).

Σχήμα 5.5. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης στα δείγματα γάλακτος των αιγών και των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* (ALG20, ALG40 και ALG60).

Σχήμα 5.6. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες του πλάσματος του αίματος.

Σχήμα 5.7. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων πλάσματος αίματος όλων των διατροφικών επεμβάσεων.

Σχήμα 5.8. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων πλάσματος αίματος στην ομάδα του μάρτυρα.

Σχήμα 5.9. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων πλάσματος αίματος των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*

Σχήμα 5.10. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες του γάλακτος.

Σχήμα 5.11. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων του γάλακτος του μάρτυρα.

Σχήμα 5.12. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων γάλακτος των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*

Σχήμα 5.13. Σχετική τρανσκριπτομική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα των αιγών.

Σχήμα 5.14. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τη σχετική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα.

Σχήμα 5.15. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα της ομάδας του μάρτυρα.

Σχήμα 5.16. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*

Σχήμα 5.17. Σχετική τρανσκριπτομική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα κύτταρα των αιγών

Σχήμα 5.18. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τη σχετική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα κύτταρα.

Σχήμα 5.19. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα της ομάδας του μάρτυρα.

Σχήμα 5.20. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*

Σχήμα 5.21. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τη σχετική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων σε μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα κύτταρα.

Σχήμα 5.22. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα αίματος της ομάδας του μάρτυρα.

Σχήμα 5.23. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για την σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα αίματος των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*

Σχήμα 5.24. Συσχέτιση κατά Pearson της ποσότητας DNA ως template με τον κύκλο φθορισμού του δείγματος.

Σχήμα 5.25. Συσχέτιση κατά Pearson της ποσότητας DNA ως template με τη σχετική αφθονία του δείγματος.

Σχήμα 5.26. Σχετική ποσότητα επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό μεγάλης κοιλίας των ομάδων CON, ALG20, ALG40 και ALG60.

Σχήμα 5.27. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τη σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας.

Σχήμα 5.28. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60)



## **Κεφάλαιο 6.**

Σχήμα 6.1. Σχέσεις γονιδίων ανοσοποιητικού συστήματος για τη μεταγραφή των mRNA των προφλεγμονωδών πρωτεϊνών.

Εικόνα 6.2. Απεικόνιση Α) αποικοδόμησης IκB και για την ενεργοποίηση και μεταγωγή του σήματος του NFκB εντός του πυρήνα και Β) αναστολή της κινάσης IKKα από το CHUK.

Εικόνα 6.3. Αναστολή του προφλεγμονώδους σήματος από τους TLR4 από το μονοπάτι STAT3/IL-10 (Hutchins *et al.*, 2013).

## **Κεφάλαιο 7.**

Σχήμα 7.1. Γραφική αναπαράσταση πειραματικού σχεδιασμού δευτέρου πειράματος.

## **Κεφάλαιο 8.**

Σχήμα 8.1. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Α, Β, Γ και Δ) σύμφωνα με τη γαλακτοπαραγωγή, τη διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα και ενέργεια γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος.

Σχήμα 8.2. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών σύμφωνα με τη γαλακτοπαραγωγή, τη διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα και ενέργεια γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος.

Σχήμα 8.3. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Α, Β, Γ και Δ) σύμφωνα λιπαρά οξέα του υγρού της μεγάλης κοιλίας.

Σχήμα 8.4. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας.

Σχήμα 8.5. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Α, Β, Γ και Δ) σύμφωνα λιπαρά οξέα του πλάσματος του αίματος.

Σχήμα 8.6. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών των λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος.

Σχήμα 8.7. Απεικόνιση κατά Pearson των σημαντικότερων συσχετίσεων των λιπαρών οξέων του γάλακτος.

Σχήμα 8.8. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Α, Β, Γ και Δ) σύμφωνα με τα μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης.

Σχήμα 8.9. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης των δειγμάτων γάλακτος.

Σχήμα 8.10. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Α, Β, Γ και Δ) σύμφωνα με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες του αίματος.

Σχήμα 8.11. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων πλάσματος αίματος όλων των διατροφικών επεμβάσεων.

Σχήμα 8.12. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες του γάλακτος.

Σχήμα 8.13. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων του γάλακτος των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων.

Σχήμα 8.14. Μεταγονιδιωματική ανάλυση των συνονθυλευμάτων του γενομικού DNA του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (% των χαρτογραφημένων διαβασμάτων) και των μη χαρτογραφημένων αλληλουχιών.

Σχήμα 8.15. Σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας. Σύγκριση μεταξύ των δυο επίπεδων ενσωμάτωσης του μικροφύκου και μεταξύ των δυο λόγων χονδροειδών προς συμπυκνωμένες ζωοτροφές.

Σχήμα 8.16. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (A, B, Γ και Δ) σύμφωνα με το προφίλ των μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας.

Σχήμα 8.17. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (A, B, Γ και Δ) σύμφωνα με το προφίλ των μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας.

## **Κατάλογος πινάκων**

### **Κεφάλαιο 2.**

Πίνακας 2.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της μεγάλης κοιλίας-κεκρύφαλου βόσκοντων προβάτων και βοοειδών (Clarke, 1977)

Πίνακας 2.2. Η σχέση συμβίωσης μικροοργανισμών και μηρυκαστικού

Πίνακας 2.3. Μικροοργανισμοί μεγάλης κοιλίας

Πίνακας 2.4. Υποστρώματα και προϊόντα μεθανοβακτηρίων

### **Κεφάλαιο 3.**

Πίνακας 3.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο προφίλ των λιπαρών οξέων και στη χημική σύσταση του γάλακτος μηρυκαστικών

Πίνακας 3.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο προφίλ των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας

Πίνακας 3.3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην οξειδωτική κατάσταση των μηρυκαστικών

Πίνακας 3.4. Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο ανοσοποιητικό σύστημα

### **Κεφάλαιο 4.**

Πίνακας 4.1. Χημική σύσταση (g/Kg) και προφίλ λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) των ζοοτροφών.

Πίνακας 4.2. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε βιταμίνες.

Πίνακας 4.3. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε αμινοξέα.

Πίνακας 4.4. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε μακροστοιχεία.

Πίνακας 4.5. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε καροτινοειδή και χλωροφύλλες.

Πίνακας 4.6. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε σάκχαρα.

Πίνακας 4.7. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε στερόλες.

Πίνακας 8. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και φαινολικό περιεχόμενο *Schizochytrium sp.*

Πίνακας 4.9. Αλληλουχίες, μέγεθος προϊόντων και θερμοκρασία πρόσθεσης εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη πραγματικού χρόνου qPCR.

Πίνακας 4.10. Αλληλουχίες εκκινητών και μέγεθος απλικονίων για τη πραγματικού χρόνου qPCR.

## **Κεφάλαιο 5.**

Πίνακας 5.1. Εξέλιξη σωματικού βάρους αιγών

Πίνακας 5.2. Ημερήσια κατανάλωση τροφών, θρεπτικών συστατικών και λιπαρών οξέων (g/ζώο).

Πίνακας 5.3. Μέση ημερήσια γαλακτοπαραγωγή (g/ημέρα) και χημική σύσταση (%) του γάλακτος αιγών, οι οποίες διατράφηκαν με τα τέσσερα σιτηρέσια καθ'όλη την πειραματική περίοδο.

Πίνακας 5.4. Μέσοι όροι των ατομικών λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των αιγών που διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σε τρεις χρόνους δειγματοληψίας (20, 40, 60 ημέρες).

Πίνακας 5.5. Μέσοι όροι των ατομικών λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) στο πλάσμα αίματος των αιγών που διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σε τρεις χρόνους δειγματοληψίας (20, 40, 60 ημέρες).

Πίνακας 5.6. Η μέση συγκέντρωση των μεμονωμένων λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων), των ομαδοποιημένων τιμών, του λόγου κορεσμένων/ακόρεστα λιπαρά οξέα (SFA/UFA), των ω6/ω3, του αθηρωματικού και του θρομβωτικού δείκτη καθώς και των δεικτών της ενεργότητας της Δ-9 αφυδρογονάσης του γάλακτος των αιγών που κατανάλωναν τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) στις τρεις χρονικές δειγματοληψίες (20, 40 και 60 ημέρα).

Πίνακας 5.7. Συσχέτιση κατά Pearson μεταξύ του στεατικού οξέος και των ισομέρων μονοακόρεστων και πολυακόρεστων και της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος.

Πίνακας 8. Ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), ολική αντιοξειδωτική κατάσταση και οξειδωτικοί δείκτες στο πλάσμα του αίματος των αιγών που

διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σε τρεις δειγματοληψίες.

Πίνακας 5.9. Ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), ολική αντιοξειδωτική κατάσταση και οξειδωτικοί δείκτες στο πλάσμα του αίματος των αιγών που διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σε τρεις δειγματοληψίες.

Πίνακας 5.10. Συσχέτιση κατά Pearson της σχετικής έκφραση επιλεγμένων γονιδίων σε μονοκύτταρα αιγών.

Πίνακας 5.11. Συσχέτιση κατά Pearson της σχετικής έκφραση επιλεγμένων γονιδίων σε ουδετερόφιλα κύτταρα αιγών.

Πίνακας 5.12. Συσχέτιση κατά Pearson της ποσότητας DNA ως template με τον κύκλο φθορισμού και τη σχετική αφθονία του δείγματος.

Πίνακας 5.13. Σχετική ποσότητα επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό μεγάλης κοιλίας των ομάδων CON, ALG20, ALG40 και ALG60.

Πίνακας 5.14. Συσχέτιση κατά Pearson της συγκέντρωσης των ισομερών των C18:1 και του στεατικού οξέος με το πληθυσμό των *Butyrivibrio fibrisolvens* και *proteoclasticus*.

## **Κεφάλαιο 7.**

Πίνακας 7.1. Κατανάλωση τροφής δευτέρου πειραματισμού (ανά ομάδα)

Πίνακας 7.2. Χημική σύσταση (g/Kg, της ζωοτροφής) και προφίλ λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) των ζωοτροφών.

## **Κεφάλαιο 8.**

Πίνακας 8.1. Εξέλιξη σωματικού βάρους αιγών πρώτου πειραματισμού (20g μικροφύκους/ζώο/ημέρα σε δυο λογούς XZ/ΣZ)

Πίνακας 8.2. Εξέλιξη σωματικού βάρους αιγών δεύτερου πειραματισμού (40g μικροφύκους/ζώο/ημέρα σε δυο λογούς XZ/ΣZ)

Πίνακας 8.3. Μέση ημερήσια κατανάλωση σιτηρεσίου και των επιμέρους ζωοτροφών, λόγος χονδροειδών προς συμπυκνωμένες ζωοτροφές και ημερήσια πρόσληψη του προϊόντος *DHAgold* πρώτου πειραματισμού (20g μικροφύκους/ζώο/ημέρα σε δυο λογούς XZ/ΣZ)

Πίνακας 8.4. Μέση ημερήσια κατανάλωση σιτηρεσίου και των επιμέρους ζωοτροφών, λόγος χονδροειδών προς συμπυκνωμένες ζωοτροφές και ημερήσια πρόσληψη του προϊόντος *DHAgold* δεύτερου πειραματισμού (40g μικροφύκους/ζώο/ημέρα σε δυο λογούς XZ/ΣZ)

Πίνακας 8.5. Μέση γαλακτοπαραγωγή, διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγή, διορθωμένη ως προς την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή και χημική σύσταση γάλακτος αιγών πρώτου πειραματισμού (20g μικροφύκους/ζώο/ημέρα σε δυο λογούς XZ/ΣZ)

Πίνακας 8.6. Μέση γαλακτοπαραγωγή, διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγή, διορθωμένη ως προς την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή και χημική

σύσταση γάλακτος αιγών δευτέρου πειραματισμού (40g μικροφύκους/ζώο/ημέρα σε δυο λογούς XZ/ΣZ)

Πίνακας 8.7. Προφίλ λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης πολλών παραγόντων.

Πίνακας 8.8. Προφίλ λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

Πίνακας 8.9. Προφίλ λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης πολλών παραγόντων.

Πίνακας 8.10. Προφίλ λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

Πίνακας 8.11. Προφίλ μεμονωμένων λιπαρών οξέων, ομαδοποιημένων τιμών, του λόγου κορεσμένα/ακόρεστα λιπαρά οξέα, του αθηρωματικού δείκτη καθώς και των δεικτών της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης του γάλακτος των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης πολλών παραγόντων.

Πίνακας 8.12. Προφίλ μεμονωμένων λιπαρών οξέων, ομαδοποιημένων τιμών, του λόγου κορεσμένα/ακόρεστα λιπαρά οξέα, του αθηρωματικού δείκτη καθώς και των δεικτών της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης του γάλακτος των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

Πίνακας 8.13. Συσχέτιση κατά Pearson των λιπαρών οξέων του γάλακτος και της ημερήσιας παραγωγής λίπους στο γάλα.

Πίνακας 8.14. Ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), ολική αντιοξειδωτική κατάσταση και οξειδωτικοί δείκτες στο πλάσμα του αίματος των αιγών που διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (A, B, Γ και Δ) σε δυο δειγματοληψίες.

Πίνακας 8.15. Ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), ολική αντιοξειδωτική κατάσταση και οξειδωτικοί δείκτες στο πλάσμα του αίματος των αιγών που διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (A, B, Γ και Δ) σε δυο δειγματοληψίες.

Πίνακας 8.16. Μεταγονιδιωματική ανάλυση των συνονθυλευμάτων του γενωμικού DNA του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (% των χαρτογραφημένων διαβασμάτων).

Πίνακας 8.17. Άλφα ποικιλομορφία (alpha diversity) της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης των τεσσάρων ομάδων κατά Chao1, Simpson και Shannon.

Πίνακας 8.18. Σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης πολλών παραγόντων.

Πίνακας 8.19. Σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

## Κατάλογος εικόνων

### Κεφάλαιο 4.

- Εικόνα 4.1. Διήθηση υγρού μεγάλης κοιλίας με ύφασμα τύπου γάζας
- Εικόνα 4.2. Συλλογή στερεού υπολείμματος περιεχομένου μεγάλης κοιλίας
- Εικόνα 4.3. Τοποθέτηση δειγμάτων σε υγρό άζωτο
- Εικόνα 4.4. Χρωματογράφημα λιπαρών οξέων γάλακτος αέριου χρωματογράφου.
- Εικόνα 4.5. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με χρήση πήγματος πολυακρυλαμιδίου.
- Εικόνα 4.6. Τοποθέτηση διαλύματος αίματος στο Histopaque 1077
- Εικόνα 4.7. Διαχωρισμός κυττάρων μετά τη φυγοκέντριση
- Εικόνα 4.8. Διαχωρισμός νουκλεϊκών οξέων και κατακρήμνιση RNA
- Εικόνα 4.9. Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση απομονωμένου RNA
- Εικόνα 4.10. Πήκτωμα αγαρόζης 0,7 % για την διερεύνηση εναπομένου γενομικού DNA μετά την επώαση της DNase (από αριστερά: Ladder low, θετικός μάρτυρας, δείγματα μετά τη DNase)
- Εικόνα 4.11. Πρότυπη καμπύλη διαδοχικών αραιώσεων του cDNA
- Εικόνα 4.12. Σχετική έκφραση γονιδίων στόχων σε rt-PCR
- Εικόνα 4.13. Καμπύλη θερμοκρασίας αποδιάταξης των απλικονίων
- Εικόνα 4.14. Ομογενοποίηση υγρού μεγάλης κοιλίας με χρήση υγρού αζώτου
- Εικόνα 4.15. Κατακρήμνιση DNA σε διάλυμα ισοπροπανόλης
- Εικόνα 4.16. Γραφική αναπαράσταση στηλών επιτάχυνσης
- Εικόνα 4.17. Ενδεικτική φωτογραφία αποτελεσμάτων φωτόμετρου nanodrop δειγμάτων για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων μετά την απομόνωση.
- Εικόνα 4.18. Ενδεικτική φωτογραφία του πήγματος αγαρόζης δειγμάτων για τον ποιοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων μετά την απομόνωση.
- Εικόνα 4.19. Ζεύγη εκκινητών και θέση πρόσδεσης σε υπερμεταβλητές περιοχές της αλληλουχίας του 16S rRNA
- Εικόνα 4.20. Μικρό-chip PGM της Ion torrent και ψηφιακή αναπαράσταση των κελιών αντίδρασης.
- Εικόνα 4.21. Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων που συμβαίνουν κατά την επιμήκυνση. Ο ανιχνευτής ανιχνεύει το πρωτόνιο που απομακρύνεται από το υδροξύλιο του 3' άκρου του νουκλεοτιδίου της συντιθέμενης αλυσίδας, εφόσον το μονονουκλεοτίδιο που εκείνη τη στιγμή πλημυρίζει το σύστημα είναι το συμπληρωματικό.
- Εικόνα 4.22. Γραφική αναπαράσταση των κύριων βημάτων μεταγονιδιωματική με τη χρήση PGM της Ion torrent.

### Κεφάλαιο 5.

- Εικόνα 5.1. Ανίχνευση της NADPH οξειδάσης σε δείγματα συνονθυλεύματος αίματος αιγών, αντιπροσωπευτικά για τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON, ALG20, ALG40, ALG60).

Εικόνα 5.2. Συνοπτική ενζυμική αντιοξειδωτική απεικόνιση του πλάσματος του αίματος για τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) καθ'όλη την πειραματική περίοδο.

## 1. Εισαγωγή

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών στη διατροφή του ανθρώπου αφού παρέχουν ενέργεια, υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεΐνες, απαραίτητα ιχνοστοιχεία και βιταμίνες (Dagnaw *et al.*, 2016). Ωστόσο, η υψηλή συμμετοχή των κορεσμένων λιπαρών οξέων στο λίπος του γάλακτος συσχετίζεται θετικά με την εκδήλωση σύγχρονων ασθενειών του ανθρώπου-καταναλωτή όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Στον αντίποδα, τα ακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των γαλακτοκομικών προϊόντων όπως το βασσενικό και το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ φαίνεται να έχουν θετική επίδραση στην υγεία του καταναλωτή αφού συμβάλλουν στην πρόληψη δημιουργίας αθηρωματικών πλακών και στη ρύθμιση της ομοιοστασίας της ινσουλίνης, της λιπογένεσης και του ανοσοποιητικού συστήματος (Albert *et al.* 1998; Simopoulos 1998; McCrorie *et al.*, 2011). Εντούτοις, πάρα το γεγονός ότι οι τροφές των μηρυκαστικών είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα κτηνοτροφικά προϊόντα (πχ γάλα) δεν είναι τόσο πλούσια σε αυτά λόγω των μικροοργανισμών που αποικούν στη μεγάλη κοιλία τους (Chilliard *et al.* 2007). Χωρίς να αποκλείονται άλλες ιδιότητές τους, τα είδη των μικροοργανισμών αυτών αποδομούν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σε κορεσμένα τα οποία απορροφώνται και μεταφέρονται στο αίμα και κατ'έπείταση στο γάλα. Τα ζυμωτικά φαινόμενα της μεγάλης κοιλίας, αποτελούν πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα για περισσότερα από 20 χρόνια με σκοπό την τροποποίηση ή μεταβολή του μικροβιώματος αυτού με κύρια κατεύθυνση τον εμπλουτισμό των γαλακτοκομικών προϊόντων με βιο-λειτουργικά μόρια, ευεργετικά της υγείας του καταναλωτή. Ωστόσο, την τρέχουσα δεκαετία λόγω της κλιματικής αλλαγής, το μικροβίωμα της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών ερευνάται σε σχέση με το αποτύπωμα άνθρακα. Συγκεκριμένα, είδη βακτηρίων που αποικούν τη μεγάλη κοιλία, παράγουν ένα από τα σημαντικότερα αέρια του θερμοκηπίου, το μεθάνιο, με δυναμική 26 φορές μεγαλύτερη από αυτή του διοξειδίου του άνθρακα, φέρνοντας την κτηνοτροφία στις πρώτες θέσεις ανθρωπογενών εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου με συνεισφορά στο 18%. Οι επιστήμονες της διατροφής των ζώων καλούνται να αντιμετωπίσουν αυτές τις σύγχρονες προκλήσεις βασισμένοι πλέον σε δύο ισχυρά εφόδια, αφενός τη γενετική των οργανισμών και αφετέρου τη συνεχώς αναπτυσσόμενη βιοτεχνολογία. Έτσι, η τροποποίηση του μικροβιώματος και η μελέτη αυτών των αλλαγών τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται με τη χορήγηση σιτηρεσίων στα οποία ενσωματώνονται



υποπροϊόντα βιομηχανίας καθώς και προϊόντα βιοτεχνολογίας όπως τα μικροφύκη. Ωστόσο, η κατανόηση της δυναμικής της μεγάλης κοιλίας αποτελεί το σημαντικότερο εφόδιο των επιστημόνων στη μελέτη αυτή.

## 2. Μεγάλη κοιλία και βιοϋδρογόνωση λιπαρών οξέων

### 2.1. Ανατομία προστομάχων

Οι προστόμαχοι των μηρυκαστικών αποτελούνται από τρία διαμερίσματα, που είναι:

- 1) η μεγάλη κοιλία,
- 2) ο κεκρύφαλος και
- 3) ο εχίνος ή βίβλος.

### 2.2. Εισαγωγή στη μεγάλη κοιλία

Η μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών αποτελεί έναν μεγάλο θάλαμο εντός του οποίου η προσληφθείσα τροφή υπόκειται σε μικροβιακή πέψη. Η μεγάλη κοιλία είναι ένας ιδανικός μικροβιακός βιότοπος για την επιβίωση και την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η θερμοκρασία της παραμένει σχετικά σταθερή μεταξύ 36 και 40° C. Το πόσιμο νερό και η μόνη εξωκρινής έκκριση, ο σίελος, δημιουργούν τις κατάλληλες ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Μέσω της πρόσληψης της τροφής, οι μικροοργανισμοί αυτοί λαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Η αποτελεσματικότητα του συστήματος αυτού ολοκληρώνεται με την περισταλτική και αντιπερισταλτική κίνηση της μεγάλης κοιλίας, παρέχοντας στους μικροοργανισμούς συνεχώς νέο υπόστρωμα. Τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης απορροφώνται και εισέρχονται στην κυκλοφορία του ρουμινοηπατικού κύκλου (Millen *et al.*, 2016).

Πίνακας 2.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της μεγάλης κοιλίας-κερκύφαλου βόσκοντων προβάτων και βοοειδών (Clarke, 1977)

pH	5,7-7,3
Οξειδωαναγωγική ικανότητα	-0,35 V
Θερμοκρασία	39-41 °C
Ωσμωτικότητα	<400 mOsmol/Kg
Επιφανειακή τάση	45-59 dynes/cm
Αέριος φάση (%)	CO <sub>2</sub> :65, CH <sub>4</sub> :27, N <sub>2</sub> :7, O <sub>2</sub> :0,6, H <sub>2</sub> :0,2, H <sub>2</sub> S:0,01
Ξηρά ουσία (%)	10-18

Πτητικά λιπαρά οξέα (μmol/ml)	Μυρμηκικό:<0,02, οξικό:66, προπιονικό: 23, βουτυρικό: 20, μεγαλομοριακά:2
Μη πτητικά οργανικά οξέα	Μέχρι 30 μεq/ml: μηλικό, μηλονικό, κιτρικό, οξαλικό, βενζοϊκό, φαινυλοξικό κ.λπ.
Γαλακτικό οξύ	<7 μmol/ml
Ηλεκτρικό οξύ	0,002-0,004 μmol/ml
Αιθυλική αλκοόλη	Μη μετρούμενη
Αμμωνία	<92 μmol/ml
Μεθυλαμίνη	<1,2 μmol/ml
Διαλυτή πρωτεΐνη	Πάντοτε υπάρχει (σίελος και χλόη)
Μη διαλυτή πρωτεΐνη	Πάντοτε σχετιζόμενη με ινώδεις ουσίες, αντιστρόφως ανάλογη με την ηλικία της χλόης
Αμινοξέα (ως γλυκίνη)	<48 μεq/ml
Λιπίδια	Πάντοτε υπάρχουν: γλυκερίδια, γαλακτολιπίδια, σουφολιπίδια, φωσφολιπίδια, καροτινοειδή, στεροειδή, λιπαρά οξέα κ.λπ.
Χλωροφύλλη	Υπάρχουν πάντοτε προϊόντα διάσπασης, φαιοφυτίνες, φυλλοερυθρίνη
Νουκλεοξέα	Ταχέως διασπώμενα, πουρίνες και πυριμιδίνες
Διαλυτοί υδατάνθρακες	Μικρά ποσά ή καθόλου 3 ώρες μετά τη λήψη της τροφής
Υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες	Απομένουν μικρά ποσά 4 ώρες μετά τη λήψη της τροφής
Πηκτίνες	Μέχρι 55% απομεινύουσες 8 ώρες μετά τη λήψη της τροφής
Ημικυτταρίνες	Πάντοτε υπάρχουν
Κυτταρίνη	Πάντοτε υπάρχει
Λιγνίνη	Πάντοτε υπάρχει
Ανόργανα στοιχεία (mg/ml)	Na: 1,5-3,0, K: 0,6-2,3, Ca: 0,1-0,2, Mg: 0,1, P: 0,3, HPO <sub>4</sub> : 1,9, HCO <sub>3</sub> :1,3 και S, Cl κ.λπ.
Ιχνοστοιχεία	Fe, Mn, Co, Cu, Mo, Zn, Se, I κ.λπ.
Βιταμίνες και αυξητικοί για τους μικροοργανισμούς παράγοντες	Άφθονη παρουσία των βιταμινών του συμπλέγματος Β, βιταμίνη C, λιποδιαλυτές βιταμίνες και αυξητικοί παράγοντες για τους μικροοργανισμούς όπως λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλύσου, πορφυρίνες, πουρίνες, πυριμιδίνες κ.λπ.

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι εξαιρετικά χαμηλή, επομένως αναφερόμαστε σε ένα κατεξοχήν αναερόβιο περιβάλλον. Εκτιμάται ότι η επιλογή των μικροοργανισμών που αποικούν τη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών ξεκίνησε πριν από 3 δισεκατομμύρια χρόνια, η συνεργασία των

μικροοργανισμών με σκοπό τη μέγιστη αποτελεσματικότητα και ομοιόσταση αποτελεί προϊόν των τόσων ετών. Σημαντικό παράδειγμα αυτού, είναι η ανάπτυξη προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών που σκοπό έχουν το μεταβολισμό των μικρο-ποσοτήτων οξυγόνου που εισέρχεται με τη λήψη της τροφής με σκοπό τη δημιουργία αναερόβιου περιβάλλοντος (Millen *et al.*, 2016).

Το κυριότερο προϊόν της ζύμωσης από τους μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας είναι τα μικρής αλύσου λιπαρά οξέα (SCFA) (οξικό, προπιονικό, βουτυρικό) τα οποία αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή ενέργειας (50-70%) για τα μηρυκαστικά. Ο λόγος για τον οποίο οι ενεργειακές ανάγκες καλύπτονται σε υψηλό ποσοστό από τα πτητικά αυτά λιπαρά οξέα έγκειται στο αναερόβιο περιβάλλον εντός της μεγάλης κοιλίας. Συγκεκριμένα, καθίσταται αδύνατη η μετατροπή της γλυκόζης σε ATP δια της αερόβιας διαδικασίας η οποία αποδίδει 38 mol ATP /mol γλυκόζης έναντι 4<sup>ov</sup> της αναερόβιας. Ωστόσο, οι μικροοργανισμοί πέραν της συμβολής τους στις ενεργειακές ανάγκες των μηρυκαστικών μέσω της παραγωγής πτητικών λιπαρών οξέων, εμπλέκονται, επίσης, και στον πρωτεϊνικό μεταβολισμό. Ο υπερμεγέθης πληθυσμός των μικροοργανισμών στο πεπτικό σύστημα των μηρυκαστικών, σε συνάρτηση με το μικρό κύκλο ζωής και τον αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, καθιστούν τους ίδιους τους μικροοργανισμούς εξαιρετικής ποιότητας πηγή πρωτεΐνης για το ζώο. Πέραν όμως από την άμεση συμβολή τους στον πρωτεϊνικό μεταβολισμό, συγκεκριμένα είδη μικροοργανισμών δύναται να μεταβολίζουν την αμμωνία στη μεγάλη κοιλία σε αμινοξέα, τα οποία καθώς παράγονται στη μεγάλη κοιλία καταφέρνουν να φτάσουν στο λεπτό έντερο και να απορροφηθούν (Millen *et al.*, 2016).

Η σύνθεση θρεπτικών συστατικών από τους μικροοργανισμούς δεν περιορίζεται στην ενέργεια και την πρωτεΐνη. Οι μικροοργανισμοί της μεγάλης κοιλίας συνθέτουν, αξιοποιώντας κυρίως ιχνοστοιχεία της τροφής, όλες τις βιταμίνες του συμπλέγματος B και K (Millen *et al.*, 2016).

Έτσι, γίνεται σαφές ότι η σχέση συνύπαρξης του ξενιστή και των μικροοργανισμών είναι αλληλεξαρτώμενη και αλληλένδετη. Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται συνοπτικά οι κυριότερες προαναφερθείσες σχέσεις εξάρτησης.

Πίνακας 2.2. Η σχέση συμβίωσης μικροοργανισμών και μηρυκαστικού.

Συνεισφορά μηρυκαστικού	Συνεισφορά μικροοργανισμών
<b>Μάσηση της τροφής ώστε να δημιουργηθούν μικρότερα τμήματά της με σκοπό την αύξηση της επιφάνειας για την πρόσδεση μικροοργανισμών</b>	Η πέψη των ημικυτταρινών και της κυτταρίνης εξαρτάται απόλυτα από τη δραστικότητα των κυτταρολυτικών ενζύμων των μικροοργανισμών
<b>Ο σιέλος παρέχει το ιδανικό περιβάλλον για τη λειτουργία και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών μέσω της ρύθμισης του pH</b>	Οι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν το μη πρωτεϊνικής φύσεως άζωτο παράγοντας απαραίτητα για τη θρέψη του ζώου αμινοξέα
<b>Οι περισταλτικές κινήσεις της μεγάλης κοιλίας ανατροφοδοτούν συνεχώς τους μικροοργανισμούς με νέο ακόρεστο υπόστρωμα</b>	Η παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή ενέργειας για τον ξενιστή
<b>Η εκκένωση των αερίων και η απορρόφηση των οξέων είναι μείζονος σημασίας για την ομοιοστασία των συνθήκων της μεγάλης κοιλίας</b>	Τα μικροβιακά κύτταρα που καταφθάνουν στο λεπτό έντερο είναι εξαιρετική πηγή πρωτεΐνης και βιταμινών

### 2.3. Μικροοργανισμοί στη μεγάλη κοιλία

Η μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών αποικείται από πολλά είδη μικροοργανισμών. Η πλειοψηφία αυτών είναι αυτόχθονοι και αποτελούν τη φυσιολογική μικροχλωρίδα. Σε υγιείς συνθήκες ομοιοστασίας η συμβίωση μεταξύ μικροοργανισμών και ξενιστή βρίσκεται σε αρμονία. Ωστόσο, εντός της μεγάλης κοιλίας αποικούν και μερικά αλλόχθονα είδη τα οποία εισήλθαν σε αυτή από την τροφή και το πόσιμο νερό, είτε από αποικίες σε αλλά επιθήλια εντός και εκτός του ζώου. Τα μη ενδογενή αυτά είδη δύναται να επηρεάζουν τα πεπτικά φαινόμενα ή ακόμα και να προκαλέσουν μόλυνση στον ξενιστή.

Οι μικροοργανισμοί της μεγάλης κοιλίας είναι κυρίως Ευβακτήρια, Αρχαία και Ευκαριωτικά και συγκεκριμένα, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα και βακτηριοφάγοι (Millen *et al.*, 2016) (Πίνακας 2.3).

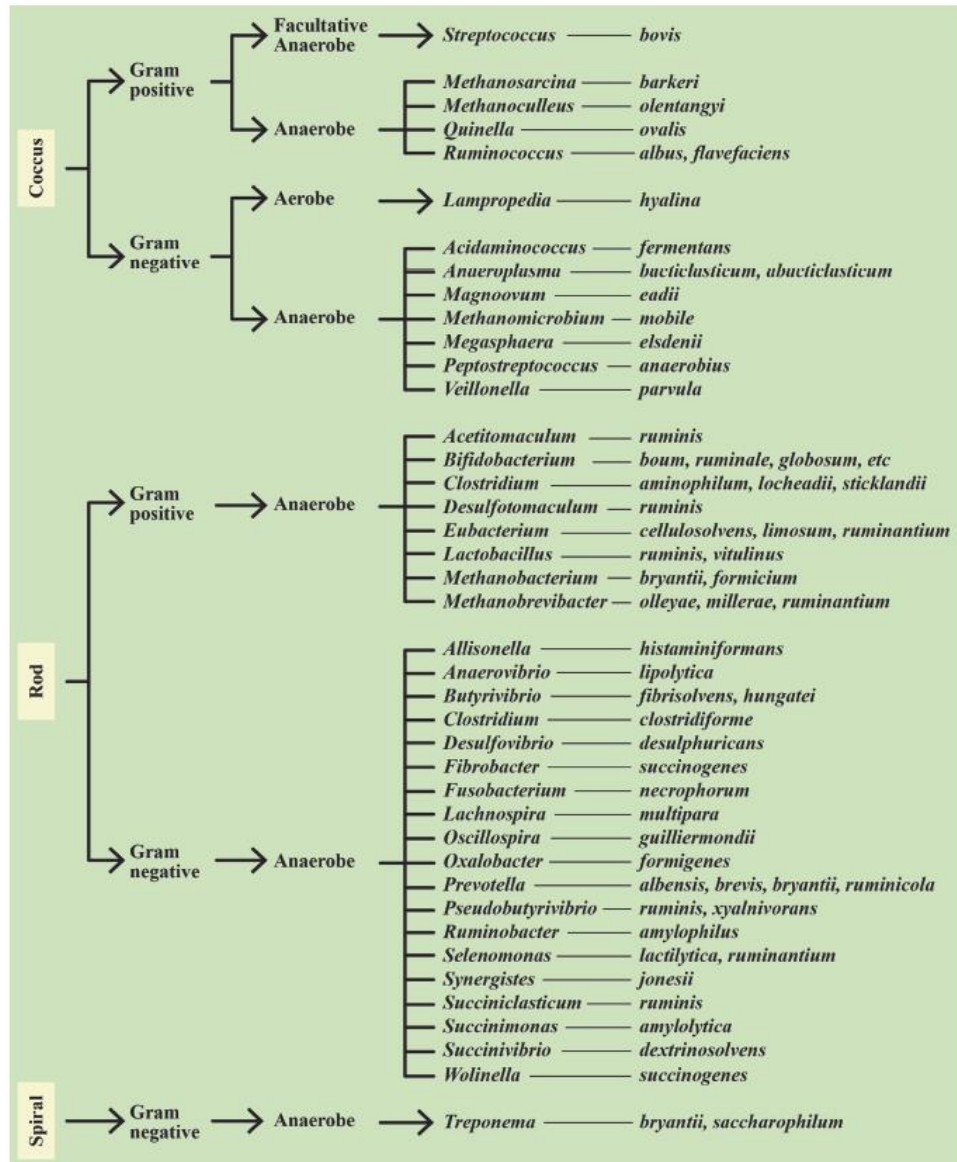
Πίνακας 2.3. Μικροοργανισμοί μεγάλης κοιλίας.

Μικροοργανισμοί	Τάξη	Συγκέντρωση ανά ml υγρού μεγάλης κοιλίας	Ποσοστό επί του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού
<b>Βακτήρια</b>	Ευβακτήρια	$10^9$ - $10^{11}$	40-90
<b>Μεθανοβακτήρια</b>	Αρχαία	$10^5$ - $10^8$	2-4
<b>Πρωτόζωα</b>	Ευκαρυώτες		0-60
<b>Μαστιγοτά</b>		$10^2$ - $10^3$	
<b>Βλεφαριδιωτά</b>		$10^4$ - $10^6$	
<b>Μύκητες</b>	Ευκαρυώτες		10
<b>Βακτηριοφάγοι</b>		$10^{10}$ - $10^{12}$	

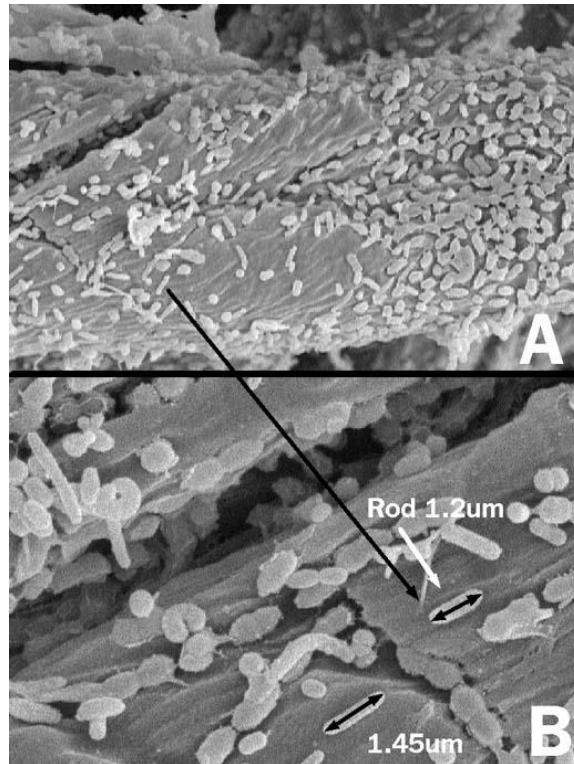
### 2.3.1. Βακτήρια στη μεγάλη κοιλία

Τα βακτήρια αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό του ολικού μικροβιακού πληθυσμού. Η πλειοψηφία των βακτηρίων αυτών είναι υποχρεωτικά αναερόβια και κατά 80-90% ταξινομούνται αρνητικά κατά gram (Σχήμα 2.1). Ωστόσο, μερικά είδη βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας, όπως οι *Butyrivibrio fibrosolvents*, χαρακτηρίζονται από κυτταρικό τοίχωμα παρόμοιο με αυτό των θετικών κατά gram βακτηρίων αλλά το κυρίως στέλεχος είναι gram αρνητικό. Όσον αφορά το ποσοστό των θετικών και αρνητικών κατά gram βακτηρίων, σημαντική παρατήρηση αποτελεί η αύξηση των gram θετικών βακτηρίων σε μηρυκαστικά ζώα τα οποία διατρέφονται κυρίως με συμπυκνωμένες ζωοτροφές (Nagaraja, 2016).

Επιπροσθέτως, τα βακτήρια στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών, ταξινομούνται σε ακόμα τρεις κατηγορίες. Τα βακτήρια που είναι προσδεμένα στα τεμάχια της τροφής είτε ελαφρώς είτε δυναμικά και αποτελούν την πλειοψηφία των βακτηρίων με ποσοστό περίπου 70%, τα βακτήρια που επιπλέουν στο υγρό της μεγάλης κοιλίας με ποσοστό περίπου 30% και τέλος τα βακτήρια τα οποία είναι προσδεμένα στο επιθήλιο της μεγάλης κοιλίας με ποσοστό σχεδόν αμελητέο αλλά όχι ασήμαντο ρόλο. Τα προσκολλημένα στο επιθήλιο βακτήρια αν και δεν εμπλέκονται άμεσα στη διαδικασία της πέψης, εμπλέκονται στη διατήρηση των ευνοϊκών συνθηκών εντός της μεγάλης κοιλίας (Nagaraja, 2016).



Σχήμα 2.1. Ταξινόμηση βακτηρίων μεγάλης κοιλίας ως προς τη μορφολογία τους και τη σχέση τους με το οξύνο (Nagaraja, 2016).



Σχήμα 2.2. *In vitro* επώαση βακτηρίων υγρού μεγάλης κοιλίας σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

### 2.3.2. Μεθανοβακτήρια

Τα μεθανοβακτήρια ανήκουν στην τάξη των Αρχαίων και διαφέρουν από τα βακτήρια, τα πρωτόζωα και τους μύκητες. Η απουσία πεπτιδογλυκανών και η ασυνήθιστη δομή των λιπιδίων τους αποτελεί το κυριότερο γνώρισμά τους. Τα μεθανοβακτήρια αποτελούν περίπου το 2-4 % του ολικού μικροβιακού πληθυσμού και ανήκουν σε 5 κυρίως γένη και 7 είδη: *Methanobacterium formicium*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanoculleus olentangyi*, και *Methanosarcina barkeri* (Nagaraja, 2016). Ακόμα, έχουν παρατηρηθεί συμβιωτικές σχέσεις των μεθανοβακτηρίων με τα πρωτόζωα (Finlay *et al.*, 1994).

Η πλειοψηφία των μεθανοβακτηρίων χρησιμοποιεί ως πηγή ενέργειας το μυρμηκικό οξύ και το  $H_2$  για την παραγωγή μεθανίου ( $CH_4$ ) (Πίνακας 2.4).

Πίνακας 2.4. Υποστρώματα και προϊόντα μεθανοβακτηρίων

Υπόστρωμα	Αντίδραση		Προϊόντα
Μείζονος σημασίας			
<b>H<sub>2</sub>+CO</b>	4H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>	→	CH <sub>4</sub> +2H <sub>2</sub> O
<b>Μυρμηκικό</b>	4HCOOH	→	CH <sub>4</sub> +3CO <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O
Ελάσσονος σημασίας			
<b>Μεθανόλη</b>	4CH <sub>3</sub> OH	→	3CH <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O
<b>Μεθυλαμίνη</b>	4CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> Cl+2H <sub>2</sub> O	→	3CH <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub> +4NH <sub>4</sub> Cl
<b>Διμεθυλαμίνη</b>	2(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NHCl+2H <sub>2</sub> O	→	3CH <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub> +2NH <sub>4</sub> Cl
<b>Τριμεθυλαμίνη</b>	4(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> NHCl+2H <sub>2</sub> O	→	3CH <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub> +2NH <sub>4</sub> Cl
<b>Οξικό</b>	CH <sub>3</sub> COOH	→	CH <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub>

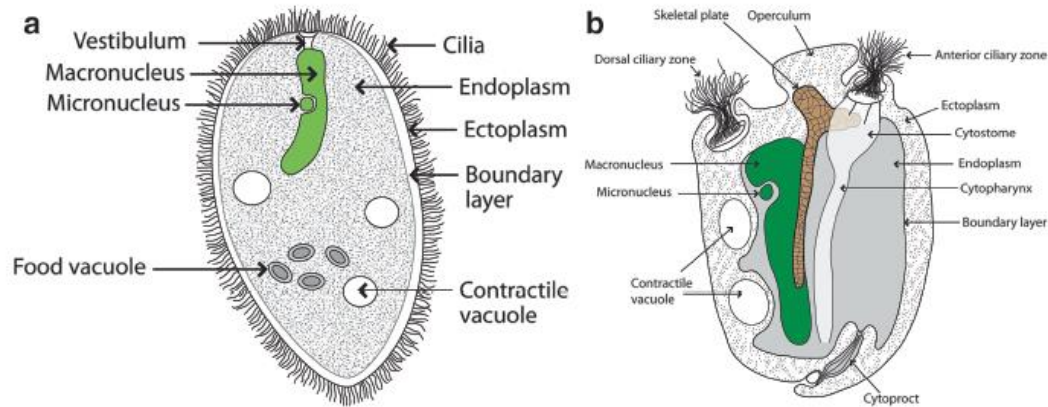
### 2.3.3. Πρωτόζωα

Τα πρωτόζωα αποτελούν τους πρώτους γνωστούς μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας που ανακαλύφθηκαν από τους Gruby και Delafond το 1843. Είναι αναερόβιοι οργανισμοί και ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα μαστιγωτά και τα βλεφαριδωτά. Τα μαστιγωτά είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος και πάχος και παρουσιάζουν μεγαλύτερη δυνατότητα κίνησης από τα βλεφαριδωτά. Ωστόσο, τα μαστιγωτά είναι μικρότερα σε μέγεθος και αριθμό σε σχέση με το συνολικό μικροβιακό πληθυσμό στη μεγάλη κοιλία, με δυνατότητα χρησιμοποίησης διαλυτών θρεπτικών συστατικών, με αποτέλεσμα η συνεισφορά τους στην ολική ζύμωση να είναι περιορισμένη (Nagaraja, 2016).

Τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί με μεγάλη ειδικευση και δομή παρόμοια με αυτή των ζώων. Παρουσιάζουν πεπτικό σύστημα (στόμα, κυτοφάρυγγα, έδρα), ουροποιητικό σύστημα (συστολικά κενοτόπια) και οστική δομή. Τέλος, όσον αφορά την κυτταρική τους δομή είναι διπύρνα με τον έναν πυρήνα να είναι μεγαλύτερος από τον άλλον. Τα βλεφαριδωτά ταξινομούνται σε δύο υποκατηγορίες με βάση τα μορφολογικά και λειτουργικά τους χαρακτηριστικά (Σχήμα 2.3). Στην πρώτη υποκατηγορία υπάγονται τα ολότριχα (*holotrichs*) που ανήκουν στη τάξη των *Trichostomatida* και έχουν βλεφαρίδες οι οποίες καλύπτουν ολόκληρη ή σχεδόν ολόκληρη την επιφάνειά τους. Η υποκατηγορία αυτή αντιπροσωπεύεται από τα δύο κύρια γένη, *Isotricha* και *Dasytricha*. Η δεύτερη υποκατηγορία ονομάζεται ενδοδηλιομορφίδια (*entodiniomorphid*) βλεφαριδωτά, ανήκουν στην τάξη των



*Entodiniomorphida* και έχουν βλεφαρίδες μόνο στο πρόσθιο άκρο τους. Το κυριότερο γένος των βλεφαριδωτών αυτών είναι οι *Entodinium*. Τα ολότριχα έχουν αυξημένη κινητικότητα σε σχέση με τα ενδοδηνιομορφίδια, ενώ τα δεύτερα αποτελούν αριθμητικά το σημαντικότερο πληθυσμό εντός της μεγάλης κοιλίας (Nagaraja, 2016).



Σχήμα 2.3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά α) ολοτρίχιων (holotrichs) και β) ενδοδηνιομορφιδίων (entodiniomorphid) (Nagaraja, 2016).

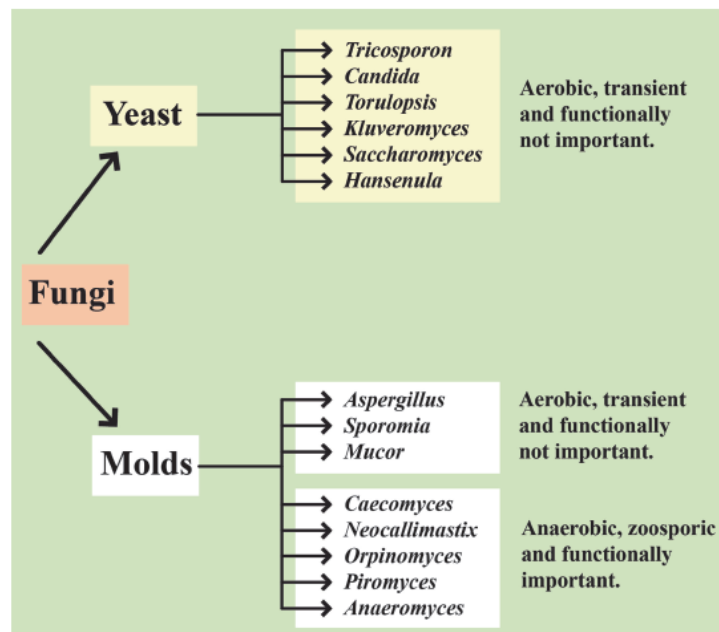
Τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα κατέχουν ένα σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της τροφής στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών, μέσω της παραγωγής υδρολυτικών ενζύμων που εμπλέκονται στη διαδικασία ζύμωσης των κύριων συστατικών της τροφής. Ωστόσο, ακόμα και σήμερα, οι ακριβείς βιοχημικές τους λειτουργίες δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως λόγω της δυσκολίας της *in vitro* καλλιέργειά τους. Συγκεκριμένα, τα ολότριχα εμπλέκονται κυρίως στη χρησιμοποίηση των διαλυτών σακχάρων ενώ τα ενδοδηνιομορφίδια χρησιμοποιούν ένα μεγαλύτερο εύρος υποστρωμάτων. Τα περισσότερα ενδοδηνιομορφίδια, με ελάχιστες εξαιρέσεις, εμπλέκονται στον καταβολισμό φυτικών ιστών και συγκεκριμένα στην αποδόμηση των υδατανθράκων των κυτταρικών τους τοιχωμάτων. Γενικά, τα είδη των ενδοδηνιομορφιδίων έχουν υψηλή δραστηριότητα αμυλολυτικών ενζύμων. Ωστόσο, η συμβολή τους στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών δεν είναι μείζονος σημασίας όπως αυτή των βακτηρίων (Nagaraja, 2016).

### 2.3.4. Μύκητες στη μεγάλη κοιλία

Οι μύκητες στη μεγάλη κοιλία ανακαλύφθηκαν και περιεγραφήκαν από τον Colin Orpin το 1975 για πρώτη φορά. Μέχρι τότε, λανθασμένα χαρακτηρίζονταν ως μαστιγωτά πρωτόζωα.

**Είδη και μορφολογία** | Με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά οι μύκητες ταξινομούνται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες: τους ζυμομύκητες και τους μυκηλιακούς (Σχήμα 2.4).

Οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, ενώ οι μυκηλιακοί είναι πολυκύτταροι και δημιουργούν ένα δίκτυο νηματίων τα οποία ονομάζονται υφές. Οι υφές έχουν σωληνοειδή δομή και συλλογικά ονομάζονται μυκήλια. Οι ζυμομύκητες είναι προαιρετικά αερόβιοι ή αναερόβιοι και δεν εμπλέκονται στη διαδικασία της πέψης. Οι μυκηλιακοί είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι, αυτόχθονες μικροοργανισμοί και συνεισφέρουν στην πέψη στη μεγάλη κοιλία. Οι ζυμομύκητες παρουσιάζουν σχετικά μεγάλη διακύμανση στη μεγάλη κοιλία ( $10^2$ - $10^3$  /ml υγρού μεγάλης κοιλίας) και αυξάνονται περαιτέρω σε ζώα που εκδηλώνουν οξέωση. Η αύξηση αυτή του πληθυσμού τους πιθανότατα να οφείλεται στην αύξηση των ζυμούμενων σακχάρων (Nagaraja, 2016).



Σχήμα 2.4. Με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά οι μύκητες ταξινομούνται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες: τους ζυμομύκητες και τους μυκηλιακούς.

**Συνεισφορά στην πέψη** | Λόγω του βιολογικού τους κύκλου, η αξιολόγηση της συνεισφοράς των μυκήτων στην πέψη της τροφής είναι δύσκολο να εκτιμηθεί. Ωστόσο, έρευνες που διεξήχθησαν συγκλίνουν στην επίδρασή τους στην πέψη και τη ζύμωση των υδατανθράκων καθώς παράγουν υδρολυτικά ένζυμα, απαραίτητα για την αποικοδόμηση των φυτικών βιομαζών (Nagaraja, 2016). Αυτά τα ένζυμα κυρίως ανήκουν στις κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, αμυλάσες και πρωτεάσες. Επιπροσθέτως, οι μύκητες στη μεγάλη κοιλία, μεταβολίζουν τις εξόζες και τις πεντόζες, παράγοντας μεταξύ των άλλων μυρμηκικό οξύ και  $H_2$ , τις κύριες πρόδρομες ενώσεις των μεθανοβακτηρίων όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Εν κατακλείδι, έχει παρατηρηθεί, ότι η χορήγηση σιτηρεσίων βασισμένων σε χονδροειδείς ζωοτροφές, κυρίως χαμηλής ποιότητας, αυξάνει τον πληθυσμό των μυκήτων στη μεγάλη κοιλία και ως εκ τούτου οι μύκητες συνεισφέρουν σε μεγάλο ποσοστό στην πέψη των ινωδών ουσιών (Nagaraja, 2016).

### **2.3.5. Βακτηριοφάγοι στη μεγάλη κοιλία**

Οι βακτηριοφάγοι, ή αλλιώς φάγοι, είναι ιοί οι οποίοι μολύνουν βακτήρια. Χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη ειδίκευση και απαρτίζονται από νουκλειικά οξέα (DNA ή RNA, μονής ή διπλής αλύσου) και πρωτεΐνες. Όταν ένας φάγος επιτίθεται σε ένα βακτήριο, αρχικά προσδένεται σε κατάλληλο υποδοχέα στην επιφάνεια του βακτηρίου και εν συνεχεία εισάγει τα νουκλειικά του οξέα εντός του βακτηριακού κυττάρου. Όταν ο ιός εισάγει το DNA του στο βακτήριο, επακολουθεί μια εκ των δύο διαδικασιών: η λύση ή η λυσογενέση. Κατά τη διαδικασία της λύσης, ο ιός αντιγράφεται εντός του βακτηρίου και εξέρχεται αυτού καταστρέφοντάς το με στόχο προσβάλει νέα βακτήρια. Κατά τη διαδικασία της λυσογένεσης, το εισαχθέν DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή (βακτήριο) και μεταδίδεται στα θυγατρικά κύτταρα. Τότε είτε δημιουργούνται νέες ιδιότητες στο κύτταρο αυτό είτε αποκόπτονται από το βακτηριακό χρωμόσωμα και εισέρχεται το κύτταρο σε μια λυτική φάση όπως της λύσης (Nagaraja, 2016).

### **2.4. Μεταβολισμός θρεπτικών συστατικών στη μεγάλη κοιλία**

Τα κύρια θρεπτικά συστατικά της τροφής των μηρυκαστικών ζώων είναι οι υδατάνθρακες, οι αζωτούχες ουσίες (πρωτεΐνες και μη πρωτεϊνικής φύσεως αζωτούχες ουσίες), τα λίπη και η λιγνίνη (Nagaraja, 2016).

### 2.4.1. Μεταβολισμός υδατανθράκων

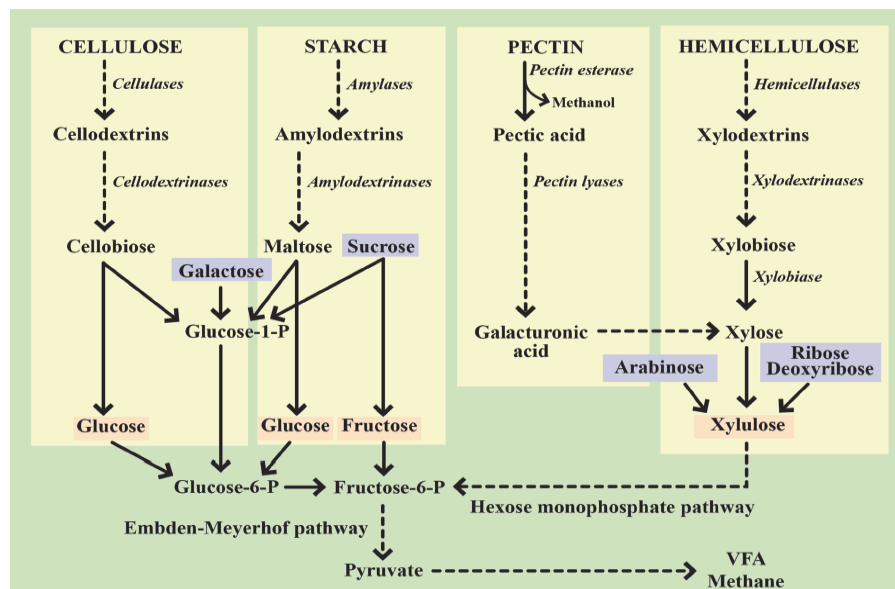
Οι πολυσακχαρίτες της τροφής μπορεί να είναι δομικοί (κυτταρίνη, ημικυτταρίνες και πηκτίνες) ή μη δομικοί (άμυλο και σάκχαρα) (Van Soest *et al.*, 1991). Οι μικροοργανισμοί (βακτήρια, πρωτόζωα, μύκητες) παράγουν πλήθος ενζύμων των οποίων η λειτουργία έγκειται στην αποικοδόμηση των γλυκοζυτικών δεσμών προκειμένου να δημιουργηθούν ολιγοσακχαρίτες και εν συνεχεία μονοσακχαρίτες. Το πρώτο βήμα της αποικοδόμησης των κυτταρικών τοιχωμάτων είναι η πρόσδεση των μικροοργανισμών στα τεμάχια της τροφής. Αρκετά είδη βακτηρίων και βλεφαριδωτών στη μεγάλη κοιλία και όλα τα είδη μυκήτων έχουν κυτταρινολυτική δράση (Teunissen και Op den Camp, 1993). Τα τρία είδη βακτηρίων που θεωρούνται ότι βρίσκονται σε αφθονία είναι: οι *Fibrobacter succinogenes*, οι *Ruminococcus albus*, και οι *Ruminococcus flavefaciens*. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι κανένα είδος από αυτά δεν είναι πρωτεολυτικό. Η πλειοψηφία των κυτταρινολυτικών βακτηρίων δύναται, επίσης, να πέπτει και τις ημικυτταρίνες και τις πηκτίνες. Τα μη κυτταρινολυτικά βακτήρια πέπτουν τις ημικυτταρίνες είναι κυρίως: οι *Prevotella sp.* (*albensis*, *brevis*, *bryanti*, και *rumincola*), οι *Butyrivibrio fibrisolvens*, οι *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*. Τα ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των ημικυτταρινών είναι οι ενδοξυλανάσες (endoxylanases). Επιπροσθέτως, οι πηκτίνες ως δομικοί πολυσακχαρίτες αποικοδομούνται πλήρως στη μεγάλη κοιλία με τα συνηθέστερα και πολυπληθέστερα πηκτινολυτικά βακτήρια είναι: οι *Prevotella sp.*, οι *Butyrivibrio fibrisolvens*, οι *Lachnospira multiparus*, οι *Streptococcus bovis*, και οι *Treponema sp.* (*bryantii* και *saccharophilum*) (Niwińska, 2012). Το άμυλο αποικοδομείται ταχέως στη μεγάλη κοιλία και η ταχύτητα αυτή εξαρτάται από τον τύπο των συμυκνωμένων ζωοτροφών και το ποσοστό τους στο ολικό σιτηρέσιο. Τα κυρίαρχα αμυλολυτικά βακτήρια είναι: οι *Ruminobacter amylophilus*, οι *Selenomonas ruminantium*, οι *Streptococcus bovis* και είδη των *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Το κύριο ένζυμο των βακτηρίων για την αποικοδόμηση του αμύλου είναι η α-αμυλάση (Cotta, 1988).

Τα ενδοδηνιομορφίδια πρωτόζωα εγκλωβίζουν τους κόκκους αμύλου και τους ζυμώνουν με αργό ρυθμό. Η διαδικασία αυτή είναι πολύ σημαντική καθώς επιβραδύνει τον ρυθμό αποικοδόμησης του αμύλου, ο οποίος είναι πολύ υψηλός, με αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητάς του. Η συνεισφορά των μυκήτων, παρά την

αμυλολυτική τους δραστηριότητα, θεωρείται μηδαμινή καθώς ο πληθυσμός τους μειώνεται σε σιτηρέσια πλούσια σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές (Nagaraja, 2016).

Εντός της μεγάλης κοιλίας αποικούν ενεργά βακτήρια αποικοδόμησης σακχάρων τα οποία ανήκουν στα γένη των: *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, και *Treponema*. Από αυτά, τα *S. bovis* και οι *Lactobacillus sp.* είναι οι σημαντικότεροι καθώς παράγουν πολύ μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος όταν το περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας κατακλύζεται από ζυμούμενους υδατάνθρακες (Nagaraja, 2016).

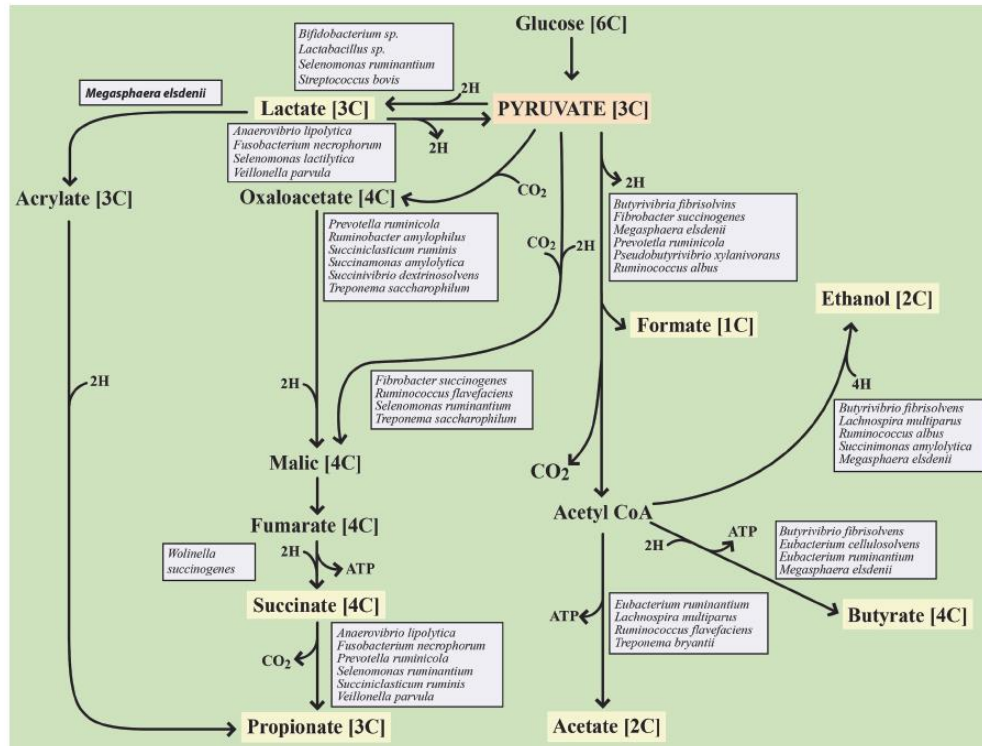
Τα προϊόντα ζύμωσης των υδατανθράκων στη μεγάλη κοιλία είναι το οξικό οξύ, το προπιονικό, το βουτυρικό, το μυρμηκικό, η ακετοΐνη, η βουτανεδιόλη, η αιθανόλη, το γαλακτικό, το ηλεκτρικό και το βαλερικό. Το μυρμηκικό μεταβολίζεται προς παραγωγή μεθανίου από τα μεθανοβακτήρια όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Το γαλακτικό και το ηλεκτρικό είναι ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού των βακτηρίων. Το ηλεκτρικό από-καρβοξυλιώνεται σε προπιονικό και οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται είναι οι *Selenomonas*. Το γαλακτικό μεταβολίζεται σε οξικό, προπιονικό και βουτυρικό κυρίως από δύο βακτήρια: τα *Megasphaera elsdenii* και τους *Selenomonas ruminantium* (Nagaraja, 2016).



Σχήμα 2.5. Μεταβολισμός των υδατανθράκων στα μηρυκαστικά ζώα (Nagaraja, 2016).

Εν συνεχεία, η γλυκόζη και η ξυλόζη είναι τα κυρίαρχα σάκχαρα των μικροοργανισμών που μεταβολίζονται δια της γλυκόλυσης (Embden-Meyerhof) ή του βιολογικού μονοπατιού της μονοφωσφορικής εξόζης ή της φωσφορικής πεντόζης και το

πυροσταφυλικό ως ενδιάμεσο προϊόν. Η τύχη του παραχθέντος πυροσταφυλικού εξαρτάται από τις συνθήκες της μεγάλης κοιλίας, όπως το pH και το μικροβιακό προφίλ (Nagaraja, 2016) (Σχήμα 2.6).



Σχήμα 2.6. Η τύχη του πυροσταφυλικού στα μηρυκαστικά ζώα (Nagaraja, 2016).

#### 2.4.2. Μεταβολισμός αζωτούχων ουσιών

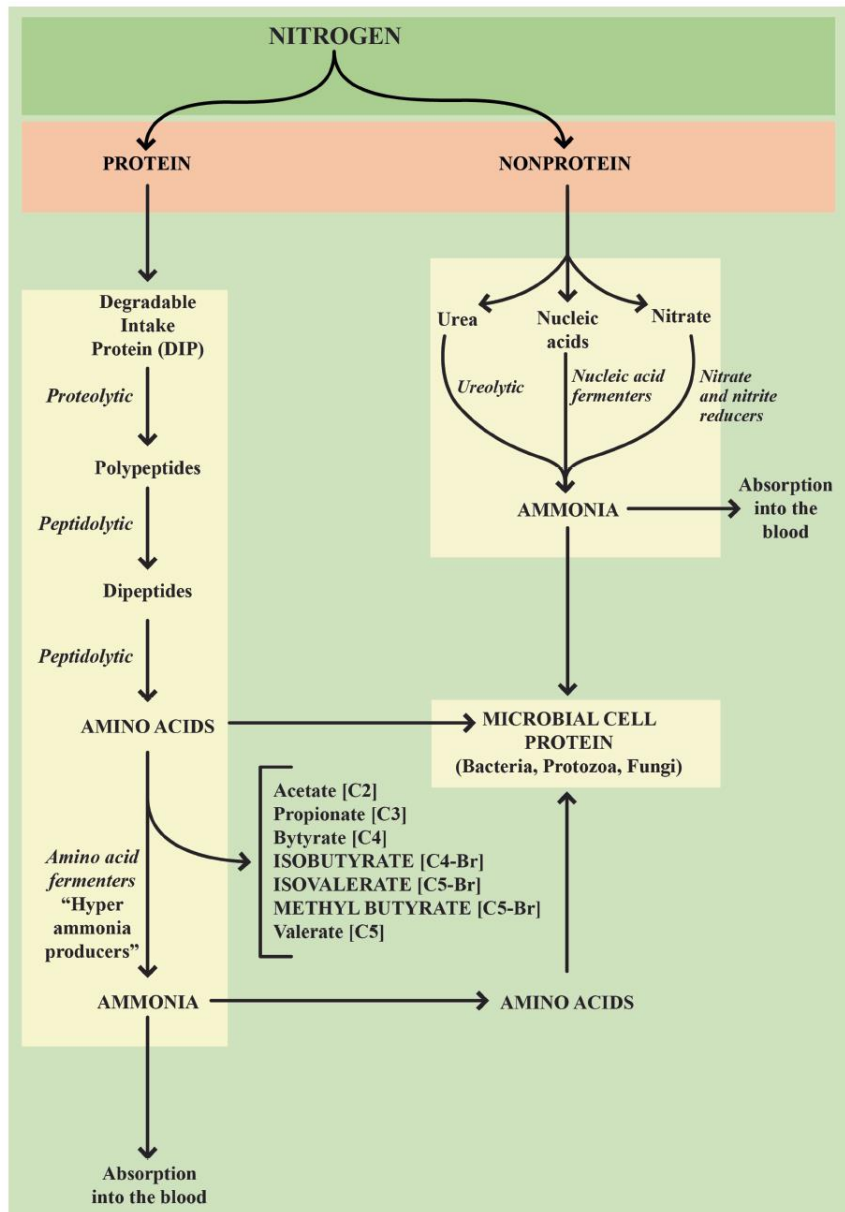
Πολλά από τα βακτήρια τα οποία μεταβολίζουν τους υδατάνθρακες στα μηρυκαστικά έχουν και πρωτεολυτικές ιδιότητες. Τα πιο ενεργά πρωτεολυτικά βακτήρια είναι: *Prevotella sp.*, *Ruminobacter amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium*, και *Megasphaera elsdenii*. Οι πρωτεΐνες της τροφής εντός της μεγάλης κοιλίας διασπώνται σε πολυπεπίδια, σε ολιγοπεπίδια και τελικώς σε αμινοξέα με την ταχύτητα της αποικοδόμησης να εξαρτάται κυρίως από το προφίλ των αμινοξέων που συνθέτουν τα πολυπεπίδια (Bach *et al.*, 2005). Ωστόσο, η πολυπλοκότητα των πρωτεϊνών πολλές φορές καθιστά αδύνατη την αποικοδόμηση μιας πρωτεΐνης από ένα μικροοργανισμό, με αποτέλεσμα τη συνεργική συνεισφορά περισσότερων (Wallace *et al.*, 1997). Ο μεταβολισμός αυτών των πεπτιδίων γίνεται σε δύο φάσεις: κατά την πρώτη φάση, οι διπεπτιδυλό-πεπτιδάσες αποκόπτουν τα διπεπίδια από το N-άκρο του πολυπεπτιδίου και ακολουθεί η περαιτέρω αποικοδόμηση του διπεπτιδίου σε αμινοξέα (Σχήμα 2.7). Ένα κοινό βακτήριο με υψηλή

δραστηριότητα του ενζύμου αυτού αποτελεί η *Prevotella ruminicola*. Εκτός από τα βακτήρια, τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα επίσης έχουν αυξημένη ενεργότητα των διπεπτιδασών. Ωστόσο, η συμβολή των μυκήτων στην αποικοδόμηση των αζωτούχων ουσιών δεν είναι σαφής παρά την παρουσία αμινοπεπτιδασών. Το προφίλ των αμινοξέων αλλά και η συγκέντρωσή τους στη μεγάλη κοιλία είναι περιορισμένη λόγω της ταχείας ζύμωσής τους. Η απαμίνωση είναι μια συνήθης διαδικασία εντός της μεγάλης κοιλίας καθώς η πλειοψηφία των πρωτεολυτικών βακτηρίων συνεισφέρει σε αυτή.

Άλλη μια διαδικασία η οποία σχετίζεται με το μεταβολισμό των αζωτούχων ουσιών στη μεγάλη κοιλία που οφείλεται σε μικροβιακή λειτουργία είναι η παραγωγή αμμωνίας. Τα είδη τα οποία συμμετέχουν ενεργά στην παραγωγή αμμωνίας είναι κυρίως: οι *Peptostreptococcus anaerobius*, οι *Clostridium sticklandii*, οι *Clostridium aminophilum* και οι *Fusobacterium necrophorum*. Επιπροσθέτως, ο ρυθμός της απαμίνωσης των αμινοξέων στη μεγάλη κοιλία εξαρτάται κυρίως από δύο παράγοντες: τον αριθμό των βακτηρίων που εμπλέκεται στην απαμίνωση και στη δραστηριότητα αυτών (Nagaraja, 2016).

Τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα έχουν εξίσου μια σημαντική συνεισφορά στην απαμίνωση των αμινοξέων (Bach *et al.*, 2005). Ο ταχύς ρυθμός ζύμωσης της ουρίας οφείλεται στη δραστηριότητα της ουρεάσης, η οποία προέρχεται κυρίως από τα βακτήρια που αποικούν στο επιθήλιο της μεγάλης κοιλίας (Nagaraja, 2016).

Τέλος, πολλά βακτήρια είναι ικανά να μεταβολίζουν την αμμωνία και να υδρολύουν το μη πρωτεϊνικής φύσεως άζωτο με σκοπό τη σύνθεση αμινοξέων. Τα ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτή τη λειτουργία είναι η γλουταμική αφυδρογονάση και η γλουταμινική συνθετάση (Nagaraja, 2016).



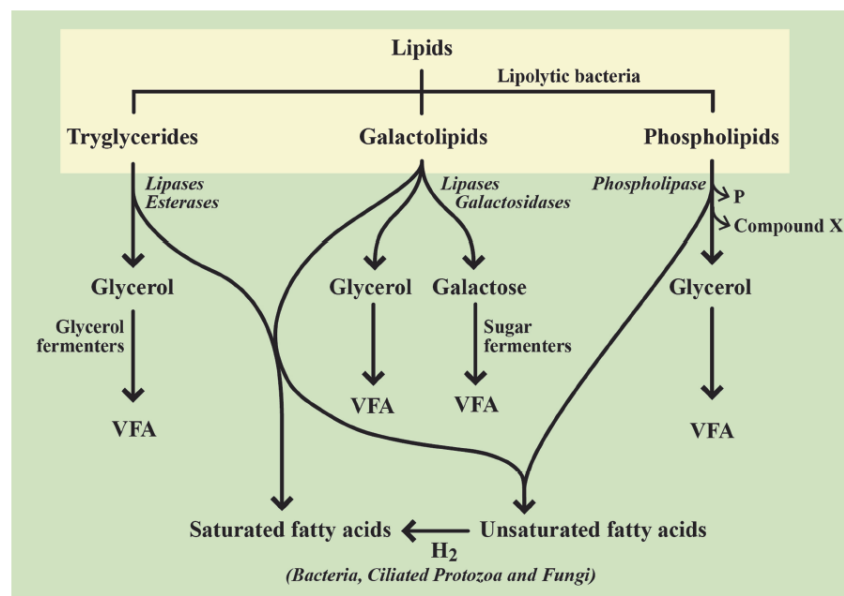
Σχήμα 2.7. Μεταβολισμός αζωτούχων ουσιών στα μηρυκαστικά (Nagaraja, 2016).

### 2.4.3. Μεταβολισμός λιπών

Τα λιπίδια των σιτηρεσιών των μηρυκαστικών αποτελούνται κυρίως από γαλακτολιπίδια, τριγλυκερίδια και φωσφολιπίδια τα οποία υδρολύονται ταχέως με την επίδραση των λιπασών και των εστερασών των βακτηρίων και των βλεφαριδωτών πρωτοζώων (Σχήμα 2.8). Τα κυριότερα λιπολυτικά βακτήρια είναι: οι *Anaerovibrio lipolytica* και οι *Butyrivibrio fibrisolvens*. Τα κύρια προϊόντα της υδρόλυσης των λιπιδίων είναι η γλυκερόλη και τα λιπαρά οξέα, και η γαλακτόζη στην περίπτωση της



υδρόλυσης των γαλακτολιπιδίων. Η γλυκερόλη μεταβολίζεται ταχέως σε οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ και χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας. Τα μακράς αλυσού κορεσμένα λιπαρά οξέα (άνω των 17 ατόμων άνθρακα) δεν αποικοδομούνται στη μεγάλη κοιλία αλλά ενσωματώνονται στα κυτταρικά λιπίδια από τους μικροοργανισμούς. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα σε αναερόβια οικοσυστήματα εκτός του εντέρου, οξειδώνονται από θειοαναγωγικά βακτήρια ή από ειδικευμένα είδη βακτηρίων με ιδιότητες αναγωγής πρωτονίων ή αλλιώς ακετογόνα βακτήρια. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και ειδικότερα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της τροφής, με κυριότερα, το λινελαϊκό (*cis-9, cis-12* C<sub>18:2</sub>) και το λινολενικό οξύ (*cis-9, cis-12, cis-15* C<sub>18:3</sub>), υπόκεινται σε μια διαδικασία υδρογόνωσης η οποία καλείται βιοϋδρογόνωση (Chilliard *et al.*, 2007). Η βιοϋδρογόνωση εκτελείται σε διαδοχικά στάδια από διαφορετικούς μικροοργανισμούς σε κάθε στάδιο με τελικό προϊόν το στεατικό οξύ (C<sub>18:0</sub>). Ωστόσο, κατά τη διαδικασία αυτή παράγονται κάποια ενδιάμεσα ισομερή τα οποία διαφεύγουν των προστομάχων και φθάνουν ως τελικά προϊόντα όπως το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (CLA) καθώς και τα *trans*-10 και 11 ισομερή του C<sub>18:1</sub>. Τα κυριότερα βακτήρια που εμπλέκονται στη διαδικασία της βιοϋδρογόνωσης είναι: οι *Butyrivibrio hungatei*, οι *B. proteoclasticus* (*Clostridium proteoclasticum*) και οι *Propionibacterium acnes* (Nagaraja, 2016).



Σχήμα 2.8. Μεταβολισμός λιπών στη μεγάλη κοιλία (Nagaraja, 2016).

## 2.5. Βιοϋδρογόνωση

Βιοϋδρογόνωση καλείται η διαδικασία κατά την οποία τα ελεύθερα λιπαρά οξέα της τροφής εντός της μεγάλης κοιλίας υδρογονώνονται, δηλαδή, αφαιρείται ένας διπλός δεσμός μεταξύ δύο ατόμων άνθρακος και προστίθεται ένα υδρογόνο (Σχήμα 2.9). Η διαδικασία αυτή είναι συνέχεια της λιπόλυσης η οποία για να επιτευχθεί, πρέπει να προηγηθεί η απελευθέρωση των λιπαρών οξέων από τους εστέρες και αυτό γιατί η βιοϋδρογόνωση λαμβάνει χώρα μόνο όταν το καρβοξυλικό άκρο είναι ελεύθερο (Buccioni *et al.*, 2012). Από φυσιολογικής άποψης, ο ρόλος της βιοϋδρογόνωσης αφορά στην αποικοδόμηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων σε κορεσμένα, καθώς τα πρώτα δρουν τοξικά στους μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας (Dehority, 2003).

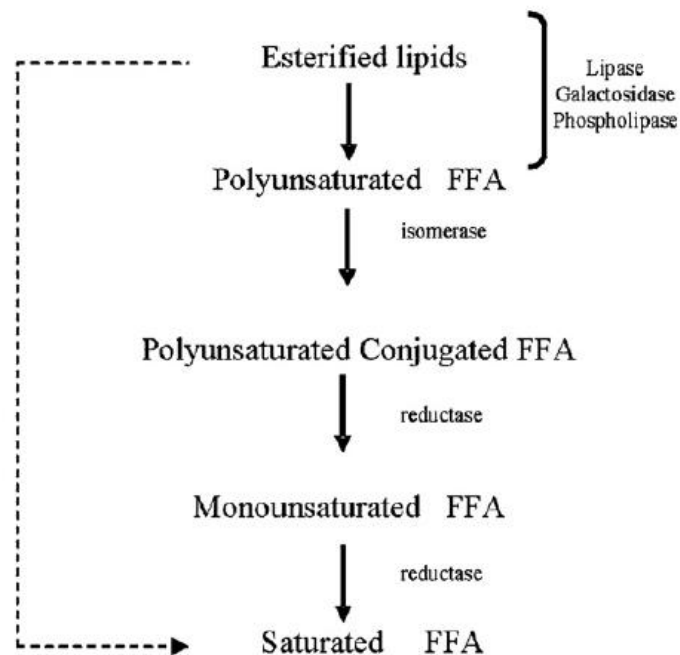
Αν και η βιοϋδρογόνωση είναι μια διαδικασία της οποίας τα αποτελέσματα επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τα πεπτικά φαινόμενα και γενικότερα τη θρέψη του ζώου, οι μικροοργανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται στο πρώτο στάδιο της υδρόλυσης των εστέρων από τα λιπίδια είναι ελάχιστοι και η εξειδίκευσή τους υψηλή (Henderson, 1971; Fay *et al.*, 1990). Αν και διάφορα στελέχη των *Butyrivibrio fibrisolvens* και των *Anaerovibrio lipolytica* υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς, ωστόσο, οι *Butyrivibrio fibrisolvens* υδρολύουν τα φωσφολιπίδια και οι *Anaerovibrio lipolytica* υδρολύουν τα τρι- και διγλυκερίδια. Επιπροσθέτως, η δραστηριότητα της λιπάσης παρατηρείται και στα βλεφαριδωτά πρωτόζωα αλλά όχι στους μύκητες, αν και η δράση τους είναι περιορισμένη σε σχέση με αυτή των βακτηρίων (Dehority, 2003).

Μετά τη δράση της λιπάσης και την ελευθέρωση των πολυακόρεστων και ακόρεστων λιπαρών οξέων, ακολουθεί η δράση των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στη βιοϋδρογόνωση. Τα βακτήρια θεωρούνται υπεύθυνα για το μεγαλύτερο ποσοστό της διαδικασίας αυτής καθώς η συνεισφορά των πρωτόζωων είναι περιορισμένη (Buccioni *et al.*, 2012). Συγκεκριμένα, τα βακτήρια τα οποία έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στην επιφάνεια των τεμαχιδίων της τροφής παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα από αυτά του υγρού περιεχομένου. Η συμμετοχή των μυκήτων στη βιοϋδρογόνωση είναι αμφιλεγόμενη. Ωστόσο, *in vitro* πείραμα των Nam και Garnsworthy (2007) αναφέρει την υδρογόνωση του λινελαϊκού οξέος (*cis*-9 *cis*-12, C<sub>18:2</sub>, LA) από μύκητες σε ρυθμό σημαντικά βραδύτερο από αυτό των βακτηρίων. Το τελικό προϊόν της βιοϋδρογόνωσης του λινελαϊκού οξέος από τους μύκητες είναι το βασσενικό οξύ (*trans*-

11, C<sub>18:1</sub>, VA), όπως συμβαίνει και στα βακτήρια, με ενεργότερο μύκητα στη διαδικασία αυτή να είναι ο Ορπινομύκητας (*Orpinomyces*) (Buccioni *et al.*, 2012).

Το λινελαϊκό, το λινολενικό (cis-9 cis-12 cis-15 C<sub>18:3</sub>, linolenic acid, LNA) και το ελαϊκό οξύ cis-9 C<sub>18:1</sub> (Oleic acid, OA) αποτελούν τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα της τροφής των μηρυκαστικών. Τα περισσότερα βακτήρια τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της βιοϋδρογόνωσης είναι κυτταρινολυτικά με σημαντικότερα αυτά των *Butyrivibrio fibrisolvens* τα οποία υδρογονώνουν το λινελαϊκό (Kepler *et al.*, 1966).

Ωστόσο, με βάση τα προαναφερθέντα, η δράση των *Butyrivibrio fibrisolvens* εκ των οποίων έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί 32 στελέχη, η περιορισμένη αλλά υπαρκτή δράση των πρωτοζώων και κάποιων μυκήτων στη βιοϋδρογόνωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων περιορίζεται στην παραγωγή των ισομερών του C<sub>18:1</sub> και όχι του στεατικού οξέως (C<sub>18:0</sub>) ως τελικό προϊόν. Ο μονός μικροοργανισμός που έχει την ιδιότητα της βιοϋδρογόνωσης των ισομερών του C<sub>18:1</sub> σε στεατικό οξύ C<sub>18:0</sub> είναι ο *Clostridium proteoclasticum*, ή αλλιώς *Butyrivibrio proteoclasticus* (Moon *et al.*, 2008). Ακόμα, οι *Propionibacterium acnes* υδρογονώνουν το ολεϊκό οξύ και το βασσενικό σε 10-OH-C<sub>18:0</sub> το οποίο έπειτα οξειδώνεται σε 10-O-C<sub>18:0</sub> (Kim *et al.*, 2008; McKain *et al.*, 2010).

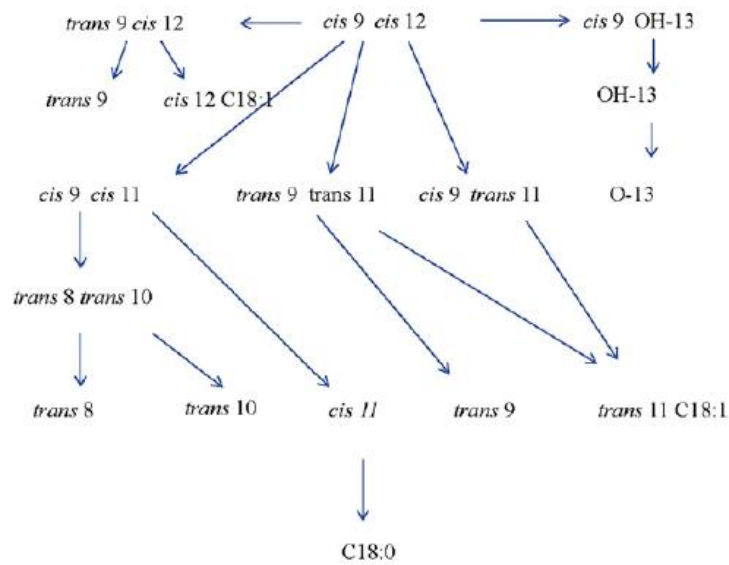


Σχήμα 2.9. Λιπόλυση των λιπιδίων της τροφής και βιοϋδρογόνωση των ελευθέρων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Buccioni *et al.*, 2012).

**Βιοϋδρογόνωση του λινελαϊκού οξέος** | Οι μικροοργανισμοί όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, χρησιμοποιούν τη βιοϋδρογόνωση προκειμένου να αμυνθούν στην τοξικότητα των ακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων προς αυτούς. Μετα τη λιπόλυση, το επόμενο βήμα αποτελεί η ισομερίωση του λινελαϊκού (Buccioni *et al.*, 2012). Τα ισομερή του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος (CLA) έχουν ένα συζευγμένο δεσμό μεταξύ 2<sup>ου</sup> και 17<sup>ου</sup> άνθρακα. Κάθε ισομερές έχει τέσσερα γεωμετρικά ισομερή: 1) *cis, trans*, 2) *trans, cis*, 3) *cis, cis* και 4) *trans, trans* για ένα σύνολο 56 δυνατών ισομερών. Η θέση του διπλού δεσμού του CLA της μεγάλης κοιλίας και του γάλακτος έχει εύρος από 6,8 ως 13,15 C<sub>18:2</sub> για ένα σύνολο 32 ισομερών (Bessa *et al.*, 2000; Kramer *et al.*, 2004; Shingfield *et al.*, 2008).

Το πρώτο στάδιο της βιοϋδρογόνωσης του λινελαϊκού οξέος αποτελείται από τον ενζυμικό ισομερισμό της *cis-12, trans-11* ισομεράσης, η οποία αλλάζει τον *cis-12* δεσμό του λινελαϊκού σε *trans-11* (Σχήμα 2.10). Η ισομεράση αυτή (LA-I) απαιτεί την παρουσία ελεύθερης καρβοξυλικής ομάδας και συγκεκριμένα αυτής που το απομονωμένο διένιο χαρακτηρίζεται από γεωμετρία “*cis-9, cis-12*”. Το ένζυμο, δεν απαιτεί την ύπαρξη συμπαραγόνα ή άλλης λειτουργικής ομάδας (Buccioni *et al.*, 2012). Μετά τη δημιουργία του *trans-11* δεσμού, ο δεσμός *cis-9* υδρογονοποιείται από τη μικροβιακή αναγωγή των *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hughes *et al.*, 1982). Τα πρώτα αυτά στάδια της βιοϋδρογόνωσης παρουσιάζουν ταχύ ρυθμό, ενώ η περαιτέρω διαδικασία από βασσενικό σε στεατικό γίνεται σε βραδύτερο ρυθμό (Buccioni *et al.*, 2012). Έτσι λοιπόν, παρατηρούνται δύο κύρια στάδια στη βιοϋδρογόνωση του λινελαϊκού, το πρώτο στάδιο όπου το λινελαϊκό υδρογονώνεται σε βασσενικό με εμπλεκόμενα τα βακτήρια του είδους *Butyrivibrio fibrisolvens* και το δεύτερο στάδιο του κορεσμού του βασσενικού σε στεατικό οξύ από τα είδη *Fusocillus spp.*, *Butyrivibrio proteoclasticum*.

Συμπληρωματικά, αξίζει να αναφερθεί ότι το 2003 σε έρευνα των Van de Vossenberg και Joblin (2003), απομονώθηκε ένα στέλεχος των *Butyrivibrio hungatei* από τη μεγάλη κοιλία αγελάδας, το οποίο δημιουργεί στεατικό οξύ από λινελαϊκό χωρίς τη συνεργητική δράση άλλου μικροοργανισμού.

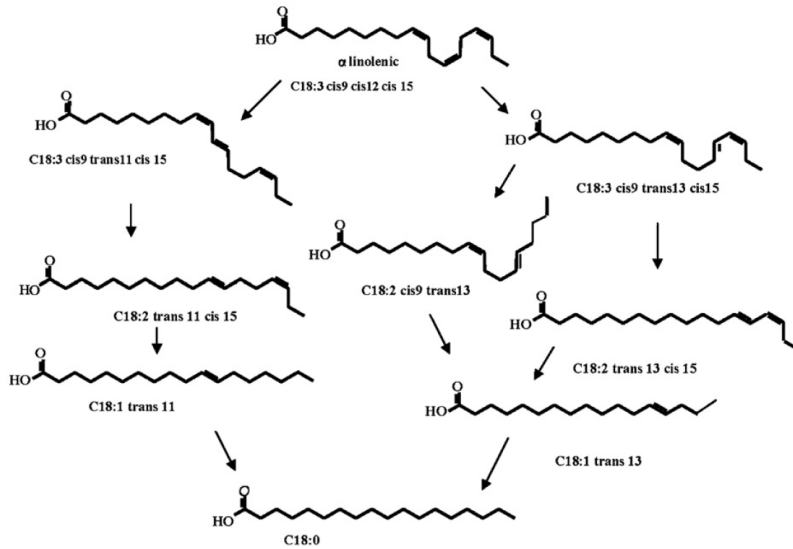


Σχήμα 2.10. Βιοϋδρογόνωση του λινελαϊκού οξέος (Buccioni *et al.*, 2012).

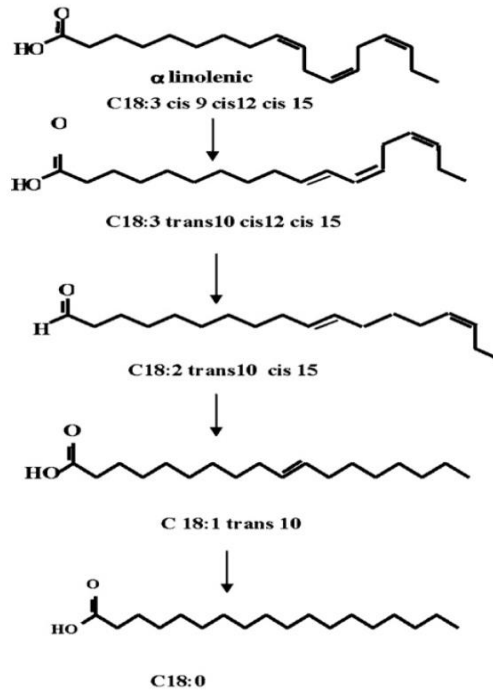
Βιβλιογραφική ανασκόπηση από τους Buccioni *et al.* (2012) αναφέρει πως σύμφωνα με τους Singh και Hawke (1979), η συνεισφορά των πρωτοζώων στη βιοϋδρογόνωση έγκειται στην πρόσληψη βακτηρίων. Ωστόσο, αργότερα, οι Devillard *et al.* (2004) παρατήρησαν ότι τα κύτταρα των πρωτοζώων εμπεριείχαν 4-5 φορές περισσότερο CLA και VA (βασσενικό οξύ) σε σχέση με τα βακτήρια. Λίγο αργότερα, έρευνα από τους ίδιους ερευνητές (Devillard *et al.*, 2006) έρχεται να διαλευκάνει τη συνεισφορά των πρωτοζώων στη βιοϋδρογόνωση αναφέροντας ότι τα πρωτόζωα στη μεγάλη κοιλιά δεν σχηματίζουν CLA και VA, αλλά είναι πολύ αποτελεσματικά στην ενσωμάτωση αυτών των λιπαρών οξέων, όπως προκύπτουν ως ενδιάμεσα από τη βιοϋδρογόνωση, από τα βακτήρια.

**Βιοϋδρογόνωση του λινολενικού οξέος** | Η βιοϋδρογόνωση του λινολενικού οξέος παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Reiser το 1951, όταν σε *in vitro* πείραμα με υγρό μεγάλης κοιλίας προβάτων και λινέλαιο παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης του λινολενικού οξέος και αύξηση της συγκέντρωσης των C<sub>18:2</sub> και C<sub>18:1</sub> ισομερών (Buccioni *et al.*, 2012). Τη δεκαετία του 1960, τρεις κυρίως έρευνες (Ward *et al.* (1964), Wilde και Dawson (1966) και Kepler *et al.* (1966), σύμφωνα με τους Buccioni *et al.* (2012), απέτελεσαν ορόσημο για την κατανόηση του μηχανισμού της βιοϋδρογόνωσης. Το 1967 οι Kepler και Tove απομόνωσαν την *cis-12*, *trans-11* ισομεράση από τους *Butyrivibrio fibrisolvens* και συμπέραναν ότι το ένζυμο αυτό μπορεί να είναι ενεργό στο λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ. Συγκεκριμένα, το πρώτο

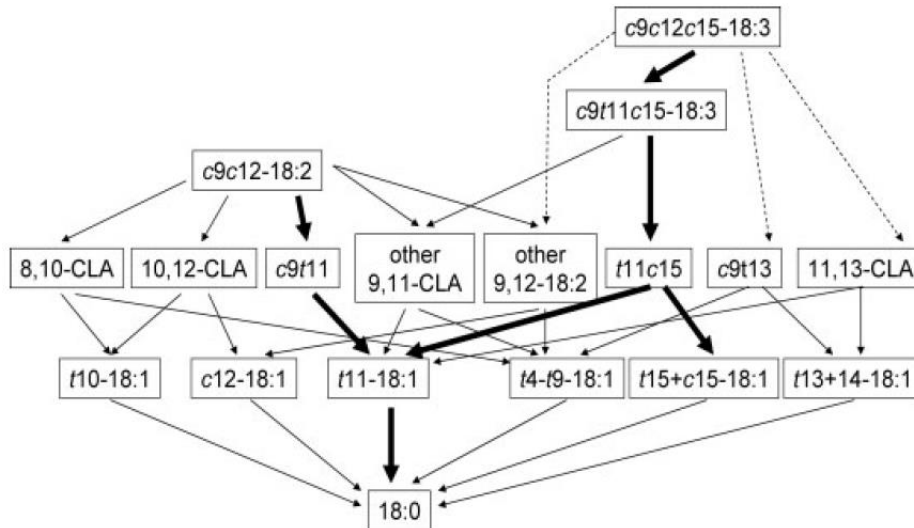
στάδιο της βιοϋδρογόνωσης του λινολενικού οξέος είναι ο ισομερισμός του 12<sup>ου</sup> δεσμού με πιθανά παράγωγα τα *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 C<sub>18:3</sub> και *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15 C<sub>18:3</sub> (Σχήμα 2.11).



Σχήμα 2.11. Βιοϋδρογόνωση των ισομερών του λινολενικού οξέος (Buccioni *et al.*, 2012).



Σχήμα 2.12. Βιοϋδρογόνωση του λινολενικού οξέος και παραγωγή *trans*-10 C<sub>18:1</sub> (Buccioni *et al.*, 2012).



Σχήμα 2.13. Βιοϋδρογόνωση του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος (Chilliard *et al.*, 2007).

**Λιπαρά οξέα μονής και διακλαδισμένης αλύσου** | Τα μονής και διακλαδισμένης αλύσου λιπαρά οξέα (OBCFA) στη μεγάλη κοιλία αποτελούνται κυρίως από *iso* C<sub>13:0</sub>, *anteiso* C<sub>13:0</sub>, *iso* C<sub>14:0</sub>, *iso* C<sub>15:0</sub>, *anteiso* C<sub>15:0</sub>, *iso* C<sub>16:0</sub>, *anteiso* C<sub>16:0</sub>, *iso* C<sub>17:0</sub>, *anteiso* C<sub>17:0</sub> (Vlaeminck *et al.*, 2004a, 2006a). Τα τελευταία χρόνια η μελέτη των μονής και διακλαδισμένης αλύσου λιπαρών οξέων αποκτά ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς θεωρείται μια μη επεμβατική πρακτική διάγνωσης των πεπτικών φαινομένων της μεγάλης κοιλίας (Vlaeminck *et al.*, 2006).

Η δημιουργία και η συγκέντρωση των μονής και διακλαδισμένης αλύσου λιπαρών οξέων εξαρτάται κυρίως από το λόγο του αμύλου προς τα κυτταρικά τοιχώματα, ο οποίος επηρεάζει την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού και κυρίως αυτών με κυτταρολυτικές ιδιότητες (Buccioni *et al.*, 2012).

Τα μονής αλύσου λιπαρά οξέα (OCFA) σχηματίζονται από επιμήκυνση του προπιονικού και του βαλερικού οξέος ενώ για τα διακλαδισμένης αλύσου λιπαρά οξέα (BSCFA) πρόδρομες ενώσεις είναι τα διακλαδισμένης αλύσου αμινοξέα βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη ή τα διακλαδισμένης αλύσου καρβοξυλικά οξέα (BSCFA) ισοβουτυρικό και ισοβαλερικό οξύ (Kaneda, 1991).

### 3. Επίδραση της συμπλήρωσης της διατροφής των μηρυκαστικών με PUFA

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, στόχος των επιστημόνων της διατροφής των ζώων και άλλων συναφών επιστημών είναι η τροποποίηση του μικροβιώματος της μεγάλης κοιλίας. Οι κυριότεροι μηχανισμοί επίτευξης αυτού αφορούν την προσθήκη ζωοτροφών πλούσιων σε ταννίνες, την προσθήκη αιθέριων ελαίων, την αναλογία των σιτηρεσίων σε άμυλο και NDF και την προσθήκη ζωοτροφών με υψηλή συγκέντρωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Ωστόσο, η παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση θα εστιάσει στην ενσωμάτωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη διατροφή των μηρυκαστικών, στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος, στο αντιοξειδωτικό σύστημα, στο προφίλ των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ειδικότερα, η μελέτη εμβαθύνει στην προσθήκη φυτικών ελαίων, ιχθυελαίων, ελαιούχων σπερμάτων και μικροφυκών στο σιτηρέσιο μηρυκαστικών ζώων (αιγών) και της επίδρασης στα παραπάνω.

Πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλύσου όπως το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA), εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA) και εικοσιδιπεντανοϊκό οξύ (DPA) μέχρι πρότινος αποτελούσαν αποκλειστικά τα ιχθυέλαια. Ωστόσο, η παρουσία δύο βασικών μειονεκτημάτων σε αυτά όπως η έντονη οσμή και η οξειδωτική αστάθεια τους περιορίζουν τη χρήση τους στη διατροφή των ζώων και στρέφουν το ενδιαφέρον των ερευνητών και της βιομηχανίας σε εναλλακτικές πηγές των σημαντικών αυτών βιομορίων (Yaakob *et al.*, 2014).

Τα **μικροφύκη** είναι γνωστά κυρίως για την παραγωγή βιοκαυσίμων, ωστόσο, τα τελευταία χρόνια διερευνώνται ως μια σημαντική πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και άλλων απαραίτητων θρεπτικών συστατικών όπως βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, χλωροφύλλες, καροτίνη και πολυφαινόλες τα οποία δύναται να αντικαταστήσουν τα τεχνητά συμπληρώματα διατροφής (Madeira *et al.* 2017).

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχονται στα μικροφύκη αποτελούν θρεπτικά συστατικά ανεκτίμητης αξίας τα οποία συνδέονται άμεσα με ευεργετικές ιδιότητες στη διατροφή του ανθρώπου καθώς οι ανάγκες αυτών των λιπαρών οξέων δεν καλύπτονται από συμβατικές τροφές. Αναφορικά, η ετεροτροφική καλλιέργεια του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* αναπτύσσει περιεκτικότητα σε εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA) 30-40% ενώ η αυτοτροφική καλλιέργεια μικροφυκών όπως το *Nannochloropsis* και το



*Phaeodactylum tricornutum* περιέχουν ως 39% εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA) (Madeira *et al.* 2017).

### **3.1. Επίδραση των PUFA στη χημική σύσταση και το προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος**

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της τροφής επηρεάζουν την παραγωγή των ενδιάμεσων ακόρεστων λιπαρών οξέων και τα τελικά προϊόντα της βιοϋδρογόνωσης, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2. Στο κεφάλαιο αυτό θα γίνει εκτενής αναφορά της βιβλιογραφίας για την επίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, με έμφαση αυτών με μεγάλο αριθμό ανθράκων και διπλών δεσμών του σιτηρεσίου, στο προφίλ των λιπαρών οξέων του αίματος, της μεγάλης κοιλίας και του γάλακτος καθώς και η επίδρασή τους στη βιοϋδρογόνωση και στη *de novo* σύνθεση στο μαστικό αδένα.

Η προσθήκη λιπών στη διατροφή των γαλακτοπαραγωγών μηρυκαστικών διερευνάται τις τελευταίες δεκαετίες με στόχο κυρίως την έκπτυξη της παραγωγικής ικανότητας και του ενεργειακού μεταβολισμού, καθώς και την τροποποίηση της χημικής σύστασης του γάλακτος και γενικότερα των προϊόντων (γάλα, κρέας κ.α.) (Chilliard *et al.*, 2007).

Το προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος αποτελείται σε ποσοστό περίπου 75% από κορεσμένα λιπαρά οξέα λόγω της βιοϋδρογόνωσης στη μεγάλη κοιλία. Τα τελευταία χρόνια, κλινικές μελέτες έχουν συνδέσει την πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων με την αύξηση των καρδιαγγειακών παθήσεων (Siri-Tarino *et al.*, 2010) με αποτέλεσμα τα γαλακτοκομικά προϊόντα να έχουν βρεθεί στο στόχαστρο διατροφολόγων και καταναλωτικού κοινού. Στον αντίποδα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία αποτελούν τη μειοψηφία στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος, φαίνεται να συνεισφέρουν στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων (Labert *et al.* 1998, Simopoulos, 1998), συμβάλουν στην ανάπτυξη και λειτουργία του εγκεφάλου (Albert *et al.* 1998, Simopoulos, 1998) και ρυθμίζουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών από το ανοσοποιητικό σύστημα (Calder, 2001). Ακόμα, σύμφωνα με τους Shingfield *et al.*, (2008) η συμβολή των γαλακτοκομικών προϊόντων στις ημερήσιες ανάγκες των ω3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε μια ισορροπημένη διατροφή είναι πολύ χαμηλή.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, στόχος των επιστημόνων είναι η τροποποίηση του προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος μέσω της διατροφής των μηρυκαστικών

προς την επιθυμητή, από πλευράς υγείας, για τον καταναλωτή κατεύθυνση. Η επίτευξη αυτού τα τελευταία χρόνια έχει διερευνηθεί κυρίως με την προσθήκη ελαιούχων σπερμάτων, φυτικών και θαλάσσιων ελαίων, μικροφυκών, τη χορήγηση βοσκήσιμης ύλης και της τροποποίησης του λόγου χονδροειδών προς συμπυκνωμένες ζωοτροφές.

Πίνακας 3.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο προφίλ των λιπαρών οξέων και στη χημική σύσταση του γάλακτος μηρυκαστικών

Συγγραφείς	Είδος ζώου	Επέμβαση	Δοσολογία	Επίδραση στη χημική σύσταση του γάλακτος	Επίδραση στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος
<b>Franklin <i>et al.</i>, 1999</b>	Αγελάδες	Μικροφύκη	910 g./ημέρα/ζώο	Λιποπεριεκτικότητα ↓ Στερεό υπόλειμμα ↓	C <sub>18:0</sub> ↓ cis-9 C <sub>18:1</sub> ↓ cis-9, trans-11 C <sub>18:2</sub> ↑ trans-10, cis-12 C <sub>18:2</sub> ↑ DHA ↑ SFA ↓ PUFA ↑
<b>Papadopoulos <i>et al.</i>, 2002</b>	Πρόβατα	Μικροφύκη	23.5, 47, 94 g./ημέρα/ζώο	Λιποπεριεκτικότητα ↑ Πρωτεϊνοπεριεκτικότητα ↑ Στερεό υπόλειμμα ↑	C <sub>18:0</sub> ↓ cis-9 C <sub>18:1</sub> ↓ C <sub>18:2n6</sub> ↓ DHA ↑ EPA ↑

<p><b>Bouattour et al., 2008</b></p>	<p>Αίγες</p>	<p>Σογιέλαιο</p>	<p>6% ΞΟ</p>	<p>Λιποπεριεκτικότητα ↑ Στερεό υπόλειμμα ↑</p>	<p>C<sub>18:0</sub> ↑ trans-11 C<sub>18:1</sub> ↑ cis-9 C<sub>18:1</sub> ↑ cis-9, trans-11 C<sub>18:2</sub> ↑ trans-10, cis-12 C<sub>18:2</sub> ↑ SFA ↓ MUFA ↑ PUFA ↑</p>
<p><b>Toral et al., 2009</b></p>	<p>Πρόβατα</p>	<p>Ηλιέλαιο/ μικροφύκη</p>	<p>25 g.+ /0, 8, 16, 24 g./ημέρα/ζώο</p>	<p>Λιποπεριεκτικότητα ↓ Στερεό υπόλειμμα ↓</p>	<p>C<sub>18:0</sub> ↓ trans-10 C<sub>18:1</sub> ↑ trans-11 C<sub>18:1</sub> ↑ cis-9 C<sub>18:1</sub> ↓ cis-9, trans-11 C<sub>18:2</sub> ↑ trans-10, cis-12 C<sub>18:2</sub> ↑ DHA ↑ EPA ↑</p>
<p><b>Bichi et al., 2013</b></p>	<p>Πρόβατα</p>	<p>Ηλιέλαιο/μικροφύκη</p>	<p>20 g. +/8 g. /Kg ΞΟ</p>	<p>Λιποπεριεκτικότητα ↓ Στερεό υπόλειμμα ↓</p>	<p>C<sub>18:0</sub> ↓ 10-OXO- C<sub>18:0</sub> ↑ trans-10 C<sub>18:1</sub> ↑</p>

					<i>cis-9</i> C <sub>18:1</sub> ↓ <i>cis-9, trans-11</i> C <sub>18:2</sub> ↑ <i>trans-10, cis-12</i> C <sub>18:2</sub> ↑ C <sub>20:4</sub> ↑ DHA ↑ EPA ↑ SFA ↓ MUFA ↑
<b>Tsiplakou &amp; Zervas 2013</b>	Αίγες	Σογιέλαιο/ιχθυέλαιο	5% /1% ΞΟ	Δεν επηρεάστηκαν	C <sub>18:0</sub> ↓ <i>trans</i> C <sub>18:1</sub> ↑ <i>cis-9</i> C <sub>18:1</sub> ↓ <i>cis-9, trans-11</i> C <sub>18:2</sub> ↑ <i>trans-10, cis-12</i> C <sub>18:2</sub> ↑ C <sub>18:2n6</sub> ↑ DHA ↑ EPA ↑
<b>Tsiplakou et al., 2017a</b>	Αίγες	Μικροφύκη	10 g./Kg ΣΖ ΞΟ	Δεν επηρεάστηκαν	C <sub>16:0</sub> ↓ <i>trans-11</i> C <sub>18:1</sub> ↓ <i>cis-9, trans-11</i> C <sub>18:2</sub> ↓

<b>Tsiplakou et al., 2017b</b>	Αίγες	Μικροφύκη	10 g./Kg ΣΖ ΞΟ	Δεν επηρεάστηκαν	Δεν επηρεάστηκαν
<b>Kholif et al., 2017</b>	Αίγες	Μικροφύκη	5/10 g./ημέρα/ζώο	Ημερ. Παράγ. λίπους ↑ Ημερ. Παράγ. πρωτεΐνης ↑	C <sub>18:0</sub> ↓ cis-9 C <sub>18:1</sub> ↑ cis-9, trans-11 C <sub>18:2</sub> ↑ C <sub>18:3n3</sub> ↑ SFA ↓ UNFA ↑ PUFA ↑
<b>Antonacci et al., 2017</b>	Αγελάδες	Σογιέλαιο/λινέλαιο	4% ΞΟ	Λιποπεριεκτικότητα ↓ Στερεό υπόλειμμα ↓ Γαλακτοπαραγωγή ↑	trans-11 C <sub>18:1</sub> ↑ cis-9 C <sub>18:1</sub> ↑ cis-9, trans-11 C <sub>18:2</sub> ↑ SFA ↓ MUFA ↑ PUFA ↑

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη διατροφή των μηρυκαστικών, στη χημική σύσταση και στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος από δημοσιευμένες εργασίες των τελευταίων ετών.

Ειδικότερα, σε πειραματική εργασία των Bichi *et al.* (2013) σε πρόβατα γαλακτοπαραγωγής, έγινε προσθήκη 25 g ηλιελαίου ανά κιλό ξηράς ουσίας σιτηρεσίου και 0 ή 8 g ανά κιλό ξηράς ουσίας μικροφυκών πλούσιων σε εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA). Η λιποπεριεκτικότητα και η ημερήσια παραγωγή λίπους του γάλακτος μειώθηκαν σημαντικά με αποτέλεσμα τη μείωση του ολικού στερεού υπολείμματος. Στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των C<sub>6:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, *cis*-9 C<sub>18:1</sub> και των SFA ενώ αντίθετα αυξήθηκαν τα, C<sub>14:0</sub>, 10-ΟΧΟ-C<sub>18:0</sub>, *trans*-10 C<sub>18:1</sub>, *trans*-11 C<sub>18:1</sub> (VA), *cis*-9, *trans*-11 C<sub>18:2</sub> (CLA), *trans*-10, *cis*-12 C<sub>18:2</sub> (CLA), C<sub>20:4</sub> (ARA), C<sub>20:5</sub> (EPA), C<sub>22:5n6</sub>, C<sub>22:5n3</sub> (DPA), C<sub>22:6n3</sub> (DHA) και τα PUFA. Οι συγγραφείς αποδίδουν τη μείωση της λιποπεριεκτικότητας στην προσθήκη των μικροφυκών (σύνδρομο της μειωμένης λιποπεριεκτικότητας, MFD, milk fat depression) η οποία παρατηρείται σε μηρυκαστικά των οποίων η διατροφή γίνεται είτε με σιτηρέσια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είτε με σιτηρέσια πλούσια σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές. Η μείωση της λιποπεριεκτικότητας οφείλεται στη μείωση των κυτταρολυτικών μικροοργανισμών με αποτέλεσμα τη μείωση του οξικού οξέος. Ακόμα, σύμφωνα με τους συγγραφείς, η πιθανή μερική αναστολή της βιοϋδρογόνωσης μείωσε τη συγκέντρωση του ελαϊκού οξέος C<sub>18:1 cis-9</sub> στη μεγάλη κοιλία και ως ακολούθως στο γάλα, καθώς και τη διαθεσιμότητα του στεατικού οξέος ως υπόστρωμα της Δ<sup>-9</sup> αφυδρογόνωσης στο μαστικό αδένια για παραγωγή ελαϊκού οξέος. Η σημαντικότητα αυτού έγκειται στο ρυθμιστικό ρόλο του ελαϊκού οξέος στη ρευστότητα των λιποσφαιρίων από τα εκκριτικά κύτταρα και στην έκκριση του λίπους στο μαστικό αδένια (Timmen και Patton, 1988; Gama *et al.*, 2008).

Εν συνεχεία, σε πειραματική εργασία των Bouattour *et al.* (2008) στο σιτηρέσιο γαλακτοπαραγωγών αιγών ενσωματώθηκε 6% σογιέλαιο επί των συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Η λιποπεριεκτικότητα και η ημερήσια παραγωγή λίπους του γάλακτος αυξήθηκαν σημαντικά με αποτέλεσμα την αύξηση του ολικού στερεού υπολείμματος. Στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των C<sub>10:0</sub>, C<sub>12:0</sub>, C<sub>14:0</sub>, C<sub>15:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, μικρής αλύσου λιπαρών οξέων (SCFA), μεσαίας αλύσου λιπαρών οξέων (MCFA) και SFA, ενώ αυξήθηκαν τα C<sub>18:0</sub>, *cis*-9 C<sub>18:1</sub>, *trans*-11 C<sub>18:1</sub> (VA),

CLA, μακράς αλύσου λιπαρά οξέα (LCFA), USFA, PUFA και MUFA. Συγκριτικά με την παραπάνω μελέτη των Bichi *et al.* (2013) παρατηρούνται εκ διαμέτρου αντίθετα αποτελέσματα τόσο στο προφίλ των λιπαρών οξέων όσο και τη χημική σύσταση του γάλακτος.

Πιο συγκεκριμένα, στην πρώτη μελέτη των Bichi *et al.* (2013) το προφίλ των λιπαρών οξέων στο προστιθέμενο με μικροφύκη σιτηρέσιο ήταν πλούσιο σε DHA λιπαρά οξέα ενώ περιείχε μικρότερη συγκέντρωση ελαϊκού και λινολεϊκού οξέος σε σχέση με την άλλη ομάδα (χωρίς μικροφύκος). Τα πολυακόρεστα αυτά μακράς αλύσου λιπαρά οξέα (DHA) ανέστειλαν, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τη διαδικασία της βιοϋδρογόνωσης με κύριο αποτέλεσμα τη μείωση του στεατικού οξέος. Στη μελέτη των Bouattour *et al.* (2008), στο σιτηρέσιο της ομάδας της διατροφικής επέμβασης του σογιελαίου παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση του στεατικού και του ελαϊκού οξέος καθώς και του λινολεϊκού. Τα λιπαρά οξέα αυτά δεν επηρέασαν τη λειτουργία της βιοϋδρογόνωσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή αυξημένης συγκέντρωσης στεατικού οξέος το οποίο χρησιμοποιήθηκε στο μαστικό αδέννα για τη σύνθεση του ελαϊκού και την έκκριση των λιποσφαιρίων, όπως περιγράφηκε παραπάνω με αποτέλεσμα την αύξηση της λιποπεριεκτικότητας.

Επιπλέον, η μείωση των μικρής και μεσαίας αλύσου λιπαρών οξέων τα οποία συντίθενται στο μαστικό αδέννα (*de novo*) οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση των μακράς αλύσου λιπαρών οξέων (στεατικό οξύ) που εισέρχονται στο μαστό από το αίμα μέσω των πρωτεϊνών στενού συνδέσμου (blood-mammary gland barrier) και ανταγωνίζονται τη σύνθεση των πρώτων (Chilliard *et al.*, 2003).

Ακόμα, οι Toral *et al.*, (2009) διερεύνησαν την επίδραση της προσθήκης ηλιελαίου μόνου ή σε συνδυασμό με 8, 16 ή 24 g μικροφυκών πλούσιων σε DHA, ανά κιλό ξηράς ουσίας στο σιτηρέσιο γαλακτοπαραγωγών προβάτων. Όσον αφορά τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην ομάδα όπου προστέθηκε το ηλιέλαιο σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ στις ομάδες της προσθήκης του μικροφύκου παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ανάλογη της αύξησης της προσθήκης του μικροφύκου. Τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής εργασίας επιβεβαιώνουν τα προαναφερθέντα από τις εργασίες των Bichi *et al.*, (2013) και των Bouattour *et al.*, (2008) αποτελέσματα και τη διαφορετική επίδραση της προσθήκης πολυακόρεστων



λιπαρών οξέων με κυρίαρχα αυτά των θαλάσσιων πηγών (DHA, EPA, DPA) και αυτών των ελαιούχων σπερμάτων (ελαϊκό, λινελαϊκό, λινολενικό).

Όσον αφορά το προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος και συγκεκριμένα των C<sub>18</sub> ΛΟ στην εργασία των Total *et al.* (2009) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του στεατικού και ελαϊκού οξέος με την προσθήκη του ηλιελαίου, ενώ η συγκέντρωση αυτών μειώθηκε σημαντικά με την προσθήκη μικροφυκών.

Σε πειραματική εργασία των Tsiplakou & Zervas (2013) στην οποία διερευνήθηκε η επίδραση της ταυτόχρονης προσθήκης 5% σογυελαίου και 1% ιχθυελαίου στη διατροφή γαλακτοπαραγωγών αιγών, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση όσον αφορά τη χημική σύσταση του γάλακτος. Οι συγγραφείς αναφέρουν πως σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η προσθήκη ιχθυελαίων μειώνει τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος σε αντίθεση με την προσθήκη φυτικών ελαίων η οποία είτε αυξάνει είτε δεν επηρεάζει τη λιποπεριεκτικότητα. Συμπερασματικά, το γεγονός ότι η χημική σύσταση παραμένει ανεπηρέαστη, πιθανότατα να οφείλεται στην αντίρροπη δράση των δύο διαφορετικού προφίλ λιπαρών οξέων ελαίων στη διατροφή των αιγών. Ωστόσο, στο προφίλ των λιπαρών οξέων παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του στεατικού οξέος και αύξηση του βασσενικού χωρίς να επηρεαστεί η συγκέντρωση του ελαϊκού.

Επιπλέον, σε πειραματική εργασία των Franklin *et al.* (1999), οι οποίοι διερεύνησαν την επίδραση της προσθήκης 910 g/ αγελάδα /ημέρα του μικροφύκους *Schizochytrium sp*, σε προστατευμένη και μη, από τη βιοϋδρογόνωση στη μεγάλη κοιλία, μορφή παρατήρησαν σημαντική μείωση της λιποπεριεκτικότητας και για τις δύο μορφές χορήγησης του μικροφύκους σε σχέση με το μάρτυρα. Στο προφίλ των λιπαρών οξέων παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του στεατικού και ελαϊκού οξέος, ενώ τα ισομερή του CLA και τα *trans* C<sub>18:1</sub> αυξήθηκαν σημαντικά. Ωστόσο, οι συγγραφείς της μελέτης αυτής δεν σχολιάζουν τον πιθανό λόγο για τον οποίο τα αποτελέσματα των προστατευμένων μικροφυκών είναι όμοια και δεν διαφέρουν σημαντικά με αυτά των μη προστατευμένων.

Σε εργασία των Papadopoulos *et al.*, (2002) διερευνήθηκε η επίδραση της προσθήκης 23,5, 47 και 94 g/ ζώο/ ημέρα του μικροφύκους *Schizochytrium sp*, στη διατροφή γαλακτοπαραγωγών προβατινών. Η προσθήκη των 94 g ανά ζώο και ημέρα του μικροφύκους αύξησε τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος ενώ μείωσε την περιεκτικότητα του γάλακτος σε λακτόζη. Όσον αφορά το προφίλ των λιπαρών οξέων

του γάλακτος παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του στεατικού και λινολεϊκού οξέος, ενώ αντίθετα αυξήθηκε η συγκέντρωση του παλμιτικού. Το ελαϊκό οξύ μειώθηκε στην ομάδα της υψηλής συμμετοχής του μικροφύκου ενώ δεν επηρεάστηκε για τις υπόλοιπες. Οι συγγραφείς συσχετίζουν την αύξηση του παλμιτικού οξέος του γάλακτος με την πρόσληψη του μικροφύκου καθώς το 50% του παλμιτικού οξέος του γάλακτος προέρχεται από το αίμα. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Chilliard *et al.* (2003) και της δεδομένης μειωμένης συγκέντρωσης του στεατικού οξέος στο γάλα της μελέτης των Papadopoulos *et al.* (2002), πιθανόν η μικρότερη συγκέντρωση μακράς αλύσου λιπαρών οξέων στο μαστικό αδένια ευνόησε τη de novo σύνθεση μεσαίας αλύσου λιπαρών οξέων.

Οι Tsiplakou *et al.* (2017a, b) διερεύνησαν την επίδραση δύο ειδών του μικροφύκου *Chlorella (vulgaris και pyrenoidosa)* στη διατροφή γαλακτοπαραγωγών αιγών. Η συμπλήρωση των σιτηρεσίων με 10 g *Chlorella vulgaris* ή *Chlorella pyrenoidosa* ανά κιλό συμπυκνωμένων ζωοτροφών δεν επηρέασε τη χημική σύσταση του γάλακτος, ενώ στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος η προσθήκη της *Chlorella vulgaris* μείωσε τη συγκέντρωση του συνόλου των *trans* C<sub>18:1</sub> και των CLA. Ωστόσο, οι δύο αυτές πειραματικές εργασίες αφορούν την προσθήκη ενός κυανοπράσινου μικροφύκου το οποίο παρά την υψηλή περιεκτικότητά του σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, χαρακτηρίζεται από μειωμένη λιποπεριεκτικότητα (1,1% στη συγκεκριμένη μελέτη).

Ακόμα, μια μελέτη από του Kholif *et al.* (2017), διερεύνησε την επίδραση της προσθήκης 5 και 10 g ανά ζώο ανά ημέρα του μικροφύκου *Chlorella vulgaris* στο σιτηρέσιο αιγών. Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος μειώθηκε σημαντικά με την προσθήκη των μικροφυκών, ενώ η ημερήσια παραγωγή λίπους και πρωτεΐνης αυξήθηκε λόγω της σημαντικής αύξησης της γαλακτοπαραγωγής. Στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του ελαϊκού, του CLA, των ακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ενώ στον αντίποδα μειώθηκαν το στεατικό οξύ και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα.

Σε πειραματική εργασία των Antonacci *et al.* (2017) διερευνήθηκε η επίδραση της προσθήκης 4% σογυλαίου επί της συνολικής προσληφθείσας ξηρής ουσίας ή/και λινελαίου και τριών διαφορετικών αναλογιών τους (25/75, 50/50, 75/25). Όσον αφορά τη χημική σύσταση του γάλακτος, ο συνδυασμός σογυλαίου/λινελαίου 50/50 μείωσε

σημαντικά τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος. Στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του στεατικού οξέος για την επέμβαση 25/75 σογιέλαιο/λινέλαιο, αύξηση των *trans-10* C<sub>18:1</sub> σε όλες τις διατροφικές επεμβάσεις ελαίων και τέλος, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του ελαϊκού οξέος για την ομάδα προσθήκης λινελαίου.

### **3.2. Επίδραση των PUFA στο προφίλ των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας**

Όπως αναφέρθηκε στα κεφάλαια 2.3., 2.5. και το 3.1. οι μικροοργανισμοί (βακτήρια, πρωτόζωα, μύκητες) της μεγάλης κοιλίας παίζουν καθοριστικό ρόλο στα ζυμωτικά φαινόμενα και το προφίλ τους δύναται να συσχετίζεται με τη σύσταση των προϊόντων. Το προφίλ των μικροοργανισμών με τη σειρά του τροποποιείται από την επίδραση της διατροφής και κυρίως από διατροφικές επεμβάσεις προσθήκης λίπους ή ελαίων, την τροποποίηση του λόγου XZ/ΣZ, την προσθήκη ζωοτροφών πλούσιων σε ταννίνες, την προσθήκη **PUFA**, κá.

Καθώς στα προηγούμενα κεφάλαια έγινε εκτενής αναφορά των μικροοργανισμών που αποικούν τη μεγάλη κοιλία και της συμβολής τους στο μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών, στο παρόν κεφάλαιο εστιάζεται στην επίδραση των **PUFA**, κυρίως από μικροφύκη, στο προφίλ των κυριότερων μικροοργανισμών στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών.

Πίνακας 3.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο προφίλ των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας

Συγγραφείς	Είδος ζώου	Επέμβαση	Δοσολογία	Βακτήρια	Πρωτόζωα	Μύκητες
<b>Boeckert <i>et al.</i> (2007)</b>	Αγελάδες	Μικροφύκη DHA gold	2% του σιτηρεσίου ή 350g/αγελάδα/ημέρα	- <i>Butyrivibrio</i>	<i>Isotricha</i> ↓ <i>prostoma</i> ↓ <i>I. intestinalis</i> ↓ <i>Epidinium</i> <i>caudatum</i> ↓	
<b>Boeckert <i>et al.</i> (2008)</b>	Αγελάδες	Μικροφύκη DHA gold	220g/αγελάδα/ημέρα	- <i>Butyrivibrio</i>	-Πρωτόζωα	
<b>Fernando <i>et al.</i> (2010)</b>	Μόσχοι	XZ/ΣZ	1) 80:20 2) 60:40 3) 40:60 4) 20:80	↑ <i>Fibrobacteres</i> (1, 2) ↓ <i>Bacteroidetes</i> (1, 2) ↓ ↑ <i>Prevotella</i> (3, 4) ↑ <i>Clostridiaceae</i> (3, 4) ↑ <i>Bacteroidetes</i> spp. (3, 4) ↑ <i>Megasphaera elsdenii</i> (3, 4)		

				<p>↑ <i>Streptococcus bovis</i> (3, 4)</p> <p>↑ <i>Selenomonas Ruminantium</i> (3, 4)</p> <p>↑ <i>Prevotella bryantii</i> (3, 4)</p> <p>↓ <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> (3, 4)</p> <p>↓ <i>Fibrobacter succinogenes</i> (3, 4)</p>		
<b>Shingfield et al. (2012)</b>	Αγελάδες	Ιχθυέλαιο	0, 75, 150 και 300g αγελάδα/ημέρα	<p>-<i>B. proteoclasticus</i></p> <p>↓ <i>B. fibrisolvens</i> +<i>Pseudobutyrvibrio</i></p> <p>-<i>S. bovis</i></p>	-Πρωτόζωα	

<p><b>Ivan et al. (2013)</b></p>	<p>Αγελάδες</p>	<p>Λινελαϊκό ή/και Λινολενικό οξύ</p>	<p>5%/Kg ΞΟ</p>	<p>- <i>Methanogens</i> ↓ <i>F. succinogenes</i> ↑ <i>R. flavefaciens</i> ↑ <i>Ruminococcus albus</i></p>	<p>↓ Πρωτόζωα</p>	
<p><b>Castro-Carrera et al. (2014)</b></p>	<p>Πρόβατα</p>	<p>Μικροφύκη DHA gold</p>	<p>8g/Kg ΞΟ</p>	<p>↓ <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Paludibacter</i> ↓ ↑ <i>Clostridium</i>  -<i>Butyrivibrio</i>  -<i>Pseudobutyrvibrio</i> ↑ <i>Succinivibrionaceae</i></p>		
<p><b>Abuelfatah et al. (2016)</b></p>	<p>Αίγες</p>	<p>Λιναρόσπορος</p>	<p>0, 10 και 20%</p>	<p>↓ Πληθυσμός βακτηρίων ↓ <i>R. flavefaciens</i> ↓ <i>F. succinogenes</i> ↓ <i>Methanogens</i> ↓</p>	<p>↓ Πρωτόζωα</p>	

<p><b>Tsiplakou <i>et al.</i>, (2017)</b></p>	<p>Αίγες</p>	<p>Μικροφύκη <i>Chlorella vulgaris</i></p>	<p>10 γ./Kg ΣΖ ΞΟ</p>	<p>↑ <i>M. stadtmanae</i> ↑ <i>M. ruminantium</i> ↑ <i>Methanogens</i> ↑ <i>B. fibrisolvens</i> ↓ <i>Ruminococcus albus</i> ↑ <i>Clostridium sticklandii</i></p>	<p>↑ Πρωτόζωα</p>	<p>-Μύκητες</p>
<p><b>Dewanckele <i>et al.</i> (2018)</b></p>	<p>Ερίφια</p>	<p>Μικροφύκη DHA gold</p>	<p>0,28g/Kg ΣΒ</p>	<p>↑ <i>Succinivibrionaceae</i> ↑ <i>Paraprevotellaceae</i> ↓ <i>Ruminococcaceae</i> ↓ <i>Acidaminococcus</i> ↑ <i>Selenomonas</i> ↑ <i>Succiniclasticum</i> ↓ <i>Pirellulaceae</i> ↑ <i>Butyrivibrio</i></p>		

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται τα σημαντικότερα αποτελέσματα της επίδρασης ορισμένων διατροφικών επεμβάσεων, παραπλήσιων με την παρούσα μελέτη, στο προφίλ των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών.

Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθενται τα αποτελέσματα όπως παρουσιάστηκαν από τους συγγραφείς. Ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων, διαφορετικών πειραματικών σχεδιασμών, μοιάζει πρακτικά αδύνατος καθώς η μελέτη του μικροβιώματος, και ιδίως η ολιστική μελέτη του, αποτελεί μια πολύ πρόσφατη προσέγγιση που έγινε κυρίως εφικτή με την εισαγωγή της αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS).

Σύμφωνα με τους Henderson *et al.* (2013), το προφίλ των μικροοργανισμών του υγρού της μεγάλης κοιλίας αγελάδων και προβάτων διέφερε σημαντικά με βάση τον παράγοντα απομόνωση DNA. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις μεταξύ μηχανικής και χημικής απομόνωσης του DNA. Ωστόσο, αξιοσημείωτο είναι πως ακόμα και μέθοδοι απομόνωσης που ακολουθούσαν την ίδια αρχή και πραγματοποιήθηκαν από εμπορικά κιτ διαφορετικών εταιριών έδωσαν διαφορετικά δεδομένα. Όσον αφορά τον τρόπο συλλογής του υγρού (από του στόματος ή μέσω φίστουλα μεγάλης κοιλίας), παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση στο προφίλ των μικροοργανισμών. Επιπλέον, στην εργασία των Castro-Carrera *et al.* (2014) σημαντική επίδραση παρατηρήθηκε στο προφίλ των βακτηρίων που μελετήθηκε ανάμεσα σε αυτά που απομονώθηκαν από υγρό μεγάλης κοιλίας και αυτά που ήταν προσδεμένα σε στερεά.

Η πρόσφατη εργασία των Dewanckele *et al.* (2018) έρχεται να υπενθυμίσει τις περιορισμένες γνώσεις στο μικροβίωμα των μηρυκαστικών με τα ανατρεπτικά της αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η χορήγηση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από το μικροφύκος *Schizochytrium* sp. που ενσωματώθηκε στα σιτηρέσια αγών, προκάλεσε μεταβολές στο μικροβίωμα των εριφίων τους, τα οποία απογαλακτίστηκαν από την πρώτη ημέρα.

Συμπληρωματικά, η εργασία των Abuelfatah *et al.* (2016) με την προσθήκη λιναρόσπορου, στη διατροφή αγών και αυτή των Ivan *et al.* (2013) με την προσθήκη λινελαϊκού και λινολενικού οξέος στη διατροφή αγελάδων, σύμφωνα με τους γνωστούς φυσιολογικούς μηχανισμούς της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, αναμένετο να δώσουν αποτελέσματα κοινής κατεύθυνσης. Ωστόσο, στο πληθυσμό των *R. flavefaciens* παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντικά αντίρροπη κατεύθυνση ανάμεσα στους δύο πειραματισμούς.



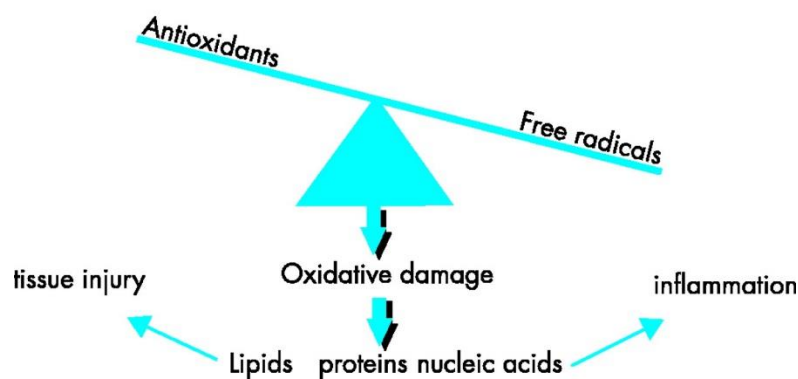
Τέλος, η επιστημονική κοινότητα διχάζεται στο κατά πόσο η αλληλούχιση ενισχυμένων απλικονίων ή η απευθείας αλληλούχιση των απομονωθέντων γονιδιωμάτων (shotgun sequencing) ενδείκνυται για τη σωστή άντληση πληροφοριών.

Συμπερασματικά, η μεγάλη κοιλία παρουσιάζει ένα πολύπλοκο σύστημα υψηλής δυναμικής και με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με την τροποποίηση του μικροβιώματος, η σύγκριση μεταξύ πειραματισμών, μεθόδων συλλογής δείγματος, απομόνωση γονιδιωμάτων και ζώων πιθανόν να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Η έρευνα του μικροβιώματος βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο καθώς απαιτεί έναν μεγάλο όγκο δεδομένων με βάση τα οποία θα γίνει μοντελοποίηση του μικροβιώματος και θα καθίσταται δυνατός ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων με μεγάλη ακρίβεια (Ungerfeld & Newbold, 2018).

### 3.3. Επίδραση των PUFA στην οξειδωτική κατάσταση του ζώου και του γάλακτος

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η προσθήκη τροφών πλούσιων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στη διατροφή των μηρυκαστικών αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική τροποποίησης των λιπαρών οξέων προς την επιθυμητή, από πλευράς υγείας του καταναλωτή κατεύθυνση. Ωστόσο, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι επιρρεπή στη μη ενζυμική (φωτοοξείδωση και αυτοοξείδωση) και ενζυμική οξείδωση όπου οι κυκλοξυγενάσες (COXs), οι λιποξυγενάσες (LOXs) και το κυτόχρωμα P450 (CYPs) οξειδώνουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και παράγουν διάφορους μεταβολίτες οι οποίοι προκαλούν οξειδωτικό στρες (Ταο, 2015).

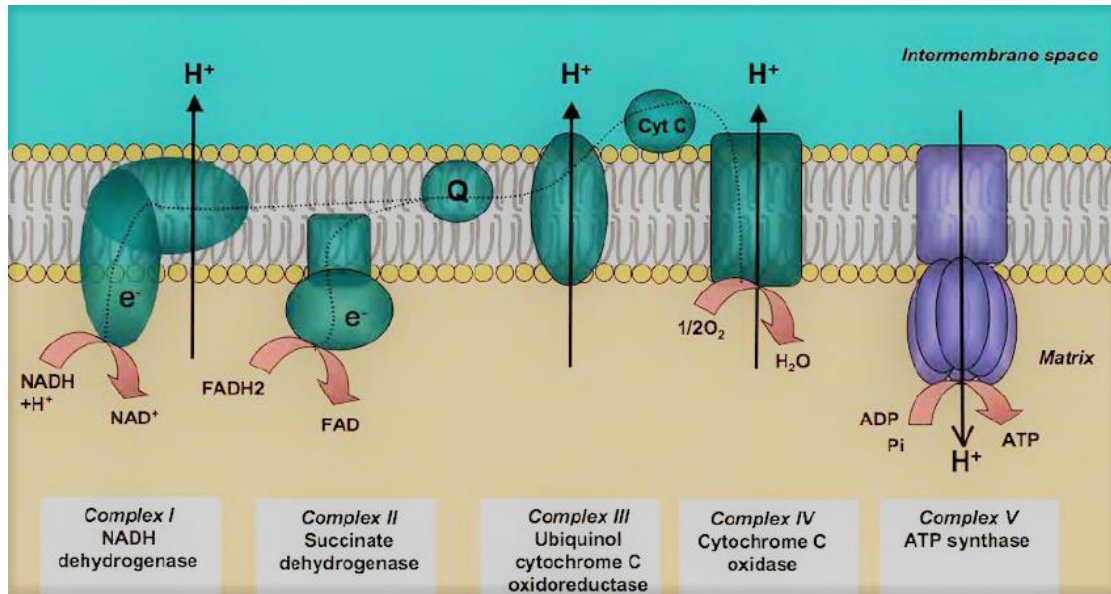
Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως διαταραχή της ισορροπίας των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών σε κυτταρικό επίπεδο (Lykkesfeldt και Svendsen, 2007) (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1. Απεικόνιση της ισορροπίας αντιοξειδωτικών και οξειδωτικών (Frank, 2003)

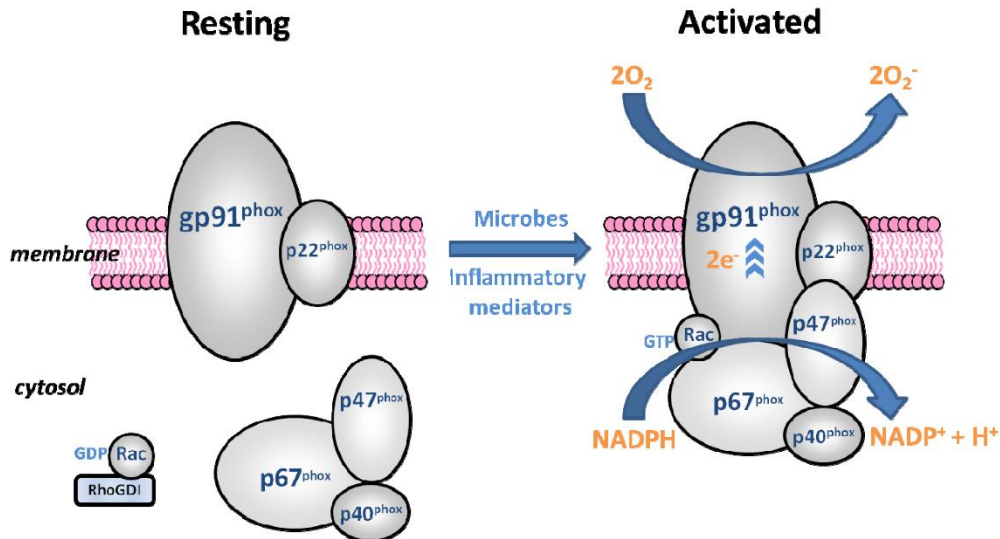
Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) όπως το ανιόν του υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ), το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και οι ρίζες υδροξυλίου ( $OH\cdot$ ) σχηματίζονται από τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις του οξυγόνου στα κύτταρα (Rey *et al.*, 2012). Η δραστικότερη ελεύθερη ρίζα οξυγόνου είναι το ανιόν του υπεροξειδίου το οποίο κατά κύριο λόγο δημιουργείται ως παραπροϊόν της αναπνευστικής αλύσου (Schonfeld και Wojtczak 2007). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού με μεγάλη ειδικότητα (οι μηχανισμοί αυτοί θα αναφερθούν στη συνέχεια) δύναται να εξουδετερώνει αυτή τη δραστική ρίζα οξυγόνου σε λιγότερο επιβλαβή. Ωστόσο, η προσθήκη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων καθώς και παλμιτικού οξέος φαίνεται να αυξάνει το ρυθμό της αλύσου μεταφοράς

ηλεκτρονίων (Σχήμα 3.2) και κατ' επέκταση τα υποπροϊόντα της (ανιόν του υπεροξειδίου) (Gao *et al.*, 2014; Arrigo *et al.*, 2015).



Σχήμα 3.2. Απεικόνιση της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας αποτελούμενη από το σύμπλοκο I: NADH αφυδρογονάση, σύμπλοκο II: αφυδρογονάση του ηλεκτρικού, σύμπλοκο III: ουβικινόνη-κυτοχρωμική οξειδωαναγωγή, σύμπλοκο IV: κυτοχρωμική οξειδάση και το σύμπλοκο V: ATP συνθετάση. Τροποποιημένη από Bellance *et al.* (2009).

Επιπλέον, πέραν της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, το παλμιτικό οξύ δύναται να εμπλέκεται στη δημιουργία του ανιόντος του υπεροξειδίου μέσω του ενζύμου NADPH οξειδάση (Lambertucci *et al.*, 2008). Η NADPH οξειδάση αποτελεί ένα σύμπλοκο μεμβρανικού ενζύμου το οποίο αποτελείται από πέντε υπομονάδες, οι δύο κυριότερες των οποίων, gp91<sup>phox</sup> και p22<sup>phox</sup> βρίσκονται εγκάρσια στις κυτταρικές μεμβράνες και αποτελούν το ετεροδιμερές φλαβοκυτόχρωμα b<sub>558</sub> και τις τρεις υπομονάδες εντός του κυτοπλάσματος p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> και p47<sup>phox</sup> (Sagi & Fluhr 2001) (Σχήμα 3.3). Το σύμπλεγμα αυτό της NADPH οξειδάσης εμπλέκεται στην οξείδωση του συνενζύμου NADPH για την παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου (Sordillo & Aitken, 2009).



Σχήμα 3.3. Σχηματική απεικόνιση του συμπλέγματος του ενζύμου NADPH οξειδάσης. Αριστερά η μη ενεργοποιημένη κατάσταση, δεξιά το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα προς παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου (McCann & Roulston, 2013).

Συμπερασματικά, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και το παλμιτικό οξύ φαίνεται να επηρεάζουν την παραγωγή της δραστικότερης ρίζας οξυγόνου, το ανιόν του υπεροξειδίου, μέσω της επίδρασης στη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσού και της NADPH οξειδάσης αντίστοιχα.

Το παραχθέν αυτό ανιόν του υπεροξειδίου μετά την παραγωγή του έχει τρεις τύχες στον οργανισμό (από πλευράς οξειδωαναγωγικών αντιδράσεων που αφορούν το αντιοξειδωτικό σύστημα) (Das & Roychoudhury, 2014, Winterbourn, 1995). Η πρώτη αφορά την αντίδραση Haber Weiss ως εξής:



Σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση το ανιόν του υπεροξειδίου εξουδετερώνεται σε οξυγόνο καθώς ο τρισθενής σίδηρος ανάγεται σε δισθενή.

Η δεύτερη αφορά τη δεύτερη πτυχή της αντίδρασης Fenton ως εξής:



Σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση, το ανιόν του υπεροξειδίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου μετατρέπονται σε μια πολύ ασταθή και επιβλαβή ελεύθερη ρίζα, τη ρίζα υδροξυλίου.

Η Τρίτη, και τελευταία, τύχη του ανιόντος του υπεροξειδίου αποτελεί την πρώτη γραμμή αντιμετώπισης του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες, τη δράση του ενζύμου δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD):



Το παραχθέν υπεροξείδιο του υδρογόνου από την αντιοξειδωτική δράση της δεσμουτάσης του υπεροξειδίου αποτελεί, επίσης, μια δραστική ρίζα οξυγόνου. Ωστόσο θεωρείται λιγότερο επιβλαβής και ασταθής από το ανιόν του υπεροξειδίου.

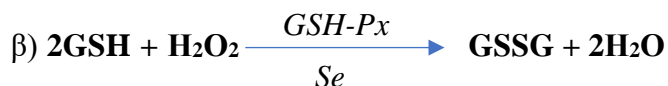
Στη συνέχεια, το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να ακολουθήσει διαφορετικά μονοπάτια οξειδωαναγωγικών αντιδράσεων.

Το πρώτο μονοπάτι αποτελείται και πάλι από την αντίδραση Fenton:



δημιουργώντας την επιβλαβή ρίζα υδροξυλίου.

Η εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μη επιβλαβή μορφή μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο διαφορετικά αντιοξειδωτικά ένζυμα: α) την καταλάση (CAT) και β) την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px) (Yu, 1994).



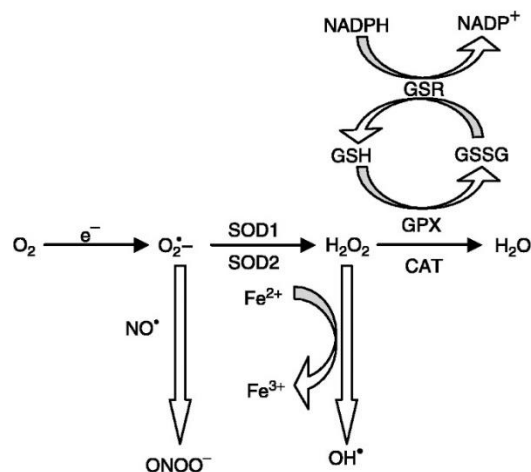
Όπως προκύπτει από την αντίδραση β) η δράση του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την ανηγμένη (μη οξειδωμένη μορφή) γλουταθειόνης για να εξουδετερώσει το υπεροξείδιο του υδρογόνου, παράγοντας οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Στο σημείο αυτό συναντάται άλλο ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο, η αναγωγάση της γλουταθειόνης, η γνωστή και ως ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR), με ρόλο την ανακύκλωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε ανηγμένη προκειμένου να επαναχρησιμοποιηθεί (Tsiplakou *et al.*, 2017d).



Τέλος, για τους κυριότερους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική ομοιοστασία διαδραματίζει η μεταφορά της γλουταθειόνης (GST). Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για την απενεργοποίηση και τη μεταφορά εκτός κυττάρου των ηλεκτόφιλων ενώσεων, και με μεγαλύτερη σημασία για την παρούσα μελέτη των λιπιδικών υπεροξειδασών που σχηματίζονται από τη δράση των παραχθέντων ριζών υδροξυλίου, όπως περιγράφεται παραπάνω, κυρίως στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Board and Menon, 2013; Labrou *et al.*, 2015).



Όπου: LOOH=λιπιδικές ρίζες υπεροξειδίου, ROOR=οργανικά υπεροξείδια, ROH=αλκοόλες.



Σχήμα 3.4. Απλουστευμένη ολιστική αναπαράσταση του αντιοξειδωτικού συστήματος (Garrel *et al.*, 2010).

Η σημαντικότητα του αντιοξειδωτικού συστήματος έγκειται στη μεγάλη συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με την εκδήλωση ποικίλων νοσημάτων στα παραγωγικά ζώα, μείωση της παραγωγικότητας και αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων λόγω διατάραξης της οξειδωτικής σταθερότητας (Celi, 2010). Έτσι με βάση τα παραπάνω, συμπεραίνεται πως τα PUFA δύνανται σε μικρές συγκεντρώσεις να ενεργοποιούν την απάντηση του αντιοξειδωτικού συστήματος μέσω της πιθανής αύξησης των αντιοξειδωτικών ενζύμων (μεγαλύτερη μεταγραφή, αύξηση πρωτεΐνης) ενώ μεγάλες συγκεντρώσεις μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση των τοξικών

υποπροϊόντων της οξείδωσης των PUFA, όπως η 4-υδροξυνονέναιλ (4-HNE), 4-υδροξυ-εξέναιλ (HHE) και η μηλονική αλδεΐδη (MDA), και την πρόκληση οξειδωτικού στρες (Ταο, 2015; Di Nunzio *et al.*, 2016). Ωστόσο, λόγω της έλλειψης δεδομένων, παραμένει αβέβαιο σε ποιο επίπεδο ενσωμάτωσης τα PUFA, αλλά και το προφίλ των λιπαρών οξέων που τα απαρτίζει, προκαλούν οξειδωτικό στρες.

Στον επόμενο πίνακα γίνεται αναφορά των πιο πρόσφατων δημοσιευμένων εργασιών σχετικά με την προσθήκη PUFA και την πρόκληση οξειδωτικού στρες, και στη συνέχεια στο πειραματικό μέρος της παρούσας μελέτης, γίνεται προσπάθεια απάντησης του παραπάνω ερωτήματος.

Πίνακας 3.3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην οξειδωτική κατάσταση των μηρυκαστικών

Συγγραφείς	Είδος ζώου	Επέμβαση	Δοσολογία	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα	Αντιοξειδωτικά ένζυμα	Οξειδωτικοί δείκτες
<b>Wullepit et al., 2012</b>	Αγελάδες	Μικροφύκη DHA gold	224 g/ ζώο	- FRAP	-GSH-Px	↑ MDA
<b>EL-Sabagh et al., (2014)</b>	Αμνοί	Μικροφύκη <i>Spirulina platensis</i>	1g/10Kg ΣΒ	↑ GSH ↑ Βιταμίνη Α		↓ MDA
<b>Tsiplakou et al., 2017a</b>	Αίγες και πρόβατα	Σογιέλαιο/ιχθυέλαιο	5% /1% ΞΟ*	- FRAP - ABTS	-SOD ↑ GST ↑ GR -GSH-Px ↑ CAT	↑ MDA -PC
<b>Tsiplakou et al., 2017b</b>	Αίγες	Μικροφύκη <i>Chlorella vulgaris</i>	10 g/Kg ΣΖ** ΞΟ	- FRAP - ABTS	↑ SOD -GST -GR -GSH-Px ↑ CAT	-MDA -PC ↓ PC (Γάλα)



<b>Tsiplakou <i>et al.</i>, 2017c</b>	Αίγες	Μικροφύκη <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	10 g/Kg ΣΖ ΞΟ	- FRAP - ABTS	-SOD -GST -GR -CAT -GSH-Px	-MDA -PC
<b>Mavrommatis <i>et al.</i>, 2018</b>	Αίγες	Μικροφύκη DHA gold	20, 40, 60 g/Kg ΞΟ	↑ FRAP ↑ ABTS	↑ SOD ↑ GST ↑ GR -GSH-Px -CAT	↑ MDA (40, 60 g) -PC

\*ΞΟ= Ξηρά ουσία

\*\*ΣΖ= Συμπυκνωμένες ζωοτροφές

Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζεται συνοπτικά η επίδραση της προσθήκης PUFA και μικροφυκών στη διατροφή των μηρυκαστικών στο αντιοξειδωτικό σύστημα. Μια μακροσκοπική παρατήρηση καταδεικνύει πως η αυξημένη συμμετοχή PUFA στη διατροφή των μηρυκαστικών, κατά κύριο λόγο αυξάνει την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων ακόμα και στις περιπτώσεις που η ανάλυση των οξειδωτικών δεικτών παραπέμπει σε προκληθέν οξειδωτικό στρες. Παρατηρείται δηλαδή πως τα βλαβερά υποπροϊόντα που επέφεραν οξειδωτικό στρες, λειτουργούν ως ενεργοποιητές της μεταγραφής και μετάφρασης ή ακόμα και της πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης προστατευτικών για το κύτταρο πρωτεϊνών (Mavangira & Sordillo, 2017).

Αναλυτικότερα, στην εργασία των Tsiplakou *et al.* (2017a) η ταυτόχρονη προσθήκη σογιελαίου και ιχθυελαίου σε ποσοστό 5% και 1% αντίστοιχα στο σιτηρέσιο αιγών και προβάτων, αύξησε τη MDA στατιστικώς σημαντικά λόγω της πιθανής λιπιδικής υπεροξειδάσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από τις δραστικές ρίζες του οργανισμού, όπως εχει αναφερθεί παραπάνω στο κεφάλαιο αυτό. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των GR, GST και CAT ενζύμων στο αίμα των ζώων που κατανάλωναν το σιτηρέσιο πλούσιο σε PUFA. Η αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων αποδίδεται από τους συγγραφείς στην πιθανή απάντηση του οργανισμού στο προκληθέν οξειδωτικό στρες.

Στις δύο εργασίες από τους Tsiplakou *et al.* (2017b, 2017c) η προσθήκη των μικροφυκών *Chlorella vulgaris* και *Chlorella pyrenoidosa* δεν προκάλεσε αύξηση των οξειδωτικών δεικτών διότι, πάρα την υψηλή περιεκτικότητα σε PUFA στο προφίλ των λιπαρών τους οξέων, η λιποπεριεκτικότητά τους ήταν χαμηλή σε σχέση με αυτή των υπολοίπων πειραματισμών (Πίνακας 4). Ωστόσο, η προσθήκη 10g *Chlorella vulgaris* /αίγα/ ημέρα αύξησε τη δραστηριότητα της SOD και της CAT στο αίμα ενώ μείωσε τα PC στο γάλα.

Εν συνεχεία, τα αποτελέσματα της μελέτης των EL-Sabagh *et al.* (2014) βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά των Tsiplakou *et al.* (2017b, 2017c) όπου η προσθήκη 1g/10 Kg ΣΒ του μικροφύκου *Spirulina platensis* μείωσε τον οξειδωτικό δείκτη MDA, ενώ φαίνεται να βελτίωσε την αντιοξειδωτική κατάσταση του αίματος των αμνών σύμφωνα με την αύξηση της ελεύθερης γλουταθειόνης και της βιταμίνης A.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να γίνει μια συγκριτική ανάλυση των πειραματισμών της ενσωμάτωσης των μικροφυκών (*Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa* και *Spirulina platensis*) με την προηγούμενη μελέτη της ενσωμάτωσης των ελαίων. Συγκεκριμένα, στην πρώτη περίπτωση, όπως αναφέρθηκε, η αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων πιθανόν οφείλεται στην απάντηση του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες. Αντίθετα, στην περίπτωση της ενσωμάτωσης των μικροφυκών του γένους *Chlorella*, η δραστηριότητα ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων αυξήθηκε χωρίς την πρόκληση οξειδωτικού στρες (οξειδωτικοί δείκτες του αίματος ανεπηρέαστοι). Οι συγγραφείς αποδίδουν την αύξηση αυτή στην υψηλή περιεκτικότητα των μικροφυκών σε πολυφαινόλες, καροτινοειδή, χλωροφύλλες, βιταμίνες, σε β-1,3-γλυκάνες και ιχνοστοιχεία τα οποία ενδεχομένως συνέβαλαν στην αποτελεσματικότερη λειτουργία του αντιοξειδωτικού συστήματος. Επιπλέον, στην εργασία τους οι EL-Sabagh *et al.* (2014) αποδίδουν τη μείωση του οξειδωτικού στρες και τη βελτίωση της αντιοξειδωτικής κατάστασης στην υψηλή περιεκτικότητα της *Spirulina platensis* σε φυτοκυανίνες, πολυσακχαρίτες, α-τοκοφερόλη και β-καροτίνη.

Συμπερασματικά, φαίνεται πως η προσθήκη ζωοτροφών πλούσιων σε PUFA συνδέεται με την αύξηση του οξειδωτικού στρες και την ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών του κυττάρου για την εξουδετέρωση των βλαβερών υποπροϊόντων. Επιπλέον, η ενσωμάτωση μικροφυκών στη διατροφή των μηρυκαστικών δύναται να ενισχύσει το αντιοξειδωτικό σύστημα βελτιώνοντας την αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού. Έτσι, δημιουργείται άλλο ένα ερευνητικό ερώτημα, σχετικά με την ενσωμάτωση ενός μικροφύκου πλούσιου σε PUFA στη διατροφή των αιγών σε επίπεδο ενσωμάτωσης το οποίο δεν θα προκαλούσε οξειδωτικό στρες είτε του οργανισμού του ζώου είτε του γάλακτος λόγω της ισορροπημένης αναλογίας της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε σχέση με τα ολικά αντιοξειδωτικά του μικροφύκου σε συνεργασία με την απάντηση του αντιοξειδωτικού συστήματος του οργανισμού.

### 3.4. Επίδραση των PUFA στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος

Το ανοσοποιητικό σύστημα δρα με σκοπό την προστασία του ξενιστή από μολυσματικούς παράγοντες από το περιβάλλον όπως βακτήρια, ιοί, μύκητες, παράσιτα, κ.α. ή άλλες ενδογενείς ενώσεις, υποπροϊόντα του μεταβολισμού του ξενιστή. Το ανοσοποιητικό σύστημα διαιρείται σε δυο λειτουργικές ομάδες απάντησης: την έμφυτη (φυσική) ανοσία και την επίκτητη ανοσία. Η έμφυτη ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή έναντι των παθογόνων. Κατά την πρώτη φάση προστατεύει το ξενιστή με σκοπό να αποφευχθεί η εισβολή του παθογόνου, και αν αυτό συμβεί, κατά τη δεύτερη φάση δρα με σκοπό την εξουδετέρωσή του είτε με την παραγωγή επιβλαβών ενώσεων από τα φαγοκύτταρα, όπως δραστικές μορφές οξυγόνου, τοξικές πρωτεΐνες παραγόμενες από τα NK κύτταρα είτε με τη διαδικασία της φαγοκύτωσης και τον εγκλωβισμό του παθογόνου (Calder, 2001).

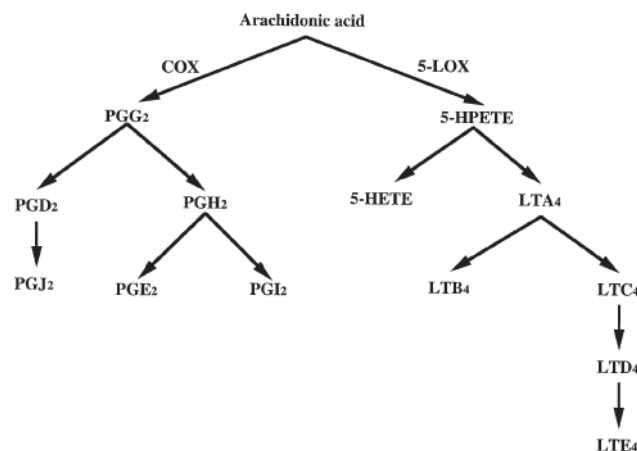
Η επικοινωνία του ανοσοποιητικού συστήματος γίνεται απευθείας μεταξύ των κυττάρων, κυρίως με τη χρήση χημικών αγγελιοφόρων πρωτεϊνών που ονομάζονται κυτοκίνες. Οι πρωτεΐνες αυτές εκκρίνονται από το κύτταρο και δρουν σε αυτό ή σε άλλα κύτταρα δίνοντας πληροφορίες για τη ρύθμιση της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού, της ωρίμανσης και της έκκρισης άλλων κυτοκινών και χημοκινών από το κύτταρο.

Από τις σημαντικότερες κυτοκίνες στη μελέτη του ανοσοποιητικού συστήματος θεωρούνται οι ιντερλευκίνες 1 και 6 (*IL-1* και *IL-6*) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (*TNF $\alpha$* ) οι οποίες παράγονται κυρίως από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Οι κυτοκίνες αυτές ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα κύτταρα με σκοπό την καταπολέμηση βακτηρίων και καρκινικών κυττάρων και την ενεργοποίηση των T και B λεμφοκυττάρων.

Η παραγωγή αυτών των προφλεγμονωδών κυτοκινών κρίνεται ιδιαίτερα ευεργετική για την αντιμετώπιση των παθογόνων από το ξενιστή. Ωστόσο, υπερπαραγωγή αυτών συνδέεται με την εκδήλωση σύγχρονων νοσημάτων. Έτσι, το κύτταρο, προκειμένου να διατηρεί συνεχώς την ομοιοστασία του αναπτύσσει ανταγωνιστές αυτών των κυτοκινών όπως η ιντερλευκίνη 10 (*IL-10*) με σκοπό την ομαλή λειτουργία του κυττάρου.

Άλλη μια κατηγορία χημικών διαμεσολαβητών επικοινωνίας του ανοσοποιητικού συστήματος είναι τα εικοσανοειδή. Τα εικοσανοειδή συντίθενται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και συγκεκριμένα από το διομο- $\gamma$ -λινολενικό οξύ ( $C_{20:3\ n6}$ ), το αραχιδονικό οξύ ( $C_{20:4\ n6}$ ) και το εικοσιπεντανοϊκό οξύ ( $C_{20:5\ n3}$ ). Στα εικοσανοειδή ανήκουν οι προσταγλανδίνες (*PG*), οι θρομβοξάνες, τα λευκοτριένια (*LT*), οι λιποξίνες, τα υπεροξυ εικοσατετρανοϊκά οξέα (*HPETE*) και τα εικοσατετρανοϊκά οξέα (*HETE*). Πρόδρομη ένωση για την παραγωγή των εικοσανοειδών αποτελούν τα πολυάκορεστα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών, μέσω της δράσης της φωσφολιπάσης  $A_2$ . Ωστόσο, οι φωσφολιπιδικές μεμβράνες καθώς αποτελούνται κατά κύριο λόγο από αραχιδονικό οξύ, η κυριότερη πρόδρομη ένωση των εικοσανοειδών στον οργανισμό είναι το αραχιδονικό.

Στη συνέχεια, το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται είτε με τη δράση του ενζύμου κυκλοοξυγενάση (*COX*) σε περίπου 16 είδη προσταγλανδίνης (*PGE<sub>2</sub>*, *PGF<sub>2</sub>*, *PGD<sub>2</sub>* κ.α.), είτε μέσω του ενζύμου 5-λιποοξυγενάση (*5-LOX*) σε *5-HETE*, *5-HPETE*, και 4-λευκοτριένες, *LTA<sub>4</sub>*, *B<sub>4</sub>*, *C<sub>4</sub>*, *D<sub>4</sub>* και *E<sub>4</sub>* (Σχήμα 3.5).



Σχήμα 3.5. Μεταβολισμός αραχιδονικού οξέος από τη δράση των κυκλοοξυγενασών και λιποοξυγενασών σε παράγωγα προφλεγμονωδών χημικών αγγελιοφόρων (Calder 2001).

Από την άλλη πλευρά, πειραματισμοί με την προσθήκη ιχθυελαίου και ειδικότερα εικοσιπεντανοϊκού (*EPA*) και εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος (*DHA*) στη διατροφή πειραματόζωων και ανθρώπων, μείωσε τη συγκέντρωση του αραχιδονικού οξέος στις μεμβράνες κυττάρων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ αύξησε τη

συγκέντρωση των EPA και DHA. Επιπλέον, η υψηλή πρόσληψη  $\omega 3$  πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αναστέλλει την ενεργότητα των φωσφολιπασών που απελευθερώνει το αραχιδονικό οξύ από τις μεμβράνες. Ακόμα, το εικοσιπεντανοϊκό οξύ ανταγωνίζεται το αραχιδονικό για το ενεργό κέντρο των λιποοξυγενασών και κυκλοοξυγενασών. Έτσι, λόγω της μειωμένης συγκέντρωσης αραχιδονικού στις μεμβράνες των κυττάρων, της μείωσης της ενεργότητας των φωσφολιπασών και του ανταγωνισμού του ενεργού κέντρου των λιποοξυγενασών, η παραγωγή εικοσανοειδών από αραχιδονικό μειώνεται με τη διατροφική πρόσληψη εικοσαπεντανοϊκού και εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος. Αποτέλεσμα της διαφορετικής πρόδρομης ένωσης για τη σύνθεση εικοσανοειδών από τα προαναφερθέντα ένζυμα είναι η παραγωγή 3-προσταγλανδινών και 5-λευκοτριενών. Επιπροσθέτως, το εικοσαδυεξανοϊκό και το εικοσαδυπεντοϊκό οξύ ( $C_{22:5n6}$ ), ως πρόδρομες ενώσεις, παράγουν επιπλέον δυο κατηγορίες εικοσανοειδών που ρυθμίζουν τη φλεγμονή, τις ρεσολβίνες και τις προτεκτίνες (Robertson *et al.*, 2013). Τέλος, τα εικοσανοειδή που παράγονται με πρόδρομη ένωση το εικοσαπεντανοϊκό και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ αφενός έχουν ως και 10 φορές μικρότερη βιολογική ισχύ στην προ-φλεγμονώδη δράση αφετέρου ανταγωνίζονται τους ίδιους υποδοχείς με αυτούς που παράγονται από το αραχιδονικό με αποτελέσματα το συνεχή ανταγωνισμό. Απόρροια αυτών είναι η μείωση της προ-φλεγμονώδους κατάστασης.

Αφού αναφέρθηκε και επεξηγήθηκε συνοπτικά ο σημαντικότερος μηχανισμός διαφοροποίησης της ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος, όσον αφορά την πρόσληψη PUFA, στον επόμενο πίνακα παρουσιάζεται βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικών ερευνών.

Πίνακας 3.4. Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο ανοσοποιητικό σύστημα

Συγγραφείς	Είδος ζώου	Επέμβαση	Δοσολογία	Κυτοκίνες
<b>Sinha <i>et al.</i>, 1991</b>	Ανθρώπινα μονοκύτταρα	EPA DHA	1-100μM	↓ IL-1β ↓ TNFα
<b>Calder &amp; Newsholmer 1991</b>	Ανθρώπινα λεμφοκύτταρα	EPA	100μM	↓ IL-2
<b>Baldie <i>et al.</i>, 1993</b>	Ανθρώπινα μονοκύτταρα	EPA DHA	1-100μM	↓ IL-1
<b>Tappia <i>et al.</i>, 1995</b>	Μακροφάγα ποντικών	DHA	100μM	↓ PGE <sub>2</sub> ↓ IL-6
<b>Yaqoob &amp; Calder 1995</b>	Μακροφάγα ποντικών	Ιχθυέλαιο	20%	↓ IL-1β ↓ TNFα ↓ IL-6
<b>Hayashi <i>et al.</i>, 1998</b>	Ποντίκια	EPA DHA	1% της συνολικής ενέργειας	↓ IL-8 ↓ IL-10

<b>Wallace <i>et al.</i>, 2000</b>	Μακροφάγα ποντικών	Ιχθυέλαιο	20%	<p>↓ IL-1β</p> <p>↓ TNFα</p> <p>↓ LTB<sub>4</sub></p>
<b>Dangi <i>et al.</i>, 2010</b>	Αιμοπετάλια ανθρώπου	DPA n6		Τα εικοσανοειδή του DPA n6 ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση
<b>Oh <i>et al.</i>, 2010</b>	Ποντίκια	Ιχθυέλαιο	27%	Πρωτεΐνη GPR120 μειώνει την προσκόλληση των LPS στους TLR4
<b>Norris &amp; Dennis 2012</b>	Μακροφάγα ποντικών	AA EPA DHA DPA		<p>DHA ↓ PGE<sub>2</sub> πιο αποτελεσματικά από EPA</p> <p>DPA το πιο ανταγωνιστικό από όλα τα PUFA σε σχέση με το AA για τη σύνθεση εικοσανοειδών.</p>
<b>Nauroth <i>et al.</i>, 2010</b>	Ποντίκια	<i>Schizochytrium sp</i>	40% DHA 16% DPA n6	Μείωσε τη φλεγμονή σε σχέση με το μάρτυρα και σε σχέση με χορήγηση DHA χωρίς DPA



Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται συνοπτικά τα σημαντικότερα αποτελέσματα της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, και πιο συγκεκριμένα αυτών με αριθμό ανθράκων > των 20 και άνω των 4 διπλών δεσμών, στις πρωτεΐνες και τα εικοσανοειδή που ρυθμίζουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Γενικότερα, παρατηρείται πως η προσθήκη αυτών των μακράς αλύσου πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μειώνει τις ενώσεις που οδηγούν σε προ-φλεγμονώδη κατάσταση είτε σε πειραματισμούς *in vitro* είτε *in vivo*.

Συγκεκριμένα, στις *in vitro* εργασίες των Baldie *et al.* (1993) και των Sinha *et al.* (1991) η προσθήκη του εικοσαπεντανοϊκού και του εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος σε ανθρώπινα μονοκύτταρα μείωσε την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών *IL-1β* και *TNFα*. Επιπλέον, οι Calder & Newsholmer (1991) παρατήρησαν σημαντική μείωση της *IL-2* με την προσθήκη εικοσιπεντανοϊκού οξέος σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Αργότερα, το 1995 οι Yaqoob και Calder παρατήρησαν *in vivo* ότι η προσθήκη ιχθυελαίου στη διατροφή ποντικών, μειώνει τη συγκέντρωση των *IL-1β*, *IL-6* και *TNFα* στα μακροφάγα. Την ίδια χρονιά (1995) οι Tappia *et al.*, βρήκαν σημαντική μείωση της *IL-6* και του εικοσανοειδούς PGE<sub>2</sub> με την προσθήκη εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος σε μακροφάγα ποντικών.

Λίγα χρόνια αργότερα οι Hayashi *et al.* (1998) διερευνώντας την επίδραση της προσθήκης του εικοσαπεντανοϊκού και του εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος σε *in vivo* πείραμα ποντικών, παρατήρησαν σημαντική μείωση της *IL-8* συνοδευόμενη από μείωση της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης *IL-10*. Η συγκεκριμένη έρευνα, διευρύνει την σκέψη των ερευνητών καθώς θα πρέπει να διευκρινιστεί αν οι προαναφερθείσες διατροφικές επεμβάσεις προστατεύουν τον οργανισμό από τις προ-φλεγμονώδεις καταστάσεις είτε προάγουν την ανοσοκαταστολή.

Οι Wallace *et al.* (2000) μελετώντας την επίδραση του ιχθυελαίου στη διατροφή ποντικών επαλήθευσαν τη μείωση των προφλεγμονωδών κυτοκινών *IL-1β* και *TNFα*. Επιπλέον, σημαντική μείωση διαπιστώθηκε για το εικοσανοειδές LTB<sub>4</sub> το οποίο παράγεται με πρόδρομη ένωση το αραχιδονικό οξύ. Οι ερευνητές αποδίδουν την μείωση αυτή στην ενσωμάτωση του DHA και EPA στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών εις βάρος του αραχιδονικού οξέος.

Αργότερα, το 2010 οι Dangi *et al.*, μελέτησαν αυτή τη φορά την επίδραση ενός π6 πολυακόρεστου λιπαρού οξέος, του εικοσιδιπεντανοϊκού (DPA), το οποίο παράγεται κυρίως από μικροφύκη και μακροφύκη μέσω της διαδοχικής επιμήκυνσης, αφυδρογόνωσης και β-οξειδωσης του εικοσιπεντανοϊκού οξέος (EPA). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας κατατάσσουν τα εικοσανοειδή που παράγονται με πρόδρομη ένωση το εικοσιδιπεντανοϊκό οξύ (DPA) σε αυτά που έχουν ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση.

Εν συνεχεία, οι Norris & Dennis (2012) μελέτησαν την προσθήκη των σημαντικότερων πρόδρομων των εικοσανοειδών (AA, EPA, DHA και DPA) σε μακροφάγα ποντικών. Τα αποτελέσματα αναφέρουν πως η προσθήκη του DHA μειώνει την προσταγλανδίνη PGE<sub>2</sub> πολύ πιο αποτελεσματικά από την προσθήκη EPA. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα πρόδρομα αυτά λιπαρά οξέα για την σύνθεση εικοσανοειδών ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την κατάλυση από τα ίδια ένζυμα, παρατηρήθηκε πως το DPA είναι το πιο ανταγωνιστικό.

Στην εργασία των Nauroth *et al.* (2010) η προσθήκη του μικροφύκους *Schizochytrium sp* (40% DHA, 16% DPA) στη διατροφή ποντικών μείωσε τη φλεγμονή σε σχέση με την πρόσληψη ενός συμβατικού σιτηρεσίου, καθώς επίσης η συνεργητική δράση αυτών των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μείωσε σημαντικά τη φλεγμονή σε σχέση με την πρόσληψη μόνο του εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος (DHA).

Κλείνοντας τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, οι Oh *et al.* (2010) με την προσθήκη ιχθυελαίου σε ποντίκια, αποδίδουν τη μείωση των προφλεγμονωδών κυτοκινών στη μείωση του σήματος από τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς Toll like receptors (*TLR4*) λόγω της πρωτεΐνης GPR120 η οποία εμποδίζει την προσκόλληση των λιποπολυσακχαριτών (LPS) στους *TLR4*.

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η μελέτη της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως EPA και DHA στις πρωτεΐνες και τα εικοσανοειδή που εμπλέκονται στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, μετρά ήδη τουλάχιστον 27 χρόνια. Ωστόσο, αφενός η πλειοψηφία των πειραματισμών αφορούν πειραματόζωα σε ιδανικές συνθήκες και αφετέρου, το μεταγραφικό μονοπάτι μεταξύ του σήματος είτε του παθογόνου είτε μιας ενδογενούς πρωτεΐνης μέχρι την παραγωγή ορμονών παραμένει άγνωστο.

## 4. Υλικά και μέθοδοι

### 4.1. Σκοπός του πρώτου πειράματος

Με βάση τη βιβλιογραφική ανασκόπηση στο κεφάλαιο **3**, σκοπός του πρώτου πειράματος ήταν να διερευνηθεί η προσθήκη μικροφυκών πλούσιων σε  $\omega 3$  πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (DPA και DHA), στη διατροφή αιγών **με σκοπό την αποσαφήνιση της αποτελεσματικότητας της μεταφοράς αυτών των λιπαρών οξέων από την τροφή στο γάλα**. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο **3.1.**, η αποτελεσματικότητα αυτών των λιπαρών οξέων εξαρτάται από πλήθος παραγόντων, όπως η προέλευσή τους (μικροφύκη, ιχθυέλαια κ.α.), ο συνδυασμός τους με άλλα έλαια διαφορετικής σύστασης (ηλιέλαιο, σογιέλαιο κ.α.), όπως και η παραλλακτικότητα μεταξύ των ειδών, κυρίως μεταξύ προβάτων και αγελάδων, **καθώς τα αντίστοιχα δεδομένα σχετικά με το αίγιο γάλα είναι περιορισμένα**.

Επιπλέον, στο κεφάλαιο **3.2.** παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα της επίδρασης των  $\omega 3$  πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στους μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας που σχετίζονται με τα ζυμωτικά φαινόμενα και την **παραγωγή μεθανίου**. Συνοπτικά, η παράθεση αυτών των αποτελεσμάτων δεν αποσαφήνισε την κατεύθυνση του μικροβιώματος της μεγάλης κοιλίας με τις προαναφερθείσες διατροφικές επεμβάσεις αφήνοντας χώρο για περαιτέρω έρευνα.

Όσον αφορά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση του κεφαλαίου **3.3.** επισημάνθηκε η επιρρέπεια των  $\omega 3$  πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην **οξειδωση** και η κατ' επέκταση **πρόκληση οξειδωτικής καταπόνησης στον οργανισμό**. Ωστόσο, αναφέρθηκε ότι μικρή αύξηση του οξειδωτικού στρες επάγει την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Επιπλέον, τα φυσικά αντιοξειδωτικά που ανευρίσκονται στα μικροφύκη όπως **οι φαινόλες, μειώνουν τη δράση των ελευθέρων ριζών**. Έτσι, ο βαθμός της οξειδωτικής καταπόνησης του οργανισμού **εξαρτάται από το επίπεδο ενσωμάτωσης** των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων καθώς και από την αντιοξειδωτική ικανότητα της πηγής προέλευσης τους.

Τέλος, η **επίδραση των  $\omega 3$  πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο ανοσοποιητικό σύστημα**, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο **3.4.**, **μειώνει τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες** των ανοσοκυττάρων, ωστόσο οι μηχανισμοί ρύθμισης αυτών καθώς και το επίπεδο πρόσληψης αυτών των λιπαρών οξέων **παραμένει σε πρώιμο ερευνητικό στάδιο**.

Έτσι, σκοπός του πρώτου πειράματος ήταν η διερεύνηση της προσθήκης του εμπορικού σκευάσματος **DHAgold™** της εταιρίας DSM, το οποίο παρασκευάζεται από το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*, σε τέσσερα επίπεδα ενσωμάτωσης, στο σιτηρέσιο γαλακτοπαραγωγών αιγών και η επίδρασή του: α) στην ποσότητα και τη χημική σύσταση του γάλακτος, β) στο προφίλ των λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος, του υγρού της μεγάλης κοιλίας και του γάλακτος, γ) στη δραστικότητα επιλεγμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων του πλάσματος του αίματος και του γάλακτος, δ) στο μικροβίωμα της μεγάλης κοιλίας και ε) στην έκφραση επιλεγμένων κυτοκινών από ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα κύτταρα αίματος.

#### 4.1.1. Πειραματικό σχέδιο

Για το σκοπό του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 24 υγιείς αίγες, φυλής Alpine διασταυρωμένες με εγχώριες, ηλικίας 3<sup>ov</sup> ως 4<sup>ov</sup> ετών, μέσου σωματικού βάρους 47,6±5,9 κιλά, στο μέσο της γαλακτικής περιόδου (150±10 ημέρες από τον τοκετό). Τα ζώα χωρίστηκαν σε τέσσερις ισοδύναμες ομάδες με βάση τη διορθωμένη, ως προς τη λιποπεριεκτικότητα, γαλακτοπαραγωγή, το σωματικό τους βάρος και τη γαλακτική τους περίοδο: α) την ομάδα **CON** (μάρτυρας: 0 g DHAgold™/ζώο/ημέρα), β) την ομάδα **ALG20** (χαμηλής συμμετοχής: 20 g DHAgold™/ζώο/ημέρα ή 2% επί των ΣΖ), γ) την ομάδα **ALG40** (μέσης συμμετοχής: 40 g DHAgold™/ζώο/ημέρα ή 4% επί των ΣΖ), και δ) την ομάδα **ALG60** (υψηλής συμμετοχής: 60 g DHAgold™/ζώο/ημέρα ή 6% επί των ΣΖ). Τα σιτηρέσια των ομάδων καταρτίστηκαν με σκοπό να είναι ισοενεργειακά και ισοαζωτούχα καλύπτοντας τις ανάγκες των ζώων σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά σε κάθε παραγωγική φάση κατά τη διάρκεια των πειραματισμών (Ζέρβας κ.α. 2004, National Academic Press, 1981) (Πίνακας 4.1).

Τα ζώα διατρέφονταν ατομικά με σιτηρέσιο αποτελούμενο από 1 kg μείγματος συμπυκνωμένων ζωοτροφών και 1 kg σανό μηδικής (XZ/ΣΖ=50/50). Η διάθεση του σιτηρεσίου γινόταν καθημερινά στις 8:00 π.μ. και στις 18:30 μ.μ. μετά τη μηχανική άμελξη, και είχαν στη διάθεσή τους, σε 24ωρη βάση, καθαρό νερό. Μετά το σχηματισμό των τεσσάρων ομάδων ακολούθησε προ-πειραματική περίοδος προσαρμογής 15 (δεκαπέντε) ημερών και εν συνεχεία η κύρια πειραματική περίοδος διάρκειας 60 (εξήντα) ημερών μεταξύ των μηνών Ιουνίου-Αυγούστου 2015. Η μέση θερμοκρασία εντός της πειραματικής εγκατάστασης καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος ήταν 29,3° C (μετεωρολογικός σταθμός LGB9, δεδομένα διαδραστικής βάσης δεδομένων meteo.gr).

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις πειραματικές εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο χώρος όπου στεγάζονταν τα ζώα ήταν κατάλληλα διαμορφωμένος με σκοπό να πληρούνται οι συνθήκες υγείας και ευζωίας των ζώων.

Πίνακας 4.1. Χημική σύσταση (g/Kg) και προφίλ λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) των ζωοτροφών του πειραματικού σιτηρεσίου.

	Μείγματα συμπυκνωμένων				Σανός μηδικής	DHAgold™
	CON	ALG20	ALG40	ALG60		
<i>Χημική σύσταση (g/Kg ζωοτροφής)</i>						
Ξ.Ο.	922	927	918	926	927	980
Ο.Α.Ο.	126	127	127	127	134	167
Λ.Ο.	43	57	63	79	13	556
NDF	157	152	149	169	503	-
ADF	61	56	57	64	381	-
Τέφρα	92	95	93	89	72	88
<i>Προφίλ λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων)</i>						
C <sub>14:0</sub>	0,1	1,4	2,8	3,7	2,3	5,9
C <sub>16:0</sub>	14,3	15,2	17,1	18,7	31,6	13,1
C <sub>18:0</sub>	3,9	3,2	2,7	2,5	5,8	0,3
C <sub>18:1 n-9 c</sub>	36,1	29,8	24,2	21,8	11,6	0
C <sub>18:2 n-6</sub>	42,2	36,5	31,1	28,6	26,4	0
C <sub>18:3 n-3</sub>	1,7	1,6	1,3	1,2	19,7	0,1
C <sub>22:5 n-6</sub>	0	2,9	5,3	6,2	0	6,8
C <sub>22:6 n-3</sub>	0,1	7,3	13,4	15,5	0	21,8

Πίνακας 4.2. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε βιταμίνες.

<b>Βιταμίνες</b>	<b>Περιεκτικότητα (/Kg σκευάσματος)</b>
Βιοτίνη	0,4 mg
Χολίνη	2,2 mg
Φυλλικό οξύ	1,3 mg
Νιασίνη (B3)	5,8 mg
A	0 IU
B-καροτένιο	6440 IU
B1	2,8 mg
B2	3,2 mg
B6	1,9 mg
C	14,1 mg
E	0 IU
B12	93,6 µg
Παντοθενικό οξύ	5,3 mg

Πηγή αναλύσεων, εταιρία εμπορικού σκευάσματος DHAgold, DSM

Πίνακας 4.3. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε αμινοξέα.

<b>Αμινοξέα</b>	<b>Περιεκτικότητα (%)</b>
Τρυπτοφάνη	0,2
Θρεονίνη	0,5
Σερίνη	0,5
Προλίνη	0,5
Γλυκίνη	0,6
Αλανίνη	0,7
Κυστίνη	0,2
Βαλίνη	0,7
Μεθειονίνη	0,3
Ισολευκίνη	0,4
Λευκίνη	0,7
Τυροσίνη	0,3
Φαινυλαλανίνη	0,4
Λυσίνη	0,4
Αργινίνη	1,5

Πηγή αναλύσεων, εταιρία εμπορικού σκευάσματος DHAgold, DSM

Πίνακας 4.4. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε ανόργανα στοιχεία.

<b>Ανόργανα στοιχεία</b>	<b>Περιεκτικότητα (%)</b>
<i>Μακροστοιχεία</i>	
Ασβέστιο	0,03
Νάτριο	2,2
Κάλιο	0,5
Μαγνήσιο	0,1
Φώσφορος	0,1
<i>Ιχνοστοιχεία</i>	
Ψευδάργυρος	0,0004
Μαγγάνιο	0,0004
Σίδηρος	0,001

Πηγή αναλύσεων, εταιρία εμπορικού σκευάσματος DHAgold, DSM

Πίνακας 4.5. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε καροτινοειδή και χλωροφύλλες.

	<b>Περιεκτικότητα (mg/Kg)</b>
Ασταξανθίνη	0,3
Καθοξανθίνη	0,6
Λουτεΐνη	0,1
Ζεαξανθίνη	0,1
Λυκοπένιο	0,1
B-καροτίνιο	29,8
Χλωροφύλλη	5,9

Πηγή αναλύσεων, εταιρία εμπορικού σκευάσματος DHAgold, DSM

Πίνακας 4.6. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε σάκχαρα.

	<b>Περιεκτικότητα (%)</b>
Φρουκτόζη	0,5
Γλυκόζη	2,2
Σουκρόζη	0,1
Λακτόζη	0,1
Μαλτόζη	1,9
Γαλακτόζη	0,1
Ολικά σάκχαρα	4,6

Πηγή αναλύσεων, εταιρία εμπορικού σκευάσματος DHAgold, DSM

Πίνακας 4.7. Περιεκτικότητα προϊόντος DHAgold™ σε στερόλες.

	Περιεκτικότητα (mg/Kg)
Χοληστερόλη	880
Καμπεστερόλη	42
Στιγμαστερόλη	1330
B-σιτοστερόλη	244
Μπρασρικαστερόλη	199
Άλλες στερόλες/στανόλες	2150
Ολικές στερόλες	3963

Πηγή αναλύσεων, εταιρία εμπορικού σκευάσματος DHAgold, DSM

#### 4.1.2. Δειγματοληψίες πρώτου πειράματος

Ατομικά δείγματα αίματος ελήφθησαν την 20<sup>η</sup>, 40<sup>η</sup> και την 60<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της κύριας πειραματικής περιόδου. Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε πρωινές ώρες πριν τη χορήγηση του σιτηρεσίου από τη σφαγίτιδα φλέβα. Το ολικό αίμα συλλέχθηκε σε φιαλίδια Vacutainer με 17 Units/ml νατριούχο ηπαρίνη και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 2700 στροφές (rpm) για 10 λεπτά στους 4°C προκειμένου να διαχωριστεί το πλάσμα του αίματος από τα ερυθροκύτταρα. Το πλάσμα στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι την ανάλυση των λιπαρών οξέων, της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Επιπροσθέτως, ατομικά δείγματα γάλακτος ελήφθησαν την 20<sup>η</sup>, 40<sup>η</sup> και την 60<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της κύριας πειραματικής περιόδου. Συγκεκριμένα, έγινε συλλογή του 5% της συνολικής πρωινής και βραδινής ποσότητας του γάλακτος. Ποσότητα 1,5 ml νωπού γάλακτος, από την ανάμειξη πρωινού και βραδινού, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά της ώρας στα 14.000 g στους 4°C προκειμένου να διαχωριστεί το λίπος του γάλακτος το οποίο απομακρύνθηκε. Κατόπιν έγινε έντονη ανάδευση για 2 λεπτά της ώρας σε συσκευή Vortex ώστε να αναμειχθούν εκ νέου ο ορός με τις καζεΐνες και το στερεό υπόλειμμα του γάλακτος. Εν συνεχεία τα αποκορυφωμένα αυτά δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να ακολουθήσει η ανάλυση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Δείγματα νωπού γάλακτος αποθηκεύτηκαν επίσης, στους -80°C μέχρι την ανάλυση των λιπαρών οξέων. Όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων γάλακτος, προηγήθηκε κατάλληλη απομόνωση του αντιοξειδωτικού περιεχομένου, όπως περιγράφεται από τους Tsiplakou *et al.*, (2017c) και παραλήφθηκε υπερκείμενο σε κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Επιπλέον, ποσότητα νωπού γάλακτος μεταφέρθηκε στο



Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με σκοπό τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης και συγκεκριμένα, τον προσδιορισμό της λιποπεριεκτικότητας, της πρωτεϊνοπεριεκτικότητας και της λακτόζης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο **4.4.1.**

Την 20<sup>η</sup>, 40<sup>η</sup> και την 60<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της κύριας πειραματικής περιόδου πραγματοποιήθηκε, επίσης, δειγματοληψία υγρού της μεγάλης κοιλίας, όπως αυτή περιγράφεται από τους Tsiplakou *et al.* (2016b). Λεπτομερέστερα, τοποθετήθηκε οισοφαγικός καθετήρας στις αίγες συνδεδεμένος με αντίστροφο συμπιεστή χαμηλής ροής. Το βάθος του σωλήνα έφτασε περίπου τα 120-150 εκ. και η πρώτη ποσότητα (περίπου 20-40 ml) απομακρύνθηκε από τη φιάλη για την αποφυγή συλλογής σιέλου. Το περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη 1,5 λίτρων και στη συνέχεια διηθήθηκε με ύφασμα τύπου γάζας με σκοπό να διαχωριστεί το υγρό της μεγάλης κοιλίας από το στερεό (Εικόνα 4.1, 4.2). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο για την αποφυγή της δράσης των πρωτεϊνών στα νουκλεϊκά οξέα (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.1. Διήθηση υγρού μεγάλης κοιλίας με ύφασμα τύπου γάζας.



Εικόνα 4.2. Συλλογή στερεού υπολείμματος περιεχομένου μεγάλης κοιλίας.



Εικόνα 4.3. Τοποθέτηση δειγμάτων σε υγρό άζωτο.

Τέλος, όσον αφορά τις δειγματοληψίες του πρώτου πειραματισμού, την 16<sup>η</sup>, 17<sup>η</sup>, 18<sup>η</sup>, 36<sup>η</sup>, 37<sup>η</sup>, 38<sup>η</sup>, 56<sup>η</sup>, 57<sup>η</sup> και την 58<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της κύριας πειραματικής περιόδου, πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες σε φιαλίδια Vacutainer με 17 Units/ml νατριούχο ηπαρίνη για το διαχωρισμό μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων κυττάρων, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.6..

## 4.2. Αναλύσεις ζωοτροφών

### 4.2.1. Προσδιορισμός ξηράς ουσίας

Ο προσδιορισμός της ξηράς ουσίας έγινε σύμφωνα με την αναλυτική μέθοδο Weende των Henneberg και Stohman (1864). Σκοπός της μεθόδου είναι ο έμμεσος προσδιορισμός της Ξηράς Ουσίας, προσδιορίζοντας την υγρασία του δείγματος. Κατά τη μέθοδο αυτή 3-4 g αλεσμένου δείγματος εισήχθησαν σε φιαλίδιο το οποίο τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 100°C για τουλάχιστον 8 ώρες. Εν συνεχεία, το δείγμα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας και το αποτέλεσμα προέκυψε από τον τύπο:

$EO (g) = \{(\text{μεικτό βάρος μετά τη ξήρανση-απόβαρο φιαλιδίου}) \times 100\} / \text{ακριβές βάρος δείγματος.}$

### 4.2.2. Προσδιορισμός τέφρας

Σκοπός της μεθόδου είναι ο έμμεσος προσδιορισμός της ανόργανης ουσίας του δείγματος μετά από καύση της οργανικής ουσίας. Κατά τη μέθοδο αυτή 1 g αλεσμένου δείγματος εισήχθη σε πορσελάνινη κάψα και οι κάψες τοποθετήθηκαν στον αποτεφρωτήρα, στους 550°C για τουλάχιστον 5 ώρες. Μετά το πέρας της διαδικασίας της καύσεως, τα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου πριν αυτά ζυγιστούν. Το αποτέλεσμα προέκυψε από τον τύπο:

$T (g) = \{(\text{μεικτό βάρος μετά την αποτέφρωση- βάρος κάψας}) \times 100\} / \text{ακριβές βάρος δείγματος.}$

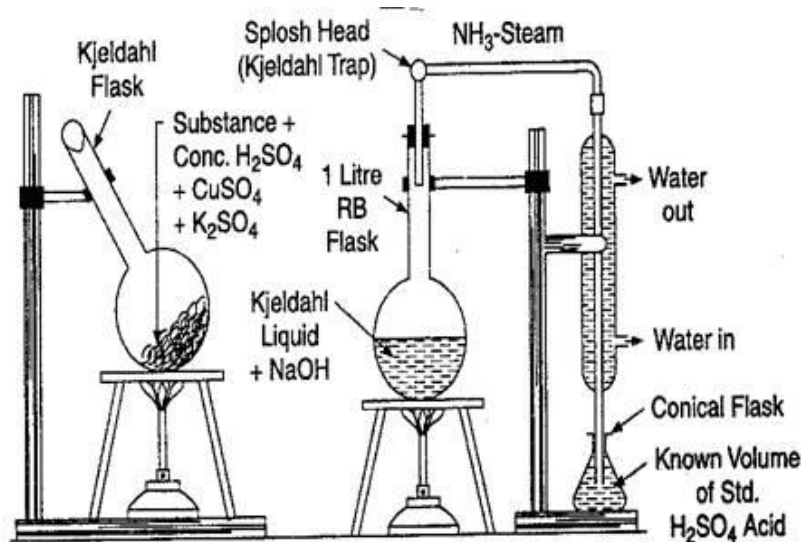
### 4.2.3. Προσδιορισμός αζωτούχων ουσιών (Α.Ο.)

Ο προσδιορισμός των αζωτούχων ουσιών στα δείγματα ζωοτροφών γίνεται με την μέθοδο Kjeldahl (1883), η οποία είναι μια μέθοδος στην αναλυτική χημεία για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αζώτου. Η βασική αρχή ήταν πως κάποιο τρόφιμο εντός του πεπτικού συστήματος λόγω του ισχυρού οξέος, απελευθερώνει άζωτο το οποίο μέσω τιτλοδότησης μπορεί να προσδιοριστεί. Σήμερα η μέθοδος Kjeldahl αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική προσδιορισμού αζώτου σε δείγματα, ύστερα από επεμβάσεις για τη γρηγορότερη διεκπεραίωση της μεθόδου και την αύξηση της ευαισθησίας της.

Η μέθοδος αυτή χωρίζεται σε δύο στάδια: α) το στάδιο της **χώνευσης** και β) το στάδιο της **απόσταξης και τιτλοδότησης**.

Κατά το πρώτο στάδιο της χώνευσης, το δείγμα θερμαίνεται με θειικό οξύ το οποίο αποσυνθέτει την οργανική ουσία. Στο δείγμα προστίθεται μια ταμπλέτα καταλύτη της οποίας το  $K_2SO_4$  αυξάνει το σημείο βρασμού. Η θερμοκρασία καύσης του μηχανήματος ρυθμίζεται στους  $420^\circ C$ . Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως η αμμωνία δεν απελευθερώνεται διότι αντιδρά με το ιόν του θειϊκού άλατος οπότε παραμένει στο δείγμα (Σχήμα 4.1).

Κατά το δεύτερο στάδιο, το καυστικό νάτριο μετατρέπει το θειϊκό άλας του αμμωνίου σε αμμωνία (αέριο) και αυτή κατά την έξοδό της από τη φιάλη έρχεται σε επαφή με το βορικό οξύ. Εν συνεχεία, το βορικό αμμώνιο που σχηματίζεται τιτλοδοτείται με υδροχλωρικό οξύ γνωστής συγκέντρωσης. Τέλος, η συσκευή αυτοματοποιημένα μετατρέπει την ποσότητα του αζώτου του δείγματος σε ποσοστό πρωτεΐνης επί του δείγματος με συντελεστή 6,25 ο οποίος μπορεί να μην ανταποκρίνεται πλήρως στην πραγματικότητα λόγω της διαφορετικότητας της αλληλουχίας των αμινοξέων που συνθέτουν κάθε πρωτεΐνη, αλλά είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος συντελεστής.



Σχήμα 4.1. Γραφική αναπαράσταση της μεθόδου Kjeldahl (1883).

Όσον αφορά τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο αναλύσεων ζωοτροφών του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με σκοπό τον προσδιορισμό των αζωτούχων ουσιών, χρησιμοποιήθηκαν τα μηχανήματα Digestion System 20 (1015) TECATOR για την καύση και το Kjeltac 8400 Analyser Unit για τον προσδιορισμό.

#### 4.2.4. Προσδιορισμός λιπαρών ουσιών

Η εκχύλιση χρησιμοποιείται για την απομόνωση διαλυτής ύλης όπως οι ολικές λιπαρές. Η ανάλυση της εκχύλισης βασίζεται στην αρχή Soxhlet (1879) γιατί είναι παγκοσμίως αποδεκτή και επαναλήψιμη. Η μέθοδος Soxhlet εφαρμόστηκε στη συσκευή 2055 Soxtec Manual Control Unit. Τα προς ανάλυση δείγματα ζυγίστηκαν μέσα σε φυσίγγια εκχύλισης και εισήχθησαν εντός της μονάδας εκχύλισης. Μετά την προσθήκη διαλύτη (πετρελαϊκός αιθέρας) σε μεταλλικά δοχεία εκχύλισης, το λίπος εκχυλίστηκε μέσα στον διαλύτη σε μια διαδικασία δύο σταδίων.

Στο πρώτο στάδιο το δείγμα εμβαπτίστηκε μέσα στο βραστό διαλύτη προκειμένου να διαλυθεί όλο το λίπος.

Στο δεύτερο στάδιο το δείγμα σηκώθηκε πάνω από την επιφάνεια του διαλύτη για να επιτρέψει επαρκές ξέπλυμα με τον διαλύτη από τους συμπυκνωτές. Τέλος, τέθηκε εντός λειτουργίας η αντλία αέρα και εξατμίστηκαν και τα τελευταία κατάλοιπα του διαλύτη. Το τελικό αποτέλεσμα προέκυψε από τον τύπο:

ΛΟ (g)=  $\{[(\text{βάρος δοχείου} + \text{λίπος}) - (\text{βάρος δοχείου})] \times 100\} / \text{ακριβές βάρος δείγματος}$

#### 4.2.5. Προσδιορισμός κλασμάτων κυτταρικών τοιχωμάτων

Ο προσδιορισμός των κλασμάτων των κυτταρικών τοιχωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή ANKOM<sup>200</sup>. Δείγματα τροφής αφού ζυγίστηκαν (0,95 g) τοποθετήθηκαν σε ειδικά σακίδια (F57-F58 ANKOM) τα οποία εμβαπτίστηκαν σε πετρελαϊκό αιθέρα. Τα σακίδια τοποθετήθηκαν στη συσκευή ANKOM με θειικό οξύ για 45 λεπτά και μετά το πέρας του χρόνου αυτού έγινε έκπλυση με απιονισμένο νερό τρεις φορές. Στη συνέχεια, εντός της συσκευής προστέθηκε διάλυμα καυστικού νατρίου και ακολούθηθηκε η ίδια διαδικασία με το θειικό οξύ. Μετά το τέλος της διαδικασίας αυτής τα σακίδια τοποθετήθηκαν στον αποτεφρωτήρα αφού αποξηράθηκαν στον κλίβανο για τουλάχιστον 8 ώρες και αποτεφρώθηκαν για 2 ώρες στους 600°C.

Το αποτέλεσμα προέκυψε από τον τύπο:

$KT (\%) = 100 \times [w_3 - (w_1 \times C_1)] / w_2$  όπου,

$w_1$ : βάρος σακιδίου χωρίς δείγμα,  $w_2$ : βάρος δείγματος,  $w_3$ : απώλεια βάρους της οργανικής ύλης και  $C_1$ : διόρθωση blank

#### 4.2.6. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων ζωοτροφών

Το προφίλ των λιπαρών οξέων των ζωοτροφών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο O'Fallon *et al.* (2007) της άμεσης σύνθεσης μεθυλεστέρων.

#### 4.2.7. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του DHAgold™

Το εμπορικό σκεύασμα DHAgold™ που παρασκευάζεται από το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* μελετήθηκε ως προς την ολική αντιοξειδωτική του ικανότητα και το φαινολικό του περιεχόμενο, όπως περιγράφεται από τους Mavrommatis *et al.* (2018). Αναλυτικότερα, προηγήθηκε απομόνωση του αντιοξειδωτικού περιεχομένου με τη μέθοδο των Goiris *et al.* (2012) με σκοπό την εκχύλιση πολικών και μη πολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε στο απομονωμένο αντιοξειδωτικό περιεχόμενο του μικροφύκου (τετραπλή μέτρηση) με τη μέθοδο Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), όπως αυτή περιγράφεται από τους Benzie και Strain (1996) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μM ισοδύναμων

ασκορβικού οξέος /1 g ξηράς ουσίας του μικροφύκους. Επιπροσθέτως, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH όπως περιγράφεται από τον Molyneux (2004).

Η μείωση της απορρόφησης εκφράστηκε ως ακολούθως:

$$\% \text{ αναστολή} = ((\text{ABS διαλύματος DPPH} - \text{ABS δείγματος at 30min}) / \text{ABS διαλύματος DPPH}) * 100$$

Το φαινολικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu που περιγράφεται από τους Hajimahmoodi *et al.* (2010). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Sigma Aldrich, USA) / 1 g ξηράς ουσίας μικροφύκους (Πίνακας 4.8).

Πίνακας 4.8. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και φαινολικό περιεχόμενο *Schizochytrium sp.*

	<b>FRAP (μM ασκορβικού οξέος / g ΞΟ)</b>	<b>DPPH (μM ασκορβικού οξέος / g ΞΟ)</b>	<b>Φαινολικό περιεχόμενο (mg GAE/ g ΞΟ)</b>
<i>Schizochytrium sp.</i>	2643±133	2380±31	0,918±0.050

### 4.3. Αναλύσεις λιπαρών οξέων

#### 4.3.1. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας

Το προφίλ των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας προσδιορίστηκε με τη μέθοδο O'Fallon *et al.* (2007) της άμεσης σύνθεσης μεθυλεστέρων, όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω. Ως δείγμα χρησιμοποιήθηκε το υγρό στο οποίο είχε απομακρυνθεί η στερεή φάση του υγρού και είχε διηθηθεί από μονή γάζα. Τα δείγματα ξεπάγωσαν ομαλά και όταν έφτασαν σε θερμοκρασία δωματίου ζυγίστηκε 1 g σε ζυγό 4<sup>ov</sup> δεκαδικών.

#### 4.3.2. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο πλάσμα του αίματος

Το προφίλ των λιπαρών οξέων στο πλάσμα του αίματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο των Bondia-Pons *et al.*, (2004).

### 4.3.3. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο γάλα

Τα δείγματα γάλακτος όπου συλλέγονταν προκειμένου να προσδιοριστεί σε αυτά το προφίλ των λιπαρών οξέων εισάγονταν εντός Falcon των 50 ml και με τη χρήση παγοκύστεων μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Ενόργανων Αναλύσεων του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής και εισάγονταν εντός καταψύκτη στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι την προετοιμασία τους για ανάλυση.

Η προετοιμασία για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων αφορά την εκχύλιση του λίπους η οποία έγινε με τη μέθοδο Jiang *et al.* (1996). Αφού απομονώθηκε το λίπος, ακολούθησε η μεθυλεστεροποίησή του για την οποία χρησιμοποιείται η μέθοδος Kelly *et al.* (1998). Το εσωτερικό πρότυπο διάλυμα παρασκευάζεται από το λιπαρό οξύ  $\text{C}_{23:0}$  το οποίο γνωρίζουμε ότι δεν απαντάται στο γάλα.

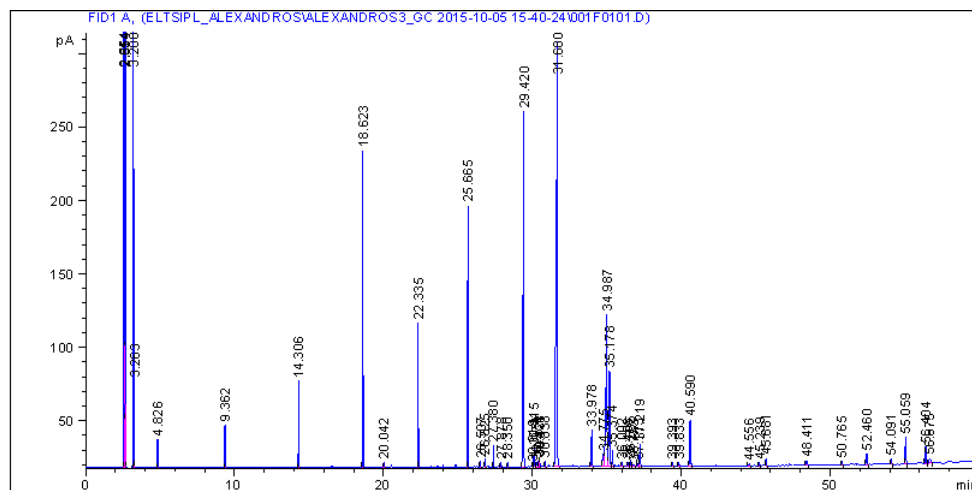
### 4.3.4. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στον αέριο χρωματογράφο και επεξεργασία αποτελεσμάτων

Ο χρωματογράφος όπου μετρήθηκαν τα δείγματα ήταν της εταιρίας Agilent Technologies, μοντέλο 6890N, εφοδιασμένος με πολική στήλη HP-88 μήκους 60 μέτρων, διαμέτρου 0,25 mm και 0,20 nm πάχος εσωτερικού φιλμ (Agilent, Santa Clara, USA) η οποία λειτουργεί σε εύρος θερμοκρασιών  $50^{\circ}\text{C}$  με  $260^{\circ}\text{C}$ . Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν φλόγας ιοντισμού (FID) ρυθμισμένος στους  $260^{\circ}\text{C}$ . Το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως προωθητικό αέριο με γραμμική ταχύτητα ρυθμισμένη στα 30 cm ανά δευτερόλεπτο. Κάθε κορυφή (σήμα) (Εικόνα 4.4) στο χρωματογράφημα τακτοποιήθηκε με βάση το πρότυπο των 37 γνωστών μεθυλεστέρων (FAME) (Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) και ποσοτικοποιήθηκε με βάση το εσωτερικό πρότυπο. Επιπροσθέτως, για την περαιτέρω ανίχνευση κάποιων σημαντικών λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα, ατομικά λιπαρά οξέα σε μορφή μεθυλεστέρων όπως το  $\text{C}_{18:2}$  cis-9, trans-11, το  $\text{C}_{18:2}$  trans-10, cis-12 και το  $\text{C}_{18:1}$  trans-11 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Τέλος, τα λιπαρά οξέα εκφράστηκαν ως επί τοις εκατό των ολικών λιπαρών οξέων του δείγματος.

Όσον αφορά τα λιπαρά οξέα του γάλακτος, κρίθηκε σκόπιμη η ομαδοποίησή τους για την ευκολότερη αλλά και σαφέστερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι ομαδοποιήσεις έγιναν ως εξής:



- Μικρής αλύσου λιπαρά οξέα (SCFA)=  $C_{4:0} + C_{6:0} + C_{8:0} + C_{10:0} + C_{11:0}$
  - Μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα (MCFA)=  $C_{12:0} + C_{13:0} + C_{14:0} + C_{15:0} + C_{16:0}$
  - Μακράς αλύσου λιπαρά οξέα (LCFA)=  $C_{17:0} + C_{18:0} + C_{20:0} + C_{22:0} + C_{23:0} + C_{24:0}$
  - Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA)=  $C_{18:2n6} + C_{18:2n6c} + C_{18:3n6} + C_{18:3n3} + C_{20:3n3} + C_{20:3n6} + C_{18:2 \text{ cis-9,trans-11}} + C_{18:2 \text{ trans-10,cis-12}} + C_{20:5} + C_{22:2} + C_{22:5} + C_{22:6}$
  - Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA)=  $C_{14:1} + C_{15:1} + C_{16:1} + C_{17:1} + C_{18:1 \text{ trans}} + C_{18:1 \text{ trans-11}} + C_{18:1 \text{ cis-9}}$
  - Ακόρεστα λιπαρά οξέα (UNFA)= PUFA+MUFA
  - Κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA)= SCFA+MCFA+LCFA
  - Κορεσμένα/Ακόρεστα (SFA/UNFA)=  $(SCFA+MCFA+LCFA)/(PUFA+MUFA)$
- Τέλος, ο αθρωματικός δείκτης (AI) υπολογίστηκε από τον τύπο  $(C_{12:0} + 4 * C_{14:0} + C_{16:0}) / (PUFA+MUFA)$ , όπως περιγράφεται από τους Ulbricht and Southgate (1991) (Tsiplakou, 2008).



Εικόνα 4.4. Χρωματογράφημα λιπαρών οξέων γάλακτος αέριου χρωματογράφου.

## 4.4. Αναλύσεις χημικής σύστασης γάλακτος

### 4.4.1. Προσδιορισμός της σύστασης του γάλακτος

Ο προσδιορισμός της σύστασης του γάλακτος έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή Milkscan (MilkoScan 133, FOSS, Hillerød, Denmark).

Η αρχή λειτουργίας της συσκευής αυτής βασίζεται στην υπέρυθη φασματοσκοπία (IR) και συγκεκριμένα στον νόμο του Beer-Lambert όπου οι διάφορες ομάδες συστατικών απορροφούν την ακτινοβολία σε διαφορετικά μήκη κύματος. Η συσκευή είναι σε θέση να μετρήσει μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα το δείγμα του γάλακτος και να

υπολογίσει: λιποπεριεκτικότητα, πρωτεϊνοπεριεκτικότητα, το ποσοστό της λακτόζης, το ποσοστό του στερεού υπολείμματος και τέλος το ποσοστό του στερεού υπολείμματος άνευ λίπους.

Προς επιβεβαίωση ότι η συσκευή λειτουργεί σωστά, πριν την έναρξη των μετρήσεων έγινε επαλήθευση με τη μέθοδο προσδιορισμού της λιποπεριεκτικότητας Gerber (1891) όπου τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με αυτά του Milkscan.

Τα δείγματα μετά το ψυγείο εισάγονταν σε υδατόλουτρο στους 37°C για περίπου 40 λεπτά. Ύστερα από ανάδευση μετρούνταν από τη συσκευή με δύο επαναλήψεις.

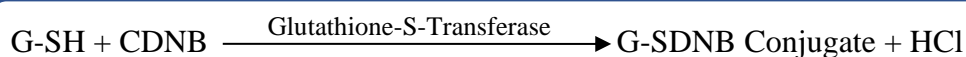
#### 4.5. Αναλύσεις αντιοξειδωτικού συστήματος

Οι αναλύσεις των αντιοξειδωτικών ενζύμων, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας καθώς και ο προσδιορισμός των οξειδωτικών δεικτών περιγράφεται αναλυτικά από τους Tsiplakou *et al.* (2017c). Περιγραφικά, θα αναφερθούν τα σημαντικότερα βήματα και η αρχή των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν.

##### 4.5.1. Αντιοξειδωτικά ένζυμα

###### 1) Μεταφοράση της γλουταθειόνης (GSTs)

Αντίδραση:



Συνθήκες:

Θερμοκρασία °C	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής	ABS σε nm	Χρόνος σε sec
38	6,5	1	340	120

Αντιδραστήρια:

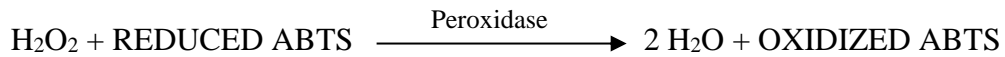
- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 2) L-Γλουταθειόνη (GSH)
- 3) 1-γλωρο-2,4-νιτροβενζόλιο (CDNB)

Προσδιορίζουμε τη δραστηριότητα μόνο σε δείγματα αίματος:

$$\text{Units/ml} = (\Delta A/\text{min}) * (V_{\text{ολ}}/ V_{\text{δείγματος(ml)}}) * (1/1,9)$$

## 2) Λακτοϋπεροξειδάση (LPO)

Αντίδραση:



Συνθήκες:

Θερμοκρασία °C	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής	ABS σε nm	Χρόνος σε sec
25	5,5	1	436	180

Αντιδραστήρια:

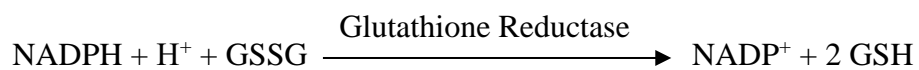
- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 2) ABTS (2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazoline-6- Sulfonic Acid)
- 3) Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Προσδιορίζουμε τη δραστηριότητα μόνο σε δείγματα γάλακτος:

$$\text{Units/ml} = \Delta A/\text{min}/ (29,3 * V_{\text{δείγματος(ml)}})$$

## 3) Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Αντίδραση:



Συνθήκες:

Θερμοκρασία °C	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής	ABS σε nm	Χρόνος σε sec
25	7,6	1	340	180

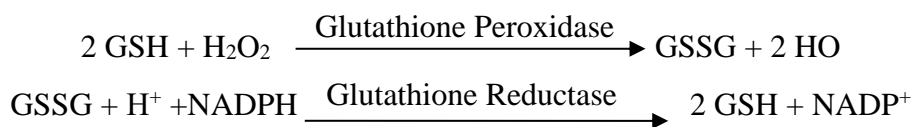
Αντιδραστήρια:

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) και αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA)
- 2) L-Γλουταθειόνη οξειδωμένη (GSSG)
- 3) β-NADPH
- 4) Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)

Προσδιορίζουμε δραστικότητα:

$$\text{Units/ml} = \Delta A / \text{min} / (6,22 * V_{\text{δείγματος(ml)}})$$

## 4) Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px)

Αντίδραση:Συνθήκες:

Θερμοκρασία °C	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής	ABS σε nm	Χρόνος σε sec
25	7	1	340	180

Αντιδραστήρια:

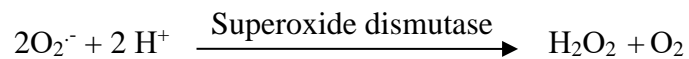
- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) και Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA)
- 2) L-Γλουταθειόνη οξειδωμένη (GSH)
- 3) Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- 4) β-NADPH
- 5) Αναγωγή της γλουταθειόνης (baker's yeast *S. cerevisiae*)

Προσδιορίζουμε τη δραστηριότητα:

$$\text{Units /ml} = (\Delta A/\text{min}) / (6,2 * V_{\text{δείγματος(ml)}})$$

### 5) Δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

Αντίδραση:



Συνθήκες:

Θερμοκρασία °C	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής	ABS σε nm	Χρόνος σε sec
25	7,8	1	550	300

Αντιδραστήρια:

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 2) Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)
- 3) Κυτόχρωμα C
- 4) Διάλυμα ξανθίνης
- 5) Ενζυμικό διάλυμα οξειδάσης ξανθίνης (XOD)

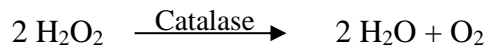
$$\% \text{ αναστολή} = (\Delta A/\text{min χωρίς αναστολή} - \Delta A/\text{min με αναστολή}) * 100 / (\Delta A/\text{min χωρίς αναστολή} - \Delta A/\text{min μάρτυρα})$$

Προσδιορίζουμε δραστηριότητα:

$$\text{Units/ml} = \% \text{ αναστολή} / 50 * V_{\text{δείγματος(ml)}}$$

### 6) Κατάλαση (CAT)

Αντίδραση:



Συνθήκες:

Θερμοκρασία °C	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής	ABS σε nm	Χρόνος σε sec
38	7	1	520	-

Αντιδραστήρια:

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH στο 7
- 2) Διάλυμα υπεροξειδάσης 800-1200 units/mg
- 3) Χρωμοφόρο διάλυμα

Το παραπάνω διάλυμα αποτελείται από:

- I. Φωσφορικό κάλιο (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH στο 7
- II. 4 αμινο-αντιπυρίνη
- III. 3,5-γλωρο-2-υδροξυβενζοϊκό θειικό οξύ

- 4) Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Μετρώ την απορρόφηση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε UV στα 240 nm.

- 5) Τερματικό διάλυμα (Sodium Azide)

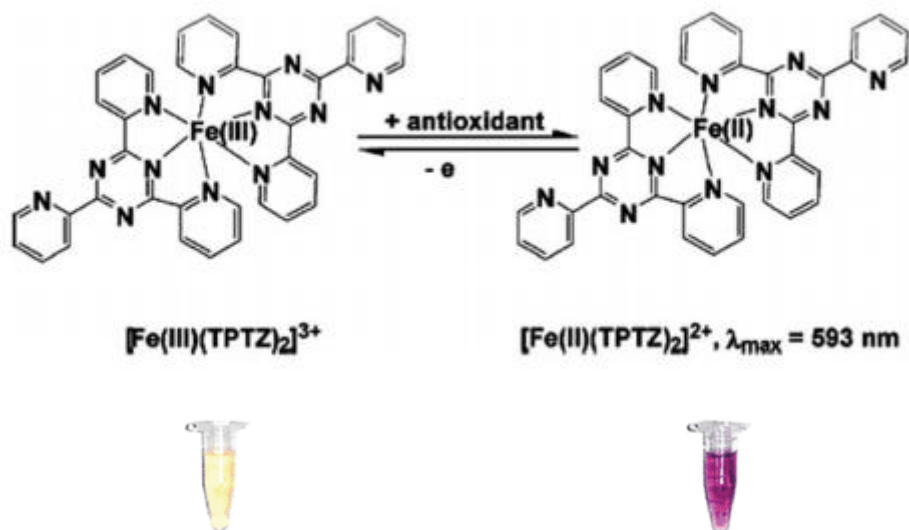
Προσδιορίζουμε τη δραστηριότητα:

$$\text{Units/ml} = (\text{ABS} * 1 * 100) / (4 * 0,075)$$

## 4.5.2. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα

### 1) Μέθοδος FRAP

Η μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας των αντιοξειδωτικών να ανάγουν το Fe (III) στο σύμπλοκο σιδηρο-2,4,6, τριπυδιδυλ-s-τριαζίνης (Fe (III)- TPTZ) σε Fe (II) στο αντίστοιχο σιδηρο-σύμπλοκο (Fe (II)- TPTZ) σε όξινο περιβάλλον.



Παρασκευή διαλυμάτων:

A) 300 mM CH<sub>3</sub>COONa\*3 H<sub>2</sub>O pH στο 3,6.

B) 10 mM TPTZ + 40 mM HCl

C) 20 mM FeCl<sub>3</sub>\* 6 H<sub>2</sub>O

D) Παρασκευάζεται το διάλυμα FRAP με την αναλογία, A:B:C→10:1:1

Το διάλυμα επωάζεται στους 37°C.

Πρότυπη καμπύλη

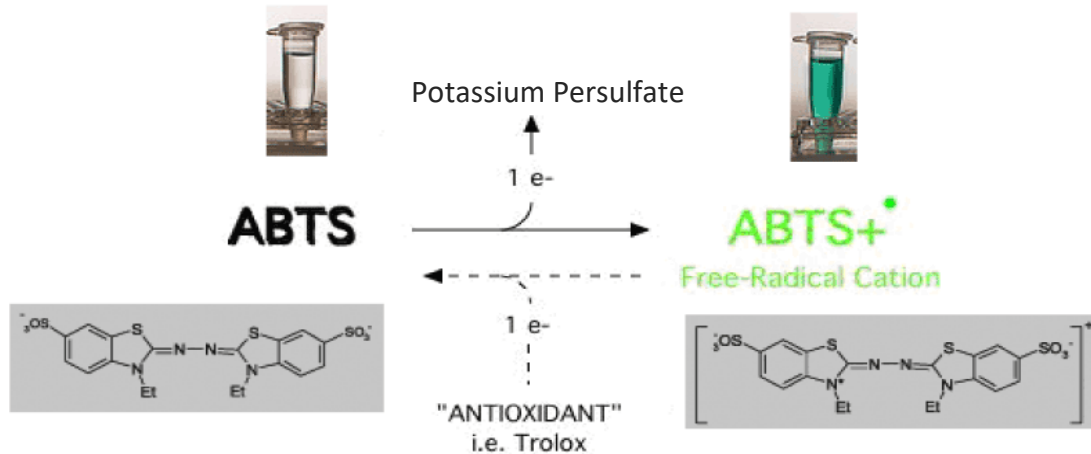
Χρησιμοποιούνται τιμές απορρόφησης πρότυπου διαλύματος ασκορβικού οξέος, συγκέντρωσης 1 mM.

μM ασκορβικού οξέος	0,5	1	2	4	6	8	10	12
μL ασκορβικού οξέος	0,5	1	2	4	6	8	10	12

Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατρέπονται σε  $\mu\text{M}$  με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Τιμή FRAP } (\mu\text{M}) = (\text{ABS}_{\text{δείγματος}} / \text{ABS}_{\text{πρότυπου}}) \times \text{τιμή πρότυπου } (\mu\text{M})$$

## 2) Μέθοδος ABTS



### Παρασκευή διαλυμάτων:

- 1) ABTS (2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid)
- 2) Υπερθειικό κάλιο

Αναμειγνύονται τα δύο διαλύματα, προσθέτοντας το διάλυμα 1 στο διάλυμα 2 σε αναλογία 1:1. Το διάλυμα αυτό (stock solution), επωάζεται για 12-16 ώρες στο σκοτάδι ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση.

Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατρέπονται σε αναστολή % με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Αναστολή \%} = (\text{ABS blank} - \text{ABS}_{\text{δείγματος}}) / \text{ABS blank} * 100$$



### 4.5.3. Οξειδωτικοί δείκτες

#### 1) Μέθοδος μηλονική αλδεΐδη (MDA)

Παρασκευή διαλυμάτων:

1. 1% Ορθοφωσφορικό οξύ
2. 0,6 % Θειοβαρβιτουρικό οξύ

Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατρέπονται σε MDA (μM) με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{MDA (}\mu\text{M)} = (\text{ABS}/155) * 100$$

#### 2) Μέθοδος πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC)

Αντιδραστήρια:

1. 2,4- δινιτροφαιλυδραζίνη (DNPH) σε HCl (2,5 N).
2. Διάλυμα ουρίας pH στο 2,3
3. Τριχλωροξικό οξύ (TCA) 20%
4. Τριχλωροξικό οξύ (TCA) 10%
5. Διάλυμα αιθανόλης: οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1:1

Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατρέπονται σε πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/ml) με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/ml)} = \text{ABS} * 45,45$$

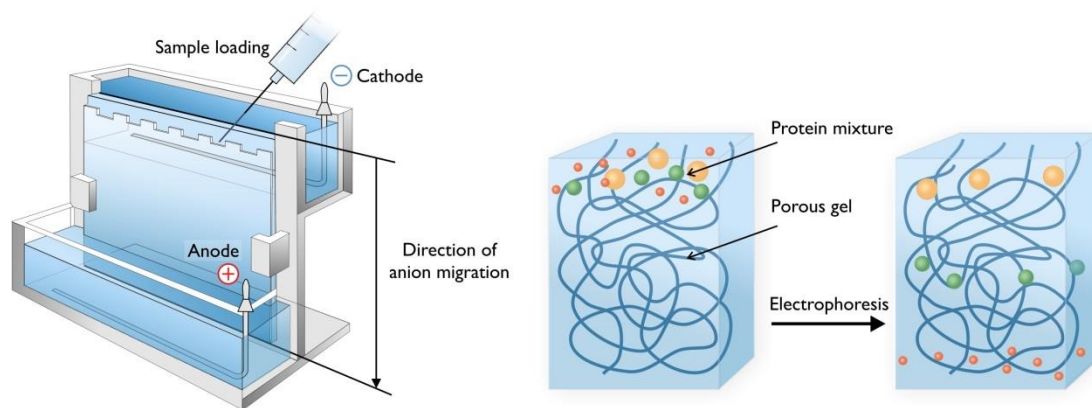
### 4.5.4. NADPH οξειδάση

Ο έμμεσος προσδιορισμός της ενεργότητας της NADPH οξειδάσης πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται από τους Manrommatis *et al.* (2018) με τη μέθοδο του native PAGE σε διαχωριστικό πήκτωμα ακριλαμιδίου 8% και 4% πήκτωμα στοίβαξης (stanning). Η δραστικότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τους Sagi και Fluhr (2001) ως ακολούθως:

- 1) Δείγματα πλάσματος αίματος, ακριβώς στα 120 μg πρωτεΐνης φορτωθήκαν σε κάθε θέση σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (1976).

- 2) Μετά την ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος, αυτό επώαστηκε για 20 λεπτά της ώρας σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,2 mM NBT, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, και 1 mM CaCl<sub>2</sub>.
- 3) Έπειτα, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω επώαση με NADPH (0,2 mM) όπου εμφανίστηκαν μπλε χρωμοφόρες ζώνες για κάθε δείγμα.

Μετά τη φωτογράφιση του πηκτώματος ενεργότητας, οι ζώνες απομονώθηκαν από το πήκτωμα, αποδιατάχθηκαν σε SDS στους 90°C για 10 λεπτά και φορτώθηκαν σε SDS PAGE σύμφωνα με τον/την Laemmli (1970) προκειμένου να επιβεβαιώσουμε πως η ενεργότητα των μπαντών του native PAGE προέρχεται αποκλειστικά από τις κύριες πρωτεϊνικές υπομονάδες της NADPH οξείδωσης.



Εικόνα 4.5. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με χρήση πηκτώματος ακριλαμιδίου.

#### Οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση μπαντών

Η φωτογράφιση τόσο του πηκτώματος native, όσο και του SDS πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή Minibis, DNR Bio-imaging System Ltd, Israel. Εν συνεχεία, με τη χρήση του προγράμματος ImageJ πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των μπαντών με βάση την πυκνότητα των εικονοκυττάρων της φωτογραφίας σύμφωνα με τους Schneider *et al.* (2012).

#### 4.6. Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα

Η διαδικασία του προσδιορισμού της σχετικής έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα βασίζονται στους Tsiplakou *et al.* (2018) με κάποιες τροποποιήσεις.

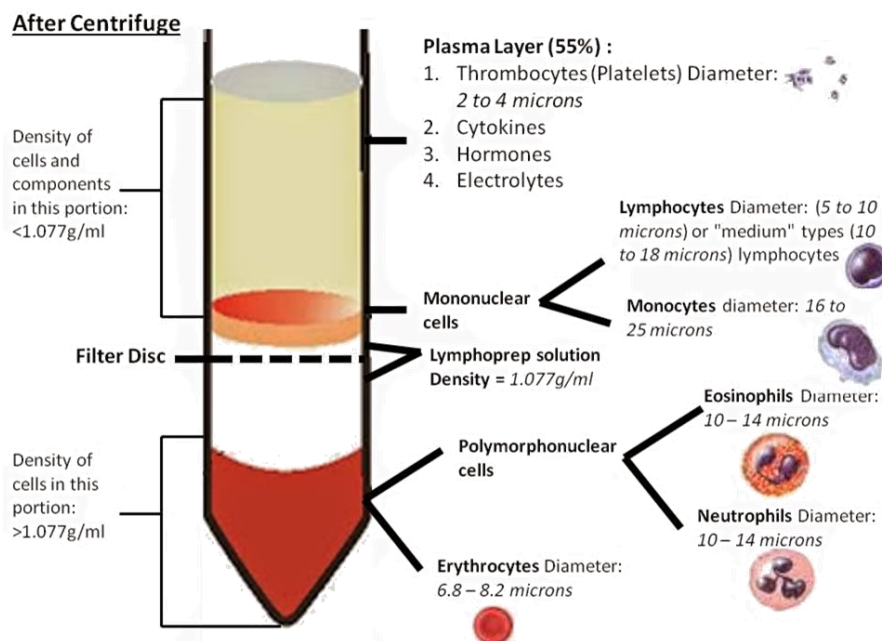
### Απομόνωση λευκοκυττάρων

Ολικό αίμα το οποίο συλλέχθηκε την 20<sup>η</sup>, 40<sup>η</sup> και την 60<sup>η</sup> ημέρα του πρώτου πειραματισμού μεταφέρθηκε άμεσα στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής για την απομόνωση μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων κυττάρων.

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αντιδραστηρίου Histopaque 1077 ορισμένης πυκνότητας (1.077 g/ml) (Sigma-Aldrich Co., USA) (Εικόνα 4.6). Μετά τη φυγοκέντριση παρατηρείται ο διαχωρισμός των κυττάρων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.7.



Εικόνα 4.6. Τοποθέτηση διαλύματος αίματος στο Histopaque 1077.



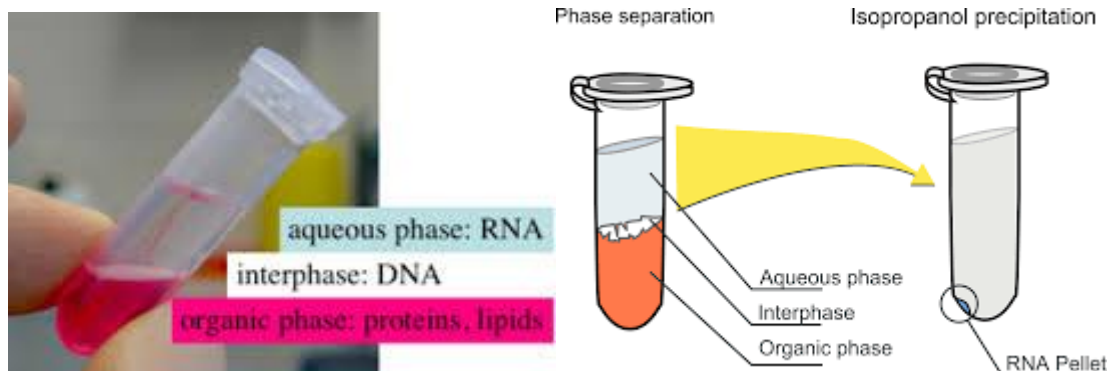
Εικόνα 4.7. Διαχωρισμός κυττάρων μετά τη φυγοκέντριση.

Εν συνεχεία, αφού αφαιρέθηκε η πρώτη στρώση υπερκειμένου (πλάσμα), η λεπτή στρώση των μονοκυττάρων μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα και έγινε πλύση 3 φορές σε Phosphate Buffer Saline (PBS) με διαδοχικές φυγοκεντρίσεις έως ότου τα κύτταρα να είναι καθαρά στον πυθμένα του σωλήνα.

Παράλληλα, στη στρώση των ερυθροκυττάρων που εμπεριέχονται τα ουδετερόφιλα μετά τη φυγοκέντριση, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με υπερκάθαρο νερό και ενδελεχείς ανακινήσεις σε ισοτονικό διάλυμα έως ότου παραλήφθησαν καθαρά κύτταρα. Ύστερα από πολλαπλές πλύσεις, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε θρεπτικό μέσο και πλύθηκαν ξανά σε PBS. Μετά από φυγοκέντριση και αφαίρεση του υπερκειμένου τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων όπως περιγράφεται παρακάτω.

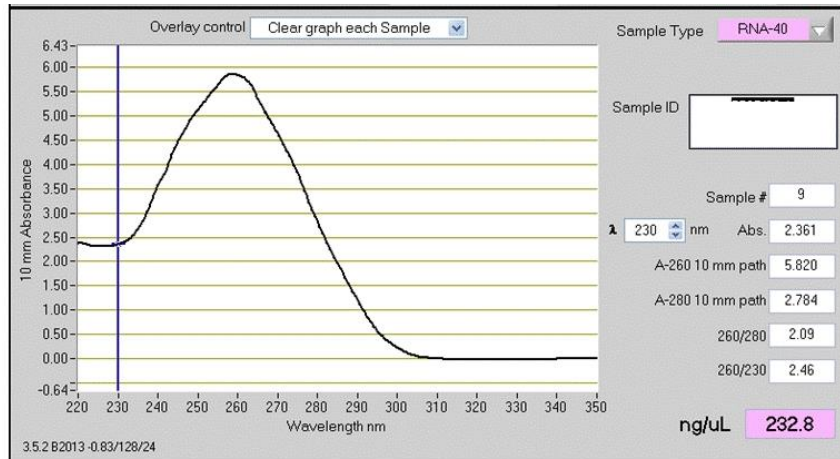
### Απομόνωση RNA

Ολικό RNA απομονώθηκε από περίπου  $5 \times 10^6$  κύτταρα/ δείγμα χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο reagent TriFast (VWR, International) και το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Εικόνα 4.8).



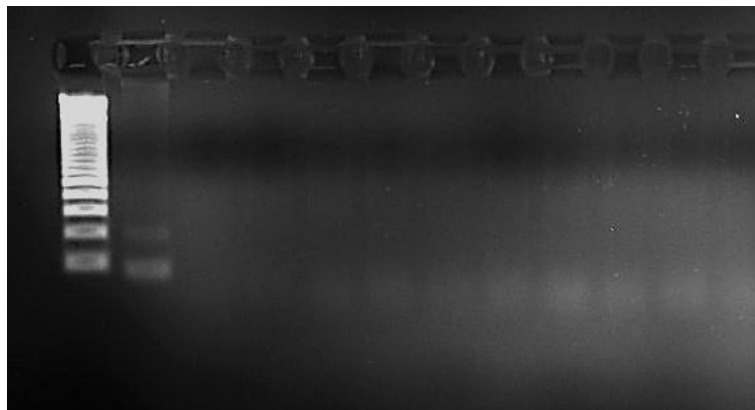
Εικόνα 4.8. Διαχωρισμός νουκλεϊκών οξέων και κατακρήμιση RNA.

Η ποσότητα και η ποιότητα του RNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά με χρήση NanoDrop (Quawell) και των λόγων A260/A280 και A260/A230 (Εικόνα 4.9).



Εικόνα 4.9. Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση απομονωμένου RNA.

Στη συνέχεια, σε 5  $\mu\text{g}$  RNA από κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε επώαση με Turbo DNase (2U/ $\mu\text{l}$ ) (Invitrogen, California, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ώστε να αποδιαταχθεί τυχόν μόλυνση από DNA. Ύστερα από την επώαση, τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ως PCR template με τη χρήση της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (*GAPDH*) και της Taq πολυμεράσης σε ένα κλασσικό PCR πρωτόκολλο 28 κύκλων με θετικό μάρτυρα ένα template αποτελούμενο από γενωμικό DNA. Εν συνεχεία τα προϊόντα της PCR φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,7% (Εικόνα 4.10) ώστε να διερευνηθεί η απουσία γενωμικού DNA μετά την επώαση της DNase.



Εικόνα 4.10. Πήκτωμα αγαρόζης 0,7% για τη διερεύνηση εναπομένου γενωμικού DNA μετά την επώαση της DNase (από αριστερά: Ladder low, θετικός μάρτυρας (πρώτη ορατή ζώνη το απλικόνιο στόχος συμπεριλαμβανομένης της περιοχής του ιντρονίου, δεύτερη ζώνη, απλικόνιο 70 βάσεων), δείγματα μετά τη DNase).

Έπειτα, τα δείγματα καθαρίστηκαν με τη χρήση διαλύματος 0,1 vol. οξικού νατρίου και 2,5 vol. αιθανόλης ώστε να κατακρημνιστεί το πλέον καθαρό RNA. Η ποσότητα και η ποιότητα του RNA διερευνήθηκε πάλι φωτομετρικά με χρήση NanoDrop (Quawell) και των λόγων A260/A280 και A260/A230. Η ανάκτηση του RNA κυμάνθηκε μεταξύ 50-85% με μέσο όρο 65%.

### **Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)**

Πεντακόσια ng καθαρού RNA μεταγράφηκαν αναστρόφως χρησιμοποιώντας το εμπορικό kit PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit (Takara Japan) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, κάνοντας χρήση των τυχαίων εξαμερών αλλά και των ολίγο- dT εκκινητών.

### **Σχεδιασμός εκκινητών**

Τα ζεύγη των εκκινητών σχεδιάστηκαν με αποκλειστικότητα στο είδος *Capra hircus* σύμφωνα με την κωδικοποιητική αλληλουχία (CDS) του GenBank, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PerlPrimer (Πίνακας 4.9). Συγκεκριμένα σχεδιάστηκαν: οι υποδοχείς τύπου Toll 4 (*TLR4*), ο διαφοροποιητής της πρώτης απάντησης των μυελοειδών 88 (*MYD88*), ο τομέας *TIR* επαγωγής της ιντερφερόνης β (*TRIF*), οι TNF υποδοχείς 3 (*TRAF3*), οι κινάσες-αναστολείς του μεταγραφικού παράγοντα *NFκ-B*, η υπομονάδα-α (*IKKα*) γνωστοί και ως διατηρημένη ουβικινόνη κινάση έλικα-βρόχου-έλικα (*CHUK*), ο μεταγραφικός παράγοντας *JunD* (*JUND*), ο οποίος αποτελεί την πιο αντιπροσωπευτική υπομονάδα του οπερονίου της πρωτεΐνης ενεργοποιητή 1 (AP-1), οι *MAP* κινάσες 1 (*MAPK1*), ο TRAF ενεργοποιητής του μεταγραφικού παράγοντα *NFκB* (*TANK*), ο ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης 3 (*IRF3*), ο ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης 5 (*IRF5*), ο μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3 (*STAT3*), η ιντερφερόνη γ (*INFg*), η ιντερλευκίνη-1 β (*IL1b*), η ιντερλευκίνη -2 (*IL2*), η ιντερλευκίνη -6 (*IL6*), η ιντερλευκίνη -8 (*IL8*), η ιντερλευκίνη -10 (*IL10*), η C-X-C χημοκίνη 5 (*CXCL5*), η C-X-C χημοκίνη 16 (*CXCL16*), ο μεταγραφικός πυρηνικός παράγοντας κάππα-B (*NFκB*), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (*TNFα*), η συνθετάση του νιτρικού οξέος (*iNOS*), η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (*GAPDH*), η πρωτεΐνη ενεργοποίησης της μονοξυγενάσης 3 της τυροσίνης/μονοξυγενάση 5 της τρυπτοφάνης, το ζήτα πολυπεπτίδιο (*YWHAZ*) και η υποξανθίνη-γουανίνη φωσφοριβομεταφοράση (*HPRT*).

Πίνακας 4.9. Αλληλουχίες, μέγεθος προϊόντων και θερμοκρασία πρόσθεσης εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματικού χρόνου qPCR.

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή	Προϊόν	Tm °C
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AAAGCCATCACCATCTTCCA -3' R: 5'-ACCACGTACTCAGCACCTCAT-3'	74	62
<i>YWHAZ</i>	F: 5'-TGTTCTATTGTGCCTAGTACACTGT -3' R: 5'-CATCAAGACTCACTGCCTCCC -3'	70	62
<i>HPRT</i>	F: 5'- CAGAAATAGTGACAGATCCATTCC -3' R: 5'- TCAAATCCAACAAAGTCTGGTC -3'	287	60
<i>TLR4</i>	F: 5'-ATGAACCACTCCACTCGCTC -3' R: 5'-TCTTGCTCCTTAGAGGCCGT -3'	70	62
<i>MYD88</i>	F: 5'-ACAGACAAACTATCGGCTGA-3' R: 5'-CACCTCTTCTCAATGAGTTCA-3'	99	60
<i>TRIF</i>	F: 5'-GACTTCTCACAGGCACCA-3' R: 5'-GTTCCCTCGTCTTGTCT-3'	149	60
<i>TRAF3</i>	F: 5'-AAGAAGGTTTCCTTGCTGC-3' R: 5'-CGATGACTCGCTGTAAATGG-3'	157	60
<i>CHUK</i>	F: 5'-TGCAGGGAAAGAGGCAGAAA-3' R: 5'-GACCGAGCAGAACTCTGTGT-3'	70	62
<i>JunD</i>	F: 5'-ACGCAGTTCCTCTTCCCAA-3' R: 5'-CCAGCTGGTTTTGCTTGTGT-3'	100	62
<i>MAPK1</i>	F: 5'-GCAACGACCACATCTGCTAC-3' R: 5'-AGGTTGGAAGGCTTGAGGTC-3'	100	62
<i>TANK</i>	F: 5'-TAAAATTTAGATTATTTATG-3' R: 5'-GCAACAAATGTCTTAAGTTT-3'	110	62
<i>IRF3</i>	F: 5'-CCAGAGGCTGGGGCACTGCC-3' R: 5'-CCTTCGGGACCTCGCCGTCA-3'	92	66
<i>IRF5</i>	F: 5'-ACATCCCCAGTGAGAAGCAG-3' R: 5'-ATGGCATAACAGATCCTGGCC-3'	100	62

<i>STAT3</i>	F: 5'-TGTGACACCAACGACCTG -3' R: 5'-CATGTCGAACGTGAGGGA -3'	142	60
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	F: 5'-AAATTCCGGTGGATGATCTG -3' R: 5'-ACCATTACATTGATGCTCTCC -3'	146	60
<i>IL1b</i>	F: 5'- TGGATAGCCCATGTGTGCTG -3' R: 5'- CAGAACACCACTTCTCGGCT -3'	70	62
<i>IL2</i>	F: 5'-GGAAGTGCTAGATTTAGCTCCA -3' R: 5'-GTTTCAGATCCCTGTAGTTCCA -3'	105	60
<i>IL6</i>	F: 5'-GTTCAATCAGGCGATTTGCT-3' R: 5'-AGGATCTGGATCAGTGTCTG -3'	147	60
<i>IL8</i>	F: 5'-CCTGCTCTCTGCAGCTCTGTG-3' R: 5'-TGCATTGGCATCGAAGTTCTG -3'	71	62
<i>IL10</i>	F: 5'-CTGGGGGAGAAGCTGAAGAC-3' R:5'-CTCTCTTCACCTGCTCCACC-3'	100	62
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	F: 5'-CGTTGTAGCCAACATCAGC -3' R: 5'-GGACCTGCGAGTAGATGAG -3'	143	60
<i>NF<math>\kappa</math>B</i>	F: 5'-ACAAATAGACGAGCTCCAGG -3' R: 5'-GGCACTTTGTTAAGAGTTAGCA -3'	123	60
<i>CXCL5</i>	F: 5'-CAAGTGCTCCATGGCAGCAG -3' R: 5'-GTTGGCGCACACCTGACG -3'	61	62
<i>CXCL16</i>	F: 5'-GTGCCTGTGTGTCCCTCTT -3' R: 5'-GCTTGCACACCACGTAGAGT -3'	70	62
<i>iNOS</i>	F: 5'-CTGGACCTCAACAAAGCCCT -3' R: 5'-GCTGCGATTTGAGCCTCATG -3'	70	60

### Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

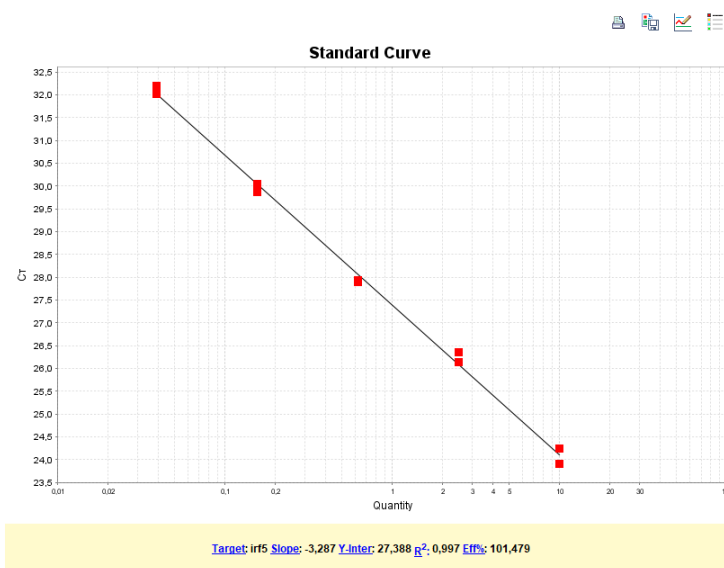
Η σχετική έκφραση των γονιδίων στόχων (*TLR4*, *MYD88*, *TRIF*, *TRAF3*, *CHUK*, *JUND*, *MAPK*, *TANK*, *IRF3*, *IRF5*, *STAT3*, *INF $\gamma$* , *IL1b*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, *TNF $\alpha$* ,



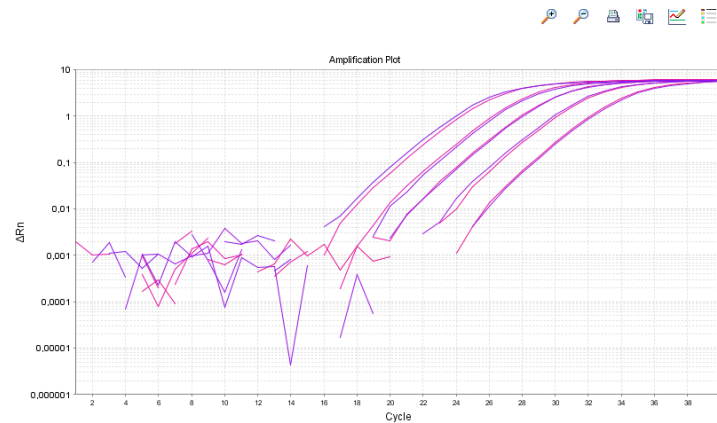
*NfκB*, *CXCL5*, *CXCL16*, *iNOS*) προσδιορίστηκε με διπλές τεχνικές επαναλήψεις σε μηχανήμα 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το μείγμα χρωστικής, πολυμεράσης και νουκλεοτιδίων SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Austin, TX, USA), τα ζεύγη των εκκινητών και 2 μl κάθε cDNA ως PCR template (πρότυπο).

Το πρόγραμμα της PCR ξεκίνησε με αποδιάταξη στους 95°C για 15 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι διπλές έλικες σε μονές και ακολούθησαν 40 κύκλοι με αποδιάταξη για 15 δευτερόλεπτα και πρόσδεση των εκκινητών για 1 λεπτό σε θερμοκρασία από 60°C ως 66°C ανάλογα με το γονίδιο στόχο, όπως φαίνεται στον πίνακα 4.9. Η ειδίκευση των εκκινητών και η πιθανότητα δημιουργίας διμερών μεταξύ τους παρακολουθούνταν με βάση την καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων με την αύξηση της θερμοκρασίας (melt curve analysis).

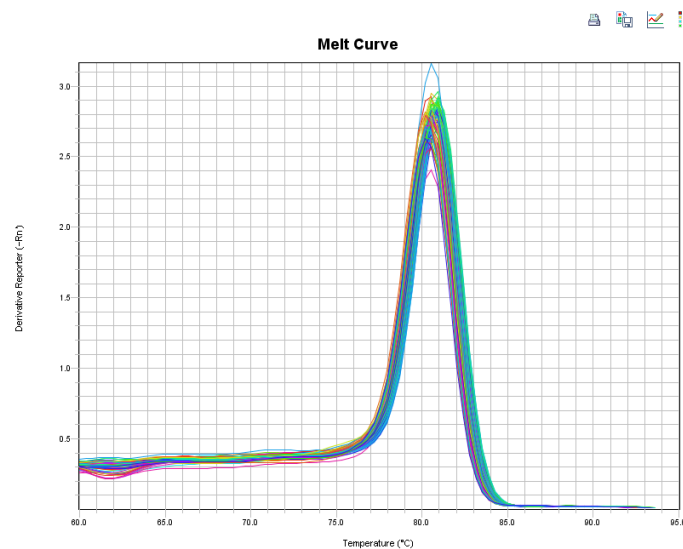
Τα επίπεδα έκφρασης των *GAPDH*, *YWHAZ* και *HPRT* χρησιμοποιήθηκαν ως ενδογενή γονίδια αναφοράς με σκοπό την κανονικοποίηση των γονιδίων στόχων. Η επιλογή τους έγινε σύμφωνα με τους Vorachek *et al.* (2013) στη μελέτη των οποίων αναδεικνύονται ως τα πιο σταθερά γονίδια σε φαγοκύτταρα προβάτων. Επιπροσθέτως, τα παραπάνω ενδογενή γονίδια αξιολογήθηκαν με το πρόγραμμα BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) το οποίο έδειξε τη σημαντική ( $P < 0,001$ ) τους, θετική, γραμμική παλινδρόμηση.



Εικόνα 4.11. Πρότυπη καμπύλη διαδοχικών αραιώσεων του cDNA.



Εικόνα 4.12. Σχετική έκφραση γονιδίων στόχων σε rt-PCR.



Εικόνα 4.13. Καμπύλη θερμοκρασίας αποδιάταξης των απλικονίων.

### Κανονικοποίηση

Η κανονικοποίηση έγινε σύμφωνα με τους Pfaffl *et al.* (2004) με τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP^{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP^{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Όπου: R η σχετική έκφραση του γονιδίου στόχου,  $E_{\text{target}}$  ή  $E_{\text{ref}}$  η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης (1+e) όπως προέκυψε από τις πρότυπες καμπύλες κάθε ζεύγους εκκινητών γονιδίων στόχων ή ενδογενών αντίστοιχα,  $\Delta CP^{\text{target}}$  η διαφορά των κύκλων (Ct) μεταξύ των δειγμάτων αναφοράς (εντός του στόχου) και του εκάστοτε

δείγματος για το οποίο αναφέρεται το R και ΔCPref ο γεωμετρικός μέσος της διαφοράς των κύκλων (Ct) μεταξύ του δείγματος αναφοράς (των ενδογενών) και των γεωμετρικών μέσων των ενδογενών για το οποίο αναφέρεται το R.

#### 4.7. Γονιδιωματική ανάλυση των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας

Μετα την παραλαβή των δειγμάτων του υγρού της μεγάλης κοιλίας, όπως περιγράφηκε παραπάνω, στα δείγματα πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA βασισμένη στις αρχές της διεθνούς βιβλιογραφίας, αλλά το επιμέρους πρωτόκολλο αναπτύχθηκε στο οικείο εργαστήριο σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γ.Π.Α.

Αναλυτικότερα, 1 g παγωμένου υγρού μεταφέρθηκε σε παγωμένο από υγρό άζωτο ιγδίο πορσελάνης και ομογενοποιήθηκε χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο (Εικόνα 4.14).

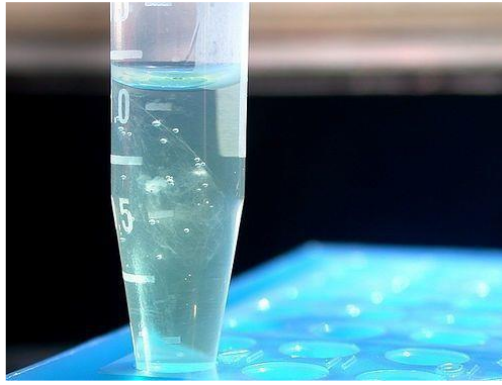


Εικόνα 4.14. Ομογενοποίηση υγρού μεγάλης κοιλίας με χρήση υγρού αζώτου.

Η πούδρα που προέκυψε μετά την ομογενοποίηση μεταφέρθηκε σε σωλήνα Falcon 50 ml και προστέθηκαν άμεσα 5 ml διαλύματος λύσης.

Αφού τα δείγματα επώαστηκαν στους 57°C για 2 ώρες με το διάλυμα λύσης, ακολούθησε επώαση στους 37°C για 30 λεπτά με διάλυμα RNase A το οποίο προηγουμένως είχε θερμανθεί στους 100°C για 10 λεπτά προκειμένου να αποδιαταχθεί πιθανή επιμόλυνση της RNase με DNase.

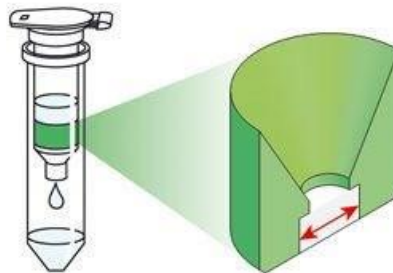
Στη συνέχεια, ακολούθησε απομόνωση του DNA με ίσο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου:ισομυλικής αλκοόλης, ανάδευση, φυγοκέντριση και ανάκτηση του υπερκείμενου για 3 συνεχόμενες φορές και τελικώς κατακρήμνιση του DNA ισοπροπανόλη και ολονύκτια επώαση στους -20°C (Εικόνα 4.15).



Εικόνα 4.15. Κατακρήμιση DNA σε διάλυμα ισοπροπανόλης.

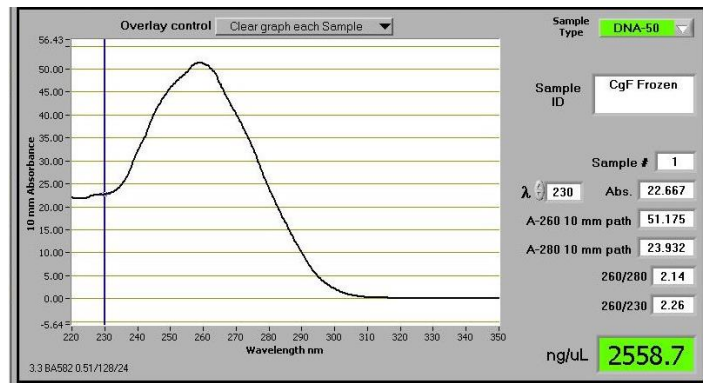
Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 7500 g για 15 λεπτά στους 4°C. Το σύμπηκτο στον πυθμένα του σωλήνα πλύθηκε μια φορά με 75% αιθανόλη και στη συνέχεια μια φορά με 100% αιθανόλη και αφού αφαιρέθηκε προσεκτικά όλη η ποσότητα αιθανόλης, το σύμπηκτο του DNA επαναδιαλύθηκε σε υπερκάθαρο νερό.

Εν συνεχεία, 150  $\mu$ L του δείγματος επεξεργάστηκαν με τη χρήση στηλών επιτάχυνσης NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

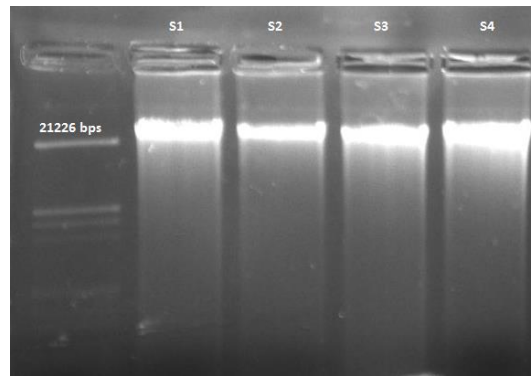


Εικόνα 4.16. Γραφική αναπαράσταση στηλών επιτάχυνσης.

Τελικώς, η ποιότητα και η ποσότητα του DNA προσδιορίστηκαν με τη χρήση φωτόμετρου nanodrop (Εικόνα 4.17) και με τη χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτώματος αγαρόζης 0,7% (Εικόνα 4.18).



Εικόνα 4.17. Ενδεικτική φωτογραφία αποτελεσμάτων φωτόμετρου nanodrop δειγμάτων για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων μετά την απομόνωση.



Εικόνα 4.18. Ενδεικτική φωτογραφία του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης δειγμάτων για τον ποιοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων μετά την απομόνωση.

#### 4.7.1. Γονιδιωματική ανάλυση των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας με Real-Time PCR

Τα απομονωμένα δείγματα DNA ενισχύθηκαν με σκοπό την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων βακτηρίων, πρωτοζώων και μυκήτων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 12, με τους εκκινητές που επιλέχθηκαν. Η ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών προσδιορίστηκε σε μηχανήμα Step-One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το μείγμα χρωστικής, πολυμεράσης και νουκλεοτιδίων SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Austin, TX, USA), τα ζεύγη των εκκινητών σε τελική συγκέντρωση 0,2  $\mu\text{M}$  και 1  $\mu\text{l}$  κάθε DNA ως PCR template (40  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ).

Το πρόγραμμα της PCR ξεκίνησε με αποδιάταξη στους 94°C για 4 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι διπλές έλικες σε μονές. Η συνέχεια των προγραμμάτων εξαρτήθηκε από το μέγεθος του απλικονίου (Πίνακας 4.10). Η ειδίκευση των εκκινητών και η πιθανότητα δημιουργίας διμερών μεταξύ τους, παρακολουθούνταν με βάση την καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων με την αύξηση της θερμοκρασίας (melt curve analysis) και την ηλεκτροφόρηση 2% πηκτώματος αραρόζης. Η σχετική γενωμική συγκέντρωση των ειδών στόχων υπολογίστηκε ως προς την αναλογία επί της γενωμικής συγκέντρωσης των ολικών βακτηρίων με βάση τον τύπο:

$$(1 + \text{PCR}_{\text{αποτελεσματικότητα}})^{-(\Delta C_{\text{στόχου}} - \Delta C_{\text{ολικών βακτηρίων}})}$$

όπου η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης PCR υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της γραμμικής λογαριθμικής διακύμανσης του φθορισμού ανά κύκλο με τη χρήση του προγράμματος LINREGPCR (Ramakers *et al.*, 2003).

Πίνακας 4.10. Αλληλουχίες εκκινητών και μέγεθος απλικονίων για την πραγματικού χρόνου qPCR.

	Αλληλουχία εκκινητή	Προϊόν	Tm °C	Βιβλιογραφία
<i>Bacteria (16s)</i>	F: 5'-CGGCAACGAGCGCAACCC-3' R: 5'-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC-3'	130	61	Zhou <i>et al.</i> (2012)
<i>Archaea</i>	F: 5'-ATTAGATACCCSBGTAGTCC-3' R: 5'-GCCATGCACCWCCTCT-3'	273	56	Kim <i>et al.</i> (2017)
<i>Protozoa</i>	F: 5'- GCTTTCGWTGGTAGTGTATT-3' R: 5'- CTTGCCCTCYAATCGTWCT-3'	321	55	Zhou <i>et al.</i> (2012)
<i>Total fungi</i>	F: 5'- GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC-3' R: 5'- CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT-3'	120	58	Zhou <i>et al.</i> (2012)
<i>Methanogen</i>	F: 5'- TTCGGTGGATCDCARAGRGC -3' R: 5'- GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC -3'	145	58	Zhou <i>et al.</i> (2012)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	F: 5'- TAACATGAGAGTTTGATCCTGGCTC -3' R: 5'- CGTACTCACCCGTCCGC -3'	136	58	Yang <i>et al.</i> (2009)
<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	F: 5'- TCCGGTGGTATGAGATGGGC -3'	200	60	

	R: 5'- GTCGCTGCATCAGAGTTTCCT -3'			Vargas-Bello-Pérez <i>et al.</i> (2016)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	F: 5'- CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG -3' R: 5'- CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC -3'	132	60	Zhou <i>et al.</i> (2012)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	F: 5'-GCGGGATTGAATGTACCTTGAGA-3' R: 5'- TCCGCCTGCCCTGAACTATC-3'	204	60	Yang <i>et al.</i> (2009)
<i>Ruminococcus albus</i>	F: 5'- CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG-3' R: 5'- CCTCCTTGCGGTTAGAACA-3'	175	62	Kim <i>et al.</i> (2017)
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	F: 5'- ATGCAAGTCGAACGGTAACAGCAGG -3' R: 5'-GCACCCGTTTCCAGGTGTTGTCC-3'	115	65	Duval <i>et al.</i> (2007)
<i>Streptococcus bovis</i>	F: 5'- TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG -3' R: 5'-ATGATGGCAACTAACAATAGGGGT-3'	127	57	Kim <i>et al.</i> (2017)
<i>Selenomonas ruminantium</i>	F: 5'- CAATAAGCATTCCGCCTGGG -3' R: 5'-TTCACTCAATGTCAAGCCCTGG-3'	138	57	Kim <i>et al.</i> (2017)
<i>Prevotella sp</i>	F: 5'- CACCAAGGCGACGATCA -3' R: 5'-GGATAACGCCYGGACCT-3'	283	55	Kim <i>et al.</i> (2017)

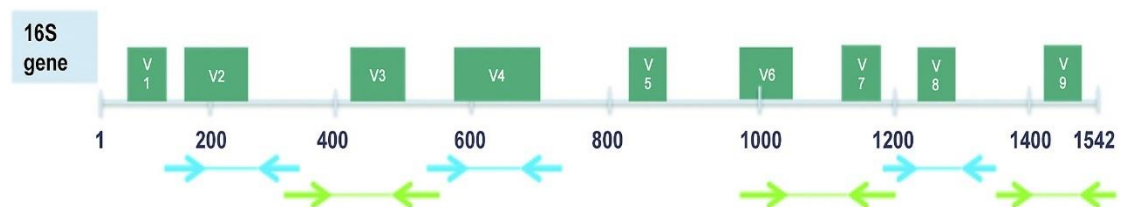


<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	F: 5'-CTTAACTATAAGAATTGCTGGAG-3' R: 5'-TTCGTTACTCACCGTCAAGATC-3'	150	58	Zhou <i>et al.</i> (2009)
<i>Methanobacteriales</i>	F: 5'-CGWAGGGAAGCTGTTAAGT-3'	343	55	Kim <i>et al.</i> (2017)
<i>Methanobacterium formicicum</i>	R: 5'-TACCGTCGTCCACTCCTT-3'			
<i>Methanomicrobiales</i>	F: 5'-ATTAGATACCCSBGTAGTCC-3'	273	60	Kim <i>et al.</i> (2017)
<i>Methanomicrobium mobile</i>	R: 5'-GCCATGCACCWCCTCT-3'			
<i>Methanobrevibacter spp.</i>	F: 5'-TGGGAATTGCTGGWGATACTRTT-3' R: 5'-GGAGCRGCTCAAAGCCA-3'	231	60	Kim <i>et al.</i> (2017)

#### 4.7.2. Μεταγονιδιωματική ανάλυση των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας με τη χρήση αλληλούχισης νέας γενιάς και την τεχνολογία Ion Torrent

##### Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA

Η υπομονάδα 16S του ριβοσωματικού RNA (16S rRNA) των βακτηρίων έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στο παρελθόν και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των βακτηρίων. Το 16S rRNA που αποτελείται από 1500 περίπου βάσεις νουκλεοτιδίων, βρίσκεται σε όλα τα βακτήρια. Η βασική του λειτουργία είναι η έναρξη και η επιμήκυνση της πρωτεϊνσύνθεσης, η οποία δεν έχει αλλάξει, και έτσι τυχαίες αλλαγές αποτελούν δείκτη του χρόνου εξέλιξης των βακτηρίων. Παρ' όλη την εν γένει υψηλή ομολογία του 16S rRNA μεταξύ των βακτηριακών ειδών (“συντηρημένες περιοχές”), το 16S rRNA περιλαμβάνει στην αλληλουχία του εννέα μεταβλητές περιοχές (Εικόνα 4.19) που είναι διακριτές μεταξύ των διαφόρων μικροβίων και οι οποίες ως εκ τούτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αναγνώριση και διάκριση μεταξύ των βακτηρίων. Για την ταυτοποίηση ακολουθήθηκε σύγκριση, με τη βοήθεια ειδικών λογισμικών προγραμμάτων, των rDNA αλληλουχιών του 16S rRNA με αλληλουχίες αναφοράς από βάσεις δεδομένων, όπως η GenBank ή η Ribosomal Database Project που περιλαμβάνουν νουκλεοτιδικές ακολουθίες εκατοντάδων χιλιάδων οργανισμών.



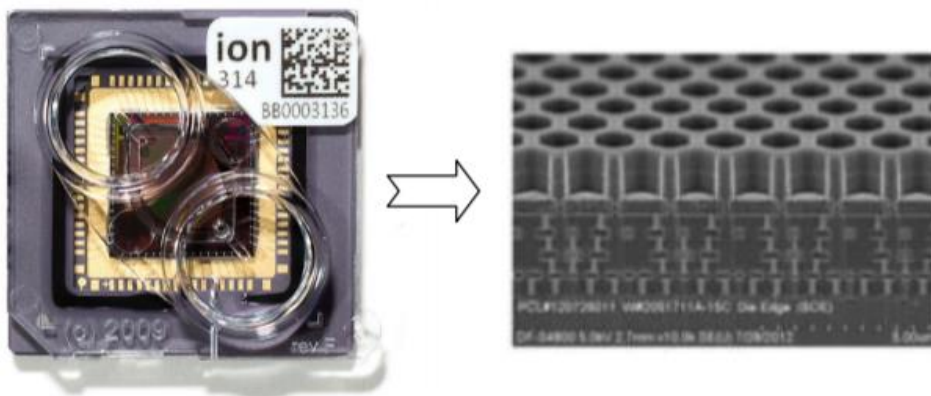
Εικόνα 4.19. Ζεύγη εκκινητών και θέση πρόσδεσης σε υπερμεταβλητές περιοχές της αλληλουχίας του 16S rRNA.

##### Αλληλούχιση των απλικονίων

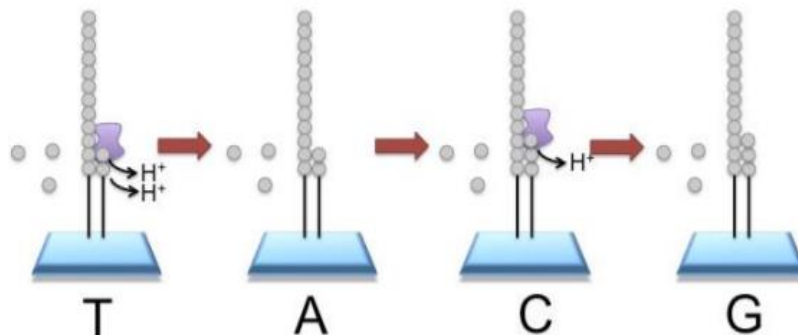
Η μέθοδος αλληλούχισης νέας γενιάς με τον αναλυτή PGM (Personal Genome machine) της Ion Torrent βασίζεται στην τεχνολογία ημιαγωγού η οποία ανιχνεύει τα πρωτόνια που απελευθερώνονται εξαιτίας της σύνδεσης νουκλεοτιδίων, μόνο σε περίπτωση που βρεθεί συμπληρωματικότητα, κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης ακινητοποιημένων αλυσίδων DNA πάνω σε ειδικά σφαιρίδια (Εικόνα 4.20, 4.21). Η

διαδικασία γίνεται σε τέσσερα στάδια: την προετοιμασία των βιβλιοθηκών, την PCR, την αλληλούχιση και την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Ion Ampliseq™ Designer της Ion torrent από τη Thermo Fisher Scientific. Το πρόγραμμα αυτό αποτελεί ένα εργαλείο που επιτρέπει το σχεδιασμό προσαρμοσμένων εκκινητών για την υψηλής ακρίβειας πολυπλεκτική PCR, η οποία αποτελεί βήμα της μεθόδου της αλληλούχισης μέσω ημιαγωγού, που χρησιμοποιεί ο γενετικός αναλυτής PGM της Ion torrent.



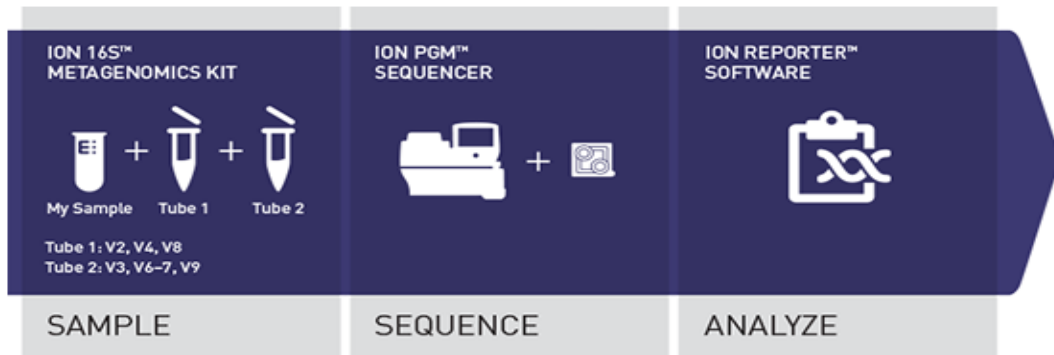
Εικόνα 4.20. Μικρό-chip PGM της Ion torrent και ψηφιακή αναπαράσταση των κελιών αντίδρασης.



Εικόνα 4.21. Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων που συμβαίνουν κατά την επιμήκυνση. Ο ανιχνευτής, ανιχνεύει το πρωτόνιο που απομακρύνεται από το υδροξύλιο του 3' άκρου του νουκλεοτιδίου της συντιθέμενης αλυσίδας, εφόσον το μονονουκλεοτίδιο που εκείνη τη στιγμή πλημμυρίζει το σύστημα είναι το συμπληρωματικό.

## Ανάλυση δεδομένων

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιείται με μια συνεχή ροή δεδομένων με τη μορφή reads από τον αλληλουχητή σε ένα κεντρικό, πανίσχυρο server με την ονομασία Ion reporter, ο οποίος ανατρέχει σε βάσεις δεδομένων όπως η Greengenes και η MicroSEQ ID 16S rRNA και ταυτοποιεί (σε επίπεδο γένους ή είδους) αυτές της αναγνώσεις (reads) σε μικροοργανισμούς.



Εικόνα 4.22. Γραφική αναπαράσταση των κύριων βημάτων μεταγονιδιωμικής με τη χρήση PGM της Ion torrent.

## 4.8. Στατιστική ανάλυση

Όσον αφορά τη στατιστική επεξεργασία, όλες οι μεταβλητές ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα και την ομοιογένειά τους με τη μέθοδο Shapiro–Wilk. Ωστόσο, σε ελάχιστες περιπτώσεις που η κανονικότητα ή η ομοιογένεια των δειγμάτων παραβιαζόταν ( $P < 0,05$ ), εφαρμόστηκε μη παραμετρική ανάλυση των Kruskal–Wallis ακολουθούμενη από πολλαπλά tests των Dunn’s εκτός της περίπτωσης των μεταβλητών που οι συγκρίσεις εμπειρίχαν περισσότερους από έναν παράγοντες και ήταν αδύνατον. Στην πλειοψηφία των μεταβλητών που ακολουθούσαν κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε ένα γενικό γραμμικό μοντέλο (General Linear Model) επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Repeated Measures) με ανάλυση διασποράς (ANOVA) λαμβάνοντας το χρόνο ως επαναλαμβανόμενη τιμή (S), σταθερές επιδράσεις τις διατροφικές επεμβάσεις ( $D=CON, ALG20, ALG40, ALG60$ ), το χρόνο δειγματοληψίας και την αλληλεπίδραση αυτών με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$Y_{ijkl} = \mu + D_i + S_j + E_k + (D \times S)_{ij} + e_{ijkl}$$

όπου  $Y_{ijkl}$  η εξαρτώμενη μεταβλητή,  $\mu$  ο μέσος όρος,  $D_i$  η επίδραση της διατροφικής επέμβασης,  $S_j$  η επίδραση του χρόνου,  $E_k$  η τυχαία επίδραση του ζώου,  $(D \times S)_{ij}$  η αλληλεπίδραση διατροφής και δειγματοληψίας και  $e_{ijkl}$  το τυπικό σφάλμα όλων των μεταβλητών. Επιπλέον, όπου ήταν εφαρμόσιμο, πραγματοποιήθηκε Post hoc ανάλυση με πολλαπλές δοκιμές Tukey's.

Στις περιπτώσεις επεξεργασίας δεδομένων περισσότερων παραγόντων (λόγος  $XZ/\Sigma Z$ , επίπεδο ενσωμάτωσης μικροφύκους και χρόνος δειγματοληψίας) εφαρμόστηκε η μέθοδος ANOVA πολλαπλών παραγόντων (MANOVA).

Επιπλέον, εφαρμόστηκε ολιστικά διαχωριστική ανάλυση (Discriminant Analysis) με σκοπό τη διερεύνηση της δυνατότητας των μετρήσεων να ταξινομηθούν στις τέσσερις ομάδες. Τα δείγματα εισήχθησαν όλα μαζί ανεξάρτητα. Το κριτήριο ταξινόμησης αυτών ήταν το Wilk's lambda ( $\lambda$ ) σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

Τέλος, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση των διατροφικών επεμβάσεων στα μεταβολικά μονοπάτια που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση των κύριων συνιστωσών (PCA). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε περιστροφή των αξόνων κατά Varimax, θεωρώντας ότι οι μεταβλητές δεν συσχετίζονται. Όλα τα αποτελέσματα κρίθηκαν στατιστικώς σημαντικά με κριτήριο ( $P < 0,05$ ), και το επιθυμητό κριτήριο ήταν το  $KMO > 0,8$ . Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS version 20.0 (IBM).

Όσον αφορά τα διαγράμματα και τις στήλες της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism 6.0. Τέλος, οι γραμμές σφάλματος επί των γραφημάτων αφορούν το μέσο στατιστικό σφάλμα (SEM).

## **1<sup>ο</sup> Πείραμα**

### **5. Αποτελέσματα**

#### **5.1. Σωματικό βάρος αιγών**

Η μεταβολή του σωματικού βάρους των αιγών παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.1. Το μέσο σωματικό βάρος των αιγών μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων δεν διέφερε σημαντικά. Ωστόσο, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του σωματικού βάρους όλων των αιγών του πειραματισμού από την αρχή προς το τέλος του πειράματος (χρόνος).

#### **5.2. Κατανάλωση τροφής**

Στην ομάδα ALG60 παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της κατανάλωσης της ξηράς ουσίας των συμπυκνωμένων ζωοτροφών (Πίνακας 5.2). Απόρροια αυτού ήταν η μειωμένη πρόσληψη του μικροφύκου από τα 60 g/ημέρα/ζώο στα 40 g/ημέρα/ζώο.

Πίνακας 5.1. Εξέλιξη σωματικού βάρους των αιγών.

	Διατροφή (Δ)					Χρόνος (μέρες) (X)					Επίδραση			
	CON	ALG20	ALG40	ALG60	SEM‡	12	24	36	48	60	SEM‡	Δ	X	ΔxX
Σωματικό βάρος (Kg)	49,3	48,8	46,5	46,6	2,9	45,9 <sup>A</sup>	48,4 <sup>B</sup>	47,0 <sup>C</sup>	48,2 <sup>BD</sup>	49,4 <sup>E</sup>	1.5	NS	***	NS

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (A, B, C, D) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$  , \*\* $p < 0,01$  , \*\*\* $p < 0,001$ .

‡ SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

Πίνακας 5.2. Ημερήσια κατανάλωση τροφής, θρεπτικών συστατικών και λιπαρών οξέων (g/ζώο).

	<i>CON</i>	<i>ALG20</i>	<i>ALG40</i>	<i>ALG60</i>
<i>Ημερήσια κατανάλωση τροφών (g/ζώο)</i>				
Συμπυκνωμένες	1000	1000	1000	1000
Χονδροειδείς	1000	1000	1000	670
<i>Ημερήσια κατανάλωση θρεπτικών συστατικών (g/ζώο)</i>				
Ξηρά ουσία	1849	1854	1854	1547
Πρωτεΐνη	260	261	261	219
Λιπαρές ουσίες	56	70	76	66
Κυτταρικά τοιχώματα	369	371	371	357
NDF	660	655	652	621
ADF	442	437	438	424
<i>Ημερήσια κατανάλωση λιπαρών οξέων (g/ζώο)</i>				
C <sub>14:0</sub>	0,34	1,10	2,06	3,08
C <sub>16:0</sub>	10,26	12,77	15,88	14,01
C <sub>18:0</sub>	2,43	2,58	2,46	2,08
C <sub>18:1 cis-9</sub>	17,03	18,49	16,75	13,05
C <sub>18:2n6</sub>	21,58	24,23	23,03	18,57
C <sub>18:3n3</sub>	2,78	3,47	3,38	2,90
C <sub>22:5n6</sub>	-	1,65	3,34	3,28

### 5.3. Ημερήσια παραγωγή γάλακτος και χημική σύσταση αυτού

Η ημερήσια ποσότητα γάλακτος, η διορθωμένη ως προς τη λιποπερικτικότητα (4%) γαλακτοπαραγωγή, η περιεκτικότητα σε λίπος, πρωτεΐνη και λακτόζη παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.3. Η ημερήσια παραγωγή γάλακτος καθώς και η διορθωμένη ως προς τη λιποπερικτικότητα (4%) γαλακτοπαραγωγή δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων συμπεριλαμβανομένης και της ομάδας ALG60 όπου τα ζώα κατανάλωναν μειωμένη ποσότητα Ξ.Ο. Η λιποπερικτικότητα μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με τις ομάδες CON και ALG20. Όσον αφορά την πρωτεϊνοπερικτικότητα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων. Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε λακτόζη μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG40 σε σχέση με αυτήν της ομάδας CON και ALG20.



Πίνακας 5.3. Μέση ημερήσια γαλακτοπαραγωγή (g/ημέρα) και χημική σύσταση (%) του γάλακτος αιγών, οι οποίες διατράφηκαν με τα τέσσερα σιτηρέσια καθ'όλη την πειραματική περίοδο.

	Διατροφή (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)					Επίδραση		
	CON	ALG20	ALG40	ALG60	SEM <sup>‡</sup>	0	20	40	60	SEM <sup>‡</sup>	Δ	X	ΔxX
Γαλακτοπαραγωγή g	1300	1391	1302	1243	378,12	1677 <sup>B</sup>	1238 <sup>AB</sup>	1072 <sup>A</sup>	1252 <sup>AB</sup>	200,25	NS	*	NS
FCM <sub>4%</sub> <sup>†</sup>	1173	1136	1094	972	263,21	1481 <sup>D</sup>	1051 <sup>C</sup>	865 <sup>A</sup>	978 <sup>BC</sup>	141,50	NS	***	NS
Λίπος %	3,50 <sup>a</sup>	2,97 <sup>a</sup>	2,60 <sup>b</sup>	2,36 <sup>b</sup>	0,260	3,23 <sup>B</sup>	2,96 <sup>B</sup>	2,65 <sup>A</sup>	2,57 <sup>A</sup>	0,175	*	*	NS
Πρωτεΐνη %	3,12	3,21	3,42	3,39	0,239	3,06 <sup>A</sup>	3,28 <sup>AB</sup>	3,51 <sup>B</sup>	3,28 <sup>A</sup>	0,146	NS	*	NS
Λακτόζη %	4,56 <sup>b</sup>	4,41 <sup>b</sup>	3,96 <sup>a</sup>	4,31 <sup>ab</sup>	0,132	4,56 <sup>C</sup>	4,38 <sup>B</sup>	4,12 <sup>A</sup>	4,17 <sup>A</sup>	0,078	*	**	*

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (A, B, C, D) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$  , \*\* $p < 0,01$  , \*\*\* $p < 0,001$ .

<sup>†</sup>Διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα (4%) γαλακτοπαραγωγή σύμφωνα με την εξίσωση  $Y_{4\%} = (0.40 + 0.15 * F) * M$ , όπου F = λίπος % και M = γαλακτοπαραγωγή σε g

<sup>‡</sup> SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

## 5.4. Προφίλ λιπαρών οξέων

### 5.4.1. Προφίλ λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας

Το προφίλ των λιπαρών οξέων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.4. Το μυριστικό οξύ ( $C_{14:0}$ ) αυξήθηκε σημαντικά ( $P<0,05$ ) μεταξύ των ομάδων ALG20, ALG40 και ALG60, αλλά και σε σχέση με αυτό στο υγρό των αιγών της ομάδας CON κατά 85%, 151% και 190% αντίστοιχα. Το πενταδεκανοϊκό οξύ ( $C_{15:0}$ ) μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά ( $P<0,05$ ) στις ομάδες ALG40 και ALG60 κατά 22% και 15% αντίστοιχα σε σχέση με αυτό της ομάδας του μάρτυρα. Το παλμιτικό οξύ ( $C_{16:0}$ ) αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά ( $P<0,05$ ) στην ομάδα ALG20 σε σχέση με τις υπόλοιπες, και συγκεκριμένα κατά 9% σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Το παλμιτολεϊκό οξύ ( $C_{16:1}$ ) αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20 και ALG60 κατά 2,4 και 4,1 φορές αντίστοιχα σε σχέση με αυτό της ομάδας του μάρτυρα. Το στεατικό οξύ ( $C_{18:0}$ ) μειώθηκε σημαντικά στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των αιγών των ομάδων ALG20, ALG40 και ALG60 (82,3%, 90% και 91% αντίστοιχα) σε σχέση με αυτό της ομάδας CON. Επιπροσθέτως, το βασσενικό οξύ (*trans-11*  $C_{18:1}$ ) αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 (κατά 3,6, 3,5 και 3 φορές αντίστοιχα) σε σχέση με αυτό της ομάδας CON. Το ενδιάμεσο ισομερές της βιοϋδρογόνωσης, *trans-10*  $C_{18:1}$  προσδιορίστηκε στο υγρό της ΜΚ των ομάδων ALG20, ALG40 και ALG60 (σε συγκέντρωση 2,03%, 1,55% και 1,66 % των ολικών λιπαρών οξέων αντίστοιχα), ενώ στην ομάδα του μάρτυρα ήταν μη ανιχνεύσιμο. Το ελαϊκό οξύ (*cis-9*  $C_{18:1}$ ) αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG20 κατά 21% σε σχέση με αυτό της ομάδας του μάρτυρα, ενώ δεν επηρεάστηκε στις άλλες διατροφικές επεμβάσεις. Το λινελαϊκό οξύ ( $C_{18:2\ n-6}$ ) μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 κατά 32% και 44% αντίστοιχα, σε σχέση με αυτό της ομάδας του μάρτυρα. Το εικοσιδιπεντανοϊκό οξύ (DPA) αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες των αιγών των οποίων το σιτηρέσιο συμπληρώθηκε με μικροφύκη (κατά 2,49%, 6,31% και 7,83% των ολικών λιπαρών οξέων αντίστοιχα) σε σχέση με τη μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωσή του στην ομάδα του CON. Το εικοσιδιεξαενοϊκό (DHA) οξύ αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 (κατά 3,01%, 11,43% και 13,93% των ολικών λιπαρών οξέων αντίστοιχα) σε σχέση με τη μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωσή του στην ομάδα του CON.

Πίνακας 5.4. Μέσοι όροι των επιμέρους λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των αιγών που διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σε τρεις χρόνους δειγματοληψίας (20, 40, 60 ημέρες).

	Διατροφή (Δ)				SEM	Χρόνος (ημέρες) (X)				SEM	Επίδραση		
	CON	ALG20	ALG40	ALG60		19	39	59	Δ		X	ΔxX	
<i>C</i> <sub>14:0</sub>	1,55 <sup>a</sup>	2,88 <sup>b</sup>	3,90 <sup>c</sup>	4,50 <sup>d</sup>	0,120	3,16	3,14	3,25	0,101	***	NS	NS	
<i>C</i> <sub>14:1</sub>	1,21	1,54	1,15	1,33	0,175	1,21	1,24	1,47	0,087	NS	NS	*	
<i>C</i> <sub>15:0</sub>	1,23 <sup>a</sup>	1,39 <sup>a</sup>	0,96 <sup>b</sup>	1,04 <sup>b</sup>	0,076	0,99 <sup>a</sup>	1,17 <sup>ab</sup>	1,32 <sup>b</sup>	0,069	***	*	*	
<i>C</i> <sub>16:0</sub>	27,18 <sup>b</sup>	29,81 <sup>a</sup>	26,55 <sup>b</sup>	26,45 <sup>b</sup>	0,566	25,26 <sup>a</sup>	27,98 <sup>b</sup>	29,24 <sup>c</sup>	0,369	**	***	**	
<i>C</i> <sub>16:1</sub>	0,14 <sup>a</sup>	0,48 <sup>bc</sup>	0,33 <sup>ab</sup>	0,73 <sup>c</sup>	0,092	0,31	0,52	0,43	0,071	**	NS	NS	
<i>C</i> <sub>17:0</sub>	0,31	0,43	0,15	0,23	0,071	0,22	0,24	0,37	0,053	NS	NS	NS	
<i>C</i> <sub>18:0</sub>	42,21 <sup>a</sup>	7,51 <sup>b</sup>	4,42 <sup>b</sup>	3,63 <sup>b</sup>	1,605	14,74	14,22	14,35	0,901	***	NS	***	
<i>C</i> <sub>18:1 t</sub>	1,27 <sup>a</sup>	2,89 <sup>b</sup>	1,97 <sup>c</sup>	1,99 <sup>c</sup>	0,225	2,25	1,94	1,89	0,178	**	NS	NS	
<i>trans-11 C</i> <sub>18:1</sub>	5,46 <sup>a</sup>	25,36 <sup>b</sup>	24,50 <sup>b</sup>	21,91 <sup>b</sup>	1,158	21,96 <sup>a</sup>	18,66 <sup>b</sup>	17,29 <sup>b</sup>	0,678	***	***	NS	
<i>trans-10 C</i> <sub>18:1</sub>	0,00 <sup>a</sup>	2,03 <sup>b</sup>	1,59 <sup>c</sup>	1,66 <sup>c</sup>	0,117	1,50	1,21	1,25	0,101	***	NS	*	
<i>cis-9 C</i> <sub>18:1</sub>	10,21 <sup>a</sup>	12,37 <sup>b</sup>	10,03 <sup>a</sup>	8,85 <sup>a</sup>	0,530	9,19 <sup>a</sup>	10,91 <sup>b</sup>	11,01 <sup>b</sup>	0,337	**	***	NS	
<i>C</i> <sub>18:2 n-6 cis</sub>	6,36 <sup>a</sup>	5,08 <sup>ab</sup>	4,31 <sup>bc</sup>	3,50 <sup>c</sup>	0,446	4,07 <sup>a</sup>	4,79 <sup>ab</sup>	5,59 <sup>b</sup>	0,348	**	*	NS	
<i>C</i> <sub>20:0</sub>	0,08	0,07	0,04	0,02	0,026	0,02	0,07	0,06	0,017	NS	NS	NS	
<i>C</i> <sub>18:3 n-3</sub>	1,47	1,29	1,14	1,15	0,231	0,82 <sup>a</sup>	1,34 <sup>ab</sup>	1,62 <sup>b</sup>	0,175	NS	*	NS	
<i>C</i> <sub>18:2 συζευγμένα</sub>	1,35	1,37	1,33	1,25	0,163	0,97 <sup>a</sup>	1,59 <sup>b</sup>	1,42 <sup>b</sup>	0,119	NS	***	NS	

Αποτελέσματα

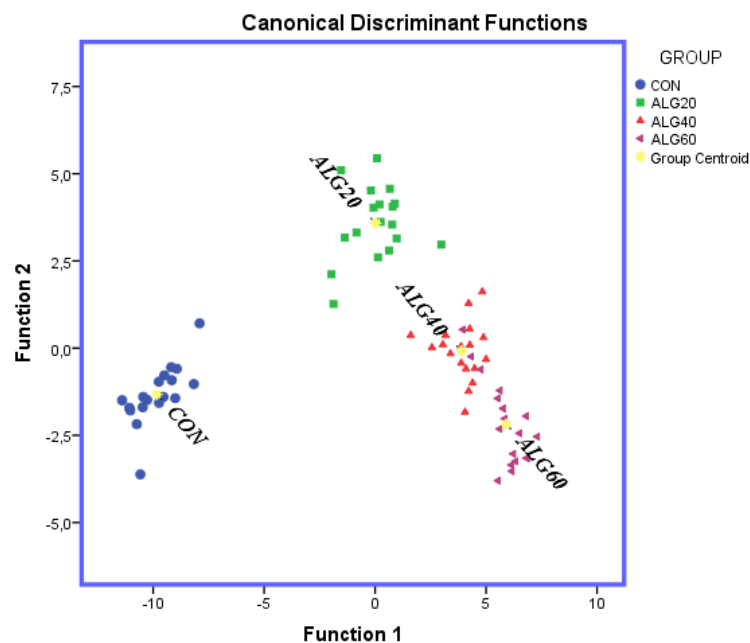
	<i>CON</i>	<i>ALG20</i>	<i>ALG40</i>	<i>ALG60</i>	<b>SEM</b>	<b>19</b>	<b>39</b>	<b>59</b>	<b>SEM</b>	<b>Δ</b>	<b>X</b>	<b>ΔxX</b>
<i>C<sub>22:5 n-6</sub></i>	0,00 <sup>a</sup>	2,49 <sup>b</sup>	6,31 <sup>c</sup>	7,83 <sup>d</sup>	0,233	4,64 <sup>a</sup>	4,09 <sup>b</sup>	3,74 <sup>b</sup>	0,191	***	*	**
<i>C<sub>22:6 n-3</sub></i>	0,00 <sup>a</sup>	3,01 <sup>b</sup>	11,43 <sup>c</sup>	13,93 <sup>d</sup>	0,512	8,70 <sup>a</sup>	6,86 <sup>b</sup>	5,71 <sup>c</sup>	0,359	***	***	**

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b, c, d) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b, c) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$  , \*\* $p < 0,01$  , \*\*\* $p < 0,001$ .

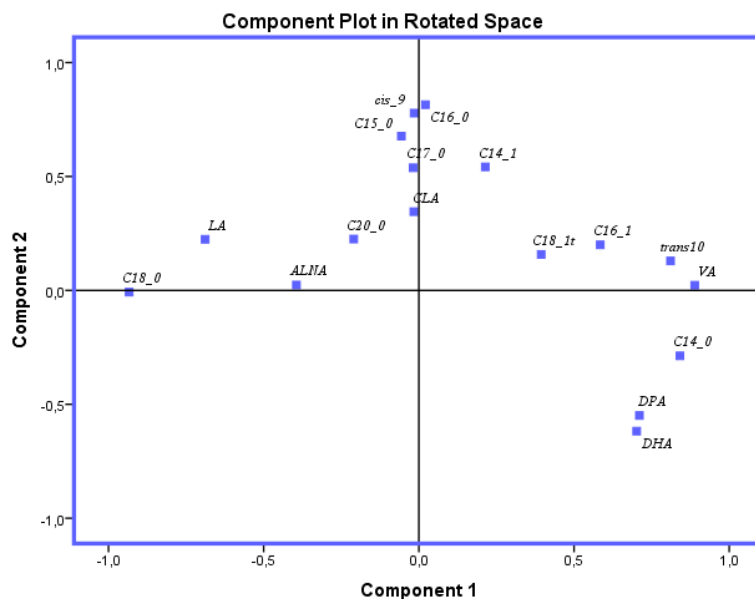
‡ SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

Επιπλέον, στα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές ομάδες (Σχήμα 5.1). Δεκαεπτά μεταβλητές εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διακρίνει τα εβδομήντα-δύο δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 97,2%. Τα λιπαρά οξέα τα οποία συνεισέφεραν περισσότερο στο διαχωρισμό ήταν: το C<sub>18:0</sub>, το C<sub>14:0</sub> και το DPA. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική και για τα δείγματα ( $P < 0,001$ ) με τιμή Wilks' lambda, 0,003 για το Function 1 και τιμή Wilks' lambda, 0,119 για το Function 2.



Σχήμα 5.1. Διαχωριστική απεικόνιση των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60).

Επιπροσθέτως, στα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών (Σχήμα 5.2). Οι δύο κύριες συνιστώσες αντιπροσωπεύουν το 50,74% και το κριτήριο KMO παρατηρήθηκε στα 0,110 λόγω των έντονων αρνητικών συσχετίσεων μεταξύ των λιπαρών.



Σχήμα 5.2. Στατιστική ανάλυση των κύριων συνιστωσών των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60).

#### 5.4.2. Προφίλ λιπαρών οξέων πλάσματος αίματος

Το προφίλ των λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.5. Το μυριστικό οξύ ( $C_{14:0}$ ) αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με αυτό στο αίμα των αιγών των ομάδων CON και ALG20. Το παλμιτικό οξύ ( $C_{16:0}$ ) μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά ( $P < 0,05$ ) στις ομάδες ALG40 και ALG60 (13,4% και 14% αντίστοιχα) σε σχέση με αυτό στο αίμα των αιγών της ομάδας CON, ενώ η μείωση 8% στην ομάδα ALG20 δεν ήταν σημαντική. Το στεατικό οξύ ( $C_{18:0}$ ) μειώθηκε σημαντικά στο αίμα των αιγών των ομάδων ALG40 και ALG60 (54,3% και 55,8% αντίστοιχα) σε σχέση με αυτό στο αίμα των αιγών της ομάδας CON καθώς επίσης 44% μεταξύ της ομάδας ALG20 και της ομάδας CON. Επιπροσθέτως, το βασσενικό οξύ (*trans-11*  $C_{18:1}$ ) αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 (22 και 19,6 φορές αντίστοιχα) σε σχέση με την ομάδα CON, καθώς αύξηση παρατηρήθηκε και στην ομάδα ALG20 (18,6 φορές) σε σχέση με την ομάδα CON. Το ελαιϊκό οξύ (*cis-9*  $C_{18:1}$ ) μειώθηκε σημαντικά κατά 45,9% στην ομάδα ALG20 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα καθώς και 50% και 55% στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Το λινελαϊκό οξύ ( $C_{18:2\ n-6}$ ) μειώθηκε σημαντικά στις τρεις διατροφικές επεμβάσεις με την προσθήκη των μικροφυκών σε

σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Συγκεκριμένα, η μείωση αντιστοιχούσε σε 17%, 43% και 64% για τις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Το εικοσαδυεξανοϊκό (DHA) και το εικοσαδυπεντανοϊκό (DPA) οξύ αυξήθηκαν σημαντικά στις ομάδες των αιγών των οποίων το σιτηρέσιο συμπληρώθηκε με μικροφύκη λόγω της λήψης αυτών των λιπαρών οξέων από την τροφή. Το DHA αυξήθηκε κατά 11,9, 17,5 και 19,5 φορές στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Το DPA αυξήθηκε κατά 3,8, 5,9 και 6,9 φορές στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Το διομο-α-λινολενικό οξύ ( $C_{20:3\ n-3}$ ) αυξήθηκε σημαντικά στο πλάσμα του αίματος στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 50%, 73% και 100% αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Το εικοσιδυενοϊκό οξύ ( $C_{22:2\ n-6}$ ) αυξήθηκε σημαντικά στο πλάσμα του αίματος στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 8,7, 14 και 18 φορές αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα.

Πίνακας 5.5. Μέσοι όροι των επιμέρους λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) στο πλάσμα αίματος των αιγών που διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σε τρεις χρόνους δειγματοληψίας (20, 40, 60 ημέρες).

	Διατροφή (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)				Επίδραση		
	CON	ALG20	ALG40	ALG60	SEM <sub>‡</sub>	20	40	60	SEM <sub>‡</sub>	Δ	X	ΔxX
<i>C</i> <sub>14:0</sub>	0,34 <sup>a</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,58 <sup>b</sup>	0,59 <sup>b</sup>	0,036	0,50	0,49	0,44	0,030	***	NS	NS
<i>C</i> <sub>14:1</sub>	0,02	0,00	0,05	0,06	0,002	0,08 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,012	NS	***	NS
<i>C</i> <sub>15:0</sub>	0,45	0,51	0,51	0,48	0,048	0,50	0,48	0,48	0,033	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>16:0</sub>	24,62 <sup>a</sup>	21,97 <sup>b</sup>	20,69 <sup>b</sup>	20,59 <sup>b</sup>	0,767	20,59 <sup>b</sup>	23,02 <sup>a</sup>	22,28 <sup>a</sup>	0,432	**	***	***
<i>C</i> <sub>16:1</sub>	0,30	0,21	0,33	0,34	0,063	0,25	0,34	0,30	0,045	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>17:0</sub>	0,57	0,50	0,57	0,59	0,079	0,44	0,60	0,63	0,064	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>18:0</sub>	27,30 <sup>a</sup>	14,92 <sup>b</sup>	12,13 <sup>c</sup>	11,76 <sup>c</sup>	0,637	14,63 <sup>a</sup>	18,01 <sup>b</sup>	16,94 <sup>c</sup>	0,378	***	***	NS
<i>C</i> <sub>18:1 trans</sub>	0,82 <sup>a</sup>	1,19 <sup>b</sup>	1,23 <sup>b</sup>	1,19 <sup>b</sup>	0,082	1,12	1,13	1,07	0,047	**	NS	NS
<i>trans-11 C</i> <sub>18:1</sub>	0,50 <sup>a</sup>	8,98 <sup>b</sup>	10,56 <sup>c</sup>	9,79 <sup>bc</sup>	0,428	9,46 <sup>a</sup>	6,15 <sup>b</sup>	6,76 <sup>b</sup>	0,306	***	***	*
<i>cis-9 C</i> <sub>18:1</sub>	13,13 <sup>a</sup>	6,90 <sup>b</sup>	6,35 <sup>cb</sup>	5,81 <sup>c</sup>	0,327	7,99	7,98	8,17	0,207	***	NS	**
<i>C</i> <sub>18:2 n-6 trans</sub>	0,09 <sup>a</sup>	0,62 <sup>b</sup>	0,52 <sup>c</sup>	0,40 <sup>d</sup>	0,037	0,44	0,40	0,39	0,027	***	NS	*
<i>C</i> <sub>18:2 n-6 cis</sub>	23,85 <sup>a</sup>	20,55 <sup>b</sup>	13,26 <sup>c</sup>	9,04 <sup>d</sup>	0,796	16,37	16,90	16,75	0,449	***	NS	NS
<i>C</i> <sub>18:3 n-6</sub>	0,20 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,39 <sup>b</sup>	0,042	0,30	0,25	0,29	0,035	**	NS	NS
<i>C</i> <sub>18:3 n-3</sub>	0,88	0,66	0,70	0,77	0,072	0,61 <sup>a</sup>	0,85 <sup>b</sup>	0,80 <sup>b</sup>	0,065	NS	*	NS



Αποτελέσματα

	<i>CON</i>	<i>ALG20</i>	<i>ALG40</i>	<i>ALG60</i>	SEM‡	20	40	60	SEM‡	Δ	X	ΔxX
<i>C<sub>20:3 n-6</sub></i>	0,22 <sup>a</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,57 <sup>bc</sup>	0,62 <sup>c</sup>	0,051	0,58 <sup>a</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,037	***	***	NS
<i>C<sub>22:0</sub></i>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,28 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,037	0,19	0,12	0,18	0,028	***	NS	NS
<i>C<sub>20:3 n-3</sub></i>	4,75 <sup>a</sup>	6,85 <sup>b</sup>	7,94 <sup>c</sup>	9,19 <sup>d</sup>	0,384	8,14 <sup>a</sup>	6,14 <sup>b</sup>	7,28 <sup>c</sup>	0,241	***	***	NS
<i>C<sub>22:2 n-6</sub></i>	0,87 <sup>a</sup>	7,37 <sup>b</sup>	11,80 <sup>c</sup>	15,11 <sup>d</sup>	0,533	8,84	8,55	8,97	0,300	***	NS	**
<i>C<sub>22:5 n-6</sub></i>	0,44 <sup>a</sup>	1,64 <sup>b</sup>	2,52 <sup>c</sup>	2,89 <sup>d</sup>	0,097	1,74 <sup>a</sup>	2,20 <sup>a</sup>	1,67 <sup>b</sup>	0,077	***	**	**
<i>C<sub>22:6 n-3</sub></i>	0,52 <sup>a</sup>	6,16 <sup>b</sup>	9,02 <sup>c</sup>	9,98 <sup>d</sup>	0,287	7,14 <sup>a</sup>	6,00 <sup>b</sup>	6,18 <sup>b</sup>	0,174	***	***	*

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b, c, d) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b, c) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$  , \*\* $p < 0,01$  , \*\*\* $p < 0,001$ .

‡ SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

### 5.4.3. Προφίλ λιπαρών οξέων γάλακτος

Το προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.6. Σύμφωνα με τις ομαδοποιημένες τιμές, τα μικρής αλύσου λιπαρά οξέα (SCFA) δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη του μικροφύκου στη διατροφή των αιγών. Τα μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα (MCFA) αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά στο γάλα των αιγών των οποίων το σιτηρέσιο συμπληρώθηκε με το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* σε σχέση με αυτά της ομάδας του μάρτυρα. Συγκεκριμένα, τα MCFA αυξήθηκαν σημαντικά στο γάλα των ομάδων ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 11%, 14% και 16% αντίστοιχα σε σχέση με αυτά της ομάδας του μάρτυρα. Τα μακράς αλύσου λιπαρά οξέα (LCFA) του γάλακτος μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 65%, 71,5% και 72,6% αντίστοιχα σε σχέση με αυτά της ομάδας του μάρτυρα. Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά στο γάλα των ομάδων ALG40 και ALG60 (κατά 16,2% και 19,2% αντίστοιχα) σε σχέση με αυτά της ομάδας του μάρτυρα, ενώ δεν επηρεάστηκαν στην ομάδα της χαμηλής ενσωμάτωσης του μικροφύκου ALG20 παρά τη μείωση κατά 6,5%. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) του γάλακτος αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 85%, 98% και 96% αντίστοιχα σε σχέση με αυτά της ομάδας του μάρτυρα.

Ο αθηρωματικός δείκτης αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG60 κατά 26% σε σχέση με αυτό της ομάδας του μάρτυρα, ενώ δεν επηρεάστηκε σημαντικά για τις ομάδες ALG20 και ALG40.

Ο δείκτης ρίσκου θρόμβωσης μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 14%, 20% και 21% αντίστοιχα σε σχέση με αυτόν της ομάδας του μάρτυρα.

Ο λόγος  $\omega 6/\omega 3$  λιπαρών οξέων μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 61%, 79% και 83,6% αντίστοιχα σε σχέση με αυτόν της ομάδας του μάρτυρα. Επιπλέον, στατιστικώς σημαντική ήταν και η μείωση του λόγου  $\omega 6/\omega 3$  μεταξύ της ομάδας ALG20 και των ομάδων ALG40 και ALG60.

Όσον αφορά τους δείκτες ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις. Συγκεκριμένα, ο δείκτης  $C_{14:1}/C_{14:0}$  μειώθηκε σημαντικά κατά 38,7% στην ομάδα ALG40 σε σχέση με αυτά της ομάδας του μάρτυρα. Ο δείκτης  $C_{16:1}/C_{16:0}$  μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 25,6%, 33,3% και 38,4% αντίστοιχα σε σχέση με αυτόν της ομάδας του μάρτυρα. Ο δείκτης

*cis-9* C<sub>18:1</sub> /C<sub>18:0</sub> αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 91%, 96% και 91% αντίστοιχα σε σχέση με αυτόν της ομάδας του μάρτυρα. Ο δείκτης C<sub>18:2c9,111</sub> / *trans-11* C<sub>18:1</sub> μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 35,6%, 25,4% και 28,8% αντίστοιχα σε σχέση με αυτόν της ομάδας του μάρτυρα.

Πίνακας 5.6. Η μέση συγκέντρωση των μεμονωμένων λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων), των ομαδοποιημένων τιμών, του λόγου κορεσμένων/ακόρεστα λιπαρά οξέα (SFA/UFA), των ω6/ω3, του αθηρωματικού και του θρομβωτικού δείκτη καθώς και των δεικτών της ενεργότητας της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης του γάλακτος των αιγών που κατανάλωναν τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) στις τρεις δειγματοληψίες (20, 40 και 60 ημέρα).

	Διατροφή (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)				Επίδραση		
	CON	ALG20	ALG40	ALG60	SEM <sup>†</sup>	20	40	60	SEM <sup>†</sup>	Δ	X	ΔxX
<i>C</i> <sub>4:0</sub>	2,35	2,31	2,46	2,28	0,152	2,12 <sup>a</sup>	2,57 <sup>b</sup>	2,44 <sup>ab</sup>	0,102	NS	***	NS
<i>C</i> <sub>6:0</sub>	2,80	2,74	2,95	2,88	0,170	2,70 <sup>a</sup>	2,97 <sup>b</sup>	2,96 <sup>ab</sup>	0,110	NS	**	NS
<i>C</i> <sub>8:0</sub>	3,34	3,35	3,74	3,75	0,177	3,45	3,61	3,72	0,121	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>10:0</sub>	10,83	10,94	11,72	12,31	0,544	10,88	11,87	12,02	0,410	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>12:0</sub>	4,43	4,26	4,84	5,10	0,356	4,41	4,94	4,81	0,245	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>13:0</sub>	0,02	0,02	0,00	0,02	0,010	0,031	0,010	0,004	0,009	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>14:0</sub>	9,85 <sup>a</sup>	10,15 <sup>a</sup>	12,36 <sup>b</sup>	11,45 <sup>b</sup>	0,516	10,76 <sup>ab</sup>	11,51 <sup>a</sup>	11,01 <sup>b</sup>	0,378	**	*	NS
<i>C</i> <sub>14:1</sub>	0,30 <sup>a</sup>	0,27 <sup>ab</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,28 <sup>ab</sup>	0,020	0,33 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,012	*	***	**
<i>C</i> <sub>15:0</sub>	0,88 <sup>ab</sup>	0,95 <sup>a</sup>	0,77 <sup>b</sup>	0,87 <sup>ab</sup>	0,040	0,94 <sup>a</sup>	0,84 <sup>b</sup>	0,83 <sup>b</sup>	0,027	**	**	NS
<i>C</i> <sub>15:1</sub>	0,20 <sup>a</sup>	0,18 <sup>ab</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,18 <sup>ab</sup>	0,014	0,23 <sup>a</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,010	*	***	NS
<i>C</i> <sub>16:0</sub>	24,39 <sup>a</sup>	28,60 <sup>b</sup>	27,12 <sup>ab</sup>	28,38 <sup>b</sup>	1,096	26,82 <sup>a</sup>	28,36 <sup>b</sup>	28,2 <sup>b</sup>	0,643	*	*	NS
<i>C</i> <sub>16:1</sub>	0,95 <sup>a</sup>	0,82 <sup>ab</sup>	0,72 <sup>b</sup>	0,69 <sup>b</sup>	0,067	0,69 <sup>a</sup>	0,88 <sup>b</sup>	0,81 <sup>a</sup>	0,043	*	*	NS
<i>C</i> <sub>17:0</sub>	0,60 <sup>a</sup>	0,30 <sup>b</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,021	0,39 <sup>a</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,013	*	*	NS
<i>C</i> <sub>17:1</sub>	0,22 <sup>a</sup>	0,11 <sup>b</sup>	0,00 <sup>cd</sup>	0,03 <sup>d</sup>	0,020	0,11 <sup>ab</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,014	***	*	NS

Αποτελέσματα

	<i>CON</i>	<i>ALG20</i>	<i>ALG40</i>	<i>ALG60</i>	<i>SEM</i> ‡	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<i>SEM</i> ‡	<b>Δ</b>	<b>X</b>	<b>ΔxX</b>
<i>C<sub>18:0</sub></i>	9,62 <sup>a</sup>	2,96 <sup>b</sup>	2,22 <sup>b</sup>	1,97 <sup>b</sup>	0,578	4,38	3,87	4,45	0,364	***	NS	NS
<i>trans-10 C<sub>18:1</sub></i>	0,59 <sup>a</sup>	0,90 <sup>b</sup>	0,82 <sup>b</sup>	0,83 <sup>b</sup>	0,057	0,83	0,77	0,76	0,035	**	NS	NS
<i>trans-11 C<sub>18:1</sub></i>	1,62 <sup>a</sup>	9,68 <sup>b</sup>	9,22 <sup>b</sup>	9,29 <sup>b</sup>	0,598	9,56 <sup>a</sup>	6,58 <sup>b</sup>	6,62 <sup>b</sup>	0,410	***	***	*
<i>cis-9 C<sub>18:1</sub></i>	21,64 <sup>a</sup>	11,18 <sup>b</sup>	9,45 <sup>bc</sup>	8,40 <sup>c</sup>	0,946	12,81	12,72	12,91	0,675	***	NS	NS
<i>C<sub>18:2 n-6 trans</sub></i>	0,30	0,36	0,33	0,30	0,033	0,30 <sup>a</sup>	0,35 <sup>b</sup>	0,32 <sup>ab</sup>	0,021	NS	NS	NS
<i>C<sub>18:2 n-6 cis</sub></i>	2,89 <sup>a</sup>	2,89 <sup>a</sup>	2,11 <sup>b</sup>	1,65 <sup>b</sup>	0,188	2,24 <sup>a</sup>	2,39 <sup>ab</sup>	2,52 <sup>b</sup>	0,114	**	*	NS
<i>C<sub>18:3 n-3</sub></i>	0,26	0,29	0,28	0,30	0,036	0,21 <sup>a</sup>	0,30 <sup>b</sup>	0,33 <sup>b</sup>	0,020	NS	***	NS
<i>C<sub>18:2 c9, t11</sub></i>	0,90 <sup>a</sup>	3,60 <sup>b</sup>	3,99 <sup>b</sup>	3,83 <sup>b</sup>	0,193	3,81 <sup>a</sup>	2,86 <sup>b</sup>	2,56 <sup>c</sup>	0,174	***	**	*
<i>C<sub>18:2 t10, c12</sub></i>	0,03 <sup>a</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,016	0,13	0,15	0,16	0,014	***	NS	*
<i>C<sub>20:3 n-6</sub></i>	0,01 <sup>a</sup>	0,04 <sup>ab</sup>	0,06 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,018	0,07 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,013	*	**	*
<i>C<sub>22:0</sub></i>	0,01 <sup>a</sup>	0,02 <sup>ab</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,10 <sup>bc</sup>	0,016	0,10 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,009	**	***	***
<i>C<sub>20:3 n-3</sub></i>	0,23 <sup>a</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,51 <sup>c</sup>	0,53 <sup>c</sup>	0,027	0,42 <sup>a</sup>	0,41 <sup>a</sup>	0,36 <sup>b</sup>	0,016	***	**	NS
<i>C<sub>23:0</sub></i>	0,00 <sup>a</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,34 <sup>c</sup>	0,39 <sup>d</sup>	0,014	0,19 <sup>a</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,009	***	*	*
<i>C<sub>24:0</sub></i>	0,00 <sup>a</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,05 <sup>c</sup>	0,08 <sup>c</sup>	0,017	0,09 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,11 <sup>a</sup>	0,012	**	***	**
<i>C<sub>24:1</sub></i>	0,00 <sup>a</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,50 <sup>c</sup>	0,68 <sup>d</sup>	0,030	0,42 <sup>a</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,31 <sup>b</sup>	0,018	***	***	***
<i>C<sub>22:5 n-6</sub></i>	0,00 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,51 <sup>c</sup>	0,69 <sup>d</sup>	0,032	0,44 <sup>a</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,018	***	***	***
<i>C<sub>22:6 n-3</sub></i>	0,00 <sup>a</sup>	0,70 <sup>b</sup>	1,30 <sup>c</sup>	1,51 <sup>c</sup>	0,078	0,97 <sup>a</sup>	0,81 <sup>b</sup>	0,85 <sup>c</sup>	0,046	***	*	**
<i>SCFA</i> ‡	19,32	19,41	20,87	21,26	0,831	18,93 <sup>a</sup>	20,80 <sup>b</sup>	20,91 <sup>b</sup>	0,607	NS	*	NS
<i>MCFAS</i> §	39,58 <sup>a</sup>	43,97 <sup>b</sup>	45,08 <sup>b</sup>	45,81 <sup>b</sup>	1,52	42,96 <sup>a</sup>	45,66 <sup>b</sup>	44,84 <sup>ab</sup>	0,938	*	*	NS

Αποτελέσματα

	<i>CON</i>	<i>ALG20</i>	<i>ALG40</i>	<i>ALG60</i>	<i>SEM</i> ‡	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<i>SEM</i> ‡	$\Delta$	<b>X</b>	$\Delta$ <b>xX</b>
<i>LCFA</i> ¶	10,33 <sup>a</sup>	3,62 <sup>b</sup>	2,94 <sup>b</sup>	2,83 <sup>b</sup>	0,579	4,87	4,18	4,87	0,368	***	NS	NS
<i>MUFA</i> ††	26,16 <sup>a</sup>	24,45 <sup>ab</sup>	21,93 <sup>b</sup>	21,12 <sup>b</sup>	1,125	24,85 <sup>a</sup>	21,86 <sup>b</sup>	22,02 <sup>b</sup>	0,836	*	*	NS
<i>PUFA</i> ‡‡	4,62 <sup>a</sup>	8,55 <sup>b</sup>	9,19 <sup>b</sup>	9,05 <sup>b</sup>	0,360	8,13 <sup>a</sup>	7,25 <sup>b</sup>	7,12 <sup>b</sup>	0,229	***	**	*
<i>SFA</i> §§	69,22	66,99	68,89	69,88	1,335	67,02 <sup>a</sup>	70,89 <sup>b</sup>	70,87 <sup>b</sup>	0,947	NS	*	NS
<i>UFA</i> ¶¶	30,78	33,01	31,11	30,12	1,324	32,98 <sup>a</sup>	29,11 <sup>b</sup>	29,13 <sup>b</sup>	0,947	NS	*	NS
<i>SFA/UFA</i> †††	2,31	2,12	2,25	2,43	0,150	2,11 <sup>a</sup>	2,50 <sup>b</sup>	2,49 <sup>b</sup>	0,106	NS	*	NS
<i>AI</i> ‡‡‡	2,33 <sup>a</sup>	2,42 <sup>ab</sup>	2,79 <sup>ab</sup>	2,95 <sup>b</sup>	0,200	2,34 <sup>a</sup>	2,81 <sup>b</sup>	2,72 <sup>ab</sup>	0,135	*	*	*
<i>TI</i> §§§	2,77 <sup>a</sup>	2,38 <sup>b</sup>	2,21 <sup>b</sup>	2,20 <sup>b</sup>	0,153	2,22	2,49	2,46	0,093	*	NS	*
<i>HPI</i> ¶¶¶	0,44	0,42	0,33	0,34	0,036	0,43	0,35	0,37	0,029	NS	NS	NS
$\omega 6$	3,18	3,49	2,98	2,70	0,197	3,02	3,04	3,19	0,121	NS	NS	NS
$\omega 3$	0,48 <sup>a</sup>	1,29 <sup>b</sup>	2,06 <sup>c</sup>	2,34 <sup>c</sup>	0,099	1,60	1,50	1,53	0,058	***	NS	NS
$\omega 6/\omega 3$	7,11 <sup>a</sup>	2,75 <sup>b</sup>	1,48 <sup>c</sup>	1,16 <sup>c</sup>	0,448	3,04	3,24	3,10	0,334	***	NS	NS
<i><math>\Delta^9</math> αφυδρογονάση (δείκτες)</i>												
<i>C<sub>14:1</sub> / C<sub>14:0</sub></i>	0,031 <sup>a</sup>	0,028 <sup>a</sup>	0,019 <sup>b</sup>	0,025 <sup>ab</sup>	0,003	0,032 <sup>a</sup>	0,022 <sup>b</sup>	0,023 <sup>b</sup>	0,002	*	**	*
<i>C<sub>16:1</sub> / C<sub>16:0</sub></i>	0,039 <sup>a</sup>	0,029 <sup>b</sup>	0,026 <sup>b</sup>	0,024 <sup>b</sup>	0,003	0,026 <sup>a</sup>	0,031 <sup>b</sup>	0,029 <sup>a</sup>	0,001	**	*	NS
<i>cis-9 C<sub>18:1</sub> / C<sub>18:0</sub></i>	2,29 <sup>a</sup>	4,39 <sup>b</sup>	4,49 <sup>b</sup>	4,40 <sup>b</sup>	0,276	3,77 <sup>a</sup>	4,39 <sup>b</sup>	3,55 <sup>a</sup>	0,183	***	**	NS
<i>C<sub>18:2 c9, 11</sub> / trans-11 C<sub>18:1</sub></i>	0,59 <sup>a</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,42 <sup>b</sup>	0,038	0,48	0,47	0,43	0,025	*	NS	*

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b, c, d) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b, c) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$  , \*\* $p < 0,01$  , \*\*\* $p < 0,001$ .

† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

‡ SCFA: Μικρής αλύσου λιπαρά οξέα =  $C_{4:0} + C_{6:0} + C_{8:0} + C_{10:0} + C_{11:0}$

§ MCFA: Μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα =  $C_{12:0} + C_{13:0} + C_{14:0} + C_{15:0} + C_{16:0}$

¶ LCFA: Μακράς αλύσου λιπαρά οξέα =  $C_{17:0} + C_{18:0} + C_{20:0} + C_{22:0} + C_{23:0} + C_{24:0}$

†† MUFA: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα =  $C_{14:1} + C_{15:1} + C_{16:1} + C_{17:1} + cis-9 C_{18:1} + trans-10 C_{18:1} + trans-11 C_{18:1} + C_{24:1 n-9}$

‡‡ PUFA: Πολυάκορεστα λιπαρά οξέα =  $C_{18:2 t9, t12} + C_{18:2 c-9,12} + C_{18:3 n-3} + C_{18:2 c9, t11} + C_{18:2 t10, c12} + C_{20:3 n-6} + C_{20:3 n-3} + C_{22:5 n-6} + C_{22:6 n-3}$

§§ SFA: Κορεσμένα λιπαρά οξέα = SCFA + MCFA + LCFA

¶¶ UFA: Ακόρεστα λιπαρά οξέα = PUFA + MUFA

††† SFA/UFA:  $(SCFA + MCFA + LCFA) / (PUFA + MUFA)$

‡‡‡ AI: Αθηρωματικός δείκτης =  $(C_{12:0} + 4 * C_{14:0} + C_{16:0}) / (PUFA + MUFA)$

§§§ TI: Δείκτης θρόμβωσης =  $(C_{14:0} + C_{16:0} + C_{18:0}) / (0.5 * MUFA) + (0.5 * n-6 PUFA) + (3 * n-3 PUFA) + (n-3 PUFA / n-6 PUFA)$

¶¶¶ HPI: Δείκτης υγείας =  $(n-6 PUFA + n-3 PUFA + MUFA) / (C_{12:0} + 4 * C_{14:0} + C_{16:0})$

Στον Πίνακα 5.7 παρουσιάζεται η συσχέτιση κατά Pearson μεταξύ του στεατικού οξέος και των μονοακόρεστων και πολυακόρεστων ισομερών του και της λιποπεριεκτικότητας. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση ( $p < 0,01$ ) διαπιστώθηκε μεταξύ του ελαϊκού και του στεατικού οξέος με τη λιποπεριεκτικότητα, ενώ το βασσενικό οξύ και το ισομερές *trans-10* C<sub>18:1</sub> συσχετίζονται αρνητικά. Αναφορικά με τη συσχέτιση των λιπαρών οξέων, το στεατικό οξύ συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά αρνητικά με το *trans-10* C<sub>18:1</sub>, το βασσενικό οξύ και τα ισομερή του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος, ενώ συσχετίστηκε θετικά με το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ. Το *trans-10* C<sub>18:1</sub> συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά αρνητικά με το ελαϊκό οξύ, ενώ συσχετίστηκε θετικά με το βασσενικό, το C<sub>18:2</sub> <sup>9, 11, 12</sup>, το λινολενικό και τα ισομερή του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος. Το βασσενικό οξύ συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά αρνητικά με το ελαϊκό και λινελαϊκό οξύ, ενώ συσχετίστηκε θετικά με τα ισομερή του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος. Το ελαϊκό οξύ συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά αρνητικά με τα ισομερή του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος, ενώ συσχετίστηκε θετικά με το λινελαϊκό οξύ. Το C<sub>18:2</sub> <sup>9, 11, 12</sup> συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά θετικά με το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ. Το λινελαϊκό οξύ συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά αρνητικά με το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (C<sub>18:2</sub> <sup>9, 11</sup>), ενώ συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά θετικά με το λινολενικό οξύ. Τέλος, στατιστική θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των ισομερών των συζευγμένων λινελαϊκών οξέων.



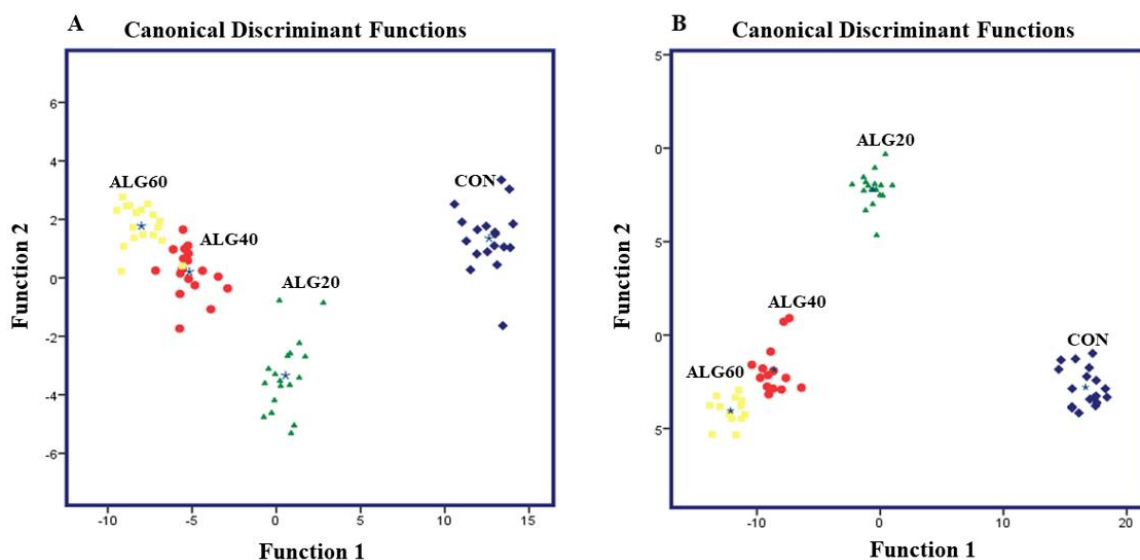
Πίνακας 5.7. Συσχέτιση κατά Pearson μεταξύ του στεατικού οξέος και των ισομέρων μονοακόρεστων και πολυακόρεστων και της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος.

	<i>C</i> <sub>18:0</sub>	<i>trans</i> -10 <i>C</i> <sub>18:1</sub>	<i>trans</i> -11 <i>C</i> <sub>18:1</sub>	<i>cis</i> -9 <i>C</i> <sub>18:1</sub>	<i>C</i> <sub>18:2 n-6 trans</sub>	<i>C</i> <sub>18:2 n-6 cis</sub>	<i>C</i> <sub>18:3 n-3</sub>	<i>C</i> <sub>18:2 c9, t11</sub>	<i>C</i> <sub>18:2 t10, c12</sub>	<i>Λίπος %</i>
<i>C</i> <sub>18:0</sub>	1									
<i>trans</i> -10 <i>C</i> <sub>18:1</sub>	-0,402**	1								
<i>trans</i> -11 <i>C</i> <sub>18:1</sub>	-0,779**	0,744**	1							
<i>cis</i> -9 <i>C</i> <sub>18:1</sub>	0,956**	-0,351**	-0,741**	1						
<i>C</i> <sub>18:2 n-6 trans</sub>	-0,017	0,481**	0,096	0,081	1					
<i>C</i> <sub>18:2 n-6 cis</sub>	0,541**	0,087	-0,299*	0,562**	0,292*	1				
<i>C</i> <sub>18:3 n-3</sub>	0,055	0,346**	-0,027	0,048	0,291*	0,322**	1			
<i>C</i> <sub>18:2 c9, t11</sub>	-0,802**	0,516**	0,855**	-0,772**	-0,008	-0,434**	-0,198	1		
<i>C</i> <sub>18:2 t10, c12</sub>	-0,661**	0,458**	0,667**	-0,608**	0,133	-0,176	0,101	0,501**	1	
<i>Λίπος %</i>	0,568**	-0,314*	-0,451**	0,660**	0,088	0,229	-0,243	-0,414**	-0,386**	1

\*: Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο 0,05.

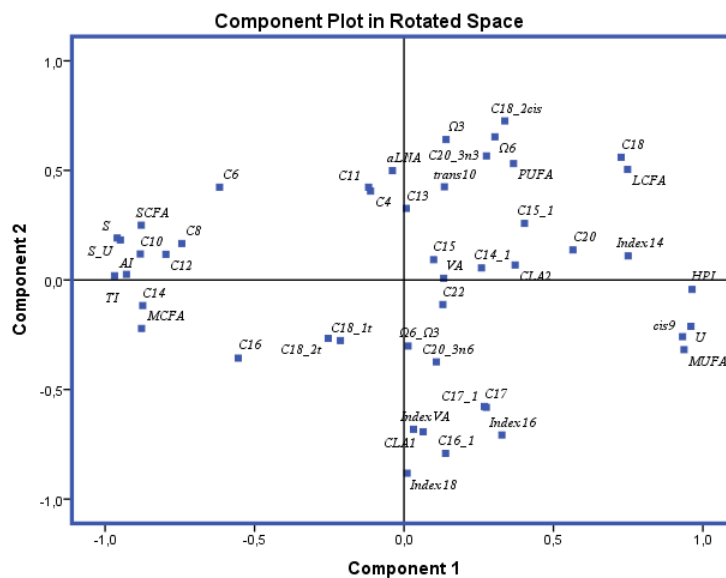
\*\* : Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο 0,01.

Επιπλέον, στα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος (Σχήμα 5.3A) και του γάλακτος (Σχήμα 5.3B) εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις. Είκοσι-τέσσερις μεταβλητές για το πλάσμα του αίματος και πενήντα-μια για το γάλα εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα εβδομήντα-δύο δείγματα για κάθε βιολογικό δείγμα (αίμα, γάλα). Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 98,6% για το πλάσμα του αίματος και 98,4% για το γάλα. Τα λιπαρά οξέα τα οποία συνεισέφεραν περισσότερο στο διαχωρισμό ήταν τα: C<sub>22:2</sub>, C<sub>18:0</sub>, cis-9 C<sub>18:1</sub>, DHA, C<sub>20:3n3</sub> και C<sub>20:3n6</sub> για το πλάσμα του αίματος και τα C<sub>23:0</sub>, DHA, C<sub>24:1</sub>, C<sub>18:0</sub>, LCFA, cis-9 C<sub>18:1</sub>, C<sub>20:3n3</sub>, Δ<sup>9</sup> 16 index, Δ<sup>9</sup> 18 index, MUFA, MCFA και C<sub>16:1</sub> για τα δείγματα γάλακτος. Η ταξινόμηση για το πλάσμα του αίματος ήταν στατιστικώς σημαντική (P<0,001) με τιμή Wilks' lambda, 0,003 για το Function 1 και τιμή Wilks' lambda, 0,115 για το Function 2. Όσον, αφορά το γάλα, η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική (P<0,001) με τιμή Wilks' lambda, 0,001 για το Function 1 και τιμή Wilks' lambda, 0,008 για το Function 2.

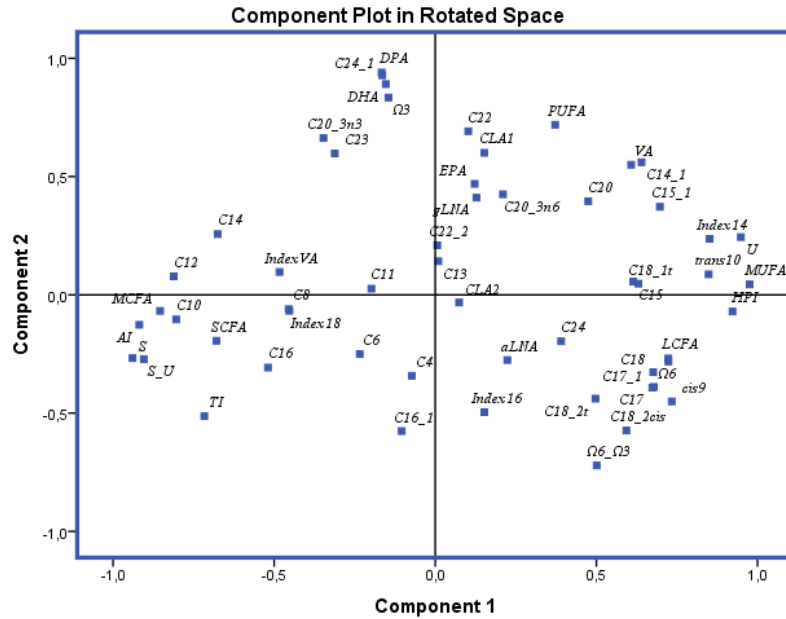


Σχήμα 5.3. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με: A) το σύνολο των λιπαρών οξέων του αίματος και B) τα μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της Δ<sup>9</sup> αφυδρογονάσης.

Επιπλέον, στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος, εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών: α) για μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της  $\Delta^{-9}$  αφυδρογονάσης των τριών ημερομηνιών δειγματοληψίας για τα δείγματα των αιγών της ομάδας του μάρτυρα (Σχήμα 5.4) και β) για μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της  $\Delta^{-9}$  αφυδρογονάσης των τριών ημερομηνιών δειγματοληψίας για τα δείγματα των αιγών και των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* (Σχήμα 5.5) με ποσοστό συμμετοχής των δύο κύριων συνιστωσών 50,37% και 51,74% αντίστοιχα. Η ανάλυση αυτή εφαρμόστηκε με αυτόν τον τρόπο προκειμένου να διαπιστωθεί η σχέση μεταξύ των λιπαρών οξέων με ή χωρίς την επίδραση του μικροφύκου.



Σχήμα 5.4. Στατιστική ανάλυση των κύριων συνιστωσών για μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της  $\Delta^{-9}$  αφυδρογονάσης των δειγμάτων γάλακτος της ομάδας του μάρτυρα (CON).



Σχήμα 5.5. Στατιστική ανάλυση των κύριων συνιστωσών για μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης στα δείγματα γάλακτος των αιγών και των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* (ALG20, ALG40 και ALG60).

Η ανάλυση των Σχημάτων 5.4 και 5.5 δείχνει ότι δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές για τις σχέσεις των λιπαρών οξέων για το διατροφικό παράγοντα που μελετήθηκε, καθώς η πλειοψηφία των μεταβλητών (λιπαρά οξέα) βρίσκονται και στα δύο σχήματα στο ίδιο τεταρτημόριο και παρουσιάζουν μια κοινή τάση.

## 5.5. Αντιοξειδωτικό σύστημα

### 5.5.1. Αντιοξειδωτικό σύστημα αίματος

Στο πλάσμα του αίματος των αιγών των ομάδων της υψηλής συμμετοχής του μικροφύκου (ALG40 και ALG60) παρατηρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα για τη δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) κατά 37,5% και 34% αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα CON, καθώς σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε για τις ομάδες ALG40 και ALG60 κατά 33% και 30% αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα ALG20 (Πίνακας 5.8) (Εικόνα 5.2).

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε έμμεσα η δραστηριότητα της NADPH οξειδάσης (NOX) με τη χρήση Native-PAGE. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του Native-PAGE και συγκεκριμένα η NOX, η οποία αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα, ενώ δεν επηρεάστηκε σημαντικά στην ομάδα ALG20.

Η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT) στο πλάσμα των αιγών δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των ομάδων. Η GSH-Px παρουσίασε μια τάση αύξησης ( $P$ value=0,061) στην ομάδα ALG20 κατά 22% σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα και τις άλλες δύο διατροφικές επεμβάσεις. Η δραστηριότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) στο πλάσμα του αίματος της ομάδας ALG60 αυξήθηκε σημαντικά κατά 100% σε σχέση με τις ομάδες CON και ALG20. Επιπροσθέτως, σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στην δραστηριότητα της μεταφοράσης της γλουταθειόνης (GST) στην ομάδα ALG60 κατά 41% σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα.

Η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP παρουσίασε σημαντική αύξηση στο αίμα των αιγών των ομάδων ALG40 και ALG60 κατά 42% και 41% αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η συγκέντρωση της μηλονικής αλδεϋδης (MDA) αυξήθηκε σημαντικά κατά 2,97 και 3,78 φορές στις ALG40 και ALG60 αντίστοιχα σε σχέση με αυτή του μάρτυρα, ενώ δεν επηρεάστηκε σημαντικά μεταξύ της ομάδας ALG20 και αυτής του μάρτυρα. Τέλος, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια δεν επηρεάστηκαν σημαντικά με την προσθήκη του μικροφύκου στη διατροφή των αιγών.

Πίνακας 5.8. Δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), ολική αντιοξειδωτική κατάσταση και οξειδωτικοί δείκτες στο πλάσμα του αίματος των αιγών που διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σε τρεις δειγματοληψίες.

	Διατροφή (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)				Επίδραση		
	CON	ALG20	ALG40	ALG60	SEM†	20	40	60	SEM†	Δ	X	ΔxX
<sup>3</sup> GSTs	0,12 <sup>b</sup>	0,14 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>ab</sup>	0,17 <sup>a</sup>	0,009	0,15	0,15	0,14	0,006	**	NS	NS
<sup>4</sup> GR	0,05 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,006	0,07 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,004	***	**	***
<sup>5</sup> SOD	9,60 <sup>b</sup>	9,92 <sup>b</sup>	13,20 <sup>a</sup>	12,90 <sup>a</sup>	0,663	10,20 <sup>b</sup>	11,40 <sup>a</sup>	12,60 <sup>a</sup>	0,443	***	***	NS
<sup>6</sup> GSH-Px	0,18	0,22	0,20	0,18	0,013	0,21 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,011	NS	***	NS
<sup>7</sup> CAT	3,75	4,16	3,76	4,06	0,412	4,38 <sup>a</sup>	3,86 <sup>ab</sup>	3,56 <sup>b</sup>	0,252	NS	**	NS
<sup>8</sup> ABTS	19,00	20,80	20,40	22,30	0,986	17,80 <sup>c</sup>	23,40 <sup>a</sup>	20,70 <sup>b</sup>	0,672	NS	***	NS
<sup>9</sup> FRAP	0,54 <sup>b</sup>	0,65 <sup>ab</sup>	0,77 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>	0,040	0,66	0,66	0,72	0,028	***	NS	**
<sup>10</sup> MDA	0,41 <sup>c</sup>	0,64 <sup>c</sup>	1,22 <sup>b</sup>	1,55 <sup>a</sup>	0,079	1,10 <sup>a</sup>	0,94 <sup>ab</sup>	0,82 <sup>b</sup>	0,062	***	*	*
<sup>11</sup> CP	1,82	2,03	2,04	2,12	0,164	1,77 <sup>b</sup>	1,91 <sup>b</sup>	2,33 <sup>a</sup>	0,104	NS	***	NS

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b, c) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b, c,) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$  , \*\* $p < 0,01$  , \*\*\* $p < 0,001$ .

† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

<sup>3</sup>GST: Μεταφοράση της γλουταθειόνης

<sup>4</sup>GR: Αναγωγή της γλουταθειόνης

<sup>5</sup>SOD: Δεσμουτάση του υπεροξειδίου

<sup>6</sup>GSH-Px: Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

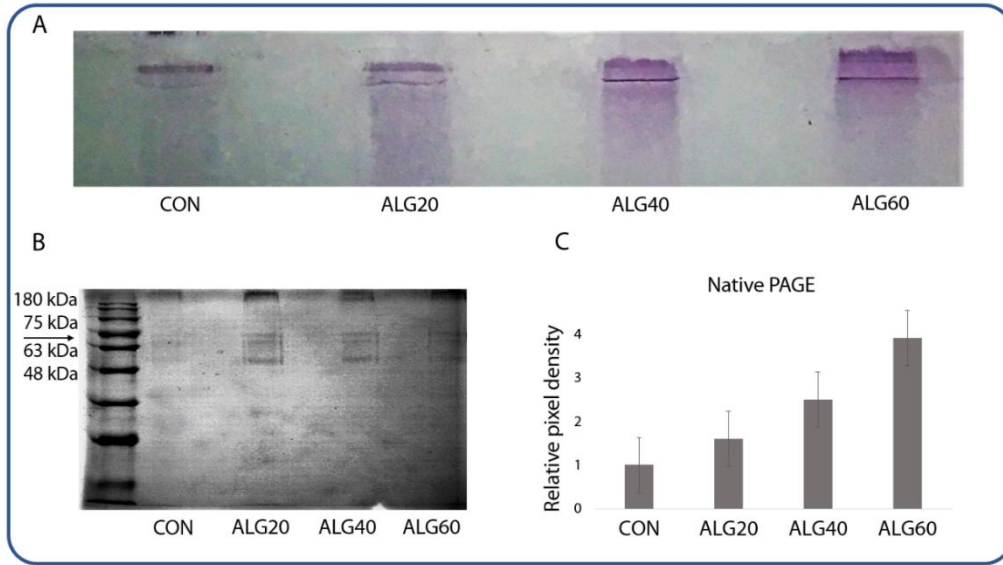
<sup>7</sup>CAT: Καταλάση

<sup>8</sup>ABTS: 2,2'-azino-di (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (αναστολή %)

<sup>9</sup>FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma (μM ασκορβικού οξέος)

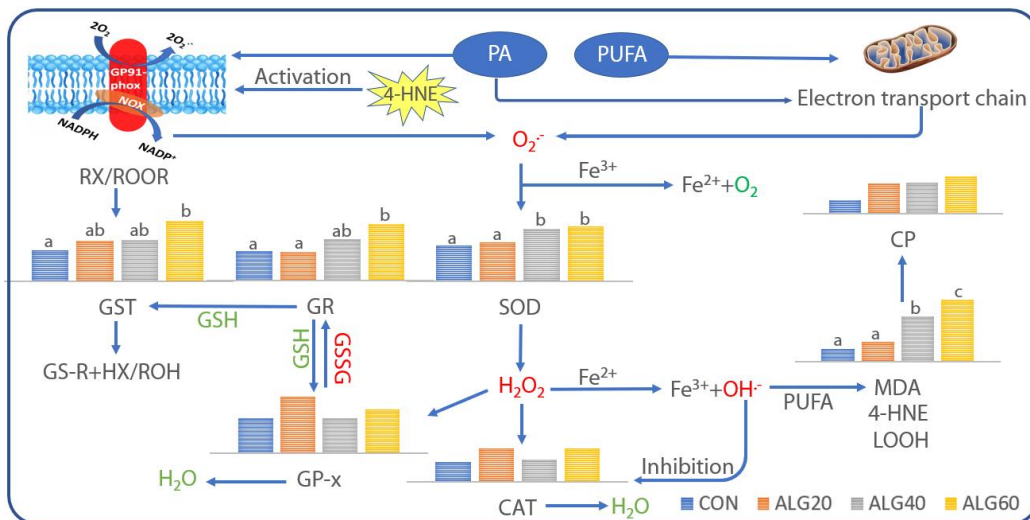
<sup>10</sup>MDA: Μηλονική αλδεϋδη (μM MDA)

<sup>11</sup>PC: Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/ml)



Εικόνα 5.1. Ανίχνευση της NADPH οξειδάσης πλάσματος αίματος αγών, αντιπροσωπευτικά για τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON, ALG20, ALG40, ALG60).

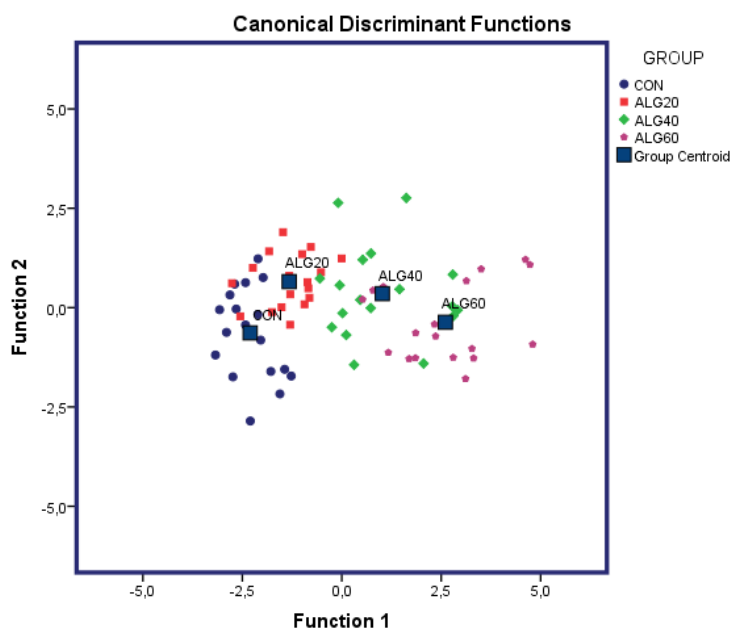
Δείγματα πρωτεΐνης (120 μg) διαχωρίστηκαν με τη χρήση 8% ακριλαμιδικού πήγματος native PAGE. A) δραστικότητα NADPH οξειδάσης για κάθε διατροφική ομάδα, παρουσία  $Ca^{+2}$  στο ρυθμιστικό διάλυμα, B) αποδιαταγμένες σε SDS-PAGE ζώνες του πήγματος A, C) σχετική πυκνότητα των εικονοκυττάρων με τη χρήση του προγράμματος ImageJ.



Εικόνα 5.2. Συνοπτική ενζυμική αντιοξειδωτική απεικόνιση του πλάσματος του αίματος για τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) καθ'όλη την πειραματική περίοδο.



*PA*= παλμιτικό οξύ, *PUFA*= πολυάκορεστα λιπαρά οξέα,  $O_2^{\cdot-}$ = ανιόν του υπεροξειδίου,  $\cdot OH$ =ριζά υδροξυλίου,  $H_2O_2$ = υπεροξείδιο του υδρογόνου, *SOD*= δεσμουτάση του υπεροξειδίου, *CAT*= καταλάση, *GR*= αναγωγή της γλουταθειόνης, *GST*= μεταφοράση της γλουταθειόνης, *GP-x*= υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, *MDA*= μηλονική αλδεΐδη, *CP*= πρωτεϊνικά καρβονύλια, *NADPH*= Φωσφορική δινουκλεοτιδική νικοτιναμιδική αδενίνη (ανηγμένη μορφή), *NADP+*= Φωσφορική δινουκλεοτιδική νικοτιναμιδική αδενίνη (οξειδωμένη μορφή), *NOX*= *NADPH* οξειδάση, *4-HNE*= 4-υδροξυνονεναλ, *GSH*=γλουταθειόνη (ανηγμένη μορφή), *GSSG*= γλουταθειόνη (οξειδωμένη μορφή), *LOOH*= ρίζες υδρο-υπεροξειδίου, *ROOR*= οργανικά υπεροξείδια, *ROH*=αλκοόλες,  $Fe^{2+}$ =ανιόντα δισθενή σιδήρου,  $Fe^{3+}$ = ανιόντα τρισθενή σιδήρου

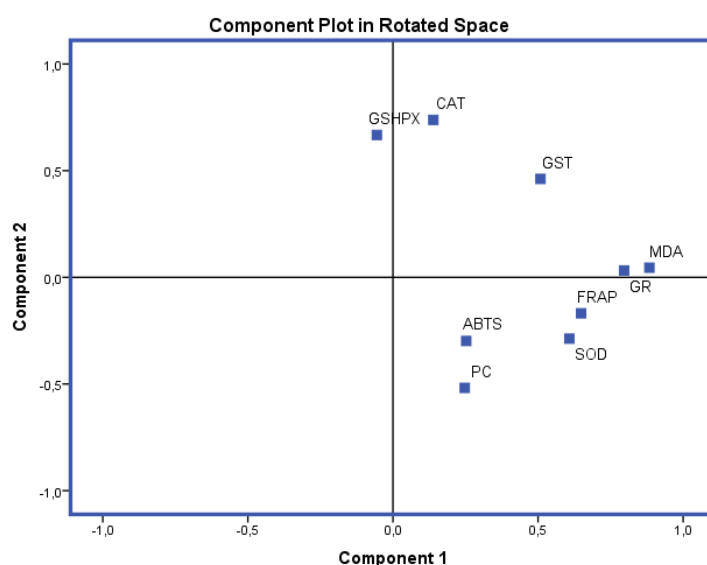


Σχήμα 5.6. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες του πλάσματος του αίματος.

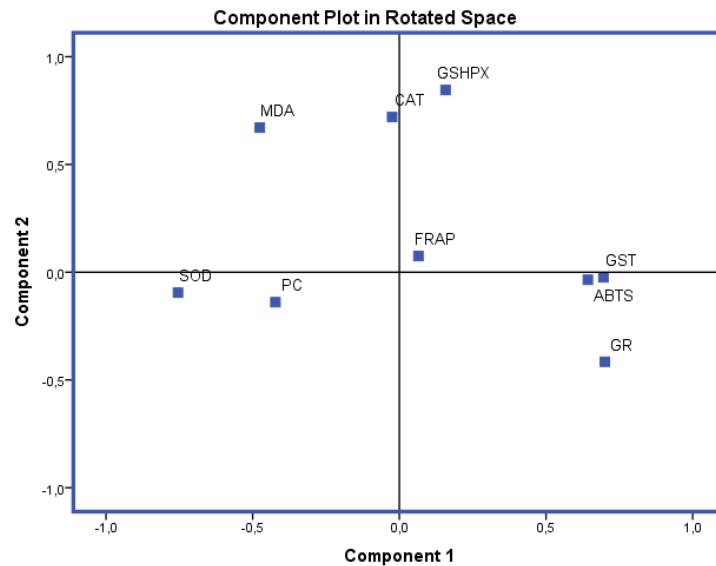
Επιπλέον, στα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού συστήματος του πλάσματος του αίματος (Σχήμα 5.6) εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις ομάδες. Εννέα μεταβλητές για το πλάσμα του αίματος εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα εβδομήντα-δύο δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 79,2% για το πλάσμα του αίματος. Οι

μεταβλητές οι οποίες συνέβαλαν περισσότερο στο διαχωρισμό ήταν η GR και η MDA. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο για το Function 1 ( $P < 0,001$ ) με τιμή Wilks' lambda, 0,135.

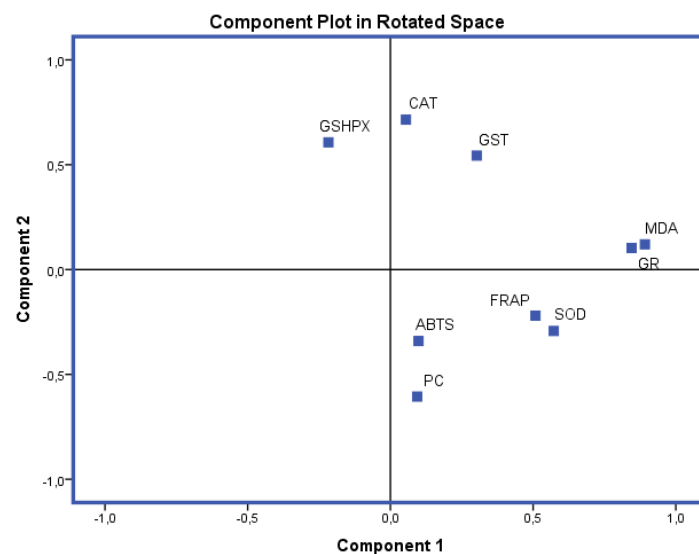
Επιπροσθέτως, στα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού συστήματος του πλάσματος του αίματος εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών: α) για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες όλων των διατροφικών επεμβάσεων (Σχήμα 5.7), β) για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες στα δείγματα της ομάδας του μάρτυρα (Σχήμα 5.8) και γ) για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των τριών ημερομηνιών δειγματοληψίας για τα δείγματα των αιγών και των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* (Σχήμα 5.9). Η ανάλυση αυτή εφαρμόστηκε με αυτόν τον τρόπο προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενζύμων, της ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης και των οξειδωτικών δεικτών με ή χωρίς την επίδραση του μικροφύκου.



Σχήμα 5.7. Στατιστική ανάλυση των κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων πλάσματος αίματος όλων των διατροφικών επεμβάσεων.



Σχήμα 5.8. Στατιστική ανάλυση των κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων πλάσματος αίματος στην ομάδα του μάρτυρα.



Σχήμα 5.9. Στατιστική ανάλυση των κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων πλάσματος αίματος των τριών ομάδων στις οποίες χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*

Από την ανάλυση των κύριων συνιστωσών προκύπτει πως τα PC και η ενεργότητα της SOD, σε σχέση με τις ολικές αντιοξειδωτικές μεθόδους, παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις σε σχέση με την επίδραση του μικροφύκου στη διατροφή των αιγών.

Ακόμα, η GSH-Px, σε σχέση με την MDA, παρουσιάζει διαφορετική τάση στην ομάδα του μάρτυρα σε σχέση με τις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60.

### 5.5.2. Αντιοξειδωτικό σύστημα γάλακτος

Η επίδραση των διατροφικών επεμβάσεων καθώς και του χρόνου δειγματοληψίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.9. Η δραστικότητα της δεσμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) και της λακτοϋπεροξειδάσης (LPO) δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τη διατροφική επέμβαση. Η δραστικότητα της καταλάσης (CAT) αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 κατά 4,5 και 3,7 φορές αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Επιπλέον, σημαντική ήταν και η αύξηση της δραστικότητας της CAT μεταξύ των ομάδων αυτών (5 και 4 φορές αντίστοιχα) σε σχέση με την ομάδα ALG20.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, σύμφωνα με την μέθοδο ABTS, αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG40 κατά 68% σε σχέση με αυτήν της ομάδας του μάρτυρα, ενώ δεν επηρεάστηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20 και ALG60. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP, αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 κατά 40% και 39% αντίστοιχα σε σχέση με αυτήν της ομάδας του μάρτυρα, ενώ δεν επηρεάστηκε σημαντικά στην ομάδα ALG20.

Η συγκέντρωση της μηλονικής αλδεϋδης αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 κατά 166% και 175% αντίστοιχα σε σχέση με αυτήν της ομάδας του μάρτυρα, ενώ δεν επηρεάστηκε σημαντικά στην ομάδα ALG20. Τέλος, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξήθηκαν σημαντικά κατά 60% στην ομάδα ALG60 σε σχέση με αυτά της ομάδας του μάρτυρα, ενώ δεν επηρεάστηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG20 και ALG40.

Πίνακας 5.9. Δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), ολική αντιοξειδωτική κατάσταση και οξειδωτικοί δείκτες στο πλάσμα του αίματος των αιγών που διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) στις τρεις δειγματοληψίες.

	Διατροφή (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)				Επίδραση		
	CON	ALG20	ALG40	ALG60	SEM <sup>1</sup>	20	40	60	SEM <sup>1</sup>	Δ	X	ΔxX
<sup>2</sup> LPO	0,28	0,31	0,31	0,39	0,057	0,31 <sup>b</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,032	NS	***	*
<sup>3</sup> SOD	11,50	14,90	12,30	12,20	1,810	15,00 <sup>a</sup>	11,70 <sup>b</sup>	11,40 <sup>b</sup>	1,020	NS	***	NS
<sup>4</sup> CAT	1,59 <sup>b</sup>	1,45 <sup>b</sup>	7,26 <sup>a</sup>	5,83 <sup>a</sup>	0,916	3,44	4,40	4,27	0,629	***	NS	NS
<sup>5</sup> ABTS	22,20 <sup>b</sup>	33,80 <sup>ab</sup>	37,40 <sup>a</sup>	34,30 <sup>ab</sup>	4,240	28,60 <sup>b</sup>	34,10 <sup>a</sup>	33,10 <sup>ab</sup>	2,420	*	*	NS
<sup>6</sup> FRAP	1,71 <sup>b</sup>	2,08 <sup>ab</sup>	2,41 <sup>a</sup>	2,37 <sup>a</sup>	0,134	2,17 <sup>a</sup>	1,82 <sup>b</sup>	1,95 <sup>b</sup>	0,091	**	*	NS
<sup>7</sup> MDA	0,62 <sup>b</sup>	0,82 <sup>b</sup>	1,65 <sup>a</sup>	1,71 <sup>a</sup>	0,119	1,28	1,23	1,09	0,076	***	NS	NS
<sup>8</sup> CP	0,77 <sup>b</sup>	1,11 <sup>ab</sup>	0,99 <sup>ab</sup>	1,23 <sup>a</sup>	0,170	0,92 <sup>b</sup>	1,19 <sup>a</sup>	0,96 <sup>ab</sup>	0,107	*	*	NS

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

<sup>1</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

<sup>2</sup>LPO: Λακτοϋπεροξειδάση

<sup>3</sup>SOD: Δεσμουτάση του υπεροξειδίου

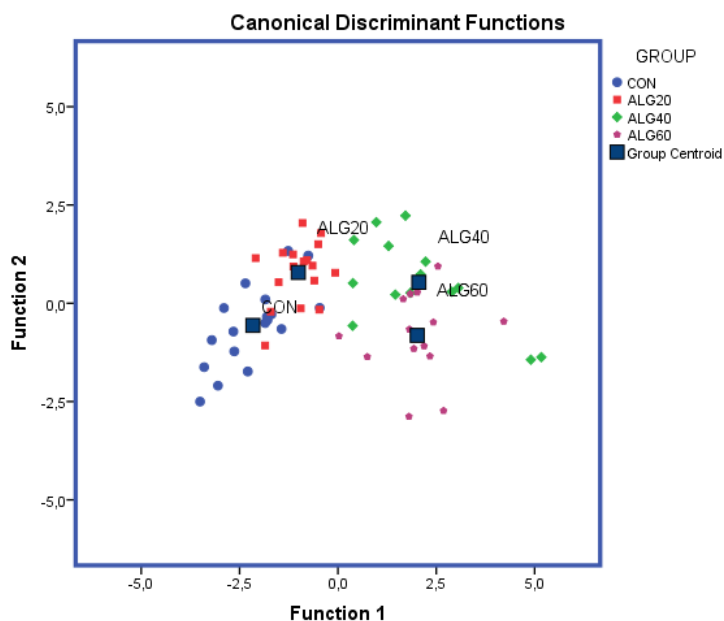
<sup>4</sup>CAT: Καταλάση

<sup>5</sup>ABTS: 2,2'-azino-di (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (αναστολή %)

<sup>6</sup>FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma (μM ασκορβικού οξέος)

<sup>7</sup>MDA: Μηλονική αλδεϋδη (μM MDA)

<sup>8</sup>PC: Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/ml)

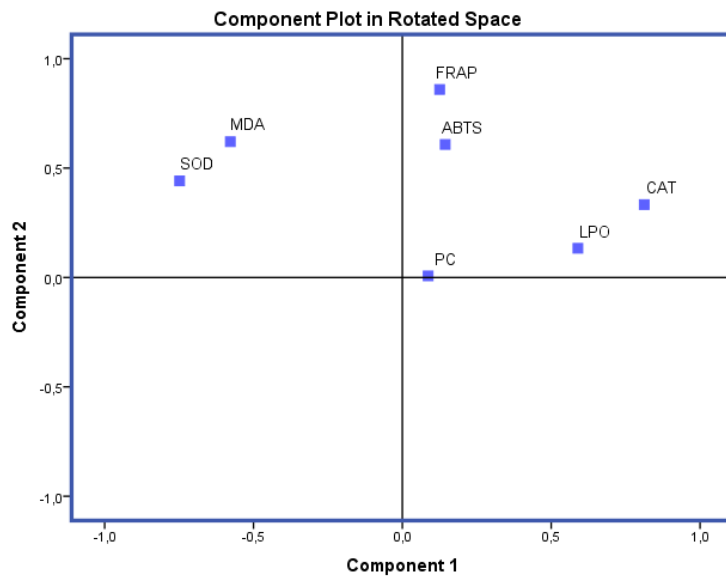


Σχήμα 5.10. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες του γάλακτος.

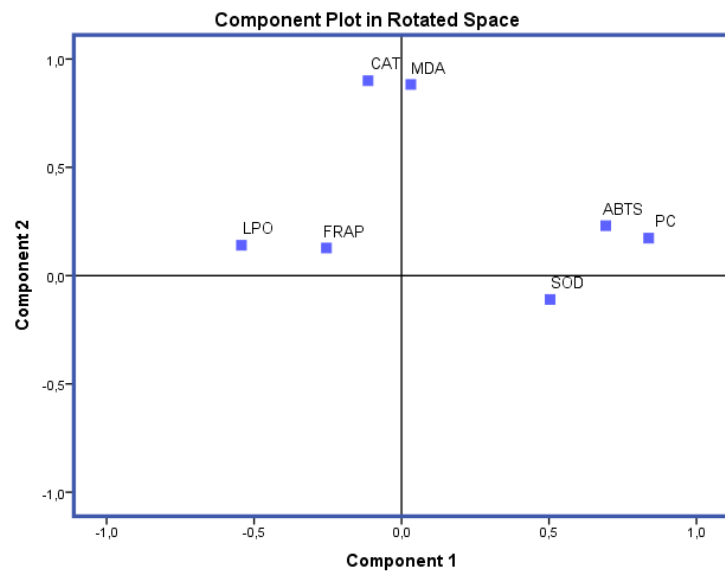
Επιπλέον, στα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού συστήματος του γάλακτος (Σχήμα 5.10) εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις. Επτά μεταβλητές για τα δείγματα γάλακτος εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα εβδομήντα-δύο δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 78,2%. Οι μεταβλητές οι οποίες συνέβαλαν περισσότερο στο διαχωρισμό ήταν η MDA και η FRAP. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική ( $P < 0,001$ ) μόνο για το Function 1, με τιμή Wilks' lambda 0,117.

Επιπροσθέτως, στα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού συστήματος του γάλακτος, εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών: α) για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες στα δείγματα της ομάδας του μάρτυρα (Σχήμα 5.11) και β) για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των τριών ημερομηνιών δειγματοληψίας για τα δείγματα των αιγών και των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* (Σχήμα 5.12). Η ανάλυση αυτή εφαρμόστηκε με αυτόν τον τρόπο προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ των

αντιοξειδωτικών ενζύμων, της ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης και των οξειδωτικών δεικτών με ή χωρίς την επίδραση του μικροφύκου.



Σχήμα 5.11. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων του γάλακτος του μάρτυρα.



Σχήμα 5.12. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων γάλακτος των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*

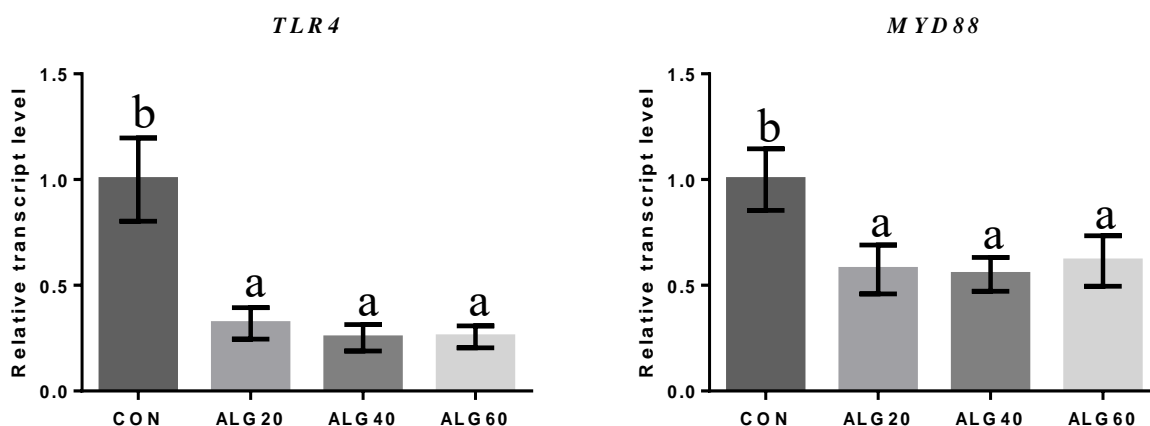


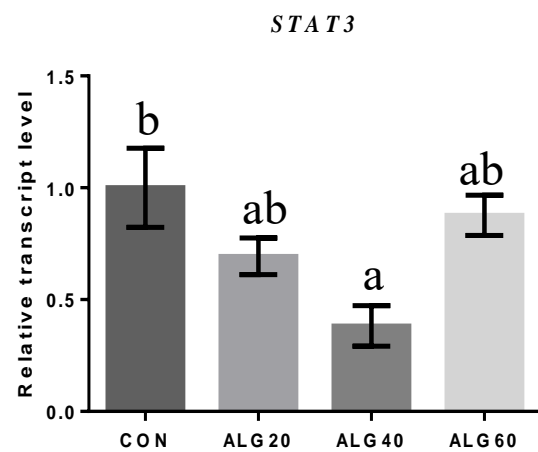
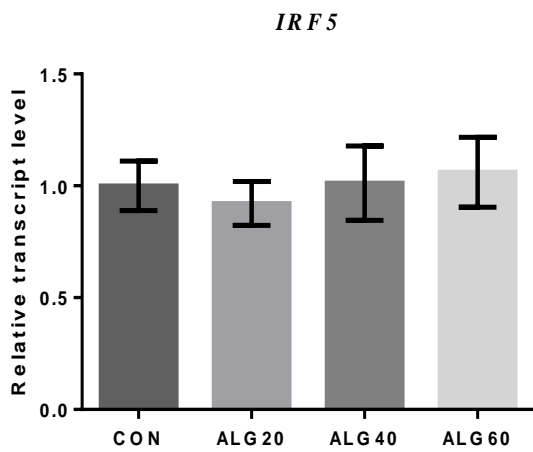
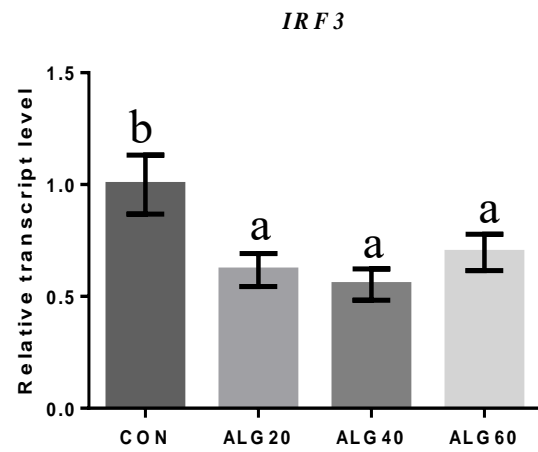
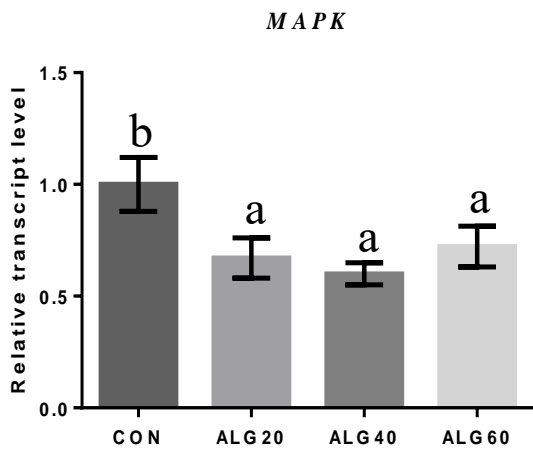
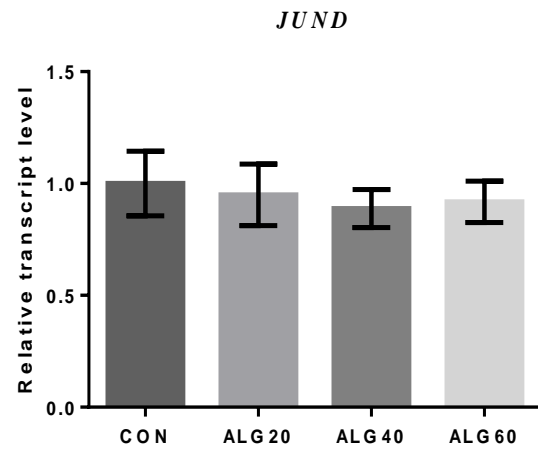
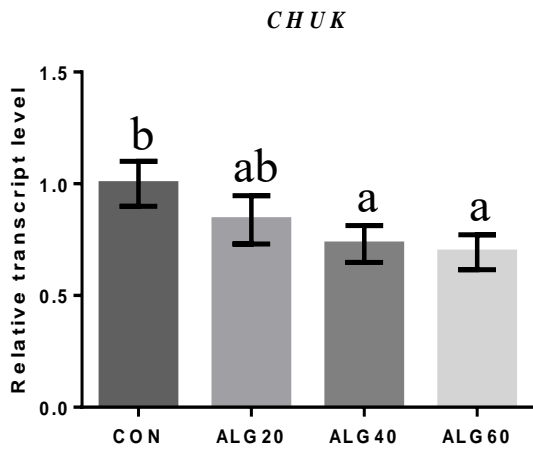
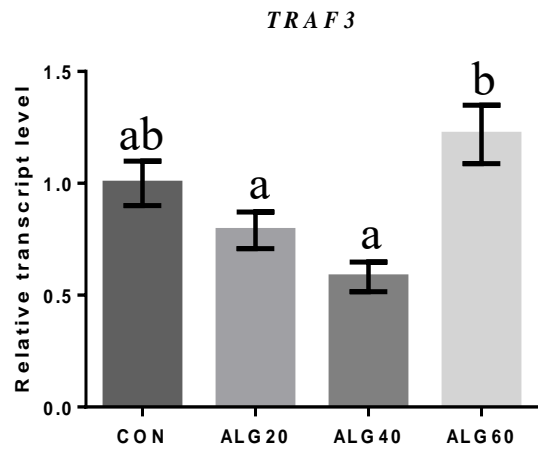
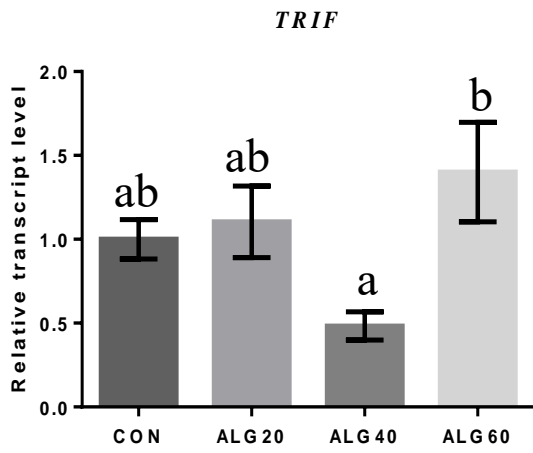
Από την ανάλυση των κύριων συνιστωσών προκύπτει πως η MDA και η δραστηριότητα της SOD παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις σε σχέση με την επίδραση του μικροφύκους στη διατροφή των αιγών. Επιπλέον, η FRAP και η ABTS παρουσιάζουν κοινή συνιστώσα στο μάρτυρα, ενώ αντίρροπη στις διατροφικές επεμβάσεις του μικροφύκους.

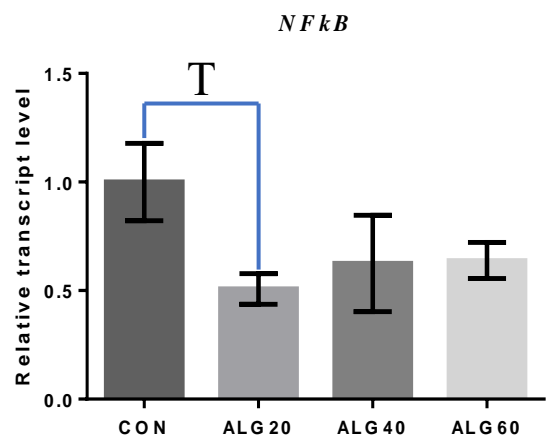
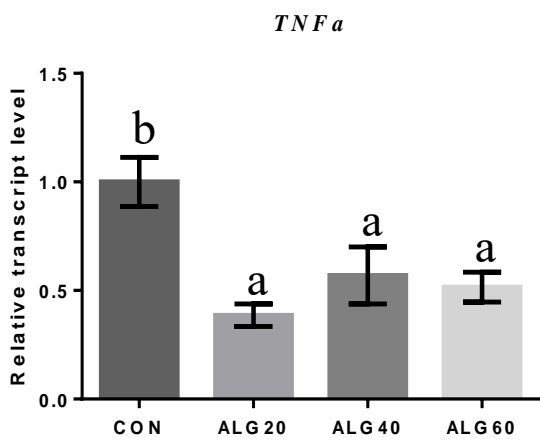
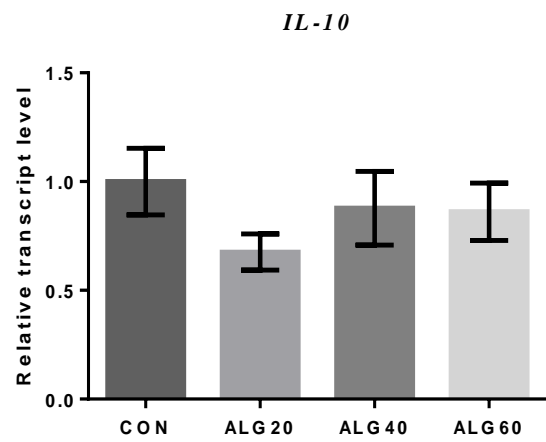
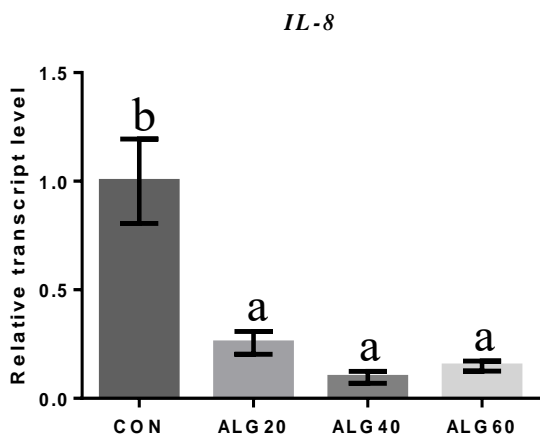
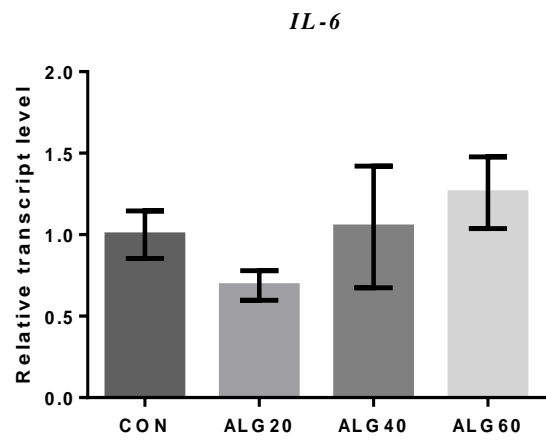
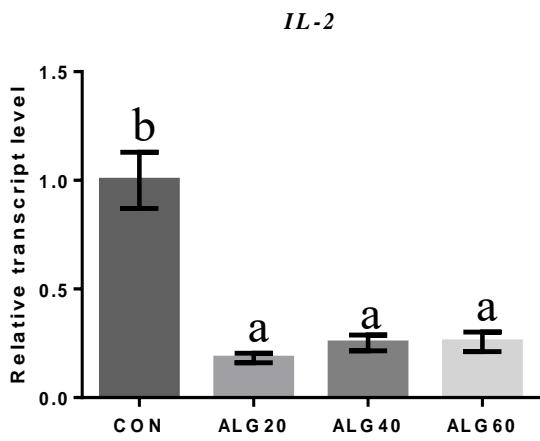
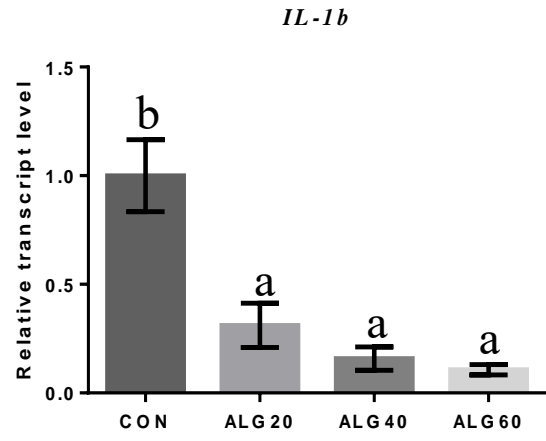
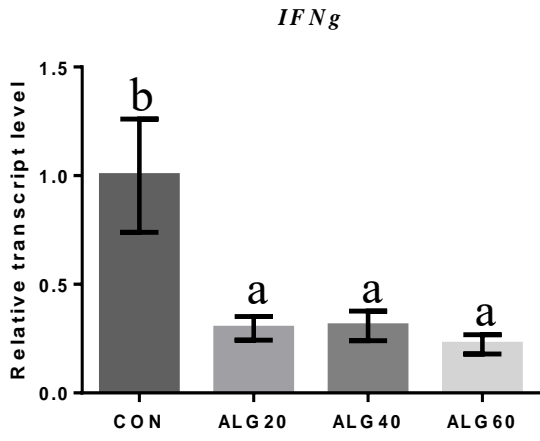
## 5.6. Ανοσοποιητικό σύστημα

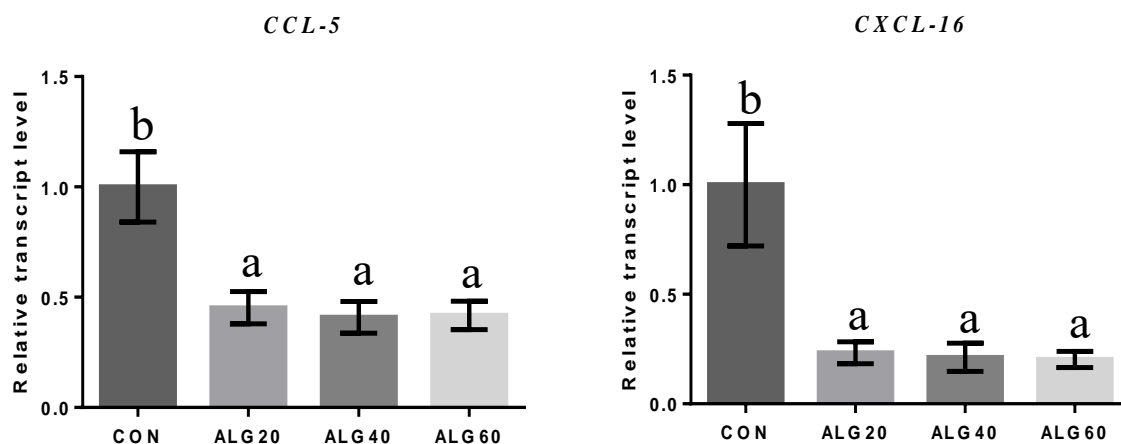
Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων αρχικά πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της *GAPDH* και της *YWHAZ* ως ενδογενή γονίδια αναφοράς καθώς προτείνονται από τους Vorachek *et al.* (2013) ως καταλληλότερα για λευκοκύτταρα μηρυκαστικών. Στη συνέχεια ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) το οποίο έδειξε τη σημαντική ( $P < 0,001$ ) τους, θετική, γραμμική παλινδρόμηση. Ωστόσο, εφαρμόζοντας στατιστική ανάλυση στη σχετική έκφραση της *GAPDH*, παρατηρήθηκε αυξητική τάση για την έκφρασή της σε μεμονωμένη διατροφική επέμβαση. Έτσι εκ των υστέρων έγινε κανονικοποίηση με τη χρήση του γεωμετρικού μέσου της *YWHAZ* και της *HPRT*. Επιπλέον, η σχετική έκφραση των γονιδίων *iNOS* και *TANK* δεν υπολογίστηκε καθώς τα αντίγραφα ήταν ελάχιστα και η εμφάνιση στη real time PCR ελάμβανε χώρα συστηματικά μετά τους 35 κύκλους.

Στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήμα 5.13 και 5.14) παρουσιάζεται η σχετική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων εκφρασμένα ώστε σε κάθε γονίδιο η ομάδα του μάρτυρα να ισούται με τη μονάδα. Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν το μέσο τυπικό σφάλμα. Οι μέσοι όροι κάθε ομάδας αντιστοιχούν στο μέσο όρο των τιμών των τριών δειγματοληψιών. Η επίδραση της διατροφής, του χρόνου δειγματοληψίας, οι αλληλεπιδράσεις αυτών καθώς και τα μέσα τυπικά σφάλματά τους παρουσιάζονται στους Πίνακες 1 και 2 στο Παράρτημα.







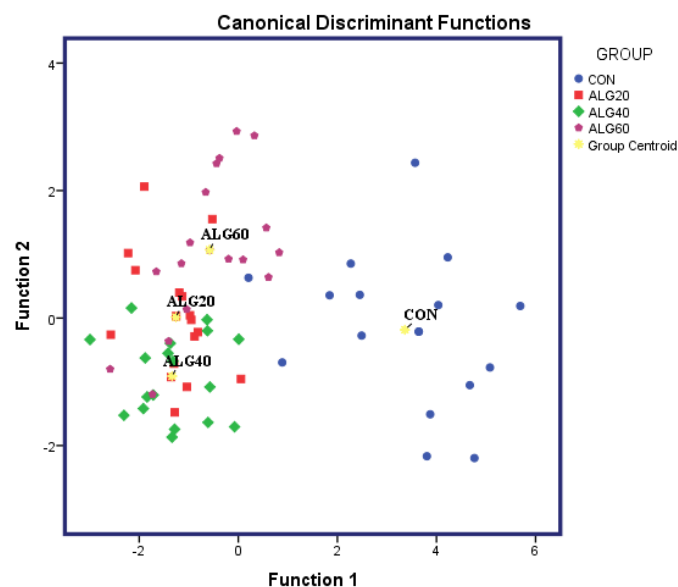


Σχήμα 5.13. Σχετική τρανσκριπτομική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα των αιγών

Στα μονοκύτταρα του αίματος αιγών, η σχετική έκφραση των *TLR4* μειώθηκε σημαντικά κατά 68%, 75% και 74% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *MYD88* μειώθηκε σημαντικά κατά 42%, 45% και 38% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *TRIF* μειώθηκε σημαντικά κατά 66% στην ομάδα ALG40 σε σχέση με την ομάδα ALG60. Η σχετική έκφραση των *TRAF3* μειώθηκε σημαντικά κατά 35% και 52% στις ομάδες ALG20 και ALG40 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα ALG60. Η σχετική έκφραση των *CHUK* μειώθηκε σημαντικά κατά 27% και 31% στις ομάδες ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *MAPK* μειώθηκε σημαντικά κατά 33%, 40% και 27% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *IRF3* μειώθηκε σημαντικά κατά 38%, 45% και 30% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *STAT3* μειώθηκε σημαντικά κατά 63% στην ομάδα ALG40 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *IFN $\gamma$*  μειώθηκε σημαντικά κατά 70%, 69% και 78% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *IL-1 $\beta$*  μειώθηκε σημαντικά κατά 71%, 85% και 90% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *IL1 $\beta$*  μειώθηκε σημαντικά κατά 71%, 85% και 90% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *IL2* μειώθηκε σημαντικά κατά 82%, 75% και 74%

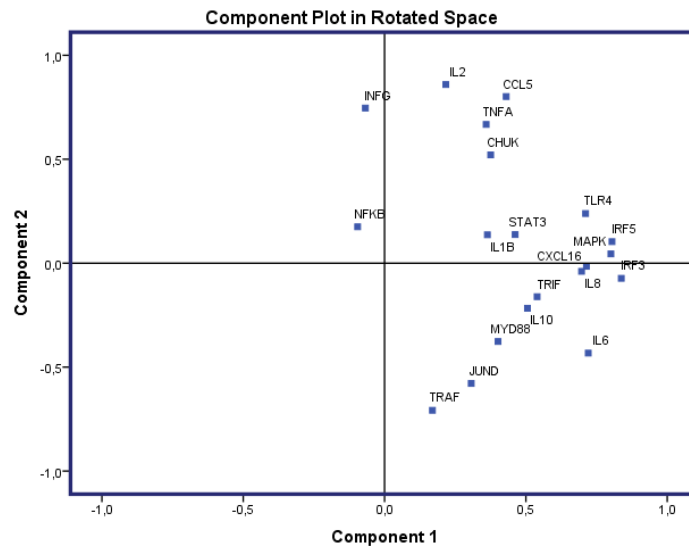
στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *IL8* μειώθηκε σημαντικά κατά 74%, 90% και 85% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *TNF $\alpha$*  μειώθηκε σημαντικά κατά 62%, 43% και 48% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *CCL5* μειώθηκε σημαντικά κατά 55%, 62% και 58% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *CXCL16* μειώθηκε σημαντικά κατά 77%, 79% και 80% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα.

Στα αποτελέσματα του ανοσοποιητικού συστήματος στα μονοκύτταρα (Σχήμα 5.14) εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις. Είκοσι μεταβλητές εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα εβδομήντα-δύο δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 77,8%. Η σχετική έκφραση των: *IL2*, *IL8*, *IL1b*, *TLR4*, *CCL5*, *IFN $\gamma$* , *TNF $\alpha$* , *CXCL16*, *IRF3*, *MAPK*, *MYD88* και *NF $\kappa$ B* ήταν αυτή που συνεισέφερε περισσότερο στην κατασκευή του μοντέλου. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο για το Function 1 ( $P < 0,001$ ), με τιμή Wilks' lambda 0,090.

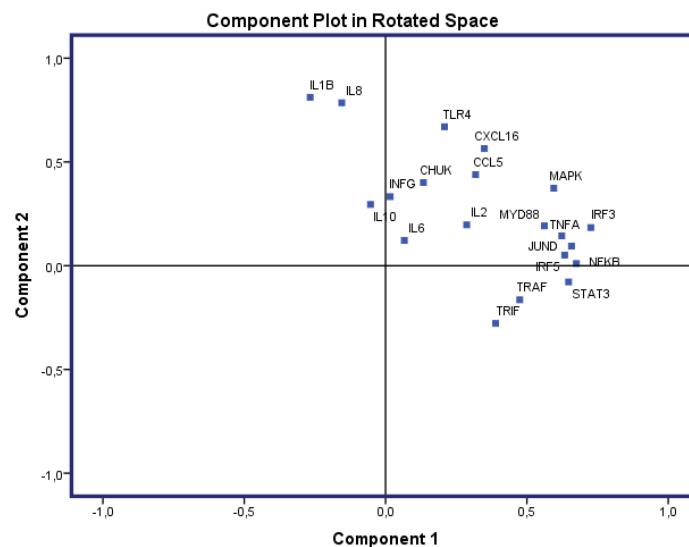


Σχήμα 5.14. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τη σχετική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα.

Επιπροσθέτως, στα αποτελέσματα του ανοσοποιητικού συστήματος στα μονοκύτταρα, (Σχήμα 5.15) εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών: α) για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων της ομάδας του μάρτυρα (Σχήμα 5.15) και β) για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων μονοκυττάρων των αιγών και των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* (Σχήμα 5.16). Η ανάλυση αυτή εφαρμόστηκε με αυτόν τον τρόπο προκειμένου να διαπιστωθεί η σχέση μεταξύ του σήματος των εν λόγω γονιδίων με ή χωρίς την επίδραση του μικροφύκου.



Σχήμα 5.15. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα της ομάδας του μάρτυρα.



Σχήμα 5.16. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*

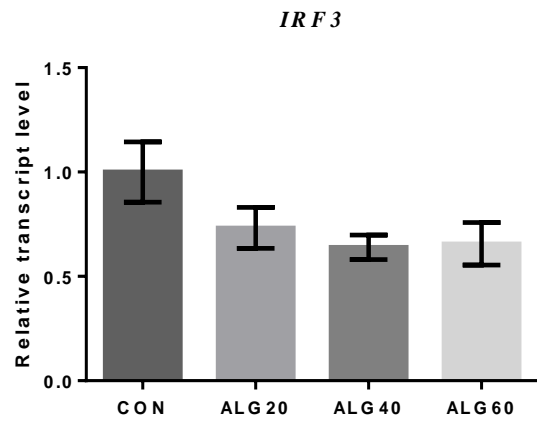
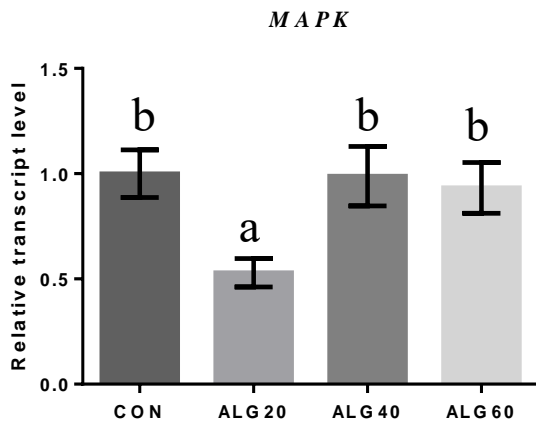
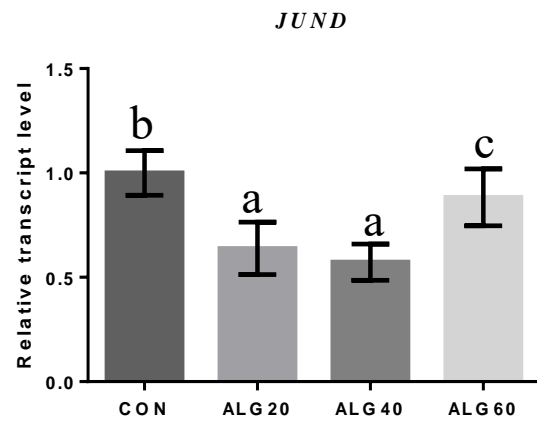
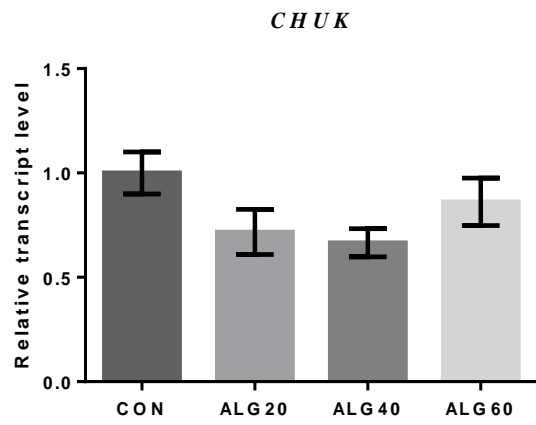
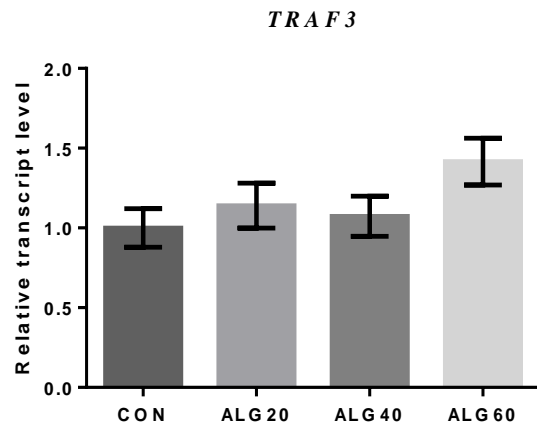
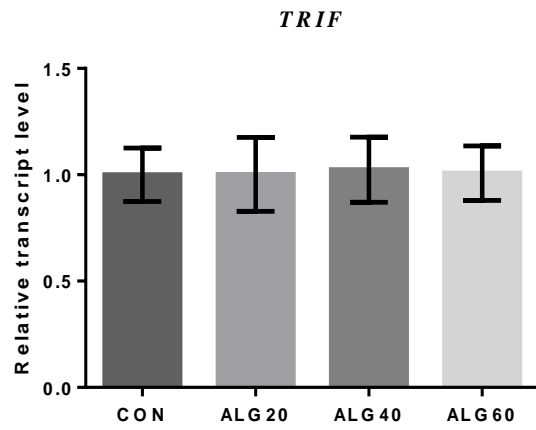
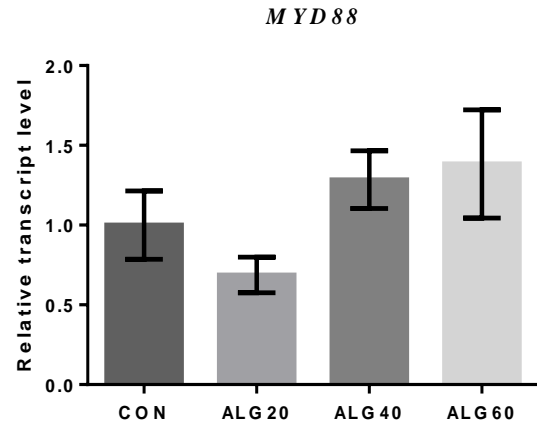
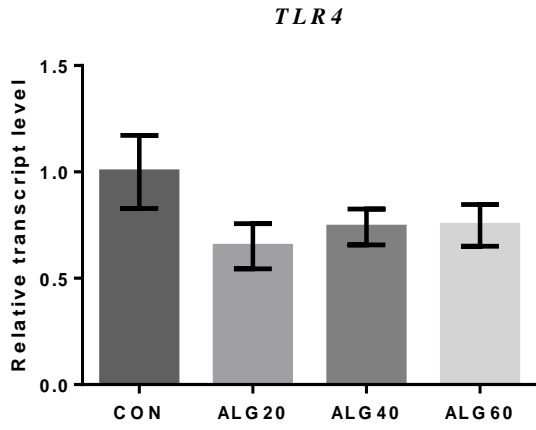
Πίνακας 5.10. Συσχέτιση κατά Pearson της σχετικής έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων σε μονοκύτταρα αιγών.

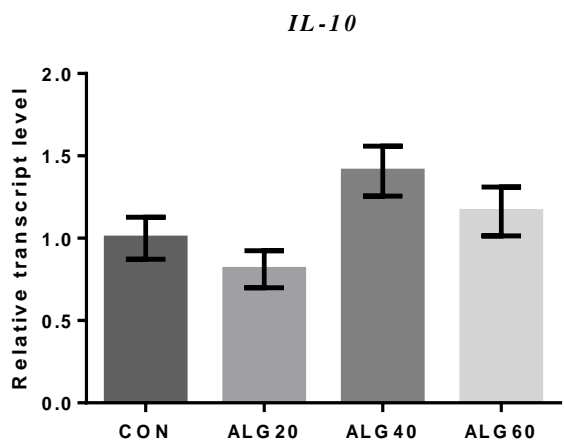
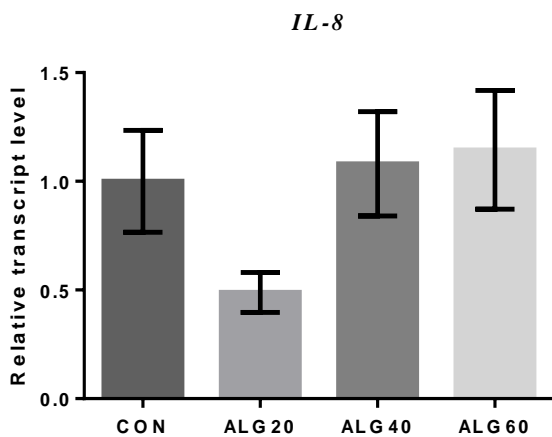
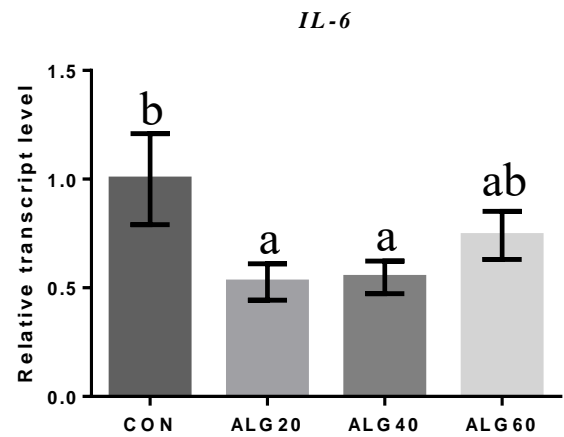
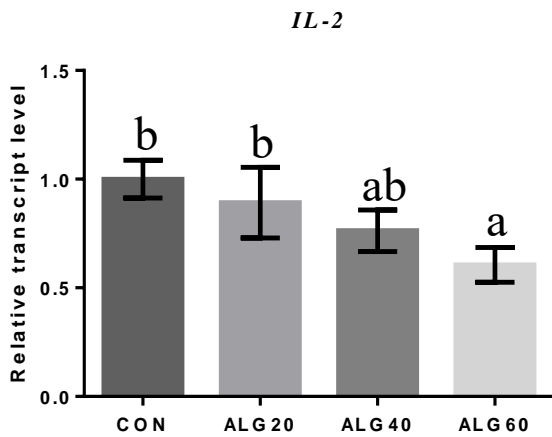
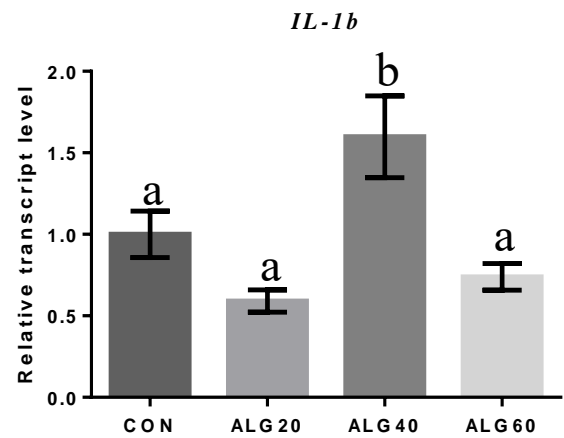
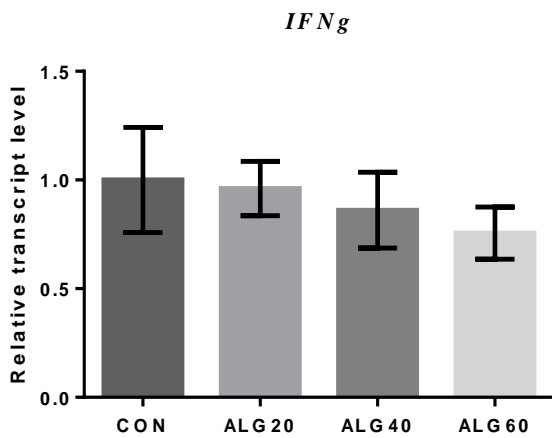
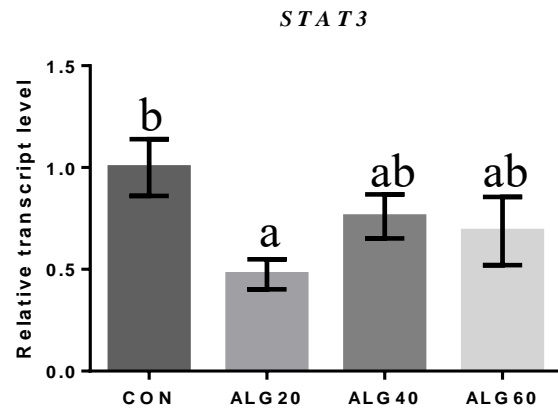
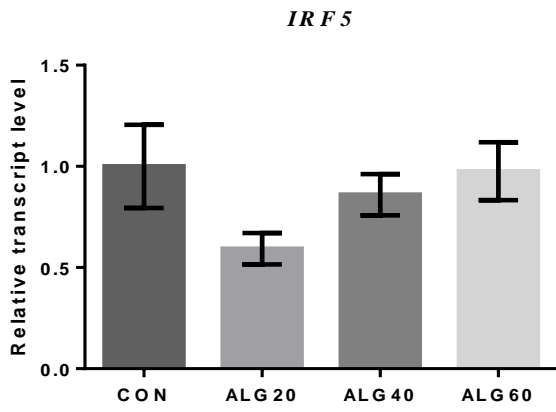
	<i>TLR4</i>	<i>MYD88</i>	<i>TRIF</i>	<i>TRAF3</i>	<i>CHUK</i>	<i>JUND</i>	<i>MAPK</i>	<i>IRF3</i>	<i>IRF5</i>	<i>STAT3</i>	<i>INFg</i>	<i>IL1b</i>	<i>IL2</i>	<i>IL6</i>	<i>IL8</i>	<i>IL10</i>	<i>TNFa</i>	<i>Nfkb</i>	<i>CCL5</i>	
<i>TLR4</i>	1																			
<i>MYD88</i>	,355**	1																		
<i>TRIF</i>	,045	,069	1																	
<i>TRAF3</i>	,057	,168	,492**	1																
<i>CHUK</i>	,300*	,086	,005	-,028	1															
<i>JUND</i>	,064	,378**	,170	,257*	,182	1														
<i>MAPK</i>	,435**	,366**	,188	,203	,301*	,324**	1													
<i>IRF3</i>	,584**	,581**	,114	,210	,201	,336**	,693**	1												
<i>IRF5</i>	,197	,298*	,286*	,200	,276*	,236*	,474**	,443**	1											
<i>STAT3</i>	,323**	,205	,357**	,356**	,051	,094	,473**	,418**	,142	1										
<i>INFg</i>	,286*	,043	-,121	-,056	,423**	-,020	,176	,083	-,052	,153	1									
<i>IL1b</i>	,561**	,140	-,067	,042	,433**	,198	,290*	,203	-,040	,112	,503**	1								
<i>IL2</i>	,637**	,277*	,020	-,005	,435**	-,022	,325**	,343**	,105	,250*	,582**	,567**	1							
<i>IL6</i>	,107	,043	,010	,096	,161	,138	,095	,098	-,028	,126	-,071	,053	,040	1						
<i>IL8</i>	,730**	,291*	-,016	,053	,305**	,183	,423**	,507**	,121	,246*	,222	,784**	,501**	,082	1					
<i>IL10</i>	,192	-,002	-,060	,144	,221	,264*	,121	,040	-,026	,076	,066	,385**	,092	,538**	,317**	1				
<i>TNFa</i>	,428**	,221	-,025	-,003	,321**	,110	,412**	,452**	,256*	,525**	,430**	,348**	,525**	,103	,447**	,219	1			
<i>Nfkb</i>	,185	,084	,161	,180	-,006	,067	,311**	,142	,229	,504**	,089	,133	,294*	-,032	,127	-,031	,573**	1		
<i>CCL5</i>	,445**	,263*	,048	-,047	,437**	,007	,488**	,379**	,187	,370**	,655**	,499**	,756**	-,016	,405**	,143	,552**	,307**	1	
<i>CXCL16</i>	,667**	,441**	,061	,051	,090	,044	,610**	,630**	,343**	,302**	,077	,312**	,447**	,160	,645**	,125	,325**	,165	,412**	1

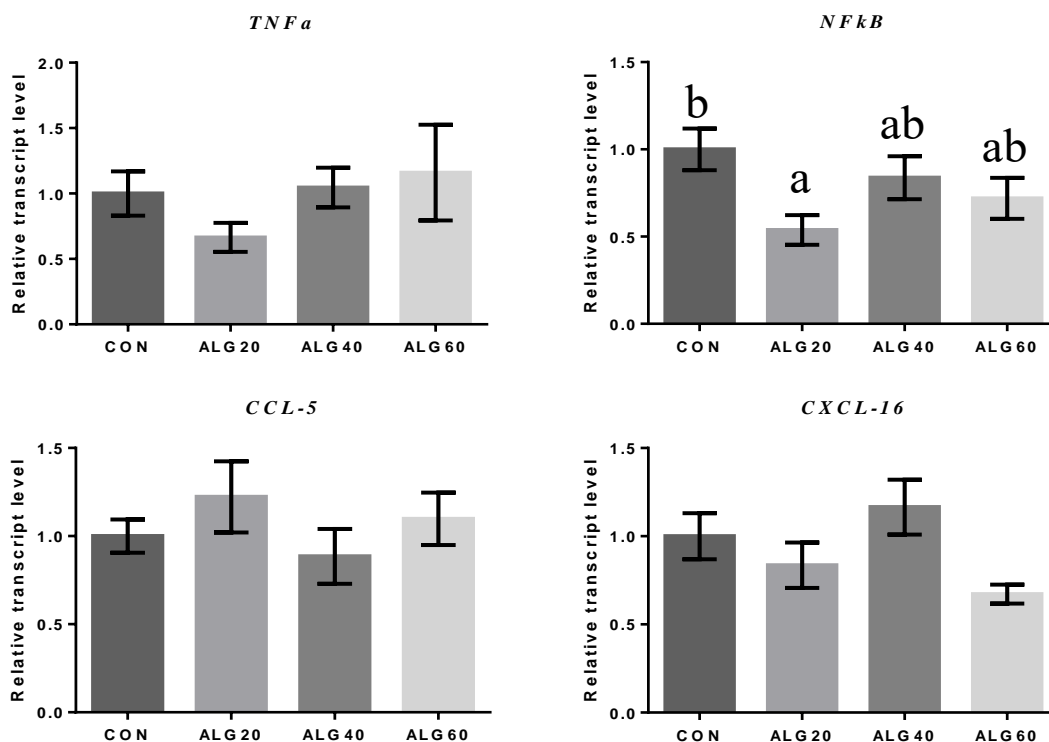
\*: Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο 0,05 , \*\*: Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο 0,01.



Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *TLR4* και αυτής των γονιδίων: *MYD88*, *CHUK*, *MAPK*, *IRF3*, *STAT3*, *INFg*, *IL1b*, *IL2*, *IL8*, *TNFa*, *CCL5* και *CXCL16* (Πίνακας 5.10). Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *MYD88* και αυτής των γονιδίων: *JUND*, *MAPK*, *IRF3*, *IRF5*, *IL2*, *IL8*, *CCL5* και *CXCL16*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *TRIF* και αυτής των γονιδίων: *TRAF3*, *IRF5*, και *STAT3*. Η σχετική έκφραση των *TRAF3* συσχετίστηκε θετικά με αυτή των *JUND* και *STAT3*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *JUND* και αυτής των γονιδίων: *MAPK*, *IRF5*, *INFg*, *IL1b*, *IL2*, *IL8*, *TNFa* και *CCL5*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *TRIF* και αυτής των γονιδίων: *MAPK*, *IRF3*, *IRF5* και *IL10*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *MAPK* και αυτής των γονιδίων: *IRF3*, *IRF5*, *STAT3*, *IL2*, *IL8*, *TNFa*, *NFkB*, *CCL5* και *CXCL16*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *IRF5* και αυτής των γονιδίων: *IRF5*, *STAT3*, *IL2*, *IL8*, *TNFa*, *CCL5* και *CXCL16*. Οι *IRF5* συσχετίστηκαν θετικά με τον *TNFa* και *CXCL16*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *STAT3* και αυτής των γονιδίων: *IL2*, *IL8*, *TNFa*, *NFkB*, *CCL5* και *CXCL16*. Οι *INFg* συσχετίστηκαν θετικά με τα εξής γονίδια: *IL1b*, *IL2*, *TNFa*, και *CCL5*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *IL1b* και αυτής των γονιδίων: *IL2*, *IL8*, *IL10*, *TNFa*, *CCL5* και *CXCL16*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *IL2* και αυτής των γονιδίων: *IL8*, *TNFa*, *NFkB*, *CCL5* και *CXCL16*. Η σχετική έκφραση της *IL6* συσχετίστηκε θετικά με αυτή της *IL10*. Η σχετική έκφραση της *IL-8* συσχετίστηκε στατιστικώς θετικά με αυτή των γονιδίων: *IL10*, *TNFa*, *CCL5* και *CXCL16*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *TNFa* και αυτής των γονιδίων: *NFkB*, *CCL5* και *CXCL16*. Η σχετική έκφραση των *NFkB* συσχετίστηκε θετικά με αυτή της *CCL5* και τέλος η σχετική έκφραση της *CCL5* συσχετίστηκε θετικά με αυτή της *CXCL16*.





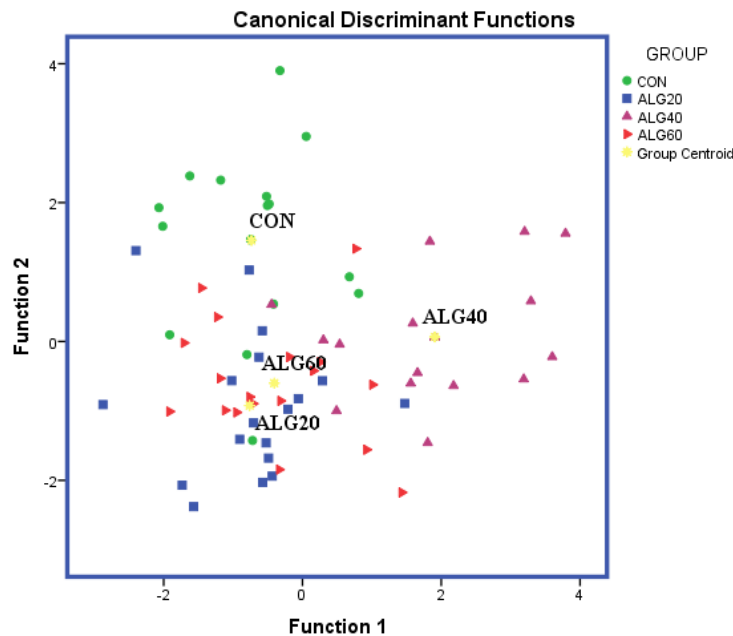


Σχήμα 5.17. Σχετική τρανσκριπτομική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα κύτταρα των αιγών.

Στα ουδετερόφιλα κύτταρα του αίματος αιγών, η σχετική έκφραση των *JUND* μειώθηκε σημαντικά κατά 36% και 43% στις ομάδες ALG20 και ALG40 αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *MAPK* μειώθηκε σημαντικά κατά 47% στην ομάδα ALG20 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *STAT3* μειώθηκε σημαντικά κατά 52% στην ομάδα ALG20 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *IL1b* αυξήθηκε σημαντικά κατά 60% στην ομάδα ALG40 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *IL2* μειώθηκε σημαντικά κατά 40% στην ομάδα ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *IL6* μειώθηκε σημαντικά κατά 47%, και 47% στις ομάδες ALG20 και ALG40 αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σχετική έκφραση των *NFκB* μειώθηκε σημαντικά κατά 33% στην ομάδα ALG20 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα.

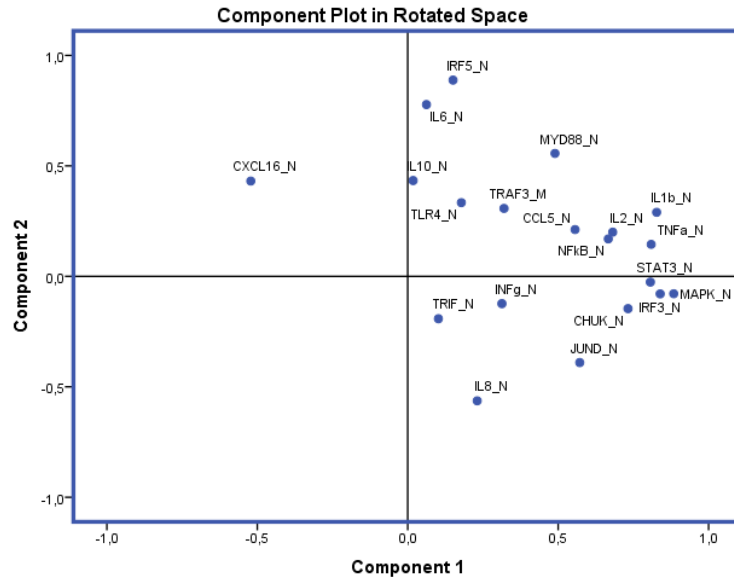
Επιπλέον, στα αποτελέσματα του ανοσοποιητικού συστήματος στα ουδετερόφιλα (Σχήμα 5.18) εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις. Είκοσι μεταβλητές εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν

ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα εβδομήντα-δύο δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 75%. Η σχετική έκφραση των *IL1b*, *IL10*, *CXCL16*, *CCL5* και *TRIF* ήταν αυτή που συνεισέφερε περισσότερο στο διαχωρισμό. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο για το Function 1 ( $P < 0,001$ ), με τιμή Wilks' lambda 0,140.

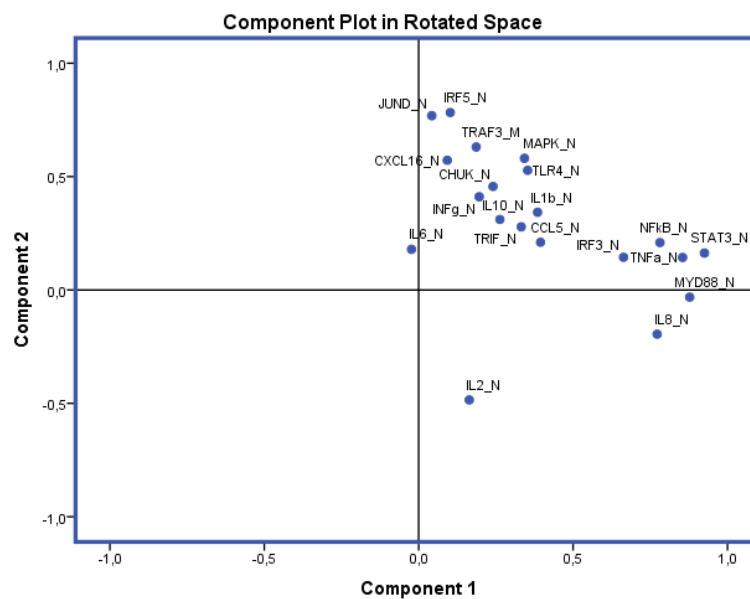


Σχήμα 5.18. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τη σχετική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα κύτταρα.

Επιπροσθέτως, στα αποτελέσματα του ανοσοποιητικού συστήματος στα ουδετερόφιλα, εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών: α) για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων της ομάδας του μάρτυρα (Σχήμα 5.19) και β) για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων ουδετερόφιλων των αιγών και των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* (Σχήμα 5.20). Η ανάλυση αυτή εφαρμόστηκε με αυτόν τον τρόπο προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ του σήματος των εν λόγω γονιδίων με ή χωρίς την επίδραση του μικροφύκου.



Σχήμα 5.19. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα της ομάδας του μάρτυρα.



Σχήμα 5.20. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*

Πίνακας 5.11. Συσχέτιση κατά Pearson της σχετικής έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων σε ουδετερόφιλα κύτταρα αιγών.

	<i>TLR4</i>	<i>MYD88</i>	<i>TRIF</i>	<i>TRAF3</i>	<i>CHUK</i>	<i>JUND</i>	<i>MAPK</i>	<i>IRF3</i>	<i>IRF5</i>	<i>STAT3</i>	<i>INFg</i>	<i>IL1b</i>	<i>IL2</i>	<i>IL6</i>	<i>IL8</i>	<i>IL10</i>	<i>TNFa</i>	<i>NFkB</i>	<i>CCL5</i>	
<i>TLR4</i>	1																			
<i>MYD88</i>	,163	1																		
<i>TRIF</i>	,185	,182	1																	
<i>TRAF3</i>	,283*	,174	,391**	1																
<i>CHUK</i>	,135	,164	,267*	,232*	1															
<i>JUND</i>	,387**	-,022	,063	,369**	,353**	1														
<i>MAPK</i>	,267*	,351**	,111	,246*	,309**	,481**	1													
<i>IRF3</i>	,301*	,333**	,170	,212	,393**	,350**	,442**	1												
<i>IRF5</i>	,308**	,266*	,024	,245*	,237*	,366**	,303**	,054	1											
<i>STAT3</i>	,337**	,650**	,208	,236*	,344**	,308**	,458**	,623**	,212	1										
<i>INFg</i>	,120	,013	,079	,171	,210	,456**	,259*	,375**	,233*	,308**	1									
<i>IL1b</i>	,255*	,402**	,229	,055	,281*	,058	,441**	,263*	,307**	,371**	,102	1								
<i>IL2</i>	-,058	,083	,115	-,205	,155	-,186	-,073	,294*	-,132	,185	,060	-,011	1							
<i>IL6</i>	,170	,104	,134	-,025	,157	,077	,025	,107	,558**	,017	-,012	,138	,184	1						
<i>IL8</i>	,130	,458**	,241*	-,024	,205	,068	,126	,273*	-,118	,429**	,099	,188	,124	-,054	1					
<i>IL10</i>	,260*	,220	,031	,138	,019	,056	,341**	,223	,205	,145	,083	,272*	-,134	,094	,041	1				
<i>TNFa</i>	,361**	,691**	,095	,308**	,187	,303**	,402**	,529**	,218	,813**	,158	,332**	-,003	-,034	,477**	,176	1			
<i>NFkB</i>	,260*	,525**	,239*	,127	,338**	,253*	,427**	,476**	,319**	,762**	,130	,344**	,065	,213	,446**	,083	,647**	1		
<i>CCL5</i>	,100	,290*	,202	,294*	,298*	,116	,284*	,406**	,129	,258*	,181	,303**	,143	,096	,082	-,002	,282*	,214	1	
<i>CXCL16</i>	,418**	-,007	,109	,171	-,031	,145	,175	-,001	,292*	,032	-,003	,318**	-,142	,093	-,181	,292*	-,024	,120	,000	

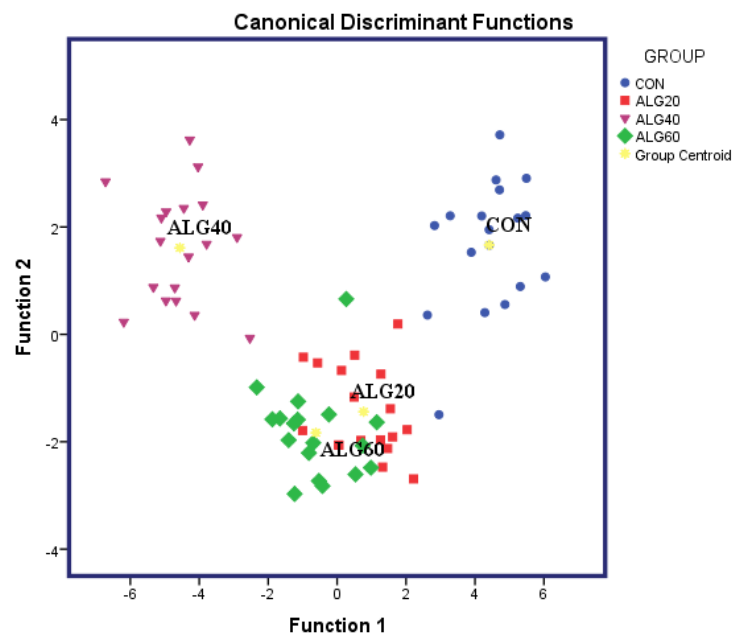
\*: Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο 0,05 , \*\*: Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο 0,01.

Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *TLR4* και αυτής των γονιδίων: *TRAF3*, *JUND*, *MAPK*, *IRF3*, *IRF5*, *STAT3*, *IL1b*, *IL10*, *TNFa*, *NFkB* και *CXCL16* (Πίνακας 5.11). Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *MYD88* και αυτής των γονιδίων: *MAPK*, *IRF3*, *IRF5*, *STAT3*, *IL1b*, *IL8*, *TNFa*, *NFkB* και *CCL5*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *TRIF* και αυτής των γονιδίων: *TRAF3*, *CHUK*, *IL8* και *NFkB*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *TRAF3* και αυτής των γονιδίων: *JUND*, *MAPK*, *CHUK*, *IRF5*, *STAT3*, *TNFa* και *CCL5*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *CHUK* και αυτής των γονιδίων: *JUND*, *MAPK*, *IRF3*, *IRF5*, *STAT3*, *IL1b*, *NFkB* και *CCL5*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *JUND* και αυτής των γονιδίων: *MAPK*, *IRF3*, *IRF5*, *STAT3*, *INFG*, *TNFa* και *NFkB*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *MAPK* και αυτής των γονιδίων: *IRF3*, *IRF5*, *STAT3*, *INFG*, *IL1b*, *IL10*, *TNFa*, *NFkB* και *CCL5*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *IRF3* και αυτής των γονιδίων: *STAT3*, *INFG*, *IL1b*, *IL2*, *IL8*, *TNFa*, *NFkB* και *CCL5*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *IRF5* και αυτής των γονιδίων: *INFG*, *IL1b*, *IL2*, *IL6*, *NFkB* και *CXCL16*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *STAT3* και αυτής των γονιδίων: *INFG*, *IL1b*, *IL8*, *TNFa*, *NFkB* και *CCL5*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *IL1b* και αυτής των γονιδίων: *IL10*, *TNFa*, *NFkB*, *CCL5* και *CXCL16*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *IL8* και αυτής των γονιδίων *TNFa* και *NFkB*. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *IL10* και αυτής του γονιδίου *CXCL16*. Τέλος, η σχετική έκφραση του γονιδίου *TNFa*, συσχετίστηκε θετικά με αυτή των *NFkB* και *CCL5*.

Επιπλέον, στα αποτελέσματα του ανοσοποιητικού συστήματος για τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα (Σχήμα 5.21) αίματος εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να

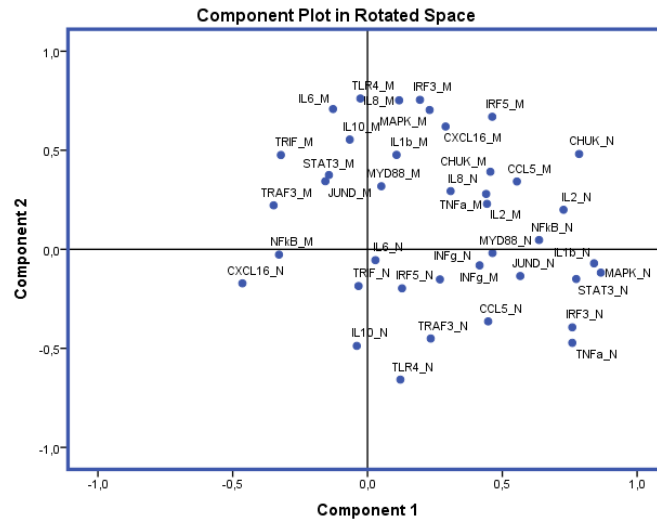


ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις. Σαράντα μεταβλητές εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα εβδομήντα-δύο δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 98,6%. Η σχετική έκφραση των *IRF3* (μονοκυττάρων), *MAPK* (μονοκυττάρων), *IRF3* (ουδετερόφιλων), *CHUK* (μονοκυττάρων), και *JUND* (μονοκυττάρων), ήταν αυτή που συνεισέφερε περισσότερο στο διαχωρισμό. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική ( $P < 0,001$ ), με τιμή Wilks' lambda 0,008 για το Function 1 και με τιμή Wilks' lambda 0,110 για το Function 2.

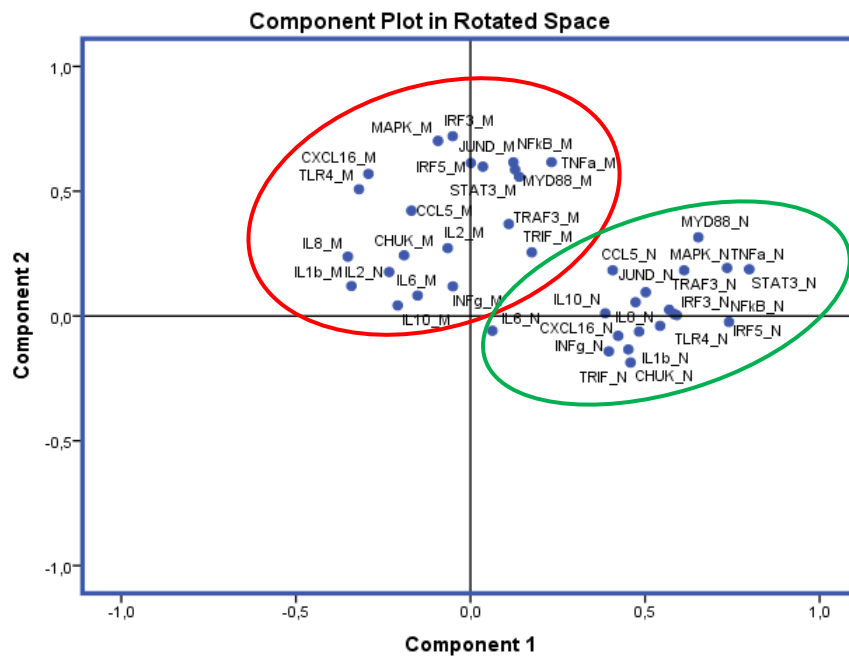


Σχήμα 5.21. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τη σχετική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων σε μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα κύτταρα.

Στα αποτελέσματα του ανοσοποιητικού συστήματος στα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα αίματος εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών: α) για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων της ομάδας του μάρτυρα (Σχήμα 5.22) και β) για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων ουδετερόφιλων των αιγών και των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* (Σχήμα 5.23). Η ανάλυση αυτή εφαρμόστηκε με αυτόν τον τρόπο προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ του σήματος των εν λόγω γονιδίων με ή χωρίς την επίδραση του μικροφύκου.



Σχήμα 5.22. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα κύτταρα αίματος της ομάδας του μάρτυρα.



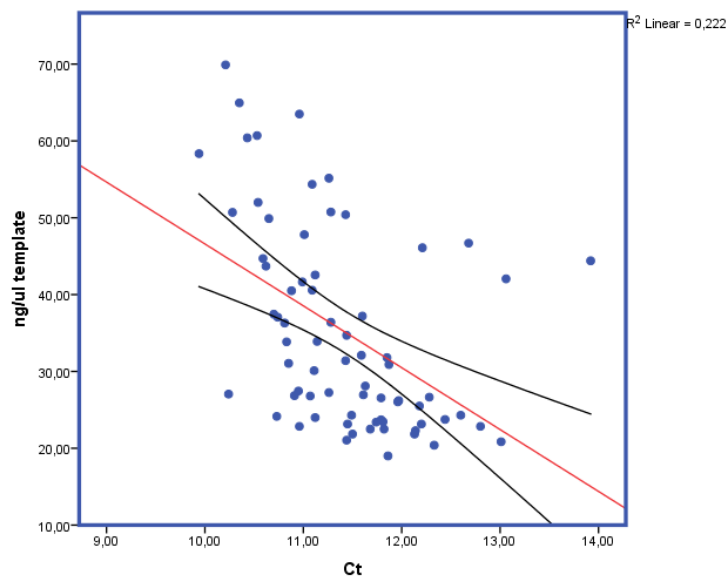
Σχήμα 5.23. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα κύτταρα αίματος των τριών ομάδων που χορηγήθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*

### 5.7. Μικροοργανισμοί της μεγάλης κοιλίας

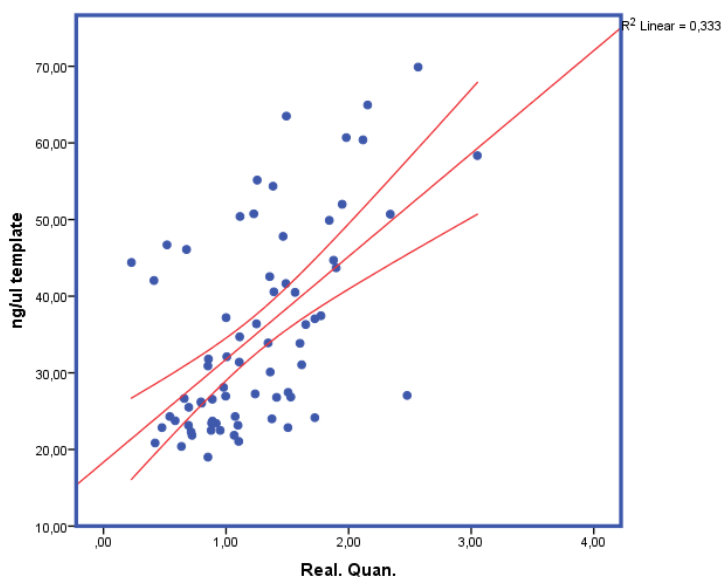
Η κανονικοποίηση των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας, όπως αυτοί ανιχνεύτηκαν και προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, πραγματοποιήθηκε με τη σχετική αφθονία των ολικών βακτηρίων (16S rRNA) στο υγρό της μεγάλης κοιλίας. Προκειμένου να επαληθευτεί η ικανότητα χρησιμοποίησης του εν λόγω γονιδίου ως γονίδιο αναφοράς, διερευνήθηκε η συσχέτιση της ποσότητας DNA ως template με τον κύκλο φθορισμού και τη σχετική αφθονία του δείγματος (Πίνακας 5.12).

Πίνακας 5.12. Συσχέτιση κατά Pearson της ποσότητας DNA ως πρότυπο (template) με τον κύκλο φθορισμού και τη σχετική αφθονία του δείγματος.

	Template (ng/μl)	Αρ. κύκλου	Σχετ. αφθονία
Template (ng/ul)	1		
Αρ. κύκλου	-0,471**	1	
Σχετ. αφθονία	0,577**	-0,945**	1



Σχήμα 5.24. Συσχέτιση κατά Pearson της ποσότητας DNA ως template με τον κύκλο φθορισμού του δείγματος.



Σχήμα 5.25. Συσχέτιση κατά Pearson της ποσότητας DNA ως template με τη σχετική αφθονία του δείγματος.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των μικροφυκών στη διατροφή των αιγών, η επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας και οι αλληλεπιδράσεις στον πληθυσμό των μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.13. Επιπλέον, στο Σχήμα 5.26 παρουσιάζονται μπάρες που αντιπροσωπεύουν το σύνολο των αποτελεσμάτων των τριών δειγματοληψιών ανά διατροφική επέμβαση. Τα *Archaea* αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα ALG60 κατά 318%, 218% και 193% αντίστοιχα σε σχέση με τις ομάδες CON, ALG20 και ALG40 αντίστοιχα. Τα *Methanogen* μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG20 και ALG40 κατά 60,4% και 58% αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα ενώ στην ομάδα ALG60 μειώθηκαν αριθμητικά κατά 33%. Οι *Butyrivibrio proteoclasticus* μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 κατά 55% και 36% αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Οι *Ruminococcus flavofaciens* μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 73%, 79% και 72% αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Οι *Fibrobacter succinogenes* μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 κατά 48% και 68% αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Οι *Methanobacterium formicicum* μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 33%, 56% και 53% αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Οι *Methanobrevibacter spp.* μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 κατά 55%, 73% και 35% αντίστοιχα, σε σχέση με την

ομάδα του μάρτυρα. Στον αντίποδα για τους μικροοργανισμούς που παράγουν μεθάνιο, οι *Methanomicrobium mobile* αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα ALG60 κατά 337%, 223% και 187% αντίστοιχα σε σχέση με τις ομάδες CON, ALG20 και ALG40 αντίστοιχα.

Πίνακας 5.13. Σχετική ποσότητα επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό μεγάλης κοιλίας των ομάδων CON, ALG20, ALG40 και ALG60.

	Διατροφή (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)				Επίδραση		
	CON	ALG20	ALG40	ALG60	SEM <sup>1</sup>	20	40	60	SEM <sup>1</sup>	Δ	X	ΔxX
<i>Archaea</i> (Αρχαία)	0,81 <sup>b</sup>	1,18 <sup>b</sup>	1,33 <sup>b</sup>	2,58 <sup>a</sup>	0,385	0,99 <sup>b</sup>	1,95 <sup>a</sup>	1,49 <sup>a</sup>	0,240	*	**	*
<i>Protozoa</i> (Πρωτόζωα)	1,47	1,43	1,04	1,08	0,178	0,97	1,39	1,39	0,149	NS	NS	NS
<i>Total fungi</i> (Μύκητες)	2,40	1,29	2,93	2,21	0,476	1,57	2,66	2,38	0,254	NS	NS	**
<i>Methanogen</i> (Μεθανοβακτήρια)	7,32 <sup>a</sup>	3,03 <sup>b</sup>	3,15 <sup>b</sup>	5,51 <sup>ab</sup>	1,069	3,23 <sup>a</sup>	5,42 <sup>b</sup>	5,61 <sup>b</sup>	0,652	*	**	NS
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	2,31	1,69	1,81	1,89	0,207	1,84	1,95	1,99	0,157	NS	NS	NS
<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	2,56 <sup>a</sup>	2,01 <sup>ac</sup>	1,16 <sup>b</sup>	1,77 <sup>cb</sup>	0,277	1,82	2,10	1,71	0,241	*	NS	NS
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	22,12 <sup>a</sup>	5,83 <sup>b</sup>	4,71 <sup>b</sup>	6,30 <sup>b</sup>	5,035	9,28	9,08	9,82	2,739	*	NS	NS
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	0,25 <sup>a</sup>	0,20 <sup>ab</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,08 <sup>b</sup>	0,040	0,37 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,033	*	***	NS
<i>Ruminococcus albus</i>	2,54	1,75	1,76	1,52	0,321	1,27 <sup>b</sup>	1,65 <sup>b</sup>	2,76 <sup>a</sup>	0,221	NS	***	NS
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	0,32	0,45	0,92	0,48	0,225	0,65	0,42	0,55	0,138	NS	NS	NS
<i>Streptococcus bovis</i>	1,79	1,36	1,14	0,76	0,329	2,57 <sup>a</sup>	0,71 <sup>b</sup>	0,56 <sup>b</sup>	0,230	NS	***	NS

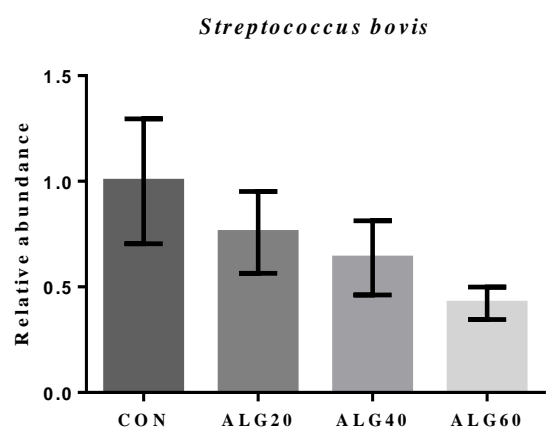
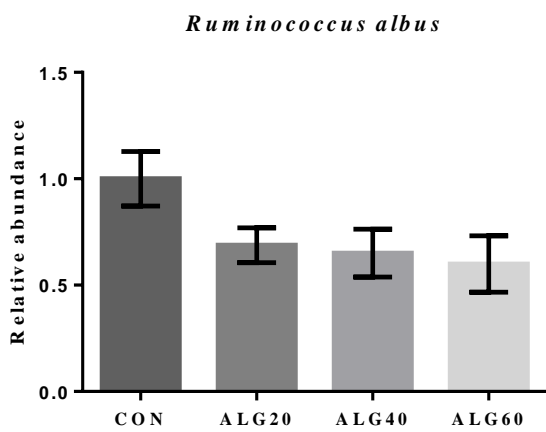
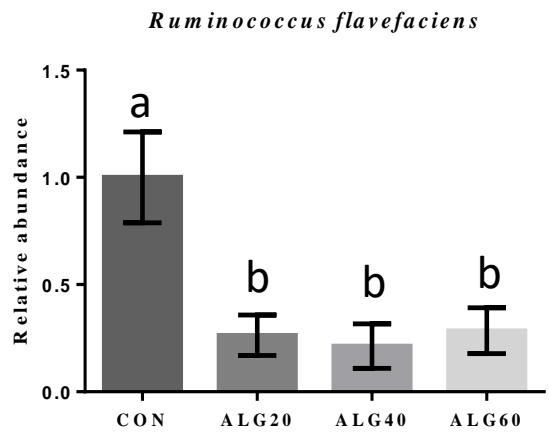
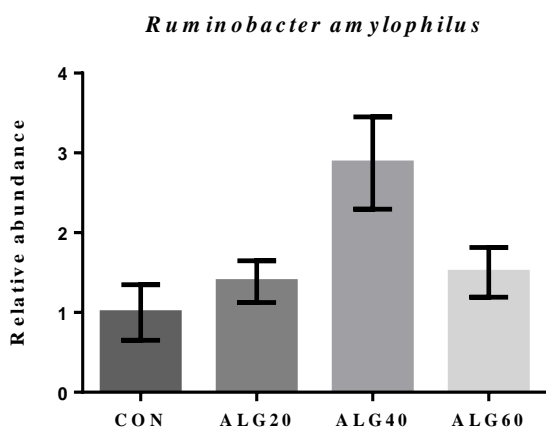
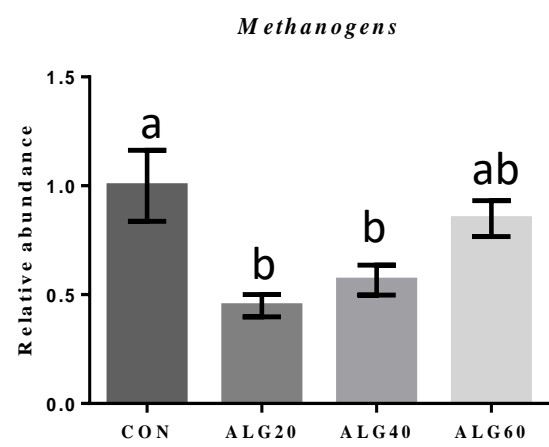
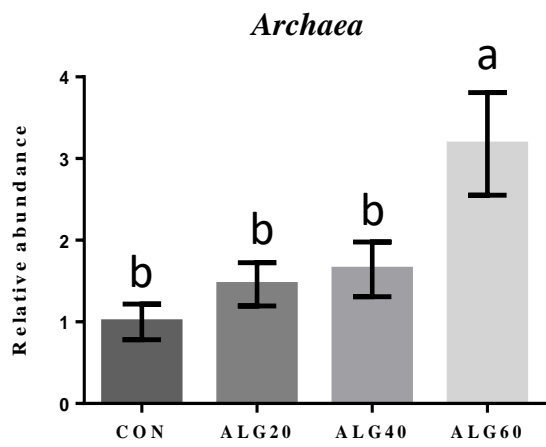
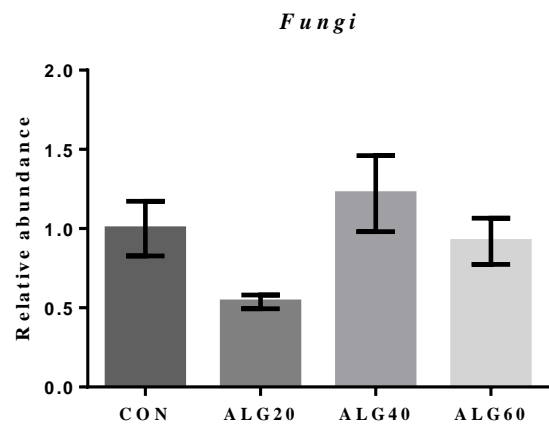
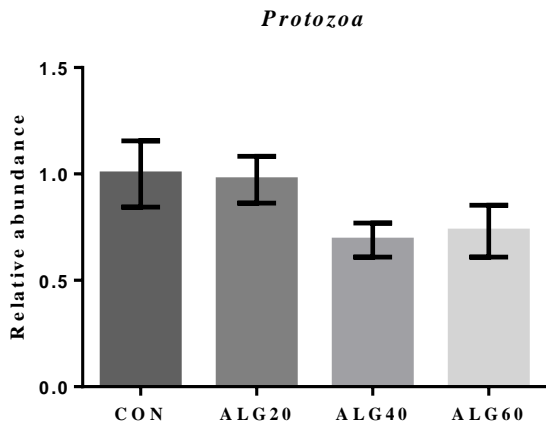
Αποτελέσματα

<i>Selenomonas ruminantium</i>	0,97	0,84	0,71	0,66	0,132	0,93	0,71	0,74	0,080	NS	NS	*
<i>Prevotella sp</i>	2,78	2,63	2,22	2,36	0,415	1,63 <sup>b</sup>	2,89 <sup>a</sup>	2,97 <sup>a</sup>	0,278	NS	**	NS
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	3,91	2,85	2,04	2,00	0,760	1,75 <sup>b</sup>	2,44 <sup>b</sup>	3,91 <sup>a</sup>	0,416	NS	**	NS
<i>Methanobacteriales</i>												
<i>Methanobacterium formicicum</i>	0,63 <sup>a</sup>	0,49 <sup>b</sup>	0,28 <sup>c</sup>	0,30 <sup>c</sup>	0,057	0,45	0,38	0,44	0,042	**	NS	*
<i>Methanomicrobiales</i>												
<i>Methanomicrobium mobile</i>	0,90 <sup>b</sup>	1,36 <sup>b</sup>	1,62 <sup>b</sup>	3,04 <sup>a</sup>	0,447	1,11 <sup>b</sup>	2,26 <sup>a</sup>	1,82 <sup>a</sup>	0,300	*	**	*
<i>Methanobrevibacter spp.</i>	1,25 <sup>a</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,34 <sup>b</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,154	0,71	0,54	0,71	0,085	**	NS	**

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

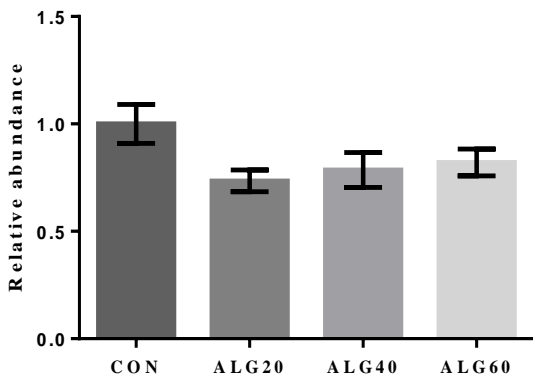
\* $p < 0,05$  , \*\* $p < 0,01$  , \*\*\* $p < 0,001$ .

<sup>1</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

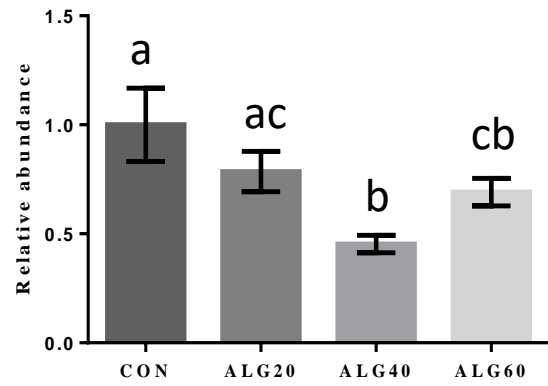




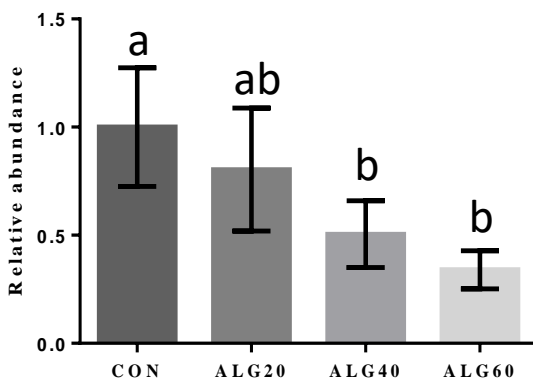
*Butyrivibrio fibrisolvens*



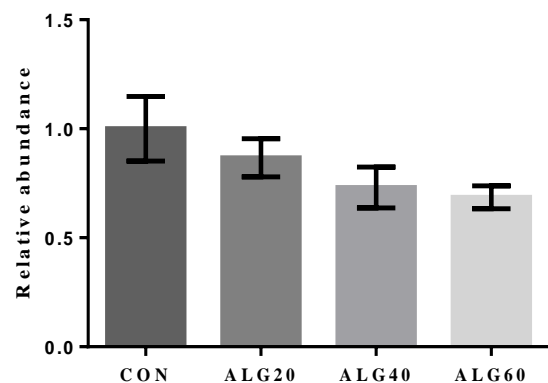
*Butyrivibrio proteoclasticus*



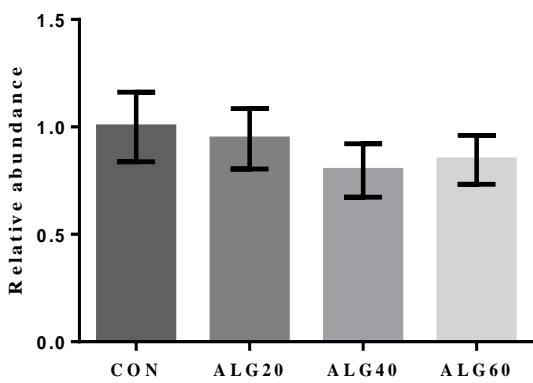
*Fibrobacter succinogenes*



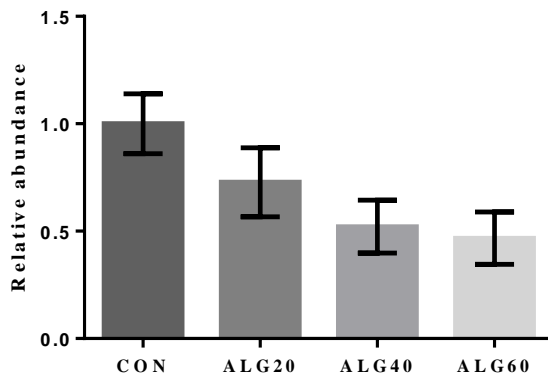
*Selenomonas ruminantium*



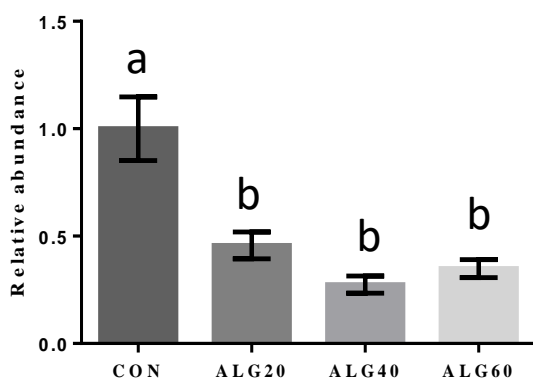
*Prevotella sp*



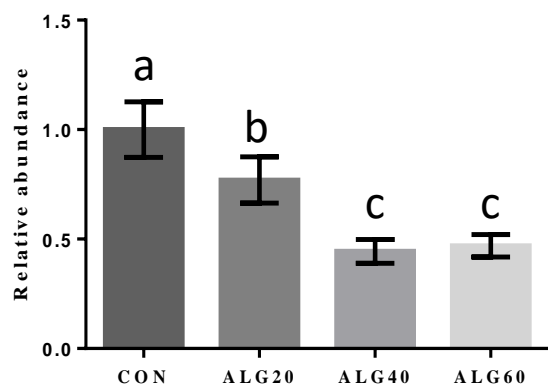
*Methanosphaera stadtmanae*

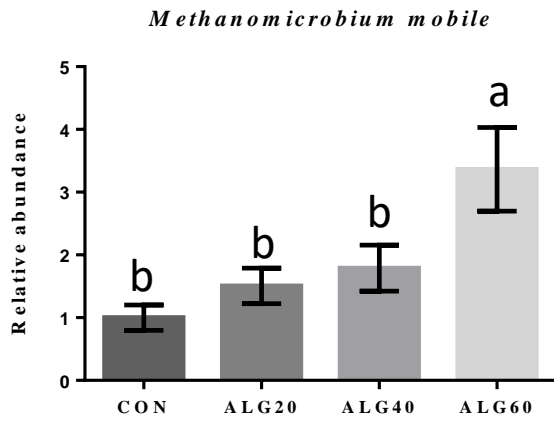


*Methanobrevibacter spp.*



*Methanobacterium formicum*





Σχήμα 5.26. Σχετική ποσότητα επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των ομάδων CON, ALG20, ALG40 και ALG60.

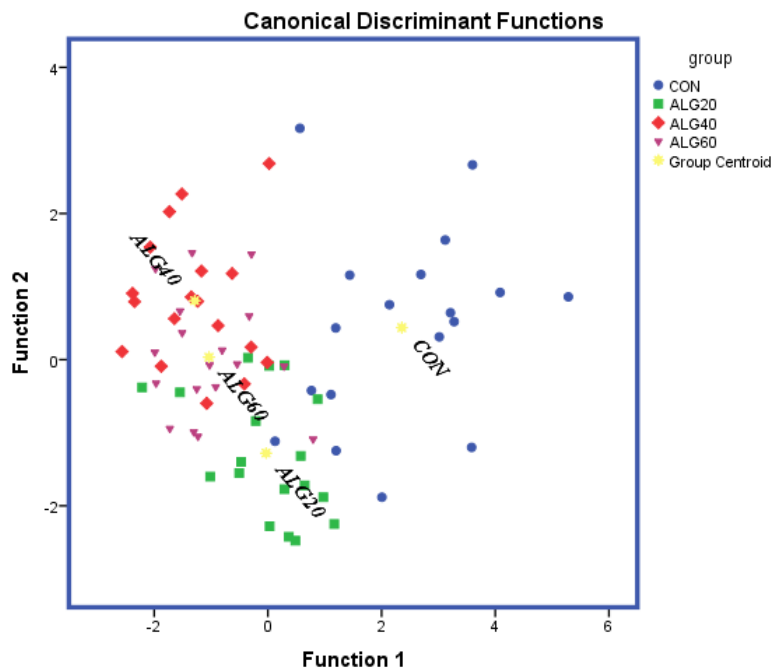
Πίνακας 5.14. Συσχέτιση κατά Pearson της συγκέντρωσης των ισομερών των  $C_{18:1}$  και του στεατικού οξέος με τον πληθυσμό των *Butyrivibrio fibrisolvens* και *proteoclasticus*.

	$C_{18:0}$	$C_{18:1 trans}$	VA	<i>trans-10 C</i> <sub>18:1</sub>	<i>cis-9 C</i> <sub>18:1</sub>	LA	ALNA	CLA	DPA	DHA	<i>B. fibrisolvens</i>
$C_{18:0}$	1										
$C_{18:1 trans}$	-,333**	1									
VA	-,896**	,321**	1								
<i>trans-10 C</i> <sub>18:1</sub>	-,756**	,623**	,763**	1							
<i>cis-9 C</i> <sub>18:1</sub>	-,099	,104	,056	-,036	1						
LA	,452**	-,105	-,589**	-,420**	,260*	1					
ALNA	,181	,055	-,387**	-,128	-,109	,773**	1				
CLA	-,097	-,130	,003	-,049	,436**	,139	,066	1			
DPA	-,759**	,046	,574**	,461**	-,428**	-,438**	-,036	-,104	1		
DHA	-,702**	-,003	,558**	,392**	-,433**	-,578**	-,251*	-,110	,957**	1	
<i>B. fibrisolvens</i>	,313**	,000	-,356**	-,286*	,002	,108	,065	-,200	-,218	-,186	1
<i>B. proteoclasticus</i>	,332**	-,055	-,310**	-,238*	,085	,156	,006	-,073	-,360**	-,335**	,445**

\*: Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο 0,05

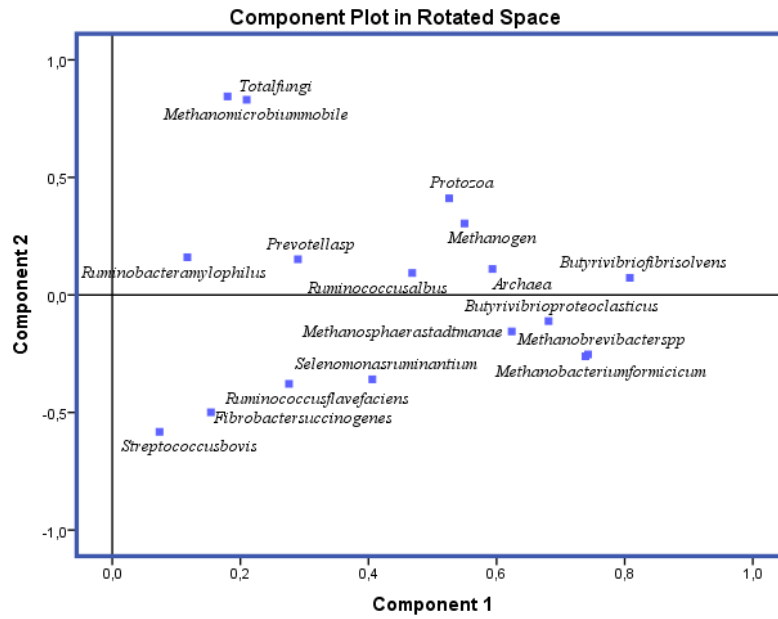
\*\* : Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο 0,01.

Επιπλέον, στα αποτελέσματα των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας (Σχήμα 5.27) εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις. Δεκαεπτά μεταβλητές εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα εβδομήντα-δύο δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 75%. Η σχετική αφθονία των *Methanobrevibacter spp.*, των *Methanobacterium formicicum*, των *Ruminococcus flavefaciens*, των *Butyrivibrio proteoclasticus*, των *Methanosphaera stadtmanae* και των *Ruminococcus albus* ήταν αυτή που συνεισέφερε περισσότερο στο διαχωρισμό. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική ( $P < 0,001$ ), με τιμή Wilks' lambda 0,136 για το Function 1 και τιμή Wilks' lambda 0,434 ( $P = 0,020$ ) για το Function 2.



Σχήμα 5.27. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60) σύμφωνα με τη σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας.

Επίσης, στα αποτελέσματα των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική αφθονία των επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας (Σχήμα 5.28). Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες συνεισέφεραν κατά 40,98% ενώ το κριτήριο KMO παρατηρήθηκε στα 0,638.



Σχήμα 5.28. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τη σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, ALG20, ALG40 και ALG60).

## 6. Σχολιασμός αποτελεσμάτων 1<sup>ου</sup> πειράματος

### 6.1. Σωματικό βάρος αιγών

Οι διατροφικές επεμβάσεις δεν επηρέασαν το βάρος των αιγών, ωστόσο παρατηρήθηκε εναπόθεση βάρους όλων των ζώων κατά τη διάρκεια του πειραματισμού. Η αύξηση αυτή του σωματικού βάρους συνδέεται κατά κύριο λόγο με τη μείωση της γαλακτοπαραγωγής και το πλεόνασμα ενέργειας των σιτηρεσίων που εναποτέθηκε σε σωματικό βάρος.

### 6.2. Κατανάλωση τροφής

Στην ομάδα ALG60 παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της κατανάλωσης της ξηράς ουσίας των συμπυκνωμένων ζωοτροφών (Πίνακας 5.2). Απόρροια αυτού ήταν η μειωμένη πρόσληψη του μικροφύκου από τα 60 στα 40 g/ημέρα/ζώο. Ωστόσο, παρά τη μείωση της κατανάλωσης της τροφής στην ομάδα αυτή, δεν παρατηρήθηκε μείωση του σωματικού βάρους των αιγών (Πίνακας 5.1), όπως δεν επηρεάστηκε και το ύψος της γαλακτοπαραγωγής (Πίνακας 5.3). Όσον αφορά την κατανάλωση της τροφής, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με αυτά των Papadopoulos *et al.* (2002) στην εργασία των οποίων παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της κατανάλωσης ξηράς ουσίας κατά 27,4%, ορίζοντας ως μέγιστη ποσότητα τα 47 g/προβατίνα/ημέρα με τη συμπλήρωση ανάλογου σκευάσματος με την παρούσα μελέτη. Η μείωση αυτή της κατανάλωσης της τροφής αποδίδεται στη μειωμένη ελκυστικότητα του σιτηρεσίου λόγω της έντονης οσμής του σε υψηλό ποσοστό ενσωμάτωσης μικροφυκών.

### 6.3. Ημερήσια παραγωγή γάλακτος και χημική σύσταση

Η ημερήσια παραγωγή γάλακτος καθώς και η διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα (4%) γαλακτοπαραγωγή δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων συμπεριλαμβανομένης και της ομάδας ALG60 όπου τα ζώα κατανάλωναν μειωμένη ποσότητα Ξ.Ο. (Πίνακας 5.3). Τα αποτελέσματα αυτά της παρούσας μελέτης βρίσκονται στην ίδια κατεύθυνση με αυτά των Bichi *et al.* (2013), Toral *et al.* (2010) και Papadopoulos *et al.* (2002) στα πειράματα των οποίων το σιτηρέσιο γαλακτοπαραγωγών προβατινών συμπληρώθηκε με το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* Η λιποπεριεκτικότητα μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες με την υψηλή συμμετοχή του μικροφύκου σε σχέση με τις ομάδες CON και ALG20 ενώ η

περιεκτικότητα του γάλακτος σε πρωτεΐνη δεν διέφερε σημαντικά. Η μείωση αυτή της λιποπεριεκτικότητας του παραγόμενου γάλακτος πιθανότατα συνδέεται με την τοξική επίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, και συγκεκριμένα του εικοσαδυεξανοϊκού (DHA, C<sub>22:6 n-3</sub>) και εικοσαδυπεντανοϊκού (DPA, C<sub>22:5 n-6</sub>) τα οποία περιέχονται στο *Schizochytrium* sp., στους μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας (Toral *et al.*, 2017). Αυτά τα υπερ-μακράς αλύσου πολυακόρεστα λιπαρά οξέα δύναται να αναστέλλουν τη λειτουργία των βακτηρίων που παράγουν οξικό οξύ προκαλώντας μεταβολές στη *de novo* λιπογένεση (Urrutia και Harvatine 2017). Επιπροσθέτως, η ενδεχόμενη αναστολή της βιοϋδρογόνωσης των ακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε στεατικό οξύ (στα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων παραπάνω αναφέρθηκε μείωση του στεατικού και αύξηση των ακόρεστων πρόδρομων ισομερών του) μείωσε τη διαθεσιμότητα της Δ<sup>-9</sup> αφυδρογονάσης για την ενδογενή παραγωγή του ελαϊκού οξέος (*cis*-9 C<sub>18:1</sub>) στο μαστικό αδένα. Η μείωση αυτή του ελαϊκού οξέος στο παραγόμενο γάλα των αιγών στο σιτηρέσιο των οποίων ενσωματώθηκε το μικροφύκος *Schizochytrium* sp. έχει μεγάλη φυσιολογική σημασία, καθώς οι ιδιότητες του ελαϊκού οξέος σχετίζονται με τη ροή των λιποσφαιρίων στο μαστικό αδένα και έτσι καθορίζουν την έκκριση του λίπους στο γάλα (Bichi *et al.* 2013). Επιπλέον, η αύξηση του C<sub>18:2 n0, c12</sub> συζευγμένου λινελαϊκού οξέος στο γάλα των επεμβάσεων (Πίνακας 5.6) πιθανότατα έπαιξε ένα σημαντικό ρόλο στη μείωση της λιποπεριεκτικότητας στις ομάδες ALG40 και ALG60 καθώς θεωρείται ο μεγαλύτερος ανασταλτικός παράγοντας της λιπογένεσης στο μαστικό αδένα (Glasser *et al.*, 2010). Ωστόσο, οι Carreno *et al.* (2016) και οι Toral *et al.* (2010, 2016) αναφέρουν ότι το σύνδρομο της πτώσης της λιποπεριεκτικότητας (MFD) στις προβατίνες συνήθως συνοδεύεται με μια μικρή πτώση της λιποπεριεκτικότητας (5-7%), ενώ στις αγελάδες δεν επηρεάζονται άλλα συστατικά του γάλακτος εκτός της λιποπεριεκτικότητας (Bauman *et al.*, 2011). Με βάση τα παραπάνω φαίνεται πως η αντίδραση των αιγών στο MFD προσομοιάζει με αυτή των αγελάδων. Επίσης, διαφορές μεταξύ των ειδών παρατηρούνται στο επίπεδο της ενσωμάτωσης των PUFA που προκαλούν MFD. Στη μελέτη των Bichi *et al.* (2013) αναφέρεται πως η προσθήκη 8g/Kg TMR (ή περίπου 21 g/ημέρα) προϊόντος μικροφυκών πλούσιο σε DHA στη διατροφή προβάτων προκάλεσε πτώση της λιποπεριεκτικότητας (MFD), ενώ στην παρούσα μελέτη η ημερήσια πρόσληψη 20g (ALG20) του προϊόντος DHAgold δεν επηρέασε σημαντικά τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος των αιγών. Επίσης, οι δοσολογίες αυτές, φαίνεται να έχουν μεγάλη διαφορά αν αναχθούν σε g/Kg σωματικού βάρους, όπου στην παρούσα μελέτη γινόταν

χορήγηση 0,42 g/ ημέρα/ Kg σωματικού βάρους ενώ στη μελέτη των Bichi *et al.* (2013) η ενσωμάτωση ήταν σημαντικά μικρότερη, στα 0,25 g/ ημέρα/ Kg σωματικού βάρους. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση του C<sub>18:2 t10, c12</sub>, που θεωρείται το κυρίαρχο λιπαρό οξύ με ανασταλτικές στη λιπογένεση ιδιότητες, προσδιορίστηκε στα 0,18, 0,19, και 0,18 % των ολικών λιπαρών οξέων για τις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι περίπου 4,5 φορές υψηλότερες (διορθωμένες ως προς τη λιποπεριεκτικότητα) σε σχέση με αυτές της μελέτης των Carreno *et al.* (2016) όπου το MFD προκλήθηκε με τη συμπλήρωση του σιτηρεσίου προβατινών με ιχθυέλαιο, ενώ στην παρούσα μελέτη, πάρα τις πολύ υψηλότερες τιμές του C<sub>18:2 t10, c12</sub> στην ομάδα ALG20, η λιποπεριεκτικότητα δεν επηρεάστηκε. Ωστόσο, στις ομάδες ALG40 και ALG60 παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της λιποπεριεκτικότητας, πάρα το γεγονός ότι η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων με ανασταλτικές στη λιπογένεση ιδιότητες (C<sub>18:2 t10, c12</sub> και *trans-10* C<sub>18:1</sub>) δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων αυτών και της ομάδας ALG20. Στον αντίποδα, η συγκέντρωση του ελαϊκού οξέος μειώθηκε κλιμακωτά μεταξύ της ομάδας του μάρτυρα και των τριών διατροφικών επεμβάσεων, και στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των ομάδων ALG20 και ALG60. Αυτές οι ενδείξεις φαίνεται να ενισχύουν την υπόθεση που περιγράφεται από τους Bichi *et al.* (2013) σχετικά με την ιδιότητα του ελαϊκού οξέος να ρυθμίζει την έκκριση των λιποσφαιρίων στο μαστικό αδέν, και ίσως αναδεικνύεται άλλη μια διαφορά μεταξύ των ειδών (προβάτων-αιγών). Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση των αντι-λιπογενητικών λιπαρών οξέων μένει σταθερή μεταξύ των επεμβάσεων των μικροφυκών (C<sub>18:2 t10, c12</sub> και *trans-10* C<sub>18:1</sub>) ενώ η λιποπεριεκτικότητα μειώνεται, οπότε συμπεραίνουμε πως η πτώση αυτή, πιθανόν να οφείλεται στην επίδραση του ελαϊκού οξέος στο μαστικό αδέν και ειδικότερα στη μείωσή του που σχετίζεται με την αύξηση του σημείου τήξης του λίπους στο μαστικό αδέν. Στη μελέτη των Toral *et al.* (2016) παρατηρήθηκε πως ο μαστός των προβατινών παρουσιάζει υψηλής προσαρμοστικότητας μηχανισμούς ώστε να αντιμετωπίζει προβλήματα ρευστότητας του λίπους από τα εκκριτικά κύτταρα χωρίς να παρατηρείται μείωση της λιποπεριεκτικότητας. Συμπερασματικά, ο μαστός των αιγών με βάση τα προαναφερθέντα, δείχνει να είναι πιο επιρρεπείς στην επίδραση του ελαϊκού οξέος σε σχέση με αυτόν των προβατινών. Ωστόσο, ενδέχεται η μείωση της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος στις ομάδες με την υψηλή ενσωμάτωση του μικροφύκους, να συνδέεται με εναλλαγές της συγκέντρωσης λιπαρών οξέων με ανασταλτικές στη λιπογένεση ιδιότητες που δεν ανιχνεύτηκαν στην παρούσα μελέτη (Toral *et al.*, 2016).



Η ανάλυση κατά Pearson μεταξύ του στεατικού οξέος και των μονοακόρεστων και πολυακόρεστων ισομερών του και της λιποπεριεκτικότητας (Πίνακα 5.7), επιβεβαιώνει στο ακέραιο τις παραπάνω υποθέσεις για τη μείωση της λιποπεριεκτικότητας καθώς το ελαϊκό και στεατικό οξύ συσχετίζονται θετικά και σημαντικά ( $P < 0,01$ ) με τη λιποπεριεκτικότητα, ενώ το βασσενικό οξύ, το ισομερές *trans-10* C<sub>18:1</sub> (με επίσης ανασταλτικές στη λιπογένεση ιδιότητες) και τα ισομερή του συζευγμένου λεναλαϊκού οξέος συσχετίζονται αρνητικά με αυτήν.

Όσον αφορά την πρωτεϊνοπεριεκτικότητα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τους πειραματισμούς των Bichi *et al.*, (2013) σε προβατίνες και των Franklin *et al.*, (1999) σε αγελάδες όπου η κατανάλωση του μικροφύκου *Schizochytrium* sp. μείωσε σημαντικά τη λιποπεριεκτικότητα ενώ δεν επηρέασε την πρωτεϊνοπεριεκτικότητα.

Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε λακτόζη μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG40 σε σχέση με αυτήν της ομάδας CON και ALG20. Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε λακτόζη εμφανίζει μικρή πλαστικότητα μεταξύ διαφόρων διατροφικών επεμβάσεων, ωστόσο, η μείωση της λακτόζης στο γάλα το οποίο τα μηρυκαστικά κατανάλωναν το μικροφύκος *Schizochytrium* sp. έχει παρατηρηθεί από τους Papadopoulos *et al.* (2002) και Reynolds *et al.* (2006) σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες και από τους Boeckeaert *et al.* (2008a) σε αγελάδες χωρίς όμως να έχει δοθεί κάποια εξήγηση για το μεταβολικό μονοπάτι. Σύμφωνα με τους Bequette και Nelson (2006) μια σημαντική ποσότητα λακτόζης στο γάλα παράγεται *de novo* στο μαστικό αδέννα από την εξονογένεση (hexoneogenesis) από γλυκερόλη και από αμινοξέα τα οποία «δωρίζουν» τον ανθρακικό σκελετό  $3^{ov}$  με 5 ατόμων άνθρακος. Παράλληλα, στην ομάδα ALG40 που παρατηρήθηκε η μείωση της λακτόζης, η πρωτεΐνη παρουσίασε μια τάση αύξησης ( $p < 0,10$ ). Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, η ενσωμάτωση του μικροφύκου στο σιτηρέσιο ίσως προκάλεσε κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των μηχανισμών σύνθεσης των αμινοξέων για παραγωγή πρωτεΐνης και την προσφορά του ανθρακικού σκελετού για *de novo* εξονογένεση λακτόζης. Ωστόσο, η παραπάνω ερμηνεία αποτελεί μια υπόθεση και χρειάζονται περισσότερες μελέτες ώστε να επιβεβαιωθεί.

## 6.4. Προφίλ λιπαρών οξέων

### 6.4.1. Προφίλ λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας

Το μυριστικό οξύ ( $C_{14:0}$ ) αυξήθηκε σημαντικά, κλιμακωτά μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων καθώς και σε σχέση με αυτό στο υγρό των αιγών της ομάδας CON λόγω της μεγαλύτερης ημερήσια πρόσληψης του από το σιτηρέσιο. Το πενταδεκανοϊκό οξύ ( $C_{15:0}$ ) αποτελεί προϊόν της μικροβιακής πέψης, και οποιαδήποτε τροποποίηση στη συγκέντρωσή του οφείλεται σε εναλλαγές του πληθυσμού συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Διατροφικές επεμβάσεις με αύξηση των συμπυκνωμένων ζωοτροφών οδηγούν σε μείωση των κυτταρολυτικών βακτηρίων και μείωση των μονής και διακλαδισμένης αλύσου λιπαρών οξέων ( $C_{15:0}$ ) (Nepsen *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2017). Το παλμιτικό οξύ ( $C_{16:0}$ ) αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα των 20 g του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στο υγρό της M.K. των αιγών της ομάδας CON ενώ δεν επηρεάστηκε στις άλλες διατροφικές επεμβάσεις πάρα το γεγονός ότι το προαναφερθέν λιπαρό οξύ έβαινε αυξανόμενο στα πειραματικά σιτηρέσια. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να συνδέεται με τυχόν αποδόμηση του εν λόγω λιπαρού οξέος σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα μηρυκαστικά (Wu *et al.*, 1991). Το παλμιτολεϊκό οξύ ( $C_{16:1}$ ) αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20 και ALG60 σε σχέση με αυτό στο υγρό της M.K. των αιγών της ομάδας CON λόγω πιθανής διαφυγής του από τη βιοϋδρογόνωση (Chalupa *et al.*, 2001). Το στεατικό οξύ ( $C_{18:0}$ ) μειώθηκε ενώ το βασσενικό οξύ (*trans-11*  $C_{18:1}$ ) αυξήθηκε στις ομάδες προσθήκης των μικροφυκών σε σχέση με την ομάδα CON. Στη μελέτη των Boeckaert *et al.* (2008) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του στεατικού οξέος και αύξηση του βασσενικού και των συνολικών *trans*- $C_{18:1}$  στο υγρό της μεγάλης κοιλίας αγελάδων στο σιτηρέσιο των οποίων είχε ενσωματωθεί το DHAgold<sup>TM</sup>. Αυτές οι διαφοροποιήσεις στο προφίλ των λιπαρών οξέων αντικατοπτρίζουν αλλαγές στα ζυμωτικά φαινόμενα της μεγάλης κοιλίας από την επίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στη βιοϋδρογόνωση. Οι Jenkins *et al.* (2008) αναφέρουν πως τα βακτήρια που εμπλέκονται στη βιοϋδρογόνωση των *trans*- $C_{18:1}$  σε στεατικό οξύ είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, με αποτέλεσμα την αναστολή της βιοϋδρογόνωσης των  $C_{18:1}$  σε στεατικό, μειώνοντας τη συγκέντρωσή του. Το ενδιάμεσο προϊόν της βιοϋδρογόνωσης *trans 10*  $C_{18:1}$  αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG20 σε σχέση με τις άλλες διατροφικές επεμβάσεις, καθώς και στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η σημαντική

αυτή αύξηση του *trans 10* C<sub>18:1</sub> σχετίζεται είτε με τον ισομερισμό του ελαϊκού ή/και του βασσενικού οξέος είτε με την βιοϋδρογόνωση του C<sub>18:2 t10, c12</sub> (Boeckeaert *et al.*, 2008). Το ελαϊκό οξύ αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG20 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα του ελαϊκού οξέος βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά των Boeckeaert *et al.* (2008) με την ενσωμάτωση του μικροφύκους *Schizochytrium sp* στο σιτηρέσιο αγελάδων. Το λινελαϊκό οξύ μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα λόγω της μειωμένης πρόσληψής του από το σιτηρέσιο. Η μείωση αυτή οφείλεται στη μειωμένη πρόσληψη του λινελαϊκού από την τροφή καθώς η ενσωμάτωση του μικροφύκους στο σιτηρέσιο των αιγών έγινε εις βάρος του μείγματος των συμπυκνωμένων ζωοτροφών που είναι πλούσιο σε λινελαϊκό οξύ. Τέλος, το εικοσαδυπεντανοϊκό και εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ αυξήθηκαν σημαντικά, κλιμακωτά στις ομάδες που έγινε ενσωμάτωση του πλούσιου στα προαναφερθέντα λιπαρά οξέα μικροφύκους (Πίνακας 5.1).

Επιπλέον παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση του στεατικού, του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος σε σχέση με τα *trans 10* C<sub>18:1</sub> και βασσενικό οξύ (Σχήμα 2), γεγονός που επιβεβαιώνει τις τροποποιήσεις των διατροφικών επεμβάσεων στη λειτουργία της βιοϋδρογόνωσης (Πίνακας 5.7).

#### 6.4.2. Προφίλ λιπαρών οξέων πλάσματος αίματος

Το μυριστικό οξύ (C<sub>14:0</sub>) αυξήθηκε στις ομάδες υψηλής συμμετοχής του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στο αίμα των αιγών των ομάδων CON και ALG20 λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης του εντός της μεγάλης κοιλίας. Το παλμιτικό οξύ (C<sub>16:0</sub>) μειώθηκε στις ομάδες υψηλής συμμετοχής του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στο αίμα των αιγών της ομάδας CON παρά το γεγονός ότι το σιτηρέσιο αυτών των ομάδων είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση παλμιτικού οξέος από την ομάδα του μάρτυρα. Σύμφωνα με τα αποξέσματα αυτά βρίσκονται τα αποτελέσματα για το παλμιτικό οξύ των Tsiplakou και Zervas (2013) όπου η συγκέντρωσή του στο πλάσμα των αιγών μειώθηκε με την προσθήκη ιχθυελαίου και σογιελαίου τα οποία είναι πλούσια σε παλμιτικό οξύ.

Η πιθανή αποδόμηση του παλμιτικού οξέος εξηγείται από τους Wu *et al.* (1991) στους πειραματισμούς των οποίων διαπιστώθηκε πως όταν οι αγελάδες διατρέφονταν με ένα συνηθισμένο σιτηρέσιο από πλευράς λιποπεριεκτικότητας, το ισοζύγιο μεταξύ της συγκέντρωσης του παλμιτικού οξέος στο δωδεκαδάκτυλο μείον τη συγκέντρωση του

παλμιτικού οξέος στην τροφή, ήταν ελάχιστες μονάδες θετικό. Αντιθέτως, όταν στη διατροφή των αγελάδων ενσωματώθηκε παλμιτικό οξύ, το προαναφερθέν ισοζύγιο έφτασε να είναι ως και 25% αρνητικό. Συμπερασματικά, προκύπτει πως η αποδόμηση του παλμιτικού οξέος στους προστομάχους των μηρυκαστικών βαίνει αυξανόμενη με τη συγκέντρωσή του στην τροφή.

Το στεατικό οξύ ( $C_{18:0}$ ) μειώθηκε σημαντικά στο αίμα των αιγών των ομάδων που έγινε ενσωμάτωση μικροφυκών σε σχέση με αυτό της ομάδας του μάρτυρα καθώς επίσης και μεταξύ της ομάδας της ελάχιστης συμμετοχής και της ομάδας του μάρτυρα. Επιπροσθέτως, το βασσενικό οξύ (*trans-11*  $C_{18:1}$ ) αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με τις ομάδες CON και ALG20, καθώς αύξηση παρατηρήθηκε και στην ομάδα ALG20 σε σχέση με την ομάδα CON. Οι τροποποιήσεις αυτές σχετίζονται άμεσα με τη μεταφορά αυτών των λιπαρών οξέων από τη μεγάλη κοιλία στο κυκλοφορικό σύστημα. Το ελαϊκό οξύ (*cis-9*  $C_{18:1}$ ) μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG20 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα καθώς και στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με τις άλλες δυο ομάδες. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά των Tsiplakou και Zervas (2013) και των AbuGhazaleh *et al.* (2002) όπου το ελαϊκό οξύ μειώθηκε σημαντικά στο πλάσμα του αίματος με την προσθήκη ιχθυελαίου και σογιελαίου στο πλάσμα του αίματος αιγών και με την προσθήκη ιχθυελαίου στο υγρό της μεγάλης κοιλίας αγελάδων αντίστοιχα. Το λινελαϊκό οξύ ( $C_{18:2\ n-6}$ ) μειώθηκε σημαντικά στις τρεις διατροφικές επεμβάσεις με την προσθήκη των μικροφυκών σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η μείωση αυτή σχετίζεται με τη μείωση του λινελαϊκού στη μεγάλη κοιλία όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Το εικοσιδιεξαενοϊκό (DHA) και εικοσιδυπενταενοϊκό (DPA) οξύ αυξήθηκαν σημαντικά στις ομάδες των αιγών των οποίων το σιτηρέσιο συμπληρώθηκε με μικροφύκη λόγω της λήψης αυτών των λιπαρών οξέων με την τροφή.

Τέλος, το διομο- $\alpha$ -λινολινικό οξύ ( $C_{20:3\ n-3}$ ) και το εικοσιδυενοϊκό οξύ ( $C_{22:2\ n-6}$ ) αυξήθηκαν στο αίμα των αιγών των τριών διατροφικών επεμβάσεων σε σχέση με αυτό της ομάδας του μάρτυρα. Τα λιπαρά αυτά οξέα δεν είχαν υψηλή συγκέντρωση στις χορηγούμενες ζωοτροφές και η βιβλιογραφία είναι ελλιπής στο θέμα αυτό. Γνωρίζοντας πως η υποβάθμιση των λιπαρών οξέων στη μεγάλη κοιλία γίνεται κατά κύριο λόγο από λιπαρά οξέα με περισσότερα άτομα άνθρακα και με διπλούς δεσμούς σε μικρότερου μήκους ανθρακική αλυσίδα και διπλών δεσμών λιπαρά οξέα χωρίς να αλλάζει όμως θέση ο  $\omega$  δεσμός πιθανόν, το  $C_{20:3\ n-3}$  να αποτελεί αποδομηθέν προϊόν

των C<sub>22:6 n-3</sub> λιπαρών οξέων και το C<sub>22:2 n-6</sub> να προέρχεται από τη βακτηριακή αποδόμηση των C<sub>22:5 n-6</sub> του μικροφύκου.

### 6.4.3. Προφίλ λιπαρών οξέων γάλακτος

Τα μικρής αλύσου λιπαρά οξέα (SCFA) δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη του μικροφύκου στο σιτηρέσιο των αιγών. Το αποτέλεσμα αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος, καθώς τα λιπαρά οξέα C<sub>4:0</sub>, C<sub>6:0</sub>, C<sub>8:0</sub> και C<sub>10:0</sub> σχετίζονται θετικά με την παραδοσιακή γεύση του αιγείου γάλακτος (Tsiplakou *et al.*, 2013). Σε συμφωνία βρίσκονται τα αποτελέσματα των Boeckeaert *et al.* (2008a) και των Bichi *et al.*, (2013) με την προσθήκη του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* στο σιτηρέσιο αγελάδων και προβατινών αντίστοιχα.

Τα μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα (MCFA) αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά στο γάλα των αιγών των οποίων το σιτηρέσιο συμπληρώθηκε με το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* σε σχέση με αυτό της ομάδας του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά στο γάλα των πειραματισμών των Franklin *et al.* (1999) και των Papadopoulos *et al.* (2002) με την ενσωμάτωση του ίδιου μικροφύκου σε αγελάδες και γαλακτοπαραγωγά πρόβατα αντίστοιχα. Το παλμιτικό οξύ αποτελεί το κυρίαρχο λιπαρό οξύ στα μεσαίας αλύσου και φτάνει στο μαστικό αδέννα εν μέρη από το αίμα. Ωστόσο, όπως παρατηρήθηκε παραπάνω, το παλμιτικό οξύ μειώθηκε σημαντικά στο πλάσμα του αίματος των αιγών που κατανάλωναν το πλούσιο σε λιπαρά σκεύασμα, ενώ στο γάλα αυξήθηκε σημαντικά. Συμπερασματικά, το μεγαλύτερο ποσοστό του παλμιτικού οξέος του γάλακτος των αιγών των τριών διατροφικών επεμβάσεων, προέρχεται από τη *de novo* σύνθεσή του στο μαστικό αδέννα. Αντιθέτως, το στεατικό οξύ και όλα τα λιπαρά οξέα με μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα των 18 ατόμων άνθρακος του γάλακτος προέρχονται από τα λιπαρά οξέα του αίματος που εισέρχονται στο μαστό. Όπως παρατηρήθηκε και σχολιάστηκε παραπάνω, το στεατικό οξύ μειώθηκε σημαντικά στο αίμα, με αποτέλεσμα στο μαστό των ζώων των ομάδων ALG20, ALG40 και ALG60 να έχει μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με αυτήν της ομάδας του μάρτυρα. Επιπλέον, τα μεσαίας και μακράς αλύσου λιπαρά οξέα (LCFA) στο μαστικό αδέννα βρίσκονται σε ένα συνεχή ανταγωνισμό για εστεροποίηση (Hansen & Knudsen, 1987). Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, η μειωμένη συγκέντρωση του στεατικού οξέος που εισήχθη στο μαστό από το αίμα, έδωσε πλεονέκτημα στη *de novo* σύνθεση του παλμιτικού οξέος με αποτέλεσμα την αύξησή

του στο γάλα των ομάδων ALG20, ALG40 και ALG60. Όσον αφορά το στεατικό οξύ και τη μείωσή του στο γάλα των αιγών των οποίων το σιτηρέσιο συμπληρώθηκε με το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*, ο μηχανισμός οφείλεται σε διαδικασίες που έλαβαν χώρα πριν από το μαστό και αναλύθηκαν προηγουμένως. Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία αυτά των άλλων εργασιών που διερεύνησαν το προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος σε πρόβατα και αγελάδες με την διατροφική ενσωμάτωση μικροφυκών πλούσιων σε PUFA (Reynolds *et al.*, 2006; Franklin *et al.*, 1999; Papadopoulos *et al.*, 2002; Bichi *et al.*, 2013; Boeckeaert *et al.*, 2008a).

Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) μειώθηκαν στο γάλα των ομάδων που κατανάλωναν τα 40 g του μικροφύκου ημερησίως σε σχέση με αυτό της ομάδας του μάρτυρα, ενώ δεν επηρεάστηκαν για την ομάδα της χαμηλής ενσωμάτωσης του μικροφύκου, ALG20. Τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα των ομαδοποιημένων μονοακόρεστων είναι τα *trans*-C<sub>18:1</sub> και το ελαϊκό οξύ. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η αναστολή της βιοϋδρογόνωσης των πολυακόρεστων σε στεατικό οξύ αύξησε τα ενδιάμεσα προϊόντα όπως τα *trans*-C<sub>18:1</sub> τα οποία εισήλθαν στην κυκλοφορία του αίματος και έπειτα στο μαστό. Στον αντίποδα, στο μαστικό αδένω των αιγών των ομάδων ALG40 και ALG60 παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένη συγκέντρωση ελαϊκού αλλά και στεατικού το οποίο χρησιμοποιείται από τη Δ<sup>-9</sup> αφυδρογονάση για την ενδογενή παραγωγή ελαϊκού στο μαστικό αδένω. Επιπλέον, πέρα της μικρότερης διαθεσιμότητας υποστρώματος (στεατικό οξύ) της Δ<sup>-9</sup> αφυδρογονάσης για παραγωγή ελαϊκού οξέος, πιθανόν η δραστηριότητα του ενζύμου αυτού να επηρεάστηκε από την υψηλή συγκέντρωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που δρουν ανασταλτικά στην ενεργότητά του (Clarke και Jump 1994). Ωστόσο, η μείωση του ελαϊκού οξέος στο γάλα των ομάδων ALG40 και ALG60 ήταν μεγαλύτερη (ποσοστιαία) από την αύξηση του βασσενικού οξέος με αποτέλεσμα τη μείωση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) του γάλακτος αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά στις ομάδες που έγινε συμπλήρωση του σιτηρεσίου με μικροφύκη, ανεξαρτήτως επιπέδου ενσωμάτωσης. Συγκεκριμένα, το λινελαϊκό οξύ μειώθηκε σημαντικά στο γάλα των ομάδων ALG40 και ALG60 σε σχέση με αυτό των ομάδων CON και ALG20 λόγω της μείωσης του λιπαρού αυτού οξέος στο αίμα και κατ' επέκταση μεταφοράς του στο μαστό. Όπως ήταν αναμενόμενο, από πληθώρα παρόμοιων πειραματισμών, η συγκέντρωση των ισομερών του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος (C<sub>18:2c9,111</sub> και C<sub>18:2c10,12</sub>) αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες που έγινε συμπλήρωση του σιτηρεσίου με μικροφύκη ανεξαρτήτως επιπέδου ενσωμάτωσης. Η

αύξηση αυτή των CLA πιθανότατα συνδέεται με την υψηλή συγκέντρωση του βασσενικού οξέος που μεταφέρθηκε από το αίμα στο μαστό και με τη δράση του ενζύμου  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης, σχηματίστηκαν τα ισομερή των CLA (Chilliard *et al.*, 2003).

Σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε, επίσης, στο γάλα των αιγών των ομάδων ALG20, ALG40 και ALG60 σε σχέση με αυτό της ομάδας του μάρτυρα για το εικοσιδιεξαενοϊκό (DHA), το εικοσιδιπενταενοϊκό (DPA) και το διομο- $\alpha$ -λινολινικό οξύ ( $C_{20:3\ n-3}$ ) λόγω της αυξημένης διαθεσιμότητας αυτών των λιπαρών οξέων στο αίμα των αιγών. Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των DHA λιπαρών οξέων από την τροφή στο γάλα των αιγών αναφέρεται από τους Farina *et al.* (2015) να κυμαίνεται από 7% ως 8,1% με την ενσωμάτωση ιχθυελαίου, 8,4% σε αγελάδες με την ενσωμάτωση μικροφυκών στο σιτηρέσιο τους καθώς και 5% με την ίδια διατροφική ενσωμάτωση σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες. Στην παρούσα μελέτη η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς του DHA προσδιορίστηκε στο 12%, 9% και 9% για τις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά, παρουσιάζουν την επίδραση του επιπέδου ενσωμάτωσης των DHA λιπαρών οξέων στην αποτελεσματικότητα της μεταφοράς τους το γάλα, η οποία βαίνει μειούμενη με την αύξηση του ποσοστού ενσωμάτωσης. Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των DPA λιπαρών οξέων από την τροφή στο γάλα, δεν υπάρχουν διαθέσιμα, μετρήσιμα δεδομένα όσο είμαστε σε θέση να γνωρίσουμε. Ωστόσο, στη μελέτη των Toral *et al.* (2017) αναφέρεται, ότι η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των DPA λιπαρών οξέων είναι πολλαπλάσια αυτής των DHA. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, η αποτελεσματικότητα αυτή προσδιορίστηκε στα 13%, 11% και 13% στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 αντίστοιχα. Τα ποσοστά αυτά δείχνουν παρόμοια αποτελεσματικότητα μεταξύ DPA και DHA λιπαρών οξέων. Έτσι, η διαφορά αυτή μεταξύ της παρούσας μελέτης και αυτής των Toral *et al.* (2017) πιθανώς να σχετίζεται με διαφορές μεταξύ των ειδών (αίγες και πρόβατα) στην ζύμωση και μετασχηματισμό αυτών των λιπαρών οξέων στην μεγάλη κοιλιά. Φαίνεται λοιπόν ότι η αποτελεσματικότητα των DHA λιπαρών οξέων κυμαίνεται μεταξύ 5-12% εξαρτώμενη από την προέλευση αυτών των λιπαρών οξέων, το επίπεδο ενσωμάτωσης, το είδος του ζώου και τη γενικότερη σύσταση του χορηγούμενου σιτηρεσίου.

Ο αθηρωματικός δείκτης αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG60 σε σχέση με αυτόν της ομάδας του μάρτυρα λόγω της σημαντικής μείωσης των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (ελαϊκό οξύ) που παρατηρήθηκε στην ίδια ομάδα. Αντίθετα, ο θρομβωτικός

δείκτης παρουσίασε επιθυμητή μείωση από πλευράς υγείας του καταναλωτή στο γάλα των ομάδων ALG20, ALG40 και ALG60, λόγω του υπερδιπλασιασμού των  $\omega 3$  λιπαρών οξέων στις ίδιες ομάδες.

Ακόμα, όπως αναφέρθηκε και στα αποτελέσματα της γαλακτοπαραγωγής και χημικής σύστασης του γάλακτος, η στατιστική συσχέτιση κατά Pearson του στεατικού οξέος και των ισομερών μονοακόρεστων και πολυακόρεστων Λ.Ο. και της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος (Πίνακας 5.7) επιβεβαιώνει κάποιες από τις υποθέσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω όπως:

- Η μείωση του ελαϊκού οξέος από τη μικρή διαθεσιμότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης σε στεατικό.
- Η μετατροπή του βασσενικού οξέος σε συζευγμένο λινελαϊκό οξύ.

## 6.5. Αντιοξειδωτικό σύστημα

### 6.5.1. Αντιοξειδωτικό σύστημα αίματος

Στο πλάσμα του αίματος των αιγών των ομάδων της υψηλής συμμετοχής του μικροφύκου (ALG40 και ALG60) παρατηρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα για τη δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) σε σχέση με την ομάδα CON και την ομάδα ALG20. Το μικροφύκος *Schizochytrium* sp., όπως φαίνεται και στον πίνακα 5.2, εμπλούτισε το σιτηρέσιο των αντίστοιχων επεμβάσεων κυρίως με εικοσιδιεξαενοϊκό, εικοσαπεντανοϊκό και παλμιτικό οξύ. Πρόσφατα, παρατηρήθηκε πως η προσθήκη  $\omega 3$  λιπαρών οξέων ή παλμιτικού οξέος σε ανθρώπους και τρωκτικά αντίστοιχα (Dugičić *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2014), αυξάνει το σχηματισμό ανιόντων του υπεροξειδίου μέσω της αύξησης της λειτουργείας της αναπνευστικής αλύσου στα μιτοχόνδρια και κατ' επέκταση, πιθανόν αυξάνεται η δράση της SOD προκειμένου να εξουδετερώσει το παραχθέν ανιόν του υπεροξειδίου. Η SOD αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι των δραστικών ριζών οξυγόνου, προστατεύοντας το κύτταρο από τις καταστροφικές συνέπειες του ανιόντος του υπεροξειδίου (Das και Roychoudhury, 2014). Ωστόσο, η ανταπόκριση του οργανισμού των αιγών φαίνεται να συνδέεται με το επίπεδο ενσωμάτωσης του μικροφύκου στο σιτηρέσιο τους. Αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσίας παρατηρήθηκε στην καρδιά και στο ήπαρ αρουραίων στο σιτηρέσιο των οποίων προστέθηκαν 160g ιχθυέλαιο /Kg τροφής (Yuan και Kitts, 2003), ενώ τα



αποτελέσματα ήταν αντίθετα με τη προσθήκη 80g ιχθυελαίου /Kg τροφής (Yuan και Kitts, 2002).

Το ανιόν του υπεροξειδίου παράγεται από τη δράση του ενζύμου NADPH οξειδάση (NOX) (Katsuyama, 2010). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε έμμεσα η δράση της NADPH οξειδάσης με τη χρήση Native-PAGE για πρώτη φορά σε δείγματα πλάσματος αίματος. Επιπλέον, οι πληροφορίες σχετικά με την επίδραση λιπαρών οξέων και τη δράση της NADPH οξειδάσης είναι αφενός αρκετά περιορισμένες και αφετέρου όλα τα δεδομένα που είναι δημοσιευμένα αφορούν γονιδιακή έκφραση, κατι το οποίο εμπεριέχει πολλούς μετα-μεταγραφικούς παράγοντες ώστε τα αποτελέσματα να ανταποκρίνονται σε επίπεδο ενεργότητας του ενζύμου. Στην εικόνα 5.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του Native-PAGE. Συγκεκριμένα η NOX αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Οι Lambertucci *et al.* (2008) παρατήρησαν αύξηση της NOX σε κύτταρα ποντικών που είχαν επωαστεί με παλμιτικό οξύ. Επιπροσθέτως, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, η υψηλή συμμετοχή των PUFA στις ALG40 και ALG60 αύξησε τον αντιπροσωπευτικό δείκτη της λιπιδικής υπεροξειδωσης, MDA. Μια δεύτερη αλδεΐδη, υποπροϊόν της λιπιδικής υπεροξειδωσης, αποτελεί η 4-υδροξυνονεναλ (4-HNE), ένα β-ακόρεστο υδροξυαλκένιο το οποίο παράγεται αναλόγως της MDA (Massarenti *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2006). Αυτές οι δυο τοξικές αλδεΐδες παράγονται με συντελεστή συσχέτισης  $r=0.779$  (Weber *et al.*, 2013). Μελέτη από τους Manea *et al.* (2015) αναφέρει πως η υψηλή συγκέντρωση της 4-HNE σε ανθρώπινα μυϊκά κύτταρα αυξάνει τη δραστηριότητα της NOX. Με βάση τα προαναφερθέντα, είναι ασφαλής η υπόθεση ότι η αύξηση των προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης στις ομάδες με την υψηλή συμμετοχή του μικροφύκους, αύξησε τη δραστηριότητα της NOX. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται περαιτέρω με τη σημαντική αύξηση της MDA η οποία θεωρείται ο πιο ακριβής δείκτης της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Nielsen *et al.*, 1997; Grotto *et al.*, 2009) στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με τις ομάδες ALG20 και CON (πίνακας 7.). Η NOX αποτελεί ένα ένζυμο το οποίο τοποθετείται εγκάρσια της κυτταρικής μεμβράνης, αποτελούμενο από πέντε υπομονάδες: τη gp91phox και την p22phox που μαζί δημιουργούν ετεροδιμερή φλαβοκυτόχρωμα b-558 και τις κυττοσολικές πρωτεΐνες p67phox, p40phox και p47phox (Sagi και Fluhr, 2001; Selemidis *et al.*, 2008; Rastogi *et al.*, 2016). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η εικόνα του Native-PAGE που προέρχεται αποκλειστικά από τη δράση της NOX, πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη κάθε ζώνης του ακριλαμιδικού πηκτώματος του Native-PAGE που αντιπροσώπευε μια

διατροφική επέμβαση σε SDS-PAGE με σκοπό τη διερεύνηση των υπομονάδων που συγκροτούν τη NOX. Πράγματι, στην εικόνα 5.1. στην απεικόνιση του SDS-PAGE (2B) η πρώτη ορατή ζώνη, περίπου στα 48 kDa, πιθανόν αντιπροσωπεύει την κυττοσολική υπομονάδα p47phox (Rotrosen και Leto, 1990). Οι δυο επόμενες ζώνες που φαίνονται αμυδρά μεταξύ 63 kDa και 75 kDa πιθανόν αντιπροσωπεύουν την κυττοσολική υπομονάδα p67phox περίπου στα 67 kDa (Rotrosen και Leto, 1990) και την κύρια λειτουργική υπομονάδα gp91phox της οποίας η μη γλυκοσυλιωμένη υπομονάδα εμφανίζεται στα 63.5 kDa (Groemping και Rittinger, 2005).

Η SOD εξουδετερώνει το ανιόν του υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, μια ελεύθερη ριζά οξυγόνου επίσης βλαβερή για το κύτταρο αλλά λιγότερο σε σχέση με το ανιόν του υπεροξειδίου και στη συνέχεια η καταλάση (CAT) είναι το ένζυμο που εξουδετερώνει αυτό το προϊόν της SOD σε  $O_2$  (Yu, 1994). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, η δραστηριότητά της στο πλάσμα των αιγών δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά. Η αύξηση της SOD στις ομάδες ALG40 και ALG60 πιθανόν επέφερε αύξηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) στο πλάσμα του αίματος των αιγών, όπου με τη σειρά του μετατράπηκε σε ριζά υδροξυλίου ( $OH^-$ ) μέσω της αντίδρασης Fenton ( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH$ ) (Winterbourn, 1995). Η ριζά αυτή, πιθανόν έδρασε ανασταλτικά στη δράση της CAT (Pigeolet *et al.*, 1990). Σε συμφωνία βρίσκεται η μελέτη των Avramovic *et al.* (2012) στην οποία παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της SOD, ενώ η CAT ήταν ανεπηρέαστη σε κύτταρα εγκεφάλου ποντικών που διατράφηκαν με σιτηρέσιο που εμπλουτίστηκε με ιχθυέλαιο.

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px) καταλύει την εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε  $H_2O$  με την ταυτόχρονη οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (Halliwell και Chirico, 1993; Yu, 1994). Η GSH-Px παρουσίασε μια τάση αύξησης στην ομάδα ALG20 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα και τις άλλες δυο διατροφικές επεμβάσεις. Η δραστηριότητα της GSH-Px δύναται να αναστέλλεται από την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης υποπροϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσής. Οι Kinter και Roberts (1996) παρατήρησαν πως συγκεκριμένα η 4-HNE δρα ως αναστολέας της GSH-Px. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η συγκέντρωση της MDA, και κατ' επέκταση αυτή της 4-HNE, αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 ενώ δεν επηρεάστηκε στην ομάδα ALG20. Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, η τάση αύξησης στην ομάδα με τη μικρότερη ενσωμάτωση του μικροφύκου πιθανόν συνδέεται με την απουσία αναστολέων, κάτι το οποίο συνέβη στις ομάδες ALG40 και ALG60.

Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) έχει, επίσης, ένα σημαντικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού ενάντια στο οξειδωτικό στρες καθώς ανάγει συνεχώς την οξειδωμένη γλουταθειόνη σε ανηγμένη, τροφοδοτώντας συνεχώς την υπεροξειδάση και τη μεταφοράση της γλουταθειόνης με νέο υπόστρωμα (Tsiplakou *et al.*, 2017d).

Η δραστηριότητα της GR στο πλάσμα του αίματος της ομάδας ALG60 αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τις ομάδες CON και ALG20. Στην ίδια κατεύθυνση βρίσκονται τα αποτελέσματα των Tsiplakou *et al.* (2017d) με την ταυτόχρονη προσθήκη σογυλαίου και ιχθυελαίου σε πρόβατα και αίγες.

Σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στη δραστηριότητα της μεταφοράσης της γλουταθειόνης (GST) στην ομάδα ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η GST είναι υπεύθυνη για τη μεταβολική απενεργοποίηση των ηλεκτόφιλων ενώσεων συμπεριλαμβανομένων των υδρο-υπεροξειδασών (Board και Menon, 2013; Labrou *et al.*, 2015). Έτσι, τα αυξημένα επίπεδα δραστηριότητας της GST των αιγών που καταναλώναν σιτηρέσιο με υψηλή συμμετοχή του μικροφύκους, σχετίζεται με την αυξημένη συγκέντρωση της MDA στο αίμα των ζώων αυτών. Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως τα υποπροϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι κατάλληλα υποστρώματα για τη δράση της GST (Alin *et al.*, 1985). Ακόμα, σημαντική αύξηση της MDA παρατηρήθηκε από τους Wullepit *et al.* (2012) στο αίμα αγελάδων των οποίων το σιτηρέσιο συμπληρώθηκε με το ίδιο μικροφύκος. Επιπροσθέτως, σημαντική αύξηση της GST συνοδευόμενη από σημαντική αύξηση της MDA παρατηρήθηκε από τους Tsiplakou *et al.* (2017d) με την ταυτόχρονη ενσωμάτωση σογυλαίου και ιχθυελαίου στο σιτηρέσιο αιγών.

Η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP, παρουσίασε σημαντική αύξηση στο αίμα των αιγών των ομάδων ALG40 and ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να σχετίζεται με την προσπάθεια του οργανισμού να προστατευτεί από τη δράση του οξειδωτικού στρες που προκλήθηκε από την υψηλή συμμετοχή των PUFA στη διατροφή των αιγών. Η πρόκληση του οξειδωτικού στρες στις ομάδες ALG40 και ALG60 επιβεβαιώνεται με την αύξηση της δραστηριότητας της SOD και τη συγκέντρωση της MDA. Αντίθετα, στα ζώα της ομάδας ALG20 δεν παρουσιάστηκε σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανόν σχετίζονται με τη σχετικά μικρή πρόσληψη PUFA σε σχέση με τις άλλες διατροφικές επεμβάσεις. Επιπλέον, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του μικροφύκους *Schizochytrium* sp. η οποία μετρήθηκε με τη μέθοδο FRAP (2,64 mM ασκορβικού οξέος/g ΞΟ) ή με τη μέθοδο DPPH (2,38 mM

ασκορβικού οξέος/g ΞΟ και το φαινολικό του περιεχόμενο (0,92 mg γαλλικού οξέος /g ΞΟ) ίσως δείχνουν πως οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που περιέχονται στο μικροφύκος πιθανόν έπαιξαν κάποιο προστατευτικό ρόλο στον οργανισμό στη μικρότερη ενσωμάτωση του. Όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο FRAP στην εργασία των Wullepit *et al.* (2012) δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές με την προσθήκη 224 g του προϊόντος DHAgold /αγελάδα/ημέρα.

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ευρέως αναλύονται ως δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών. Η πρωτεϊνική καρβονυλίωση μπορεί να προκληθεί είτε απευθείας από τη δράση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην πρωτεϊνική αλυσίδα (Dalle-Donne *et al.*, 2003) είτε έμμεσα μέσω της ρίζας υδροξυλίου και την οξείδωση των λιπιδίων (Grimsrud *et al.*, 2008). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως τα πρωτεϊνικά καρβονύλια που σχηματίζονται από τη δράση των αλδεϋδών προϊόντων της λιπιδικής υπεροξείδωσης, απαντώνται με μεγαλύτερη συχνότητα στον οργανισμό από αυτά που σχηματίζονται από την άμεση δράση των δραστικών ριζών οξυγόνου στα αμινοξέα (Yuan *et al.*, 2007). Στην παρούσα μελέτη τα πρωτεϊνικά καρβονύλια δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την προσθήκη του μικροφύκου στη διατροφή των αιγών. Παρομοίως, στη μελέτη των Wander και Du (2000) με την ενσωμάτωση ιχθυελαίου στη διατροφή ανθρώπων και στη μελέτη των Tsiplakou *et al.* (2017) με την ταυτόχρονη προσθήκη σογιελαίου και ιχθυελαίου στη διατροφή αιγών, παρατηρήθηκε πως τα πρωτεϊνικά καρβονύλια δεν επηρεάστηκαν πάρα τη σημαντική αύξηση της MDA.

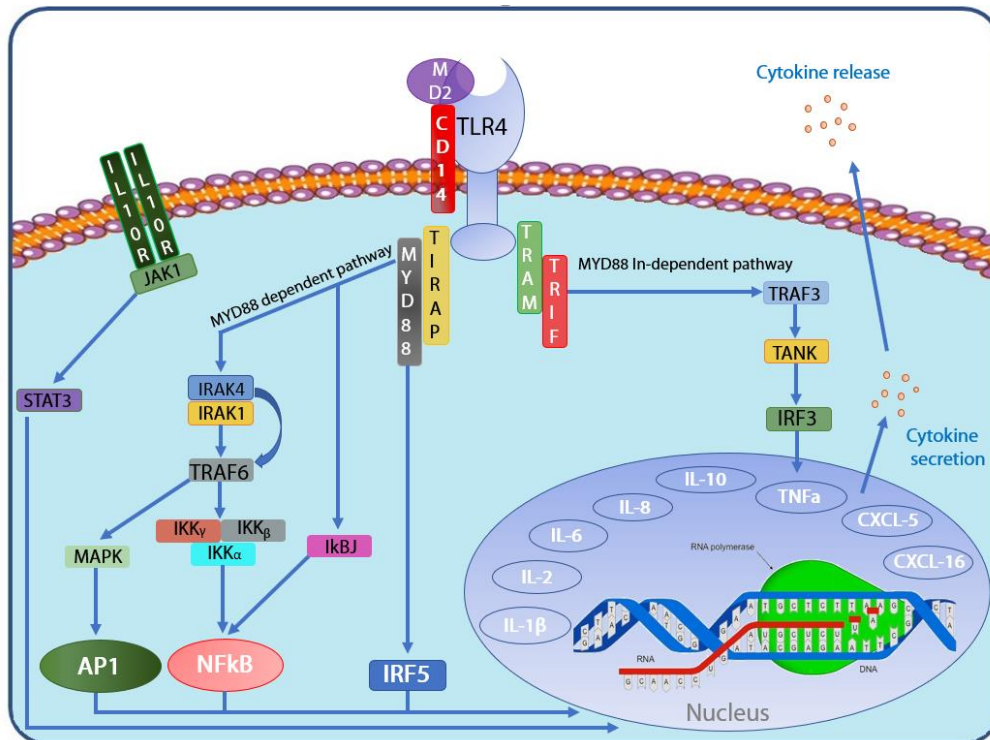
### 6.5.2. Αντιοξειδωτικό σύστημα γάλακτος

Σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στην ενεργότητα της καταλάσης, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP, καθώς επίσης και στη συγκέντρωση της MDA στο γάλα των αιγών των ομάδων ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι ο οργανισμός ενεργοποίησε έναν αμυντικό μηχανισμό στο γάλα προκειμένου να προστατευτεί από τα επιβλαβή υποπροϊόντα της οξείδωσης των PUFA, ειδικότερα στις ομάδες που η ενσωμάτωση του *Schizochytrium* sp ήταν υψηλή. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ενσωμάτωση των 20 g *Schizochytrium* sp./kg συμπυκνωμένων ζωοτροφών στη διατροφή των αιγών, αποτελούν μια ασφαλή δοσολογία για την αποφυγή τυχόν οξειδωτικής αστάθειας στο προϊόν. Σημαντική αύξηση της καταλάσης, συνοδευόμενη από αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής

ικανότητας με την μέθοδο FRAP παρατηρήθηκε από τους Tsiplakou *et al.*, (2017d) στο γάλα αιγών, στο σιτηρέσιο των οποίων είχε ενσωματωθεί σογιέλαιο και ιχθυέλαιο. Παρόμοια με το αίμα, η δεσμουτάση του υπεροξειδίου στο γάλα εξουδετερώνει το ανιόν του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και μετέπειτα η λακτουπεροξειδάση, μετατρέπει το προϊόν της SOD σε H<sub>2</sub>O (Fox and Kelly, 2005). Ωστόσο, η δραστηριότητα των ενζύμων αυτών δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μεταβολή πέρα μια τάσης αύξησης ( $P < 0,10$ ) που παρατηρήθηκε στη δραστηριότητα της LPO στην ομάδα ALG60 σε σχέση με αυτή της ομάδας του μάρτυρα. Ο μηχανισμός με τον οποίο η δραστηριότητα της SOD αυξήθηκε σημαντικά στο πλάσμα του αίματος, ενώ δεν επηρεάστηκε στο γάλα, ίσως να σχετίζεται με τις πρωτεΐνες στενού συνδέσμου και τον φραγμό αίματος-μαστού. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση ώστε να αποσαφηνιστεί κατά πόσο η αντιοξειδωτική άμυνα του γάλακτος αποτελεί έναν αυτόνομο μηχανισμό ή όχι. Επιπλέον, στη μελέτη των Tsiplakou *et al.* (2017b) η προσθήκη του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* στη διατροφή γαλακτοπαραγωγών αιγών, δεν επηρέασε τη δραστηριότητα της SOD και της LPO του γάλακτος. Τέλος, όσον αφορά την αντιοξειδωτική κατάσταση του γάλακτος, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα ενώ στο πλάσμα του αίματος δεν επηρεάστηκαν σημαντικά. Ο μηχανισμός με το οποίο ενδέχεται να συνέβη αυτή η διαφοροποίηση, έγκειται στην υψηλότερη συγκέντρωση της MDA που παρατηρήθηκε στο γάλα σε σχέση με το πλάσμα του αίματος και κατ' επέκταση και των υπολοίπων αλδεϋδών της λιπιδικής υπεροξειδάσης όπως η 4-HNE. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην αντιοξειδωτική κατάσταση του αίματος, οι αλδεϋδες αυτές οξειδώνουν τις πρωτεΐνες δημιουργώντας πρωτεϊνικά καρβονύλια. Επιπλέον, η απουσία του ενζύμου μεταφοράς της γλουταθειόνης στο γάλα (Knowles *et al.*, 1999), η οποία προσδένεται και μεταβολίζει αυτές τις αλδεϋδες (4-HNE) σχηματίζοντας GS-HNE, πιθανόν να είναι ο κυριότερος λόγος της αύξησης αυτής (Pizzimenti *et al.*, 2010).

## 6.6. Ανοσοποιητικό σύστημα

Τα αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα παρουσιάστηκαν στο Σχήμα 5.13 καθώς και στον Πίνακα 1 του Παραρτήματος. Παρακάτω στο Σχήμα 6.1 απεικονίζονται τα υπό μελέτη γονίδια καθώς και οι σχέσεις αυτών σε ανοσοποιητικά κύτταρα με σκοπό τη βαθύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων.



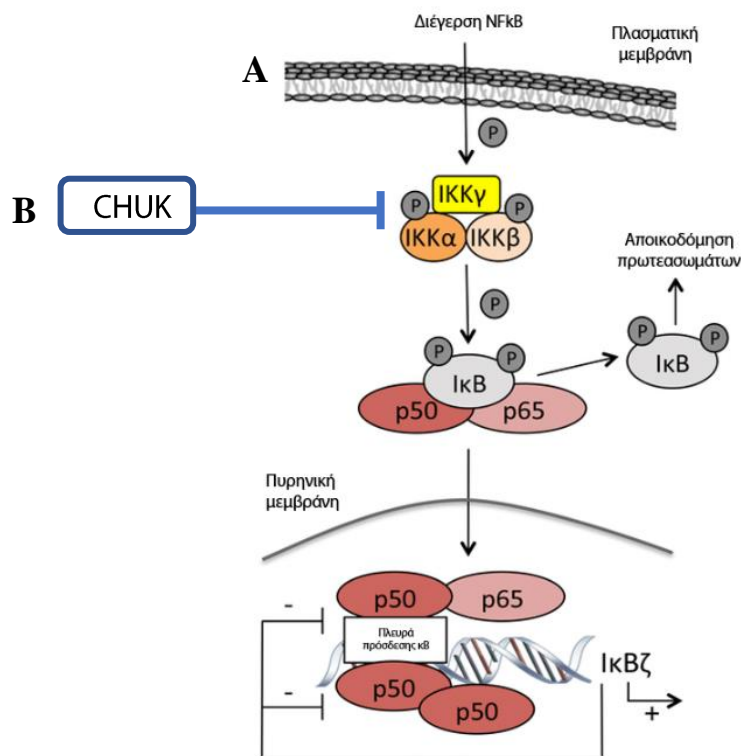
Σχήμα 6.1. Σχέσεις γονιδίων ανοσοποιητικού συστήματος για τη μεταγραφή των mRNA των προφλεγμονωδών πρωτεϊνών.

Η σχετική έκφραση των *TLR4* μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η μείωση αυτή πιθανόν συνδέεται με τον υποδοχέα συζευγμένης πρωτεΐνης G 120 (*GPR120*) η οποία αναστέλλει τη μετάδοση του σήματος των *TLR* υποδοχέων για την απάντηση προφλεγμονώδους κατάστασης μέσω της αναστολής της φωσφορυλίωσης της κινάσης *IKKβ* σε σχέση με τους *NFκB*, είτε εμποδίζει την προσκόλληση των πολυσακχαριτών (LPS) των βακτηρίων με τους *TLR4* υποδοχείς των μονοκυττάρων, παρουσία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων DHA και EPA (Oh *et al.*, 2010). Τα κύρια μονοπάτια μετάδοσης του σήματος στον πυρήνα είναι δύο: το εξαρτώμενο από τους *MYD88* και το μη εξαρτώμενο των *MYD88* (Σχήμα 6.1). Ξεκινώντας από το *MYD88* μη εξαρτώμενο και

τη μετάδοση του σήματος από τα γονίδια *TRAM/TRIF* (υποδοχέας των TIR /τομέας TIR επαγωγής της ιντερφερόνης β) στους TNF υποδοχείς 3 (*TRAF3*), παρατηρήθηκε αριθμητική μείωση της έκφρασης των *TRIF* στην ομάδα ALG40 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα, ενώ η έκφραση στην ομάδα ALG60 αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με την ομάδα ALG40. Αποτέλεσμα αυτών, ήταν η ίδια τάση των *TRIF* να μεταφερθεί στο επόμενο γονίδιο του μονοπατιού, το *TRAF3*, όπως επιβεβαιώνεται και από τα στοιχεία του Πίνακα 10 όπου παρατηρείται σημαντική θετική συσχέτιση των δύο γονιδίων. Η αύξηση της έκφρασης των *TRIF* και *TRAF3* στην ομάδα ALG60 πιθανόν να σχετίζεται με το προκληθέν οξειδωτικό στρες που κορυφώθηκε στην ομάδα αυτή όπως αναφέρθηκε παραπάνω στο κεφάλαιο 6.5.1. (Gill *et al.*, 2010). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη όπως φαίνεται στον Πίνακα 10, οι *TRIF* και *TRAF3* δεν συσχετίστηκαν θετικά με τους *TLR4* παρότι αποτελούν ένα αναπόσπαστο γονιδιακό μονοπάτι (Σχήμα 6.1). Επιπλέον, οι διαφοροποιήσεις των *TRIF* και *TRAF3* στην ομάδα ALG60 δεν προηγήθηκαν των *TLR4*. Έτσι, συμπεραίνεται ότι κάποιος άλλος διαμεμβρανικός υποδοχέας, όπως οι *TLR3*, είτε κάποιος ενδοκυττοπλασματικός που δεν διερευνήθηκε στην παρούσα μελέτη, πιθανόν να συσχετίζεται με αυτές τις διαφοροποιήσεις στους *TRIF* και *TRAF3* (Gill *et al.*, 2010). Πάρα την αύξηση στην έκφραση των *TRIF* και *TRAF3* στα μονοκύτταρα της ομάδας ALG60, η έκφραση της *IRF3* μειώθηκε στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα πάρα το διαφορετικό μοτίβο των προηγούμενων γονιδίων στο γονιδιακό αυτό μονοπάτι. Ωστόσο, η ενδιάμεση κινάση *TANK* της οποίας η έκφραση ήταν αρκετά περιορισμένη ώστε να αντληθούν σαφή συμπεράσματα μπορεί να εμπλέκεται στον τερματισμό του σήματος από το *MYD88* μη εξαρτώμενο μονοπάτι μέχρι την *TANK* και/ή τη συσχέτιση της *IRF3* με κάποιο άλλο ρυθμιστικό παράγοντα. Επιπλέον, παρά την παρόμοια τάση μεταξύ της *IRF3* και της *IFN $\gamma$* , αξίζει να αναφερθεί πως δεν παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ αυτών των γονιδίων, καθώς η *IRF3* ρυθμίζει την έκκριση της *IFN $\beta$* . Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την υπόθεση της μεγάλης εξειδίκευσης του ανοσοποιητικού συστήματος ακόμα και στη φυσική ανοσία (Eisen και Chakraborty 2010).

Όσον αφορά το πιο πολυπαραγοντικό γονιδιακό μονοπάτι, το εξαρτώμενο από τους *MYD88*, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης των *MYD88* στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα, με παρόμοιο μοτίβο με αυτό των *TLR4* και το οποίο επιβεβαιώνεται περαιτέρω από τη θετική τους συσχέτιση (Πίνακας 5.10). Η μείωση της ενεργοποίησης του σήματος από τους *TLR4*,

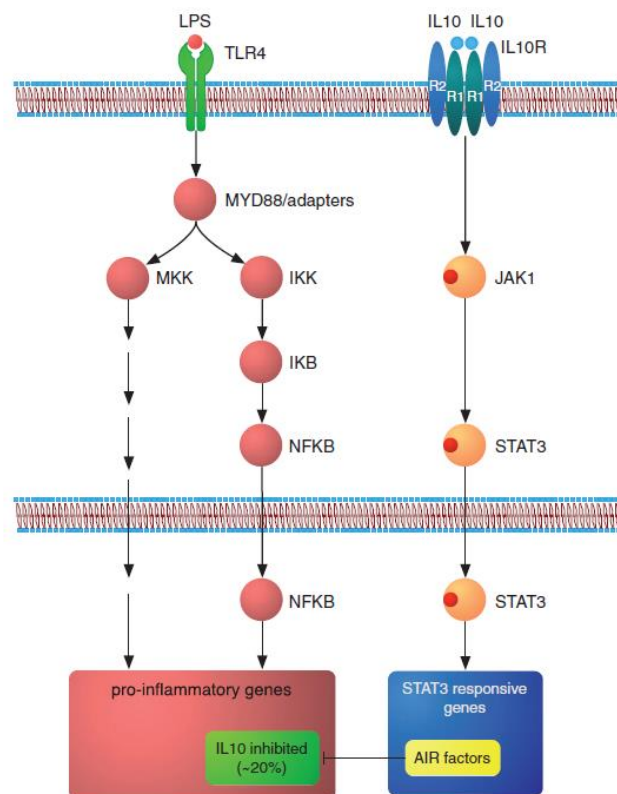
στο εξαρτώμενο από τους *MYD88* μονοπάτι με την προσθήκη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αποτελεί πλέον μια εδραιωμένη παρατήρηση (Lee *et al.*, 2009). Εν συνεχεία, οι *MYD88* ενεργοποιούν τους *IRAK4* που με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν την *IRAK1* ενεργοποιώντας τους *TRAF6* και αυτοί με τη σειρά τους ενεργοποιούν τη *MAP* κινάση και το *IKK* σύμπλεγμα με τελικό στόχο την *API* και τους *NFκB* αντίστοιχα (Σχήμα 6.1) (Youn *et al.*, 2006). Έτσι, καθώς το σήμα στους *MYD88* αφορούσε μείωση της έκφρασης αυτού του μονοπατιού στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, η έκφραση της *MAP* κινάσης, επίσης μειώθηκε σημαντικά. Ωστόσο, η έκφραση της *API* όπως μελετήθηκε από το πιο αντιπροσωπευτικό γονίδιο του οπερονίου της, το *JUND* (Srivastava *et al.*, 2013), δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων. Αντίστοιχα, η έκφραση του *NFκB* παρουσίασε τάση μείωσης ( $P=0,078$ ) (Παράρτημα Πίνακας 1.) στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Ωστόσο, φαίνεται η μείωση αυτή να συνδέεται με μειωμένη έκφραση πρόδρομων γονιδίων όπως τα *IRAK* και οι *TRAF6* καθώς η έκφραση του αναστολέα της *IKKα* κινάσης (*CHUK*) μειώθηκε, επίσης, σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα, αποτέλεσμα που δείχνει ότι η μείωση του *NFκB* δεν σχετίζεται με εμβόλιμη αναστολή στο γονιδιακό αυτό μονοπάτι (Σχήμα 6.2 B) αλλά με μια σαφή μετάδοση σήματος από τους υποδοχείς της μεμβράνης μέχρι το μεταγραφικό παράγοντα πριν μεταδώσει αυτό το σήμα στον πυρήνα.





Εικόνα 6.2. Απεικόνιση Α) αποικοδόμησης *IκB* για την ενεργοποίηση και μεταγωγή του σήματος του *NFκB* εντός του πυρήνα και Β) αναστολή της κινάσης *IKKα* από το *CHUK*.

Ένα ακόμα σημαντικό γονιδιακό μονοπάτι αποτελεί το *STAT3/JAK1 / IL-10*, το οποίο είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση της αντιφλεγμονώδους λειτουργίας, και δεν μπορεί να αντικατασταθεί από κανένα άλλο μεταγραφικό παράγοντα ή κυτοκίνη (Hutchins *et al.*, 2013) (Εικόνα 6.3).



Εικόνα 6.3. Αναστολή του προφλεγμονώδους σήματος από τους *TLR4* από το μονοπάτι *STAT3/IL-10* (Hutchins *et al.*, 2013).

Η έκφραση της *STAT3* μειώθηκε αριθμητικά σε όλες τις διατροφικές επεμβάσεις σε σχέση με αυτήν στην ομάδα του μάρτυρα. Ωστόσο η μείωση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο στην ομάδα ALG40. Η έκφραση της *IL10* δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Καθώς η έκφραση της *IL10* ρυθμίζεται αποκλειστικά από το προαναφερθέν μονοπάτι (Hutchins *et al.*, 2013), οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην *STAT3* και δεν επηρέασαν αντιστοίχως την *IL10*, πιθανόν σχετίζονται με μετα-μεταγραφικούς παράγοντες όπως τυχόν αναστολή της φωσφορυλίωσης της συνδεθείσας πρωτεΐνης. Το

αποτέλεσμα αυτό, αποτελεί πλεονέκτημα των διατροφικών επεμβάσεων που εφαρμόστηκαν, καθώς μείωση της *IL10* θα μπορούσε να οδηγήσει ακόμα και στην ανοσοκαταστολή (Taylor *et al.*, 2006).

Μετά τους ρυθμιστικούς παράγοντες του κυττοπλάσματος και τα γονίδια που ελέγχουν τη λειτουργία τους, ακολουθούν τα αποτελέσματα της μετάδοσης αυτών των σημάτων στην έκφραση κυτοκινών και χημειοκινών. Η μείωση της έκφρασης της *IFN $\gamma$*  στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα των διατροφικών επεμβάσεων των μικροφυκών καθώς η αυξημένη παραγωγή της κυτοκίνης αυτής σχετίζεται αφενός με την εκδήλωση της φλεγμονής και δευτερευόντως με την αναστολή της σύνθεσης ποικίλων δομικών συστατικών όπως το κολλαγόνο και οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες που έχουν μεγάλη σημασία για τα παραγωγικά χαρακτηριστικά (Keane και Strieter 2001).

Η σχετική έκφραση της *IL1b* μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η δράση της *IL-1b* σχετίζεται με την ωρίμανση και πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων, την ενεργοποίηση των NK κυττάρων και γενικότερα την οξεία εκδήλωση της φλεγμονής σε ανοσοποιητικά κύτταρα (Galli και Calder, 2009). Η σχετική έκφραση των *TNF $\alpha$*  μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η δράση των *TNF $\alpha$*  σχετίζεται με την ενεργοποίηση της μεταγραφής και σύνθεσης κυτοκινών από τα μακροφάγα κύτταρα και τη θανάτωση κυτταρικών όγκων. Επομένως, όπως και η *IL1b*, εμπλέκονται στην εκδήλωση της φλεγμονής (Galli και Calder 2009). Όπως αναφέρθηκε και στη βιβλιογραφική ανασκόπηση, η προσθήκη ιχθυελαίων και ειδικότερα εικοσαπεντανοϊκού και εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος, μειώνει την παραγωγή της *IL1b* και *TNF $\alpha$*  σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα ποντικών (Baldie *et al.*, 1993, Sinha *et al.*, 1991, Yaqoob & Calder 1995, Wallace *et al.*, 2000). Η σχετική έκφραση της *IL2* η οποία ρυθμίζει την ενεργοποίηση, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των Τ και Β κυττάρων, μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, σε σχέση με αυτήν της ομάδας του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά των Calder & Newsholmer (1991) όπου η προσθήκη EPA (εικοσιπεντανοϊκού οξέος) μείωσε την έκφραση *IL2* σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Η σχετική έκφραση της ιντερλευκίνης 8 (*IL8*), η οποία εμπλέκεται στη χημειόταξη των ουδετερόφιλων (δηλαδή στην εξωκυττάρια κινητοποίηση των ανοσοποιητικών κυττάρων προς τους παθογόνους παράγοντες), μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, πιθανόν λόγω της μείωσης της γενικότερης

φλεγμονώδους κατάστασης. Η μείωση της *IL8* παρατηρήθηκε από τους Hayashi *et al.*, (1998) με την προσθήκη EPA και DHA λιπαρών οξέων σε ανοσοποιητικά κύτταρα ποντικών. Δεν έχει όμως αποσαφηνιστεί αν η μείωση αυτή της *IL8* λόγω των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αποτελεί ένα θετικό αποτέλεσμα στη μείωση της φλεγμονώδους κατάστασης ή ελλοχεύει αρνητική επίδραση στην απάντηση του οργανισμού σε τυχόν παθογόνα (Fenton *et al.*, 2013). Πρόσφατη εργασία των Teague *et al.* (2013) αναφέρει πως ανεξάρτητα από τη μείωση των σημαντικών κυτοκινών για την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού σε παθογόνα, λόγω της πρόσληψης πολυακόρεστων  $\omega 3$  λιπαρών οξέων, η δράση των Β λεμφοκυττάρων παρουσιάζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.

Όσον αφορά τις χημειοκίνες, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της *CCL5* και της *CXCL16* στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, σε σχέση με αυτές στην ομάδα του μάρτυρα. Η χημειοκίνη *CCL-5* εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των Τ κυττάρων, των μακροφάγων, ηωσινόφιλων και βασεόφιλων κυττάρων με αποτέλεσμα η αύξηση της να σχετίζεται με την εκδήλωση της φλεγμονής (Aldinucci και Colombatti 2014). Η χημειοκίνη *CXCL-16* αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία μπορεί να αποσπαστεί από την μεμβράνη με τη βοήθεια της μεταλλοπρωτεϊνάσης ADAM10 και η διαλυτή της μορφή σχετίζεται με την χημειόταξη παρόμοια με την *IL-8* (Matsumura και Demaria 2010). Επιπλέον, η *CXCL-16* δρα ως ανιχνευτής της οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), συνεισφέροντας στο μεταβολισμό και απομάκρυνση της (Tsiplakou *et al.*, 2018). Σύμφωνα με την εργασία των Wu *et al.* (2002) η πρόσληψη των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων EPA και DHA αυξάνει την ενσωμάτωση αυτών των λιπαρών οξέων στα φωσφολιπίδια των LDL, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της οξειδωσιμότητάς της. Λόγω αυτών, η πιθανή βελτίωση της οξειδωτικής σταθερότητας της LDL ενδέχεται να σχετίζεται με την αποκλιμάκωση της έκφρασης της *CXCL16*.

Πέραν της ρυθμιστικής ικανότητας των κυτοκινών στο ανοσοποιητικό σύστημα, σημαντικό ρολό διαδραματίζουν και τα εικοσανοειδή τα οποία συντίθενται από πολυακόρεστα μακράς αλυσού λιπαρά οξέα (Calder 2001). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί, πως η σύνθεσή τους παρουσιάζει μεγάλο ανταγωνισμό μεταξύ των  $\omega 6$  και των  $\omega 3$  πολυακόρεστων, γεγονός το οποίο έχει μεγάλη βιολογική σημασία καθώς κάθε πρόδρομη ένωση παράγει διαφορετικής ισχύος προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές ή ακόμα και αντιφλεγμονώδεις όπως οι ρεσολβίνες (Patterson *et al.*, 2012).

Οι ρεσολβίνες και άλλα αντιφλεγμονώδη εικοσανοειδή, τα οποία προέρχονται από τη δράση των κυκλοοξυγενασών όταν πρόδρομη ένωση αποτελεί το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ, δύνανται να αναστέλλουν τη δράση των γεννητριών του ανιόντος του υπεροξειδίου μειώνοντας το οξειδωτικό στρες (Kohil και Levy 2009).

Συμπερασματικά, με βάση τα προαναφερθέντα και τη σχετική βιβλιογραφική ανασκόπηση στο κεφάλαιο **3.4.**, η ενσωμάτωση πολυακόρεστων  $\omega 3$  μακράς αλύσου λιπαρών οξέων στη διατροφή πειραματόζωων, αυξάνει την ενσωμάτωση αυτών των λιπαρών οξέων στις μεμβράνες των ανοσοποιητικών κυττάρων με αποτέλεσμα τη σύνθεση πιο ήπιας δράσης εικοσανοειδών (Calder 2001). Αποτέλεσμα αυτών είναι η μείωση των κυριότερων προφλεγμονωδών κυτοκινών (*IL-1 $\beta$*  και *TNF $\alpha$* ), προσταγλανδινών (*PGE $_2$* ) και λευκοντριένιων (*LTB $_4$* ) (Wallace *et al.*, 2000, Norris & Dennis 2012).

Πέραν αυτού, η σύνθεση των εικοσανοειδών, με πρόδρομη ένωση το εικοσιδιπεντανοϊκό οξύ (DPA) το οποίο περιέχεται σε υψηλή συγκέντρωση στο μικροφύκος *Schizochytrium sp.*, παρουσιάζει τη σημαντικότερη αντιφλεγμονώδη δράση από τα υπόλοιπα  $\omega 3$  PUFA που διερευνώνται στο ανοσοποιητικό σύστημα (Dangi *et al.*, 2010, Nauroth *et al.*, 2010, Norris & Dennis 2012).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διαχωριστικής ανάλυσης (Σχήμα 5.14) στα μονοκύτταρα των αιγών, παρατηρήθηκε σημαντικός διαχωρισμός των μεταβλητών της ομάδας του μάρτυρα με τις τρεις διατροφικές επεμβάσεις χωρίς αυτές να διαχωρίζονται μεταξύ τους, αποτέλεσμα το οποίο πιθανόν υποδεικνύει πως τα διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης του μικροφύκους δεν επηρέασαν σημαντικά τις μεταβλητές (γονίδια) που μελετήθηκαν στα μονοκύτταρα.

Όσον αφορά τη σχετική έκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων στα ουδετερόφιλα, η σχετική έκφραση της *MAPK* μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG20 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα ενώ έμεινε ανεπηρέαστη στις άλλες διατροφικές επεμβάσεις. Στη συνέχεια του γονιδιακού αυτού δικτύου, η σχετική έκφραση των *JUND* μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60, σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα, αλλά και μεταξύ των ομάδων ALG20 και ALG40 σε σχέση με την ομάδα ALG60. Ωστόσο, καθώς η έκφραση της *MAPK* ρυθμίζει την έκφραση της *API (JUND)* η οποία παρουσίασε μεταβολές μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τη *MAPK*, τίθεται το ερώτημα, αν επηρεάστηκε κάποιος μετα-μεταγραφικός μηχανισμός της συνδεθείσας πρωτεΐνης της *MAPK* μεταξύ των ομάδων, ή η έκφραση της *API* επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες οι οποίοι δεν έχουν διερευνηθεί ακόμα. Η θετική συσχέτιση

(Πίνακας 11) της *JUND* με τους *IRF3*, *IFR5*, *INFG*, *STAT3*, *TNFA* και *NFkB* πιθανόν να σχετίζεται με τις διαφοροποιήσεις αυτές. Η σχετική έκφραση των *STAT3* μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG20 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα χωρίς να επηρεαστεί η έκφραση της *IL-10* όπως παρατηρήθηκε και παραπάνω στα μονοκύτταρα. Η σχετική έκφραση των *NFkB* μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG20 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα, ενώ στις ομάδες ALG40 και ALG60 παρουσίασε τάση μείωσης. Αντίθετα, η σχετική έκφραση των *IL1b* αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG40 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Ο μηχανισμός με τον οποίο η γενικότερη προφλεγμονώδης κατάσταση παρατηρήθηκε μειωμένη στα ουδετερόφιλα, ενώ η έκφραση της *IL1b* αυξήθηκε στην ομάδα ALG40 υποδηλώνοντας φλεγμονή, παραμένει άγνωστος και δεν μπορεί πάρα να αποδοθεί σε τυχαία ατομικότητα των πειραματόζωων. Όμως, σε συσχέτιση κατά Pearson των μεταβλητών αποκλειστικά της ομάδας ALG40, η έκφραση της *IL1b* συσχετίστηκε θετικά μόνο με τους *TLR4*, *MYD88* και *CCL5*, στα οποία γονίδια δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές. Επομένως, αναφορικά με την αύξηση της έκφρασης της *IL1b*, αν πράγματι βασίζεται στην ατομικότητα των ζώων, φαίνεται να μην επηρέασε σημαντικά της υπόλοιπες παραμέτρους. Επιπλέον, η σχετική έκφραση των *IL2* μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα ALG60, ενώ η σχετική έκφραση των *IL6* μειώθηκε στις ομάδες ALG20 και ALG40 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα αντίστοιχα.

Όσον αφορά τη διαχωριστική ανάλυση των ουδετερόφιλων (Σχήμα 5.19) δεν παρατηρήθηκε σημαντική ταξινόμηση των μεταβλητών στις διατροφικές ομάδες, παρά μόνο μια μικρή τάση διαχωρισμού της ομάδας ALG40 (πιθανόν λόγω της αύξησης της *IL1b*) από τις υπόλοιπες.

Η διαχωριστική ανάλυση που εφαρμόστηκε στις μεταβλητές των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων διεχώρισε πλήρως την ομάδα του μάρτυρα από τις διατροφικές επεμβάσεις προσθήκης του μικροφύκου, καθώς και την ομάδα ALG40 σε σχέση με τις υπόλοιπες. Το αποτέλεσμα δεν μπορεί να συσχετιστεί με την επίδραση του διαφορετικού επιπέδου ενσωμάτωσης του μικροφύκου καθώς ο διαχωρισμός δεν έγινε και μεταξύ των ομάδων ALG20 και ALG60, αλλά μπορεί να υποδηλώνει κάποια προδιάθεση αυτής (δοσολογίας) σε συνάρτηση με τη διαφορετική απόκριση των ουδετερόφιλων από τα μονοκύτταρα στην εν λόγω διατροφική επέμβαση.

Τέλος, οι μεταβλητές των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων της ομάδας του μάρτυρα στην ανάλυση κύριων συνιστωσών (Σχήμα 5.22) φαίνονται αναμεμιγμένες στα τεταρτημόρια μεταξύ των δυο ιστών. Ωστόσο, όταν η ανάλυση εφαρμόστηκε στις

μεταβλητές των διατροφικών επεμβάσεων, αυτές συσπειρώθηκαν με βάση τον ιστό και διαχωρίστηκαν σημαντικά (Σχήμα 5.23).

### 6.7. Μικροοργανισμοί μεγάλης κοιλίας

Τα μεθανοβακτήρια αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία βακτηρίων που ανήκουν στο βασίλειο που ονομάζεται *Archaea* και παράγουν μεθάνιο σε αναερόβιες συνθήκες. Οι δύο κυριότερες κατηγορίες τους διαχωρίζονται ανάλογα με την παρουσία ή μη του κυτοχρώματος. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα *Archaea* της τάξης *Methanosarcinales* τα οποία περιέχουν κυτόχρωμα και παράγουν μεθάνιο με πρόδρομη ένωση το υδρογόνο, το διοξείδιο του άνθρακα, τη μεθανόλη και το οξικό οξύ και στη δεύτερη κατηγορία, που στερούνται το κυτόχρωμα, ανήκουν οι τάξεις *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales* και *Methanopyrales* και χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα και το υδρογόνο ή το μυρμηκικό οξύ ως υπόστρωμα προς παραγωγή μεθανίου (Fricke *et al.*, 2006).

Τα *Archaea* αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα ALG60 σε σχέση με τις ομάδες CON, ALG20 και ALG40 ενώ η πλειοψηφία των αρχαίων στη μεγάλη κοιλία, τα *Methanogen*, μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG20 και ALG40 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Η αύξηση των αρχαίων στην ομάδα ALG60 μπορεί να συνδέεται με την άγνωστη ως τώρα κατηγορία των Rumen Cluster C μικροοργανισμών που αποτελούν περίπου το 16% των αρχαίων αλλά μπορούν να φτάσουν ακόμα και το 80%. Η κατηγορία αυτών των μικροοργανισμών δεν έχει ακόμα συνδεθεί με μεθανογενετικές ιδιότητες (Buddle *et al.*, 2010).

Συγκεκριμένα, το είδος *Methanobacterium formicicum* που αποτελεί εκπρόσωπο της τάξης *Methanobacteriales*, μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Τα *Methanobacterium formicicum* αποτελούν κατά Gram θετικά *Archaea* τα οποία παράγουν μεθάνιο από την εκμετάλλευση υδρογόνου/διοξειδίου του άνθρακα και μυρμηκικού (Kelly *et al.*, 2014). Τα είδη των *Methanobrevibacter spp.* (Gram θετικά) που αντιπροσωπεύουν περίπου τα 2/3 των αρχαίων στη μεγάλη κοιλία μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG20, ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα (Leahy *et al.*, 2013). Οι *Methanosphaera stadtmanae*, που ανήκουν στην τάξη των *Methanobacteriales* και παράγουν μεθάνιο μέσω της αναγωγής της μεθανόλης, μειώθηκαν αριθμητικά με την προσθήκη του μικροφύκου στο σιτηρέσιο των αιγών. Οι *Methanosphaera stadtmanae*

θεωρούνται ιδιαίτερα ασυνήθιστα μεθανοβακτήρια καθώς ανήκουν στην κατηγορία των μεθανοβακτηρίων που στερούνται κυτόχρωμα. Ωστόσο αξιοποιούν τη μεθανόλη, ένα γνώρισμα που συναντάται μόνο στα μεθανοβακτήρια που περιέχουν κυτόχρωμα (*Methanosarcinales*) (Fricke *et al.*, 2006). Όσον αφορά τους μικροοργανισμούς που παράγουν μεθάνιο, οι *Methanomicrobium mobile* που ανήκουν στην οικογένεια *Methanomicrobiales*, αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα ALG60 σε σχέση με τις ομάδες CON, ALG20 και ALG40 αντίστοιχα. Συνολικά, οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που παράγουν μεθάνιο στη μεγάλη κοιλία μειώθηκαν στις ομάδες που έγινε συμπλήρωση του σιτηρεσίου αγών με το μικροφύκος *Schizochytrium sp.*

Το μεθάνιο που αποβάλλεται από τα μηρυκαστικά ζώα ευθύνεται κατά 33% των συνολικών, ανθρωπογενών εκπομπών μεθανίου (Giuburunca *et al.*, 2014). Πέραν όμως των περιβαλλοντικών αρνητικών επιπτώσεων, η παραγωγή μεθανίου συνοδεύεται με μείωση της διαθέσιμης ενέργειας του σιτηρεσίου από 2 ως 12% (Johnson & Johnson, 1995). Ωστόσο, τα μεθανοβακτήρια εμπλέκονται στην εξουδετέρωση του υδρογόνου από τη μεγάλη κοιλία η οποία έχει σπουδαία φυσιολογική σημασία. Καθώς η ζύμωση στη μεγάλη κοιλία αποτελεί μια οξειδωτική διαδικασία, η αναγωγή των απαραίτητων συνενζύμων (NADH, NADPH, FADH) μέσω των αφυδρογονασών δύναται να επηρεαστεί αρνητικά από τη συσσώρευση υδρογόνου (Marti *et al.*, 2009).

Τα μεθανοβακτήρια ανταγωνίζονται τα βακτήρια παραγωγής οξικού οξέος για τη χρησιμοποίηση των υποστρωμάτων με αποτέλεσμα η εξάλειψη των μεθανοβακτηρίων να συνδέεται με αύξηση της παραγωγικότητας (λιποπεριεκτικότητα) (Buddle *et al.*, 2010).

Παρόμοια αποτελέσματα, όσον αφορά τη μεθανογένεση, παρατηρήθηκαν στα *in vitro* και *in vivo* πειράματα των Fievez *et al.* (2003) με την προσθήκη ιχθυελαίου. Συγκεκριμένα, η προσθήκη των EPA και DHA λιπαρών οξέων μείωσαν ως 80% την παραγωγή μεθανίου, αύξησαν την παραγωγή προπιονικού οξέος, χωρίς να επηρεάσουν τα ολικά πτητικά λιπαρά οξέα και την πεπτικότητα του NDF. Επιπλέον, στην εργασία των Machmüller *et al.* (2003) η προσθήκη μυριστικού οξέος στο σιτηρέσιο προβάτων μείωσε την παραγωγή μεθανίου και τον πληθυσμό των αρχαίων χωρίς όμως να παρατηρηθούν σημαντικές αλλαγές στον πληθυσμό των μεθανοβακτηρίων που μελετήθηκαν.

*In vitro* μελέτες των Boeckeaert *et al.* (2006) και των Fievez *et al.* (2007) παρουσιάζουν σημαντική αναστολή της μεθανογένεσης και αύξηση του προπιονικού οξέος με την προσθήκη σκευάσματος μικροφύκους πλούσιου σε DHA λιπαρά οξέα. Επιπλέον, στη μελέτη των Maia *et al.* (2016) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της μεθανογένεσης με την προσθήκη μακροφυκών σε συνδυασμό με χόρτο λειμώνων αλλά όχι με την προσθήκη ενσιρώματος αραβοσίτου.

Στην ερευνητική εργασία των Roque *et al.* (2018) η προσθήκη του μακροφύκους *Asparagopsis taxiformis* σε υγρό μεγάλης κοιλίας επέφερε μείωση 95% στο παραχθέν μεθάνιο χωρίς καμία αρνητική επίδραση στα πτητικά λιπαρά οξέα. Επιπλέον, η εν λόγω μελέτη αναφέρει πως η προσθήκη του μακροφύκους επέφερε άμεση αναστολή της μεθανογένεσης. Αντίθετα, η μείωση του πληθυσμού των μεθανοβακτηρίων παρατηρήθηκε ετεροχρονισμένα σε σχέση με την εκπομπή του αερίου, υποδεικνύοντας την πιθανή επίδραση του μακροφύκους στη δραστηριότητα των μεθανοβακτηρίων και όχι άμεσα στο πληθυσμό τους.

Αντίθετα, στην *in vivo* μελέτη των Moate *et al.* (2013) η προσθήκη διαφορετικών επίπεδων μικροφύκους, πλούσιου σε DHA λιπαρά οξέα σε συνδυασμό με σιτηρέσιο πλούσιο σε χονδροειδείς ζωοτροφές, δεν επηρέασε τη μεθανογένεση.

Σύμφωνα με τους Buddle *et al.* (2010) η επίδραση της συμπλήρωσης των σιτηρεσίων με πολυάκορεστα λιπαρά οξέα στη μεθανογένεση οφείλεται α) στον ανταγωνισμό των υποστρωμάτων (υδρογόνο) για υδρογόνωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και των μεθανοβακτηρίων για παραγωγή μεθανίου και β) στην άμεση αναστολή των μεθανοβακτηρίων από τα πολυάκορεστα λιπαρά οξέα αυτά καθ' αυτά (Chaves *et al.*, 2008). Επιπλέον, η επίδραση αυτή εξαρτάται από την πηγή αυτών των λιπαρών οξέων και τα αποτελέσματά της είναι ποικίλα (Cosgrove *et al.*, 2008).

Όπως αναφέρθηκε και στη βιβλιογραφική ανασκόπηση τα τρία είδη βακτηρίων που εμπλέκονται στην βιο-αποδόμηση των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων μέσω της δράσης των κυτταρινολυτικών ενζύμων είναι: τα *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, και *Ruminococcus flavefaciens*, εκ των οποίων κυρίαρχο ρόλο έχουν τα *Fibrobacter succinogenes* (Hu *et al.*, 2007). Στην παρούσα μελέτη οι *Fibrobacter succinogenes* μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 ενώ τα *Ruminococcus flavefaciens* μειώθηκαν σημαντικά σε όλες τις διατροφικές επεμβάσεις ενσωμάτωσης του μικροφύκους σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Το



τρίτο σημαντικότερο είδος κυτταρινολυτικών βακτηρίων, *Ruminococcus albus* δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Συμπερασματικά, η προσθήκη του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* επηρέασε αρνητικά τον πληθυσμό των κυτταρινολυτικών ενζύμων κυρίως στις ομάδες υψηλής ενσωμάτωσης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην εργασία των Abuelfatah *et al.* (2016) στην οποία η προσθήκη λιναρόσπορου στο σιτηρέσιο αγών μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των *Ruminococcus flavofaciens* και *Fibrobacter succinogenes*. Επιπλέον, ο πληθυσμός των *Fibrobacter succinogenes* στο υγρό της μεγάλης κοιλίας μειώθηκε σημαντικά με τη συμπλήρωση του σιτηρέσιου μόσχων με ιχθυέλαιο (Huws *et al.*, 2010). Ακόμα, παρατηρείται πως η τροποποίηση του μικροβιώματος της μεγάλης κοιλίας εξαρτάται άμεσα από το προφίλ των λιπαρών οξέων που ενσωματώνεται στην τροφή, καθώς στην εργασία των Liu *et al.* (2011) με την ενσωμάτωση ιχθυελαίου και ηλιέλαιου στο σιτηρέσιο μόσχων, ο πληθυσμός των *Ruminococcus flavofaciens* μειώθηκε σημαντικά κυρίως με την προσθήκη ιχθυελαίου. Συνολικά, σύμφωνα με τους Maia *et al.* (2007), τα πολυάκορεστα λιπαρά οξέα και ιδίως αυτά που περιέχονται στα ιχθυέλαια (DHA και EPA) δρουν τοξικά στα κυτταρινολυτικά βακτήρια, μειώνοντας σημαντικά τον πληθυσμό τους.

Πέραν της αποδόμησης των κυτταρικών τοιχωμάτων των τροφών, σημαντική πηγή ενέργειας αποτελούν επίσης οι μη δομικοί πολυσακχαρίτες (άμυλο). Τα κυρίαρχα αμυλολυτικά βακτήρια αποτελούν οι: *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminantium* και οι *Streptococcus bovis*. Το κύριο ένζυμο των βακτηρίων για την αποικοδόμηση του αμύλου είναι η  $\alpha$ -αμυλάση (Cotta, 1988). Στην παρούσα μελέτη η προσθήκη των μικροφυκών δεν επηρέασε τα εν λόγω αμυλολυτικά βακτήρια σημαντικά. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναφορικά με τους *Streptococcus bovis* έρχεται η μελέτη των Shingfield *et al.* (2012) στην οποία η προσθήκη ιχθυελαίου στο σιτηρέσιο αγελάδων, δεν επηρέασε τον πληθυσμό τους.

Πολλά από τα βακτήρια τα οποία διασπούν τους υδατάνθρακες στα μηρυκαστικά έχουν και πρωτεολυτικές ιδιότητες. Τα πιο ενεργά πρωτεολυτικά βακτήρια είναι: *Prevotella sp.*, *Ruminobacter amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium*, και οι *Megasphaera elsdenii*. Ο πληθυσμός των ειδών του γένους *Prevotella* δεν επηρεάστηκε από την ενσωμάτωση του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξαν και οι Huws *et al.* (2010), όταν στο σιτηρέσιο μόσχων ενσωματώθηκε ιχθυέλαιο.

Στη μελέτη αυτή, ο πληθυσμός των *Megasphaera elsdenii* δεν προσδιορίστηκε καθώς ήταν μη ανιχνεύσιμος. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην εργασία των Huws *et al.* (2010) με την προσθήκη ιχθυελαίου στο σιτηρέσιο μόσχων όπου οι *Megasphaera elsdenii* δεν ήταν ανιχνεύσιμοι με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Επίσης, οι Klieve *et al.* (2003) δεν κατάφεραν με την ίδια μέθοδο να προσδιορίσουν τα εν λόγω βακτήρια στο υγρό της μεγάλης κοιλίας αγελάδων που διατράφηκαν με σιτηρέσιο πλούσιο σε συμπληρωμένες ζωοτροφές.

Ένα ακόμα σημαντικό είδος βακτηρίων που δύναται να αποικοδομεί τις ημικυτταρίνες, τις πηκτίνες και τις πρωτεΐνες είναι οι *Butyrivibrio fibrisolvens* (Nagaraja, 2016). Τα αυτά βακτήρια και οι *Anaerovibrio lipolytica* εμπλέκονται κυρίως στην υδρόλυση των λιπιδίων. Στην παρούσα μελέτη ο πληθυσμός των *Butyrivibrio fibrisolvens* δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη των μικροφυκών. Στο ίδιο καταλήγουν τα αποτελέσματα πειραματισμών με την προσθήκη μικροφυκών πλούσιων σε DHA λιπαρά οξέα στο σιτηρέσιο αγελάδων (Boeckeaert *et al.*, 2008, 2007) και προβατινών (Castro-Carrera *et al.*, 2014). Αντιθέτως, η προσθήκη ίδιου σκευάσματος, με την παρούσα μελέτη στη διατροφή αιγών και εριφίων αύξησε τον πληθυσμό των *Butyrivibrio* (Dewanckele *et al.*, 2018). Επιπλέον όσον αφορά τη βιοϋδρογόνωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων σε στεατικό στη μεγάλη κοιλία, οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί, *Butyrivibrio proteoclasticus* μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες ALG40 και ALG60 σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα.

Η συσσώρευση διαφορετικών ισομερών του C<sub>18:1</sub> και η μείωση της συγκέντρωσης του στεατικού οξέος που αναφέρθηκε στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων των λιπαρών οξέων στις ομάδες που έγινε η ενσωμάτωση των μικροφυκών συνδέεται με την ανασταλτική επίδραση των DHA λιπαρών οξέων στον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στη βιοϋδρογόνωση των C<sub>18:1</sub>. Οι *Butyrivibrio proteoclasticus* αποτελούν το μόνο ανιχνεύσιμο βακτηριακό είδος που βιοϋδρογονώνει τα ισομερή του C<sub>18:1</sub> σε στεατικό οξύ (Kemp *et al.*, 1975, Wallace *et al.*, 2006, McKain *et al.*, 2010). Πράγματι, σε *in vitro* πειράματα των Szczechowiak *et al.* (2016) η προσθήκη ιχθυελαίου και σογιελαίου μείωσε τη σχετική αφθονία των *Butyrivibrio proteoclasticus* στο υγρό μεγάλης κοιλίας αγελάδων, όπως συνέβη και στο υψηλό ποσοστό ενσωμάτωσης του μικροφύκου στην παρούσα μελέτη (ALG40 και ALG60). Παρόμοιοι πειραματισμοί *in vivo* δεν παρατήρησαν σημαντικές διαφοροποιήσεις για τους *Butyrivibrio proteoclasticus* πάρα την ταυτόχρονη αναστολή της βιοϋδρογόνωσης

των C<sub>18:1</sub> ισομερών σε στεατικό οξύ, όπως παρατηρήθηκε και στην ομάδα ALG20 της παρούσας μελέτης.

Συμπερασματικά και σύμφωνα με τους Boeckeaert *et al.* (2008) η βιοϋδρογόνωση των ισομερών αυτών όχι μόνο δεν οφείλεται αποκλειστικά στους *Butyrivibrio proteoclasticus*, αλλά φαίνεται να εμπλέκονται και άλλα μη καλλιεργημένα βακτήρια σε μεγαλύτερο βαθμό από αυτούς. Τα είδη αυτά πιθανότατα ανήκουν στα γένη *Butyrivibrio* και *Pseudobutyrovibrio* άλλα και σε άλλα γένη της οικογένειας *Lachnospiraceae*. Άλλη μια πιθανή εξήγηση του γιατί δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού των *Butyrivibrio proteoclasticus* στην ομάδα ALG20, πάρα τη σημαντική αναστολή της παραγωγής του στεατικού οξέος και της σημαντικής αρνητικής του συσχέτισης με τα ισομερή C<sub>18:1</sub> όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.14, μπορεί να οφείλεται στη μείωση της βιοϋδρογονωτικής δραστηριότητας των βακτηρίων και όχι του πολλαπλασιασμού τους (Dewanckele *et al.*, 2018). Απάντηση στην προαναφερθείσα ερευνητική υπόθεση θα έδινε η αλληλούχιση και η βιοπληροφορική ανάλυση απομονωθέντος RNA από το υγρό της μεγάλης κοιλίας.

Η συμβολή των μυκήτων και των πρωτοζώων στην πέψη είναι δευτερευούσης σημασίας σε σχέση με αυτή των βακτηρίων. Ωστόσο πειράματα με την εξάλειψή τους από τη μεγάλη κοιλία είχαν αρνητικά αποτελέσματα στα παραγωγικά χαρακτηριστικά (Nagaraja, 2016). Στην παρούσα μελέτη, ο πληθυσμός των μυκήτων και των πρωτοζώων δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την προσθήκη των μικροφυκών στο σιτηρέσιο των αιγών. Σύμφωνα με την εργασία των Boeckeaert *et al.* (2018) η προσθήκη 43,7 g DHA/ημέρα σε αγελάδες ΣΒ=615 Kg (70mg DHA / Kg ΣΒ) δεν επηρέασε τον πληθυσμό των πρωτοζώων, αντιθέτως, η αύξηση του επιπέδου της ενσωμάτωσης στα 76,1 g DHA/ημέρα σε αγελάδες ιδίου βάρους (123 mg DHA / Kg ΣΒ) μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό τους. Στην παρούσα μελέτη, η ημερήσια πρόσληψη DHA προσδιορίστηκε στα 2,42 g και 4,84 g DHA στις ομάδες ALG20 και ALG40/ ALG60 αντίστοιχα, που ισοδυναμεί με 51 και 100 mg DHA / Kg ΣΒ. Συμπερασματικά, παρά τις διαφορές μεταξύ των ειδών, η προσθήκη DHA στη διατροφή των αιγών πιθανόν να ήταν χαμηλή προκειμένου να επηρεάσει τον πληθυσμό των πρωτοζώων σημαντικά. Ωστόσο, στις ομάδες υψηλής ενσωμάτωσης παρατηρήθηκε αριθμητική μείωση αυτών.

## 2<sup>ο</sup> Πείραμα

### 7. Πειραματικό σχέδιο 2<sup>ου</sup> πειράματος

#### 7.1. Σκοπός του πειράματος

Μετα την επεξεργασία και ερμηνεία των αποτελεσμάτων του πρώτου πειράματος και με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, προέκυψαν επιπλέον ερευνητικά ερωτήματα που απαιτούσαν διερεύνηση. Κατά τον πρώτο πειραματισμό η ενσωμάτωση των μικροφυκών πραγματοποιήθηκε σε σιτηρέσια με λόγο ΧΖ/ΣΖ 50/50, όμως, στα διάφορα παραγωγικά συστήματα της αιγοπροβατοτροφίας και ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των χονδροειδών κυρίως ζωοτροφών, ο λόγος αυτός ποικίλει. Μεταβολές του λόγου ΧΖ/ΣΖ όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3.2., επηρεάζουν τον πληθυσμό των μικροοργανισμών στη μεγάλη κοιλιά και ως εκ τούτου τα ζυμωτικά φαινόμενα. Επιπλέον, από τα αποτελέσματα του πρώτου πειραματισμού διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη κατανάλωση του μικροφύκους από τις αίγες έφτασε τα 40 g ημερησίως έναντι των 60 που χορηγήθηκαν στην επέμβαση ALG60.

Ένα ακόμη ερευνητικό ερώτημα που προέκυψε από το πρώτο πειραματισμό σχετίζεται με το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού και την οξειδωτική κατάσταση του γάλακτος. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η ενσωμάτωση μικροφυκών πλούσιων σε ω3 πολυάκορεστα λιπαρά οξέα αύξησε σημαντικά την οξειδωτική καταπόνηση στις ομάδες μέσης και υψηλής συμμετοχής του μικροφύκους. Επιπλέον, η υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών και κατ' επέκταση αμύλου στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών ζώων συνδέεται με την αύξηση μεταβολιτών που προκαλούν οξειδωτικό στρες. Έτσι, το ερώτημα έγκειται στο αν η ενσωμάτωση ακόμα και του χαμηλότερου επιπέδου μικροφυκών (20 g ημερησίως) με λόγο ΧΖ/ΣΖ υπέρ των συμπυκνωμένων θα οδηγούσε σε οξειδωτική καταπόνηση του οργανισμού είτε σε ανεπιθύμητη οξειδωτική κατάσταση του γάλακτος.

Όσον αφορά τους μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας και ειδικότερα τα μεθανοβακτήρια, στον πρώτο πειραματισμό η ενσωμάτωση των μικροφυκών στο σιτηρέσιο των αιγών μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό τους. Ωστόσο, μεταβολές στο λόγο ΧΖ/ΣΖ δύναται, επίσης, να επηρεάζουν τον πληθυσμό των μεθανοβακτηρίων και κατ' επέκταση τη μεθανογένεση. Συγκεκριμένα, η υψηλή συμμετοχή χονδροειδών ζωοτροφών στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών ζώων προάγει την παραγωγή μεθανίου από τα μεθανοβακτήρια.

Με βάση τις προαναφερθείσες ερευνητικές υποθέσεις, κρίθηκε σκόπιμη η συνέχεια των πειραματισμών με την ταυτόχρονη ενσωμάτωση του σκευάσματος **DHAgold™** στα δύο βέλτιστα επίπεδα, με βάση το πρώτο πείραμα και δύο διαφορετικών λόγων **XZ/ΣZ** στο σιτηρέσιο γαλακτοπαραγωγών αιγών με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση τους: α) στην ποσότητα και στη χημική σύσταση του γάλακτος, β) στο προφίλ των λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος, του υγρού της μεγάλης κοιλίας και του γάλακτος, γ) στη δραστηριότητα επιλεγμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων του πλάσματος του αίματος και του γάλακτος και δ) στο προφίλ των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας.

## 7.2. Πειραματικό σχέδιο

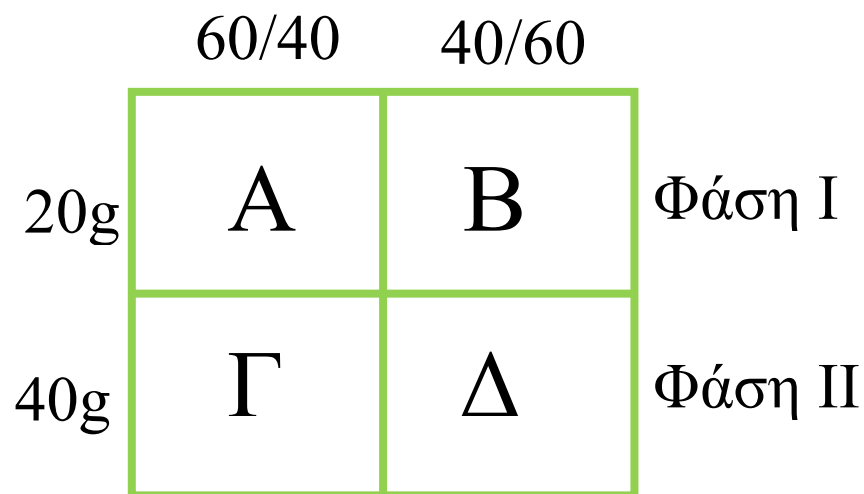
Για το σκοπό του δευτέρου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 22 υγιείς, αίγες φυλής Alpine διασταυρωμένες με εγχώριες, ηλικίας 3<sup>ov</sup> ως 4<sup>ov</sup> ετών μέσου σωματικού βάρους 50,6±6,1 Kg στο μέσο της γαλακτικής περιόδου (80±10 ημέρες από τον τοκετό). Καθώς, δεν υπήρχε επαρκής αριθμός ζώων/επέμβαση, αποφασίστηκε το πείραμα να πραγματοποιηθεί σε δυο φάσεις. Κατά την πρώτη φάση του πειράματος, τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ισοδύναμες ομάδες (n=11) με βάση τη διορθωμένη, ως προς τη λιποπεριεκτικότητα, γαλακτοπαραγωγή, το σωματικό τους βάρος και τη γαλακτική τους περίοδο: α) την ομάδα **A** (20 g DHAgold™/ζώο/ημέρα και XZ/ΣZ=60/40) και β) την ομάδα **B** (20 g DHAgold™/ζώο/ημέρα και XZ/ΣZ=40/60). Μετά το πέρας της πρώτης φάσης ακολούθησε μια δεύτερη χρησιμοποιώντας τα ίδια ζώα σε κάθε ομάδα με τις επεμβάσεις να αποτελούνται: από την ομάδα **Γ** (40 g DHAgold™/ζώο/ημέρα και XZ/ΣZ=60/40) και την ομάδα **Δ** (40 g DHAgold™/ζώο/ημέρα και XZ/ΣZ=40/60) (Σχήμα 7.1). Η πρώτη φάση των 20 g προηγήθηκε αυτής των 40 g για να μην υπάρξουν μετεπιδράσεις από την επέμβαση I, στην επέμβαση II. Τα σιτηρέσια των ομάδων καταρτίστηκαν με σκοπό να είναι ισοενεργειακά και ισοαζωτούχα, καλύπτοντας τις ανάγκες των ζώων σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά σε κάθε παραγωγική φάση κατά τη διάρκεια των πειραματισμών (Ζέρβας κ.α. 2004, National Academic Press, 1981) (Πίνακας 7.2). Τα ζώα διατρέφονταν ομαδικά με σιτηρέσιο αποτελούμενο από μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών, σανό μηδικής και άχυρο σίτου, όπως φαίνεται στον Πίνακα 7.1. Η διάθεση του σιτηρεσίου γινόταν καθημερινά στις 8:00 π.μ. και στις 18:30 μ.μ. μετά τη μηχανική άμελξη, και είχαν στη διάθεσή τους σε 24ωρη βάση, καθαρό νερό. Μετά την κατάρτιση των ομάδων ακολούθησε προ-πειραματική περίοδος προσαρμογής 14 (δεκατεσσάρων) ημερών και εν συνεχεία η κύρια πειραματική

περίοδος διάρκειας 42 (σαράντα-δυο) ημερών για κάθε μια από της δύο επιμέρους φάσης μεταξύ των μηνών Απρίλιος- Αύγουστος 2016.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις ίδιες πειραματικές εγκαταστάσεις που περιεγράφησαν στο κεφάλαιο 4.1.1..

Πίνακας 7.1. Κατανάλωση τροφής δευτέρου πειραματισμού (ανά ομάδα).

	Ομάδα Α/Γ	Ομάδα Β/Δ
Σανός μηδικής (Kg/ημέρα)	13,2	7,7
Άχυρο σίτου (Kg/ημέρα)	3,3	2,0
Μείγμα ΣΖ (Kg/ημέρα)	11,0	14,4
Λόγος ΧΖ/ΣΖ	60/40	40/60
Συνολική κατανάλωση (Kg/ημέρα)	27,5	24,1
Ατομική κατανάλωση (Kg/ημέρα)	2,50	2,19



Σχήμα 7.1. Γραφική αναπαράσταση πειραματικού σχεδιασμού δευτέρου πειράματος.

Πίνακας 7.2. Χημική σύσταση (g/Kg) και προφίλ λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων) των ζωοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

	Μείγμα <i>A</i>	Μείγμα <i>B</i>	Μείγμα <i>Γ</i>	Μείγμα <i>Δ</i>	Σανός μηδικής	Άχυρο σίτου
<i>Χημική σύσταση (g/Kg ζωοτροφής)</i>						
Ξ.Ο.	908	910	944	918	911	937
Τέφρα	41	45	45	43	103	77
Ο.Α.Ο.	136	139	136	139	177	25
Λ.Ο.	61	58	69	65	13	19
NDF	244	189	227	210	415	715
ADF	89	72	86	80	306	507
<i>Προφίλ λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων)</i>						
C <sub>12:0</sub>	0,08	0,08	0,09	0,10	0,53	1,02
C <sub>14:0</sub>	2,48	2,12	3,10	3,18	6,20	0,00
C <sub>16:0</sub>	21,94	22,99	20,22	23,77	36,77	29,88
C <sub>18:0</sub>	1,92	2,06	1,55	1,87	2,33	4,86
C <sub>18:1 n-9 c</sub>	28,95	31,83	22,13	27,08	2,49	34,77
C <sub>18:2 n-6</sub>	31,96	31,04	31,09	27,76	18,27	21,95
C <sub>20:0</sub>	0,22	0,23	0,17	0,20	0,64	0,82
C <sub>18:3 n-3</sub>	1,07	0,96	1,13	0,88	30,68	1,86
C <sub>20:3n3</sub>	0,44	0,37	0,56	0,47	1,50	1,37
C <sub>24:0</sub>	0,32	0,25	0,26	0,25	0,00	0,73
C <sub>22:5 n-6</sub>	2,56	1,88	4,96	3,78	0,00	0,00
C <sub>22:6 n-3</sub>	6,87	4,95	13,76	10,21	0,00	0,00

### 7.2.1. Δειγματοληψίες δευτέρου πειράματος

Ατομικά δείγματα αίματος ελήφθησαν την 21<sup>η</sup> και την 42<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της κύριας πειραματικής περιόδου για κάθε μια από τις δύο πειραματικές φάσεις. Η

αιμοληψία πραγματοποιήθηκε την 8<sup>η</sup> π.μ., πριν τη χορήγηση του σιτηρεσίου, από τη σφαγίτιδα φλέβα. Το ολικό αίμα συλλέχθηκε σε φιαλίδια Vacutainer με 17 Units/ml νατριούχο ηπαρίνη και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 2700 στροφές (rpm) για 10 λεπτά στους 4°C προκειμένου να διαχωριστεί το πλάσμα του αίματος από τα ερυθροκύτταρα. Το πλάσμα στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι την ανάλυση των λιπαρών οξέων, της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Επιπροσθέτως, ατομικά δείγματα γάλακτος ελήφθησαν την 21<sup>η</sup> και την 42<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της κύριας πειραματικής περιόδου για κάθε μια από τις δύο πειραματικές φάσεις. Οι επιμέρους διαδικασίες αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο **4.1.2.**

Τέλος, την 21<sup>η</sup> και την 42<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της κύριας πειραματικής περιόδου για κάθε μια από τις δύο πειραματικές φάσεις πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία υγρού της μεγάλης κοιλίας, όπως αναφέρθηκαν ήδη στο κεφάλαιο **4.1.2.**



## 8. Αποτελέσματα 2<sup>ου</sup> πειράματος

### 8.1. Σωματικό βάρος αιγών

Η εξέλιξη του σωματικού βάρους των αιγών κατά τη διάρκεια των πειραματισμών παρουσιάζεται στους Πίνακες 8.1 και 8.2.

### 8.2. Κατανάλωση τροφής

Τα αποτελέσματα της κατανάλωσης της τροφής παρουσιάζονται στους Πίνακες 8.3 και 4. Συγκεκριμένα, στις ομάδες *Γ* και *Δ* παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της κατανάλωσης της ξηράς ουσίας των συμπυκνωμένων ζωοτροφών (Πίνακας 8.4.). Απόρροια αυτού ήταν η μειωμένη πρόσληψη του μικροφύκου από τα 40 g/ημέρα/ζώο στα 33,7 και 33,2 g/ημέρα/ζώο αντίστοιχα.

Πίνακας 8.1. Εξέλιξη σωματικού βάρους αιγών πρώτης πειραματικής φάσης (20g μικροφύκους/ζώο/ημέρα με δυο λογούς XZ/ΣZ)

	Διατροφή (Δ)		SEM‡	Χρόνος (ημέρες) (X)						SEM‡	Επίδραση		
	20g			7	14	21	28	35	42		Δ	X	ΔxX
	60/40	40/60											
	A	B											
Σωματικό βάρος (Kg)	51,3	49,79	2,21	47,79 <sup>a</sup>	50,15 <sup>b</sup>	51,17 <sup>c</sup>	51,23 <sup>c</sup>	51,53 <sup>c</sup>	51,39 <sup>c</sup>	1,59	NS	***	NS

Πίνακας 8.2. Εξέλιξη σωματικού βάρους αιγών δεύτερης πειραματικής φάσης (40g μικροφύκους/ζώο/ημέρα με δυο λογούς XZ/ΣZ)

	Διατροφή (Δ)		SEM‡	Χρόνος (ημέρες) (X)						SEM‡	Επίδραση		
	40g			7	14	21	28	35	42		Δ	X	ΔxX
	60/40	40/60											
	Γ	Δ											
Σωματικό βάρος (Kg)	51,2	51,36	2,82	50,82 <sup>ac</sup>	51,55 <sup>b</sup>	51,68 <sup>b</sup>	51,36 <sup>ab</sup>	51,64 <sup>ab</sup>	50,55 <sup>c</sup>	2,01	NS	***	NS

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b, c) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0.05$ ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

‡ SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

Πίνακας 8.3. Μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής με δυο λόγους χονδροειδών προς συμπυκνωμένες ζωοτροφές (Α: ΧΖ/ΣΖ=60/40 και Β ΧΖ/ΣΖ=40/60) και ημερήσια πρόσληψη του προϊόντος *DHAgold* 20g /ζώο/ημέρα.

	<i>A (n=11)</i>	<i>B (n=11)</i>
Συνολική κατανάλωση σιτηρεσίου σε Kg ανά ομάδα	25,35 ± 1,15	23,9 ± 0,26
Συνολική κατανάλωση σιτηρεσίου % της χορηγητέας ποσότητας	94,48 ± 3,28	99,20 ± 1,50
Κατανάλωση αχύρου % της χορηγητέας ποσότητας	65,50 ± 24	98,60 ± 2,90
Κατανάλωση μηδικής % της χορηγητέας ποσότητας	100	100
Κατανάλωση μείγματος % της χορηγητέας ποσότητας	96,60 ± 3,60	98,8 ± 2,50
Λόγος ΧΖ/ΣΖ	59,1 / 40,9	40,5 / 59,5
Μέση ημερήσια κατανάλωση <i>DHAgold</i> ανά ζώο σε g	19,30 ± 0,73	19,78 ± 0,50

Πίνακας 8.4. Μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής με δυο λόγους χονδροειδών προς συμπυκνωμένες ζωοτροφές (Γ: ΧΖ/ΣΖ=60/40 και Δ ΧΖ/ΣΖ=40/60) και ημερήσια πρόσληψη του προϊόντος *DHAgold* 40g /ζώο/ημέρα.

	<i>Γ (n=11)</i>	<i>Δ (n=11)</i>
Συνολική κατανάλωση σιτηρεσίου σε Kg ανά ομάδα	22,43 ± 1,34	18,47 ± 2,47
Συνολική κατανάλωση σιτηρεσίου % της χορηγητέας ποσότητας	89,93 ± 4,47	88,36 ± 5,58
Κατανάλωση αχύρου % της χορηγητέας ποσότητας	49,26 ± 26,28	90,00 ± 28,4
Κατανάλωση μηδικής % της χορηγητέας ποσότητας	100	100
Κατανάλωση μείγματος % της χορηγητέας ποσότητας	84,25 ± 6,29	83,47 ± 7,80
Λόγος ΧΖ/ΣΖ	62,1 / 37,9	43,8 / 56,2
Μέση ημερήσια κατανάλωση <i>DHAgold</i> ανά ζώο σε g	33,70 ± 2,51	33,20 ± 3,30

### **8.3. Ημερήσια παραγωγή γάλακτος και χημική σύσταση**

Η μέση γαλακτοπαραγωγή, η διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα και ως προς την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή, καθώς και η χημική σύσταση του γάλακτος των δυο φάσεων, παρουσιάζονται στους Πίνακες 8.5 και 8.6 αντίστοιχα. Παρά τις αριθμητικές διακυμάνσεις, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή για καμία από τις παραπάνω παραμέτρους που προσδιορίστηκαν.

Πίνακας 8.5. Μέση γαλακτοπαραγωγή, διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα και ως προς την ενέργεια, και χημική σύσταση του γάλακτος των αιγών της πρώτης φάσης (20g μικροφύκους/ζώο/ημέρα σε δυο λογούς ΧΖ/ΣΖ).

	Διατροφή (Δ)			Χρόνος (ημέρες) (Χ)						Επίδραση			
	A	B	SEM <sup>†</sup>	7	14	21	28	35	42	SEM <sup>†</sup>	Δ	X	ΔxX
Γαλακτοπαραγωγή (g/ημέρα)	2033	1719	233,20	1856 <sup>ad</sup>	1996 <sup>b</sup>	1853 <sup>ad</sup>	1856 <sup>d</sup>	1902 <sup>d</sup>	1790 <sup>a</sup>	165,80	NS	***	*
†FCM <sub>4%</sub> (g/ημέρα)	1770	1611	177,40	1781 <sup>a</sup>	1757 <sup>a</sup>	1669 <sup>b</sup>	1632 <sup>b</sup>	1719 <sup>ab</sup>	1587 <sup>cb</sup>	128,60	NS	**	NS
‡ECM (g/ημέρα)	1150	1041	115,61	1142 <sup>ac</sup>	1142 <sup>ac</sup>	1079 <sup>bd</sup>	1064 <sup>bd</sup>	1113 <sup>cd</sup>	1030 <sup>b</sup>	83,36	NS	**	NS
Λίπος (%)	3,37	3,65	0,19	3,86 <sup>a</sup>	3,33 <sup>b</sup>	3,46 <sup>bc</sup>	3,43 <sup>bc</sup>	3,53 <sup>c</sup>	3,44 <sup>bc</sup>	0,15	NS	***	NS
Ημερ. παραγωγή λίπους (g)	63,81	61,57	5,85	69,25 <sup>a</sup>	63,89 <sup>b</sup>	61,83 <sup>bc</sup>	59,30 <sup>c</sup>	63,83 <sup>b</sup>	58,04 <sup>c</sup>	4,41	NS	**	NS
Πρωτεΐνη (%)	2,89	3,10	0,12	3,07 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>	2,96 <sup>bc</sup>	3,00 <sup>ab</sup>	3,00 <sup>ca</sup>	2,96 <sup>bc</sup>	0,09	NS	*	NS
Ημερ. παραγωγή πρωτεΐνης (g)	56,83	51,51	5,77	55,31 <sup>b</sup>	56,83 <sup>a</sup>	53,07 <sup>db</sup>	53,55 <sup>cb</sup>	55,03 <sup>ab</sup>	51,19 <sup>d</sup>	4,14	NS	*	NS
Λακτόζη (%)	4,81	4,93	0,06	4,85 <sup>a</sup>	4,92 <sup>b</sup>	4,87 <sup>a</sup>	4,85 <sup>abc</sup>	4,99 <sup>b</sup>	4,75 <sup>c</sup>	0,05	NS	**	NS

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b, c, d) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

‡ Διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα (4%) γαλακτοπαραγωγή σύμφωνα με την εξίσωση  $Y_{4\%} = (0.40 + 0.15 * F) * M$  όπου  $F = \text{λίπος } \%$  και  $M = \text{γαλακτοπαραγωγή σε g}$

‡ Διορθωμένη ως προς την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή σύμφωνα με την εξίσωση  $ECM = (0,327 * \Gamma) + (12,95 * \Lambda) + (7,2 * \Pi)$  όπου  $\Gamma = \text{γαλακτοπαραγωγή σε g}$ ,  $\Lambda = \text{ημερήσια παραγωγή λίπους σε g}$  και  $\Pi = \text{ημερήσια παραγωγή πρωτεΐνης σε g}$

Πίνακας 8.6. Μέση γαλακτοπαραγωγή, διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα και ως προς την ενέργεια, και χημική σύσταση του γάλακτος των αιγών της δεύτερης φάσης (40g μικροφύκους/ζώο/ημέρα σε δυο λογούς XZ/ΣΖ)

	Διατροφή (Δ)			Χρόνος (ημέρες) (X)						Επίδραση			
	Γ	Δ	SEM <sup>†</sup>	7	14	21	28	35	42	SEM <sup>†</sup>	Δ	X	ΔxX
Γαλακτοπαραγωγή (g/ημέρα)	1744	1392	221,16	1560 <sup>ac</sup>	1584 <sup>ac</sup>	1604 <sup>a</sup>	1707 <sup>b</sup>	1499 <sup>c</sup>	1456 <sup>c</sup>	159,33	NS	*	*
†FCM <sub>4%</sub> (g/ημέρα)	1446	1226	156,61	1309 <sup>a</sup>	1318 <sup>ca</sup>	1417 <sup>bc</sup>	1464 <sup>b</sup>	1269 <sup>da</sup>	1238 <sup>da</sup>	114,83	NS	*	*
‡ECM (g/ημέρα)	950	801	101,99	860 <sup>a</sup>	870 <sup>ac</sup>	921 <sup>bc</sup>	955 <sup>b</sup>	834 <sup>a</sup>	812 <sup>a</sup>	74,84	NS	**	*
Λίπος (%)	3,17	3,30	0,27	3,03 <sup>a</sup>	3,04 <sup>a</sup>	3,47 <sup>b</sup>	3,33 <sup>b</sup>	3,31 <sup>ab</sup>	3,22 <sup>ac</sup>	0,02	NS	**	NS
Ημερ. παραγωγή λίπους (g)	49,84	44,50	5,18	44,92 <sup>a</sup>	45,63 <sup>a</sup>	52,02 <sup>b</sup>	52,05 <sup>b</sup>	44,66 <sup>a</sup>	43,78 <sup>a</sup>	3,91	NS	**	NS
Πρωτεΐνη (%)	2,94	3,03	0,13	2,93 <sup>ab</sup>	2,95 <sup>ab</sup>	2,98 <sup>ab</sup>	2,92 <sup>a</sup>	3,07 <sup>b</sup>	3,08 <sup>b</sup>	0,10	NS	*	NS
Ημερ. παραγωγή πρωτεΐνης (g)	48,29	40,34	5,06	43,93 <sup>ac</sup>	45,03 <sup>da</sup>	46,18 <sup>ab</sup>	47,74 <sup>b</sup>	42,63 <sup>c</sup>	41,24 <sup>dc</sup>	3,71	NS	**	**
Λακτόζη (%)	4,53	4,59	0,09	4,72 <sup>a</sup>	4,64 <sup>b</sup>	4,76 <sup>ac</sup>	4,48 <sup>de</sup>	4,44 <sup>e</sup>	4,32 <sup>f</sup>	0,07	NS	***	NS

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b, c, d, e) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

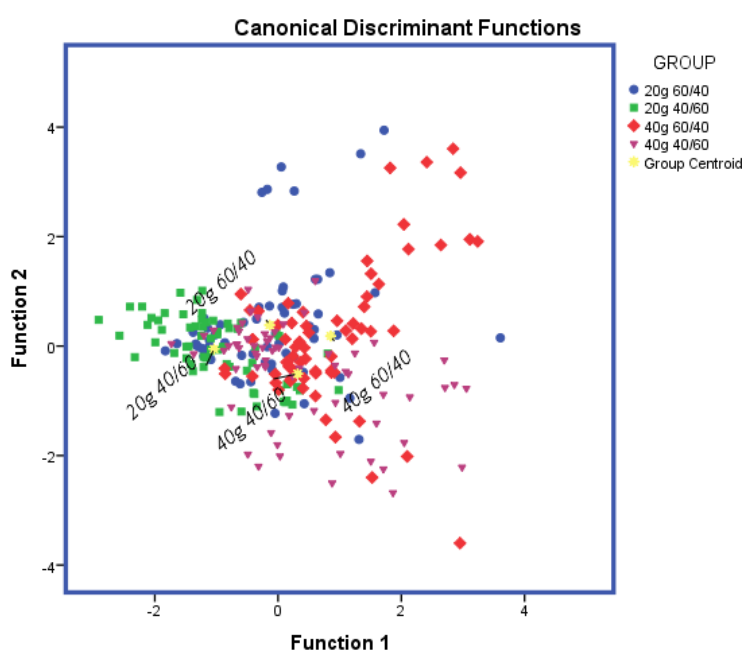
\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

† Διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα (4%) γαλακτοπαραγωγή σύμφωνα με την εξίσωση  $Y_{4\%} = (0.40 + 0.15 * F) * M$  όπου  $F =$  λίπος % και  $M =$  γαλακτοπαραγωγή σε g

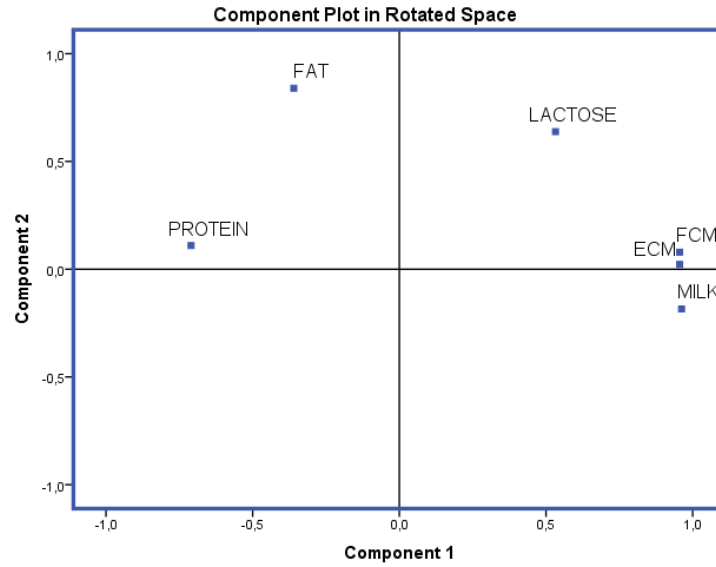
‡ Διορθωμένη ως προς την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή σύμφωνα με την εξίσωση  $ECM = (0,327 * \Gamma) + (12,95 * \Delta) + (7,2 * \Pi)$  όπου  $\Gamma =$  γαλακτοπαραγωγή σε g,  $\Delta =$  ημερήσια παραγωγή λίπους σε g και  $\Pi =$  ημερήσια παραγωγή πρωτεΐνης σε g

Καθώς τα αποτελέσματα της γαλακτοπαραγωγής και της χημικής σύστασης δεν διέφεραν σημαντικά, εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) (Σχήμα 8.1) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις. Έξι μεταβλητές για το γάλα εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα 264 δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 45,5%. Οι μεταβλητές οι οποίες συνεισέφεραν περισσότερο στο διαχωρισμό ήταν: η περιεκτικότητα σε λακτόζη και το λίπος. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική ( $P < 0,001$ ) αλλά η τιμή Wilks' lambda 0,596, κρίνεται υψηλή για να αντλήσουμε ασφαλή αποτελέσματα ταξινόμησης.



Σχήμα 8.1. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (A, B, Γ και Δ) σύμφωνα με τη γαλακτοπαραγωγή, τη διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα και την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος.

Επιπλέον, στα αποτελέσματα της γαλακτοπαραγωγής και της χημικής σύστασης του γάλακτος εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών (Σχήμα 8.2). Η τιμή KMO προσδιορίστηκε στο 0,519, δείχνοντας την ύπαρξη μεταβλητών με αρνητική συσχέτιση. Όμως, από φυσιολογικής άποψης, το αποτέλεσμα αυτό δεν αποτελεί στατιστική αστοχία, αλλά μέρος των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 8.2. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών σύμφωνα με τη γαλακτοπαραγωγή, τη διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα και την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος.



## 8.4. Προφίλ λιπαρών οξέων

### 8.4.1. Προφίλ λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας

Στον Πίνακα 8.7 παρουσιάζονται οι επιδράσεις της προσθήκης του μικροφύκου, της μεταβολής του λόγου XZ/ΣZ, του χρόνου δειγματοληψίας, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις αυτών χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο πολυπαραγοντικής ANOVA επαναλαμβανόμενων μετρήσεων. Στον Πίνακα 8.8 δίνονται επιπλέον στοιχεία, για την επίδραση των προς μελέτη παραμέτρων ανάμεσα στις τέσσερις ομάδες, θεωρώντας ως μόνη επαναλαμβανόμενη μέτρηση το χρόνο δειγματοληψίας. Το καπροϊκό οξύ (C<sub>6:0</sub>) αυξήθηκε σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν στα 40g του μικροφύκου κατά 2,7 φορές σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g (Πίνακας 7). Το καπρικό οξύ (C<sub>10:0</sub>) αυξήθηκε σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν στα 40g του μικροφύκου κατά 59% σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Το λαυρικό οξύ (C<sub>12:0</sub>) αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες των 40g του μικροφύκου κατά 60% σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g, καθώς και υπερ των συμπυκνωμένων ζωοτροφών κατά 36%. Το μυριστικό οξύ (C<sub>14:0</sub>) αυξήθηκε σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν στα 40g του μικροφύκου κατά 34% σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g καθώς σημαντική αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε μεταξύ του λόγου και του επιπέδου του μικροφύκου. Το πενταδεκανοϊκό οξύ (C<sub>15:0</sub>) μειώθηκε σημαντικά κατά 18% στις ομάδες με λόγο 40/60. Το παλμιτικό οξύ (C<sub>16:0</sub>) και το παλμιτολεϊκό οξύ (C<sub>16:1</sub>) αυξήθηκαν σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν στα 40g του μικροφύκου κατά 2,7% και 36% αντίστοιχα, σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Το μαργαρινικό οξύ (C<sub>17:0</sub>) αυξήθηκε σημαντικά στα 40g του μικροφύκου κατά 75% σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g.

Το στεατικό οξύ (C<sub>18:0</sub>) μειώθηκε σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν στα 40g του μικροφύκου κατά 57% σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Το βασσενικό οξύ (*trans-11* C<sub>18:1</sub>) και το ενδιάμεσο προϊόν της βιοϋδρογόνωσης *trans-10* C<sub>18:1</sub> αυξήθηκαν σημαντικά κατά 70% και 31% αντίστοιχα στις ομάδες με την υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Το ελαϊκό οξύ (*cis-9* C<sub>18:1</sub>) αυξήθηκε σημαντικά κατά 13% στις ομάδες με λόγο 40/60. Το *trans* λινελαϊκό οξύ (C<sub>18:2 n-6</sub>) μειώθηκε σημαντικά (26%) όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν στα 40g του μικροφύκου σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Το λινελαϊκό οξύ παρουσίασε τάση μείωσης (14%) στις ομάδες με λόγο 40/60 ενώ μειώθηκε σημαντικά κατά 36% όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν στα 40g του μικροφύκου κατά 75% σε σχέση με

αυτό στις ομάδες των 20g. Το λινολενικό οξύ ( $C_{18:3\ n-3}$ ) μειώθηκε σημαντικά (36%) στις ομάδες με λόγο 40/60, ενώ τάση αύξηση κατά 21% παρατηρήθηκαν όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν στα 40g του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Τα συζευγμένα ισομερή του λινελαϊκού οξέος μειώθηκαν κατά 21% τόσο στις ομάδες με λόγο 40/60 όσο και στις ομάδες με την υψηλότερη ενσωμάτωση του μικροφύκους.

Το εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ (DPA) και το εικοσαδιεξανοϊκό οξύ (DHA) μειώθηκαν σημαντικά (23% και 29% αντίστοιχα) στις ομάδες με την υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών ενώ αυξήθηκαν σημαντικά (55,5% και 47% αντίστοιχα) με την αύξηση του επιπέδου του μικροφύκους. Αυτές οι μεταβολές των προαναφερθέντων λιπαρών οξέων μεταξύ του λόγου XZ/ΣZ και του επιπέδου ενσωμάτωσης του μικροφύκους επέφεραν σημαντική αλληλεπίδραση του λόγου προς το μικροφύκος.

Πίνακας 8.7. Προφίλ λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης πολλών παραγόντων.

	Διατροφή (Δ)			Χρόνος (Χ)			Επίδραση									
	ΧΖ/ΣΖ (Α)		Μικροφύκος (Μ)	Χρόνος δειγματοληψίας		Επίδραση	Αλληλεπίδραση									
	60/40	40/60		3 <sup>η</sup>	6 <sup>η</sup>		Α	Μ	Χ	ΜxΑ	ΧxΑ	ΜxΧ	ΜxΧxΑ			
<i>C</i> <sub>6:0</sub>	1,09	1,08	0,164	0,46	1,72	0,132	1,10	1,08	0,145	NS	***	NS	NS	*	NS	NS
<i>C</i> <sub>8:0</sub>	1,97	1,60	0,19	1,63	1,95	0,157	1,95	1,63	0,152	NS	NS	NS	NS	***	**	NS
<i>C</i> <sub>10:0</sub>	1,10	1,12	0,103	0,86	1,37	0,091	1,09	1,14	0,101	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>12:0</sub>	0,75	1,02	0,074	0,68	1,09	0,084	0,98	0,79	0,077	*	***	NS	NS	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>14:0</sub>	4,22	4,10	0,159	3,55	4,77	0,151	4,45	3,87	0,151	NS	**	NS	**	NS	NS	*
<i>C</i> <sub>14:1</sub>	1,13	1,03	0,065	1,10	1,06	0,050	1,14	1,02	0,050	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>15:0</sub>	1,11	0,91	0,066	0,99	1,03	0,050	1,03	0,99	0,050	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>16:0</sub>	28,51	28,69	0,240	28,21	28,99	0,215	28,39	28,81	0,231	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>16:1</sub>	0,52	0,58	0,077	0,47	0,63	0,062	0,62	0,48	0,052	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>17:0</sub>	0,87	0,70	0,114	0,57	1,00	0,091	0,85	0,72	0,100	NS	***	NS	NS	NS	*	NS
<i>C</i> <sub>18:0</sub>	15,98	11,60	2,264	19,26	8,33	1,751	13,68	13,91	1,609	NS	***	NS	NS	NS	*	NS
<i>C</i> <sub>18:1 trans</sub>	1,86	1,99	0,134	1,89	1,96	0,151	1,84	2,01	0,108	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>trans-11 C</i> <sub>18:1</sub>	10,97	18,66	2,046	12,93	16,72	1,750	14,76	14,88	1,451	*	T	NS	NS	NS	NS	NS
<i>trans-10 C</i> <sub>18:1</sub>	1,18	1,54	0,121	1,33	1,40	0,113	1,34	1,38	0,102	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Αποτελέσματα

	60/40	40/60	SEM <sup>†</sup>	20g	40g	SEM <sup>†</sup>	3 <sup>η</sup>	6 <sup>η</sup>	SEM <sup>†</sup>	A	M	X	Mx1	Xx1	MxX	MxXx1
<i>cis-9 C<sub>18:1</sub></i>	9,56	10,79	0,402	10,20	10,15	0,335	10,18	10,17	0,338	*	NS	NS	NS	NS	*	NS
<i>C<sub>18:2 n-6 trans</sub></i>	0,75	0,64	0,072	0,80	0,59	0,066	0,74	0,65	0,057	NS	*	NS	NS	**	*	**
<i>C<sub>18:2 n-6 cis</sub></i>	4,14	3,56	0,222	4,69	3,01	0,181	3,83	3,86	0,122	T	***	NS	NS	NS	NS	NS
<i>C<sub>18:3 n-3</sub></i>	1,40	0,89	0,110	1,03	1,25	0,096	1,16	1,12	0,082	**	T	NS	NS	NS	*	NS
<i>C<sub>18:2 συζευγμένα ισομερή</sub></i>	1,23	0,96	0,080	1,23	0,97	0,073	1,00	1,19	0,069	*	*	*	NS	NS	NS	NS
<i>C<sub>20:3 n-3</sub></i>	0,02	0,05	0,020	0,07	0,01	0,018	0,03	0,04	0,018	NS	*	NS	NS	*	NS	*
<i>C<sub>22:5 n-6</sub></i>	3,41	2,62	0,131	2,36	3,67	0,131	2,96	3,07	0,105	***	***	NS	*	NS	NS	NS
<i>C<sub>22:6 n-3</sub></i>	8,19	5,80	0,322	5,66	8,33	0,301	6,88	7,11	0,284	***	***	NS	T	NS	NS	NS

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (A, B, C, D) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

T= Τάση

Πίνακας 8.8. Προφίλ λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

Μικροφύκος <i>XZ/ΣΖ</i>	Διατροφή ( <i>A</i> )				SEM	Χρόνος δειγματοληψίας ( <i>X</i> )			Επίδραση			
	<i>A</i>		<i>B</i>			SEM	3 <sup>η</sup> εβδομάδα	6 <sup>η</sup> εβδομάδα	SEM	<i>A</i>	<i>X</i>	<i>ΔxX</i>
	20g		40g									
	60/40	40/60	60/40	40/60								
<i>C</i> <sub>6:0</sub>	0,41 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	1,79 <sup>b</sup>	1,76 <sup>b</sup>	0,182	1,29	1,11	0,124	***	NS	**	
<i>C</i> <sub>8:0</sub>	1,83	1,42	2,12	1,85	0,209	1,96 <sup>a</sup>	1,65 <sup>b</sup>	0,125	NS	*	***	
<i>C</i> <sub>10:0</sub>	0,95 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>	1,24 <sup>b</sup>	1,44 <sup>b</sup>	0,124	1,08	1,12	0,095	**	NS	NS	
<i>C</i> <sub>12:0</sub>	0,63 <sup>a</sup>	0,74 <sup>a</sup>	0,87 <sup>a</sup>	1,20 <sup>b</sup>	0,123	0,95	0,77	0,081	*	NS	NS	
<i>C</i> <sub>14:0</sub>	3,90 <sup>ac</sup>	3,15 <sup>b</sup>	4,51 <sup>c</sup>	4,91 <sup>d</sup>	0,208	4,42 <sup>a</sup>	3,85 <sup>b</sup>	0,146	***	**	*	
<i>C</i> <sub>14:1</sub>	1,15	1,05	1,10	1,02	0,065	1,14	1,02	0,040	NS	*	NS	
<i>C</i> <sub>15:0</sub>	1,10 <sup>a</sup>	0,89 <sup>b</sup>	1,12 <sup>a</sup>	0,94 <sup>ab</sup>	0,066	1,03	0,99	0,039	*	NS	NS	
<i>C</i> <sub>16:0</sub>	28,19	28,23	28,71	29,16	0,286	28,38	28,76	0,197	NS	NS	NS	
<i>C</i> <sub>16:1</sub>	0,50	0,44	0,58	0,72	0,088	0,63 <sup>a</sup>	0,49 <sup>b</sup>	0,052	NS	*	NS	
<i>C</i> <sub>17:0</sub>	0,66 <sup>ac</sup>	0,48 <sup>a</sup>	1,08 <sup>b</sup>	0,94 <sup>cb</sup>	0,125	0,86	0,72	0,084	**	NS	NS	
<i>C</i> <sub>18:0</sub>	19,77 <sup>a</sup>	18,75 <sup>a</sup>	11,47 <sup>b</sup>	5,66 <sup>b</sup>	2,690	14,07	13,75	1,475	**	NS	*	
<i>C</i> <sub>18:1 trans</sub>	1,92	1,86	1,82	2,06	0,207	1,81	2,02	0,123	NS	NS	NS	
<i>trans-11 C</i> <sub>18:1</sub>	9,59 <sup>a</sup>	16,26 <sup>b</sup>	12,66 <sup>a</sup>	20,23 <sup>b</sup>	2,366	14,48	14,94	1,258	*	NS	NS	
<i>trans-10 C</i> <sub>18:1</sub>	1,19	1,47	1,21	1,54	0,165	1,31	1,39	0,098	NS	NS	NS	
<i>cis-9 C</i> <sub>18:1</sub>	9,68	10,72	9,42	10,64	0,483	10,09	10,13	0,288	NS	NS	NS	

Αποτελέσματα

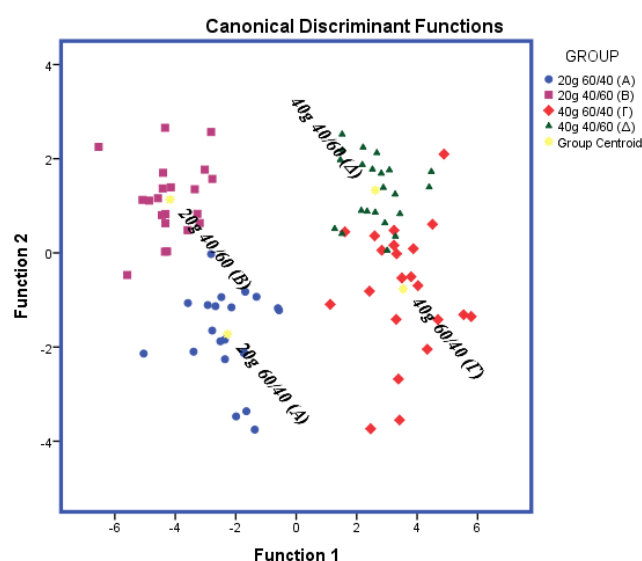
	20g		40g		SEM	3 <sup>η</sup> εβδομάδα	6 <sup>η</sup> εβδομάδα	SEM	Δ	X	ΔxX
	60/40	40/60	60/40	40/60							
<i>C18:2 n-6 trans</i>	0,83	0,76	0,66	0,53	0,089	0,75	0,65	0,057	NS	NS	***
<i>C18:2 n-6 cis</i>	4,82 <sup>a</sup>	4,57 <sup>a</sup>	3,43 <sup>b</sup>	2,61 <sup>c</sup>	0,251	3,84	3,87	0,161	***	NS	NS
<i>C20:0</i>	0,01 <sup>a</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,04 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,019	0,02 <sup>a</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,011	*	***	***
<i>C18:3 n-3</i>	1,19 <sup>a</sup>	0,87 <sup>a</sup>	1,56 <sup>b</sup>	0,94 <sup>a</sup>	0,136	1,17	1,11	0,072	**	NS	NS
<i>C18:2 συζευγμένα ισομερή</i>	1,39 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>	1,09 <sup>b</sup>	0,83 <sup>b</sup>	0,099	0,99 <sup>a</sup>	1,20 <sup>b</sup>	0,066	**	*	NS
<i>C20:3 n-3</i>	0,04	0,09	0,00	0,02	0,024	0,03	0,04	0,017	NS	NS	**
<i>C22:5 n-6</i>	2,96 <sup>a</sup>	1,76 <sup>b</sup>	4,04 <sup>c</sup>	3,43 <sup>da</sup>	0,197	2,97	3,13	0,131	***	NS	*
<i>C22:6 n-3</i>	7,26 <sup>a</sup>	4,07 <sup>b</sup>	9,49 <sup>c</sup>	7,44 <sup>da</sup>	0,451	6,89	7,26	0,297	***	NS	NS

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (A, B, C, D) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

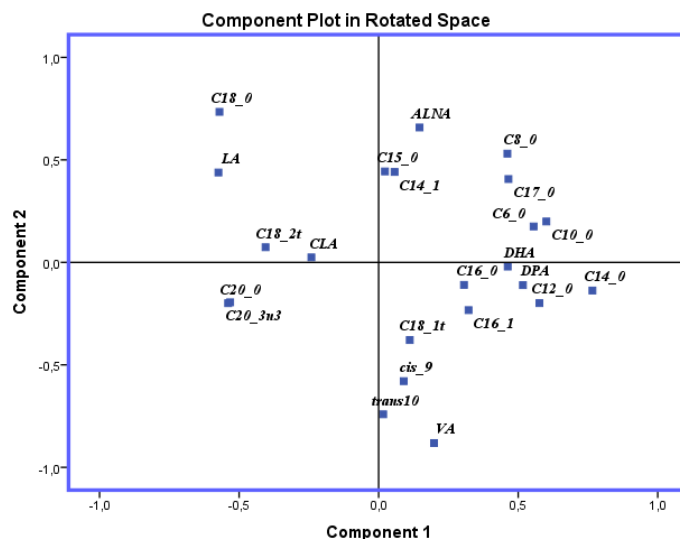
† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

Στα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) (Σχήμα 8.3) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις. Είκοσι-τρεις μεταβλητές εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα ογδόντα-οχτώ δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 94,2%. Τα λιπαρά οξέα τα οποία συνεισέφεραν περισσότερο στο διαχωρισμό ήταν: τα C<sub>6:0</sub>, DPA και τα C<sub>17:0</sub>. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική (P<0,001) με τιμή Wilks' lambda 0,021 για το Function 1 και τιμή Wilks' lambda 0,254 για το Function 2.



Σχήμα 8.3. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (A, B, Γ και Δ) σύμφωνα με τα λιπαρά οξέα του υγρού της μεγάλης κοιλίας.

Στο προφίλ των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών των δυο ημερομηνιών δειγματοληψίας (Σχήμα 8.4). Η τιμή KMO προσδιορίστηκε στα 0,063, δείχνοντας την ύπαρξη μεταβλητών με αρνητική συσχέτιση. Ωστόσο, από φυσιολογικής άποψης, το αποτέλεσμα αυτό δεν αποτελεί στατιστική αστοχία, αλλά μέρος των αποτελεσμάτων. Η συμμετοχή των δυο κύριων συνιστωσών παρατηρήθηκε σχετικά χαμηλή (36,2%).



Σχήμα 8.4. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών των λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας.

#### 8.4.2. Προφίλ λιπαρών οξέων πλάσματος αίματος

Το προφίλ των λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος παρουσιάζεται στους Πίνακες 8.9 και 8.10. Το μυριστικό οξύ ( $C_{14:0}$ ) αυξήθηκε σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν 40g του μικροφύκους κατά 106% σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g (Πίνακας 9). Το παλμιτικό οξύ ( $C_{16:0}$ ) και το παλμιτολεϊκό οξύ ( $C_{16:1}$ ) αυξήθηκαν σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν 40g του μικροφύκους κατά 8,5% και 97% αντίστοιχα, σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g.

Το στεατικό οξύ ( $C_{18:0}$ ) μειώθηκε σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν 40g του μικροφύκους κατά 40% σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Το βασσενικό οξύ (*trans-11*  $C_{18:1}$ ) αυξήθηκε σημαντικά κατά 120% όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν 40g του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g, καθώς αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε μεταξύ του λόγου  $XZ/\Sigma Z$  και του επιπέδου ενσωμάτωσης του μικροφύκους. Το ελαϊκό οξύ (*cis-9*  $C_{18:1}$ ) μειώθηκε σημαντικά κατά 11% όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν 40g του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Το λινελαϊκό οξύ μειώθηκε σημαντικά κατά 27% όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν 40g του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Το λινολενικό οξύ ( $C_{18:3\ n-3}$ ) μειώθηκε σημαντικά (44%) στις ομάδες με λόγο 40/60. Το  $C_{20:3\ n-6}$  το  $C_{20:3\ n-3}$  και το  $C_{22:2\ n-6}$  αυξήθηκαν σημαντικά κατά 146%, 38% και 126% αντίστοιχα με την αύξηση της προσθήκης του μικροφύκους. Επιπλέον, σημαντική αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε για το λόγο  $XZ/\Sigma Z$  προς το επίπεδο του μικροφύκους



για το C<sub>20:3</sub> n-3 και το C<sub>22:2</sub> n-6. Το εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ (DPA) και το εικοσαδιεξανοϊκό οξύ (DHA) αυξήθηκαν σημαντικά (κατά 110% και 31% αντίστοιχα) με την αύξηση του επιπέδου του μικροφύκους.

Πίνακας 8.9. Προφίλ λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης πολλών παραγόντων.

	Διατροφή (Δ)			Χρόνος (Χ)			Επίδραση									
	XZ/ΣZ (Δ)		Μικροφύκος (Μ)	Χρόνος δειγματοληψίας		Επίδραση	Αλληλεπίδραση									
	60/40	40/60	SEM <sup>†</sup>	20g	40g	SEM <sup>†</sup>	3 <sup>η</sup>	6 <sup>η</sup>	SEM <sup>†</sup>	Δ	Μ	Χ	ΜxΔ	ΧxΔ	ΜxΧ	ΜxΧxΔ
<i>C</i> <sub>14:0</sub>	0,43	0,46	0,033	0,29 <sup>a</sup>	0,60 <sup>b</sup>	0,040	0,34 <sup>a</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,037	NS	***	**	NS	NS	***	NS
<i>C</i> <sub>16:0</sub>	15,69	16,57	0,545	15,47 <sup>a</sup>	16,79 <sup>b</sup>	0,459	16,26	16,00	0,377	NS	*	NS	NS	*	NS	NS
<i>C</i> <sub>16:1</sub>	0,42	0,62	0,072	0,35 <sup>a</sup>	0,69 <sup>b</sup>	0,065	0,54	0,50	0,062	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>17:0</sub>	0,95	0,80	0,075	0,84	0,91	0,062	0,83	0,92	0,65	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>18:0</sub>	20,25	15,72	2,008	22,53	13,45	1,614	18,68	17,28	1,526	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>18:1 t</sub>	1,35	1,01	0,283	1,34	1,02	0,225	1,31	1,06	0,220	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>trans-11 C</i> <sub>18:1</sub>	4,40	7,56	1,186	3,73	8,23	0,947	5,42	6,54	0,824	NS	***	NS	**	NS	NS	NS
<i>cis-9 C</i> <sub>18:1</sub>	8,66	8,71	0,393	9,19	8,18	0,288	9,12	8,25	0,291	NS	**	**	NS	*	NS	*
<i>C</i> <sub>18:2 n-6 trans</sub>	0,53	0,48	0,070	0,48	0,53	0,052	0,53	0,47	0,059	NS	NS	NS	NS	*	*	NS
<i>C</i> <sub>18:2 n-6 cis</sub>	21,03	22,11	0,701	24,98	18,16	0,599	22,11	21,03	0,639	NS	***	NS	NS	*	*	*
<i>C</i> <sub>18:3 n-3</sub>	1,81	1,01	0,166	1,44	1,39	0,125	1,43	1,39	0,120	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>20:3 n-6</sub>	0,42	0,55	0,071	0,28	0,69	0,064	0,42	0,55	0,056	NS	***	*	NS	NS	NS	NS
<i>C</i> <sub>20:3 n-3</sub>	8,63	9,06	0,333	7,43	10,26	0,293	8,61	9,09	0,249	NS	***	*	*	*	*	NS
<i>C</i> <sub>22:2 n-6</sub>	4,85	5,22	0,316	3,09	6,98	0,243	4,37	5,69	0,228	NS	***	***	*	*	NS	NS

Αποτελέσματα

	<i>60/40</i>	<i>40/60</i>	<i>SEM</i> <sup>†</sup>	<i>20g</i>	<i>40g</i>	<i>SEM</i> <sup>†</sup>	<i>3<sup>η</sup></i>	<i>6<sup>η</sup></i>	<i>SEM</i> <sup>†</sup>	<i>A</i>	<i>M</i>	<i>X</i>	<i>Mx1</i>	<i>Xx1</i>	<i>MxX</i>	<i>MxXx1</i>
<i>C22:5 n-6</i>	1,36	1,50	0,095	0,92	1,94	0,091	1,29	1,57	0,090	NS	***	*	NS	NS	NS	NS
<i>C22:6 n-3</i>	9,06	8,46	0,259	7,60	9,93	0,219	8,61	8,92	0,216	NS	***	NS	NS	NS	*	*

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (A, B, C, D) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

<sup>†</sup> SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

Πίνακας 8.10. Προφίλ λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

<i>Μικροφύκος</i> <i>XZ/ΣZ</i>	<i>Διατροφή (Δ)</i>				<i>SEM</i>	<i>Χρόνος δειγματοληψίας (X)</i>			<i>Επίδραση</i>		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>Γ</i>	<i>Δ</i>		<i>3<sup>η</sup></i> <i>εβδομάδα</i>	<i>6<sup>η</sup></i> <i>εβδομάδα</i>	<i>SEM</i>	<i>Δ</i>	<i>X</i>	<i>ΔxX</i>
	<i>20g</i>		<i>40g</i>								
	<i>60/40</i>	<i>40/60</i>	<i>60/40</i>	<i>40/60</i>							
<i>C<sub>14:0</sub></i>	0,24 <sup>a</sup>	0,34 <sup>a</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,61 <sup>b</sup>	0,052	0,36 <sup>a</sup>	0,56 <sup>b</sup>	0,036	***	***	***
<i>C<sub>16:0</sub></i>	15,28 <sup>a</sup>	15,65 <sup>a</sup>	16,29 <sup>ab</sup>	17,66 <sup>b</sup>	0,536	16,39	16,06	0,302	*	NS	*
<i>C<sub>16:1</sub></i>	0,32 <sup>a</sup>	0,39 <sup>ab</sup>	0,58 <sup>b</sup>	0,86 <sup>c</sup>	0,076	0,55	0,52	0,050	***	NS	NS
<i>C<sub>17:0</sub></i>	0,88	0,80	0,96	0,75	0,082	0,80	0,89	0,055	NS	NS	NS
<i>C<sub>18:0</sub></i>	23,39 <sup>a</sup>	21,67 <sup>ab</sup>	15,87 <sup>b</sup>	9,41 <sup>c</sup>	2,074	18,14	17,02	1,215	***	NS	T
<i>C<sub>18:1 t</sub></i>	1,76	0,93	1,00	1,10	0,316	1,35	1,04	0,185	NS	NS	T
<i>trans-11 C<sub>18:1</sub></i>	3,32 <sup>a</sup>	4,14 <sup>a</sup>	6,30 <sup>a</sup>	11,35 <sup>b</sup>	1,205	5,82	6,74	0,702	***	NS	T
<i>cis-9 C<sub>18:1</sub></i>	9,18	9,20	7,99	8,51	0,366	9,18	8,26	0,222	T	***	**
<i>C<sub>18:2 n-6 trans</sub></i>	0,43	0,52	0,60	0,43	0,069	0,51	0,48	0,048	NS	NS	NS
<i>C<sub>18:2 n-6 cis</sub></i>	23,47 <sup>a</sup>	26,49 <sup>b</sup>	18,23 <sup>c</sup>	17,25 <sup>c</sup>	0,728	21,86	20,87	0,512	***	NS	**
<i>C<sub>18:3 n-3</sub></i>	1,78 <sup>a</sup>	1,09 <sup>b</sup>	1,79 <sup>a</sup>	0,87 <sup>b</sup>	0,157	1,38	1,38	0,092	***	NS	NS
<i>C<sub>20:3 n-6</sub></i>	0,20 <sup>a</sup>	0,36 <sup>a</sup>	0,68 <sup>b</sup>	0,71 <sup>b</sup>	0,079	0,41 <sup>a</sup>	0,56 <sup>b</sup>	0,050	***	**	NS
<i>C<sub>20:3 n-3</sub></i>	7,73 <sup>a</sup>	7,13 <sup>a</sup>	9,83 <sup>b</sup>	10,83 <sup>b</sup>	0,382	8,63 <sup>a</sup>	9,13 <sup>b</sup>	0,227	***	*	**
<i>C<sub>22:2 n-6</sub></i>	3,13 <sup>a</sup>	3,05 <sup>a</sup>	7,08 <sup>b</sup>	7,06 <sup>b</sup>	0,339	4,45 <sup>a</sup>	5,71 <sup>b</sup>	0,196	***	***	NS
<i>C<sub>22:5 n-6</sub></i>	0,85 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>	1,87 <sup>b</sup>	2,06 <sup>b</sup>	0,116	1,32	1,57	0,086	***	NS	NS

Αποτελέσματα

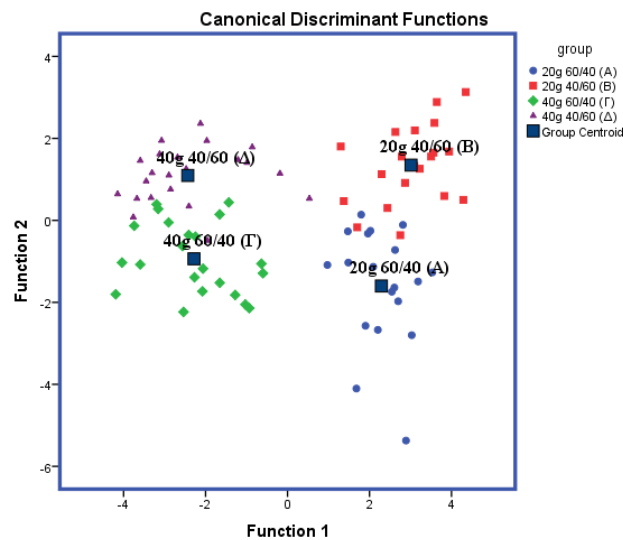
	20g		40g		SEM	3 <sup>η</sup> εβδομάδα	6 <sup>η</sup> εβδομάδα	SEM	Δ	X	ΔxX
	60/40	40/60	60/40	40/60							
<i>C</i> <sub>22:6 n-3</sub>	7,99 <sup>a</sup>	7,21 <sup>a</sup>	10,05 <sup>b</sup>	10,29 <sup>b</sup>	0,342	8,76	9,01	0,198	***	NS	*

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (A, B, C, D) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

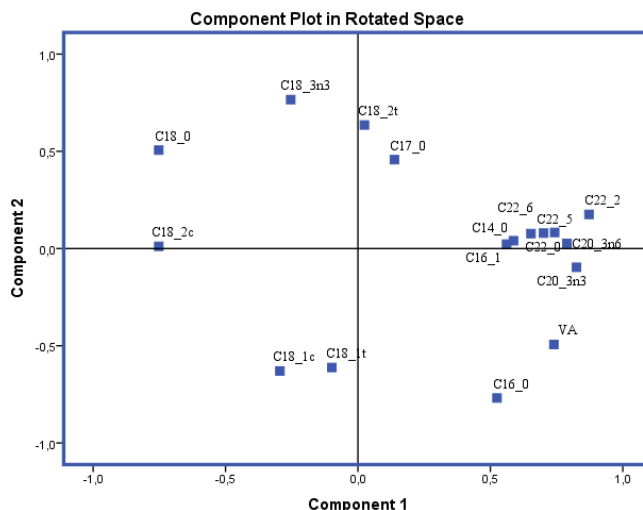
† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

Στα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) (Σχήμα 8.5) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις. Είκοσι-τρεις μεταβλητές εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα ογδόντα-οχτώ δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 91,6%. Τα λιπαρά οξέα τα οποία συνεισέφεραν περισσότερο στο διαχωρισμό ήταν: τα  $C_{18:2}$  cis, DHA,  $C_{20:3}$  n3,  $C_{22:2}$  n6, DPA,  $C_{22:0}$  και τα  $C_{20:3}$  n6. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική ( $P < 0,001$ ) με τιμή Wilks' lambda 0,036 για το Function 1 και τιμή Wilks' lambda 0,277 για το Function 2..



Σχήμα 8.5. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (A, B, Γ και Δ) σύμφωνα λιπαρά οξέα του πλάσματος του αίματος.

Στο προφίλ των λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών των δυο ημερομηνιών δειγματοληψίας (Σχήμα 8.6). Η τιμή KMO προσδιορίστηκε στα 0,133, δείχνοντας την ύπαρξη μεταβλητών με αρνητική συσχέτιση. Η συμμετοχή των δυο κύριων συνιστωσών βρέθηκε σχετικά χαμηλή (55,6%).



Σχήμα 8.6. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών των λιπαρών οξέων του πλάσματος του αίματος.

### 8.4.3. Προφίλ λιπαρών οξέων γάλακτος

Στον Πίνακα 8.11 παρουσιάζονται οι επιδράσεις της προσθήκης του μικροφύκου, της μεταβολής του λόγου  $XZ/\Sigma Z$ , του χρόνου δειγματοληψίας, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις αυτών χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο πολυπαραγοντικής ANOVA επαναλαμβανόμενων μετρήσεων. Το πενταδεκανοϊκό οξύ ( $C_{15:0}$ ) μειώθηκε σημαντικά κατά 20% στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$ . Το ακόρεστο ισομερές του πενταδεκανοϊκού οξέος ( $C_{15:1}$ ) μειώθηκε σημαντικά (31%) όταν στο σιτηρέσιο ενσωματωθήκαν 40g του μικροφύκου, σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Το παλμιτικό οξύ ( $C_{16:0}$ ) και το παλμιτολεϊκό οξύ ( $C_{16:1}$ ) αυξήθηκαν σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματωθήκαν 40g του μικροφύκου κατά 5% και 34% αντίστοιχα, σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Το στεατικό οξύ ( $C_{18:0}$ ) μειώθηκε σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματωθήκαν 40g του μικροφύκου κατά 40% σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Το σύνολο των *trans* ακόρεστων ισομερών του στεατικού οξέος, συμπεριλαμβανομένων του βασσενικού οξέος (*trans-11*  $C_{18:1}$ ) και του ενδιάμεσου *trans-10*  $C_{18:1}$ , αυξήθηκαν σημαντικά κατά 68% και 46% στις ομάδες με την υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών και με την αύξηση του επιπέδου ενσωμάτωσης του μικροφύκου αντίστοιχα. Το ελαϊκό οξύ (*cis-9*  $C_{18:1}$ ) αυξήθηκε σημαντικά κατά 22% στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$  ενώ μειώθηκε σημαντικά (30%) στις ομάδες των 40g του μικροφύκου, σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Όσον αφορά το ελαϊκό οξύ, παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση για τους δυο κύριους προς μελέτη παράγοντες. Το λινελαϊκό οξύ ( $C_{18:2\ n-6}$ ) μειώθηκε σημαντικά

(21%) όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν 40g του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Το λινολενικό οξύ ( $C_{18:3\ n-3}$ ) μειώθηκε σημαντικά (43%) στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$ . Το συζευγμένο ισομερές n-7 του λινελαϊκού οξέος ( $C_{18:2\ c9, c11}$ ) αυξήθηκε κατά 81% στις ομάδες με την υψηλότερη ενσωμάτωση του μικροφύκους. Το δεύτερο συζευγμένο ισομερές n-6 του λινελαϊκού οξέος ( $C_{18:2\ c10, c12}$ ) αυξήθηκε κατά 125% και 100% στις ομάδες με την υψηλότερη συμμετοχή των συμπυκνωμένων ζωοτροφών και με τη μέγιστη ενσωμάτωση του μικροφύκους αντίστοιχα. Το  $C_{20:3\ n-3}$  και το  $C_{24:1}$  αυξήθηκαν σημαντικά στο γάλα των ομάδων με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$  (33% και 26% αντίστοιχα) καθώς επίσης και στις ομάδες με την υψηλή ενσωμάτωση του μικροφύκους (κατά 37% και 120% αντίστοιχα). Επιπλέον, οι μεταβολές των προαναφερθέντων λιπαρών οξέων στο γάλα επέφεραν σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ όλων των προς μελέτη παραγόντων. Το εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ (DPA) αυξήθηκε σημαντικά (18%) στις ομάδες με την υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών ενώ η αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν 67% με την αύξηση του επιπέδου του μικροφύκους. Το εικοσαδιεξανοϊκό οξύ (DHA) αυξήθηκε σημαντικά (55%) στο γάλα των ζώων που κατανάλωναν 40g του μικροφύκους. Όσον αφορά τα DHA λιπαρά οξέα, οι αλληλεπιδράσεις όλων των παραμέτρων ήταν σημαντικές.

Τα μεσαία αλύσου λιπαρά οξέα μειώθηκαν κατά 4,6% στις ομάδες της υψηλής συμμετοχής συμπυκνωμένων ζωοτροφών ενώ τα μακράς αλύσου παρουσίασαν σημαντική μείωση κατά 40% στο γάλα των ζώων που κατανάλωναν 40g μικροφύκους. Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα αυξήθηκαν (14%) στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$  ενώ τα πολυάκορεστα λιπαρά οξέα αυξήθηκαν σημαντικά κατά 25% στις ομάδες με την υψηλή συμμετοχή του μικροφύκους στο σιτηρέσιο των αιγών. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα μειώθηκαν σημαντικά κατά 4,3% και 2% στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$  και ομάδες με την υψηλή συμμετοχή του μικροφύκους αντίστοιχα, ενώ τα ακόρεστα λιπαρά οξέα αυξήθηκαν κατά 12% και 6% αντίστοιχα στις ίδιες ομάδες. Τα  $\omega 6$  λιπαρά οξέα αυξήθηκαν σημαντικά (11,4%) στις ομάδες της υψηλής συμμετοχής συμπυκνωμένων ζωοτροφών ενώ τα  $\omega 3$  αυξήθηκαν κατά 42% με την αύξηση του μικροφύκους στο σιτηρέσιο των αιγών, επιφέροντας επιπλέον αλληλεπιδράσεις σε όλες τις παραμέτρους. Οι μεταβολές αυτές μείωσαν σημαντικά το λόγο  $\omega 6/\omega 3$  λιπαρά οξέα κατά 31% με τα 40g του μικροφύκους.

Ο αθηρωματικός δείκτης μειώθηκε σημαντικά κατά 16% στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$  ενώ ο θρομβωτικός δείκτης μειώθηκε κατά 13% στις ομάδες υψηλής



ενσωμάτωσης του μικροφύκους. Οι δείκτες της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης, σχετικά με το C<sub>16:1</sub> και C<sub>18:1</sub> αυξήθηκαν σημαντικά κατά 27% και 42% αντίστοιχα, στο γάλα των ομάδων της υψηλής ενσωμάτωσης του μικροφύκους.

Πίνακας 8.11. Προφίλ μεμονωμένων λιπαρών οξέων, ομαδοποιημένων τιμών, του λόγου κορεσμένα/ακόρεστα λιπαρά οξέα, του αθηρωματικού δείκτη καθώς και των δεικτών της  $\Delta^{-9}$  αφυδρογονάσης του γάλακτος των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης πολλών παραγόντων.

	<i>Διατροφή (Δ)</i>			<i>Χρόνος (Χ)</i>						<i>Επίδραση</i>						
	<i>XZ/ΣZ (Δ)</i>		<i>SEM<sup>†</sup></i>	<i>Μικροφύκος (Μ)</i>			<i>Χρόνος δειγματοληψίας</i>			<i>Επίδραση</i>		<i>Αλληλεπίδραση</i>				
	<i>60/40</i>	<i>40/60</i>		<i>20g</i>	<i>40g</i>	<i>SEM<sup>†</sup></i>	<i>3<sup>η</sup></i>	<i>6<sup>η</sup></i>	<i>SEM<sup>†</sup></i>	<i>Δ</i>	<i>Μ</i>	<i>Χ</i>	<i>ΜxΔ</i>	<i>ΧxΔ</i>	<i>ΜxΧ</i>	<i>ΜxΧxΔ</i>
<b>C4:0</b>	2,83	2,73	0,094	2,79	2,76	0,072	2,75	2,80	0,075	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>C6:0</b>	3,25	3,58	0,269	3,21	3,63	0,206	3,55	3,28	0,212	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>C8:0</b>	3,75	3,84	0,135	3,77	3,83	0,104	3,82	3,78	0,098	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS
<b>C10:0</b>	11,71	11,70	0,367	11,73	11,75	0,315	12,04 <sup>a</sup>	11,44 <sup>b</sup>	0,277	NS	NS	***	NS	NS	NS	NS
<b>C11:0</b>	0,17	0,11	0,024	0,15	0,13	0,019	0,15	0,13	0,018	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS
<b>C12:0</b>	4,64	4,56	0,250	4,65	4,54	0,204	4,78 <sup>a</sup>	4,41 <sup>b</sup>	0,185	NS	NS	***	NS	NS	NS	NS
<b>C13:0</b>	0,03	0,01	0,011	0,03 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,009	0,03	0,02	0,008	NS	*	NS	*	NS	NS	NS
<b>C14:0</b>	10,26	9,67	0,305	9,97	9,95	0,237	10,08	9,85	0,225	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>C14:1</b>	0,30	0,28	0,014	0,29	0,29	0,012	0,30 <sup>a</sup>	0,28 <sup>b</sup>	0,012	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS
<b>C15:0</b>	0,97 <sup>a</sup>	0,77 <sup>b</sup>	0,037	0,85	0,88	0,030	0,89 <sup>a</sup>	0,85 <sup>b</sup>	0,027	**	NS	**	NS	NS	*	NS
<b>C15:1</b>	0,23	0,21	0,022	0,26 <sup>a</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,018	0,23 <sup>a</sup>	0,20 <sup>b</sup>	0,017	NS	***	*	NS	NS	NS	NS
<b>C16:0</b>	29,19	27,99	0,670	27,89 <sup>a</sup>	29,29 <sup>b</sup>	0,517	25,57	28,61	0,490	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
<b>C16:1</b>	0,50	0,46	0,023	0,41 <sup>a</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,020	0,40 <sup>a</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,020	NS	***	***	NS	NS	***	NS
<b>C17:1</b>	0,10 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,013	0,09 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,012	0,08 <sup>a</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,011	**	**	*	NS	NS	NS	NS

Αποτελέσματα

	60/40	40/60	SEM <sup>†</sup>	20g	40g	SEM <sup>†</sup>	3 <sup>η</sup>	6 <sup>η</sup>	SEM <sup>†</sup>	A	M	X	MxA	XxA	MxX	MxXxA
<b>C18:0</b>	7,07	5,67	0,912	7,98 <sup>a</sup>	4,76 <sup>b</sup>	0,776	6,34	6,41	0,673	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
<b>C18:1 Σ trans</b>	5,92 <sup>a</sup>	9,94 <sup>b</sup>	1,189	6,45 <sup>a</sup>	9,42 <sup>b</sup>	0,965	7,66	8,20	0,861	*	**	NS	NS	NS	*	NS
<b>cis-9 C18:1</b>	10,30 <sup>a</sup>	12,60 <sup>b</sup>	0,761	13,48 <sup>a</sup>	9,42 <sup>b</sup>	0,851	10,99	11,91	0,579	*	**	NS	*	NS	NS	NS
<b>C18:2 n-6 trans</b>	0,41	0,37	0,031	0,41	0,37	0,026	0,40	0,38	0,023	NS	NS	NS	NS	NS	NS	***
<b>C18:2 n-6 cis</b>	2,03	2,24	0,088	2,39 <sup>a</sup>	1,88 <sup>b</sup>	0,072	2,08	2,19	0,077	NS	***	NS	*	NS	NS	NS
<b>C18:3 n-3</b>	0,44 <sup>a</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0,034	0,33	0,36	0,027	0,35	0,35	0,025	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>C20:0</b>	0,12	0,11	0,006	0,12 <sup>a</sup>	0,11 <sup>b</sup>	0,006	0,11	0,12	0,005	NS	*	NS	NS	NS	**	NS
<b>C22:0</b>	0,05	0,03	0,012	0,06 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,010	0,05 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,016	NS	*	*	NS	NS	NS	NS
<b>C18:2 c9, t11</b>	1,21	1,26	0,175	0,88 <sup>a</sup>	1,59 <sup>b</sup>	0,155	1,16	1,31	0,130	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
<b>C18:2 t10, c12</b>	0,04 <sup>a</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,017	0,04 <sup>a</sup>	0,08 <sup>b</sup>	0,015	0,07	0,06	0,013	*	*	NS	NS	NS	*	NS
<b>C20:3 n-3</b>	0,03 <sup>a</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,021	0,30 <sup>a</sup>	0,41 <sup>b</sup>	0,015	0,40 <sup>a</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,015	*	***	***	***	***	***	***
<b>C20:4</b>	0,38	0,45	0,036	0,19	0,64	0,025	0,33 <sup>a</sup>	0,50 <sup>b</sup>	0,028	NS	***	***	**	NS	**	*
<b>C20:5</b>	0,01 <sup>a</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,013	0,03	0,04	0,011	0,04 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,010	*	NS	*	NS	NS	NS	NS
<b>C24:1</b>	0,28 <sup>a</sup>	0,36 <sup>b</sup>	0,018	0,20 <sup>a</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,015	0,29 <sup>a</sup>	0,35 <sup>b</sup>	0,014	**	***	***	**	**	***	***
<b>C22:5 n-6</b>	0,22 <sup>a</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,016	0,18 <sup>a</sup>	0,30 <sup>b</sup>	0,014	0,21 <sup>a</sup>	0,27 <sup>b</sup>	0,014	*	***	***	NS	*	NS	NS
<b>C22:6 n-3</b>	1,05	1,17	0,055	0,87 <sup>a</sup>	1,35 <sup>b</sup>	0,042	1,05 <sup>a</sup>	1,17 <sup>b</sup>	0,044	NS	***	**	***	*	***	**
<b>SCFA‡</b>	21,71	22,03	0,661	21,65	22,09	0,523	22,30 <sup>a</sup>	21,44 <sup>b</sup>	0,489	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS
<b>MCFA§</b>	45,08 <sup>a</sup>	43,00 <sup>b</sup>	0,741	43,39	44,69	0,629	44,35	43,73	0,558	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>LCFA¶</b>	7,20	5,78	0,917	8,11 <sup>a</sup>	4,87 <sup>b</sup>	0,783	6,45	6,53	0,678	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS

Αποτελέσματα

	60/40	40/60	SEM <sup>†</sup>	20g	40g	SEM <sup>†</sup>	3 <sup>η</sup>	6 <sup>η</sup>	SEM <sup>†</sup>	A	M	X	Mx1	Xx1	MxX	MxXx1
<b>MUFA<sup>††</sup></b>	19,86 <sup>a</sup>	22,63 <sup>b</sup>	0,833	21,18	21,30	0,653	20,83 <sup>a</sup>	21,65 <sup>b</sup>	0,616	*	NS	*	NS	NS	NS	NS
<b>PUFA<sup>‡‡</sup></b>	6,10	6,54	0,205	5,61 <sup>a</sup>	7,03 <sup>b</sup>	0,165	6,03 <sup>a</sup>	6,62 <sup>b</sup>	0,173	NS	***	**	*	NS	**	*
<b>SFA<sup>§§</sup></b>	73,99 <sup>a</sup>	70,81 <sup>b</sup>	0,960	73,15 <sup>a</sup>	71,65 <sup>b</sup>	0,739	73,10 <sup>a</sup>	71,76 <sup>b</sup>	0,726	*	*	*	NS	NS	NS	NS
<b>UFA<sup>¶¶</sup></b>	25,96 <sup>a</sup>	29,17 <sup>b</sup>	0,959	26,79 <sup>a</sup>	28,33 <sup>b</sup>	0,741	26,85 <sup>a</sup>	28,27 <sup>b</sup>	0,724	*	*	*	NS	NS	NS	NS
<b>SFA/UFA<sup>†††</sup></b>	2,94 <sup>a</sup>	2,48 <sup>b</sup>	0,133	2,79	2,63	0,103	2,79 <sup>a</sup>	2,63 <sup>b</sup>	0,102	*	NS	*	*	NS	NS	NS
<b>ω6</b>	3,07 <sup>a</sup>	3,42 <sup>b</sup>	0,112	3,21	3,28	0,090	3,09 <sup>a</sup>	3,40 <sup>b</sup>	0,095	*	NS	**	NS	NS	NS	NS
<b>ω3</b>	1,82	1,87	0,075	1,52 <sup>a</sup>	2,16 <sup>b</sup>	0,052	1,78 <sup>a</sup>	1,91 <sup>b</sup>	0,055	NS	***	**	**	**	**	**
<b>ω6/ω3</b>	1,72	2,05	0,129	2,23 <sup>a</sup>	1,54 <sup>b</sup>	0,100	1,79	1,98	0,101	NS	***	NS	*	NS	NS	NS
<b>TI<sup>§§§</sup></b>	1,55	1,49	0,032	1,62 <sup>a</sup>	1,41 <sup>b</sup>	0,027	1,52	1,51	0,024	NS	***	NS	*	*	NS	NS
<b>HPI<sup>¶¶¶</sup></b>	0,70	0,68	0,006	0,67 <sup>a</sup>	0,68 <sup>b</sup>	0,005	0,67 <sup>a</sup>	0,68 <sup>b</sup>	0,005	NS	**	*	NS	NS	*	NS
<b>AI<sup>‡‡‡</sup></b>	2,97 <sup>a</sup>	2,49 <sup>b</sup>	0,144	2,76	2,70	0,111	2,81 <sup>a</sup>	2,65 <sup>b</sup>	0,107	*	NS	*	NS	NS	NS	NS
<b>Δ<sup>9</sup> αφυδρογονάση</b>																
<b>C<sub>14:1</sub> / C<sub>14:0</sub></b>	0,03	0,03	0,002	0,03	0,03	0,001	0,03	0,03	0,001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>C<sub>16:1</sub> / C<sub>16:0</sub></b>	0,02	0,02	0,001	0,015 <sup>a</sup>	0,019 <sup>b</sup>	0,001	0,014 <sup>a</sup>	0,019 <sup>b</sup>	0,001	NS	***	***	NS	NS	**	NS
<b>cis-9 C<sub>18:1</sub> / C<sub>18:0</sub></b>	2,29	2,81	0,251	2,11 <sup>a</sup>	2,99 <sup>b</sup>	0,221	2,60	2,50	0,183	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (A, B, C, D) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά (p ≤ 0,05).

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

‡ SCFA: Μικρής αλύσου λιπαρά οξέα =  $C_{4:0} + C_{6:0} + C_{8:0} + C_{10:0} + C_{11:0}$

§ MCFA: Μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα =  $C_{12:0} + C_{13:0} + C_{14:0} + C_{15:0} + C_{16:0}$

¶ LCFA: Μακράς αλύσου λιπαρά οξέα =  $C_{17:0} + C_{18:0} + C_{20:0} + C_{22:0} + C_{23:0} + C_{24:0}$

†† MUFA: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα =  $C_{14:1} + C_{15:1} + C_{16:1} + C_{17:1} + \text{cis-9 } C_{18:1} + C_{18:1 \text{ trans}} + C_{24:1}$

‡‡ PUFA: Πολυάκορεστα λιπαρά οξέα =  $C_{18:2 \text{ n-6 trans}} + C_{18:2 \text{ n-6 cis}} + C_{18:3 \text{ n-3}} + C_{18:2 \text{ c9, t11}} + C_{18:2 \text{ t10, c12}} + C_{20:3 \text{ n-6}} + C_{20:3 \text{ n-3}} + C_{22:5 \text{ n-6}} + C_{22:6 \text{ n-3}}$

§§ SFA: Κορεσμένα λιπαρά οξέα = SCFA + MCFA + LCFA

¶¶ UFA: Ακόρεστα λιπαρά οξέα = PUFA + MUFA

††† SFA/UFA:  $(SCFA + MCFA + LCFA) / (PUFA + MUFA)$

‡‡‡ AI: Αθηρωματικός δείκτης =  $(C_{12:0} + 4 * C_{14:0} + C_{16:0}) / (PUFA + MUFA)$

§§§ TI: Δείκτης θρόμβωσης =  $(C_{14:0} + C_{16:0} + C_{18:0}) / (0.5 * MUFA) + (0.5 * n-6 \text{ PUFA}) + (3 * n-3 \text{ PUFA}) + (n-3 \text{ PUFA} / n-6 \text{ PUFA})$

¶¶¶ HPI: Δείκτης υγείας =  $(n-6 \text{ PUFA} + n-3 \text{ PUFA} + MUFA) / (C_{12:0} + 4 * C_{14:0} + C_{16:0})$

Πίνακας 8.12. Προφίλ μεμονωμένων λιπαρών οξέων, ομαδοποιημένων τιμών, του λόγου κορεσμένα/ακόρεστα λιπαρά οξέα, του αθηρωματικού δείκτη καθώς και των δεικτών της Δ-9 αφυδρογονάσης του γάλακτος των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

Μικροφύκος XZ/ΣZ	Διατροφή (Δ)				SEM	Χρόνος δειγματοληψίας (X)			Επίδραση		
	A		B			SEM	3 <sup>η</sup> εβδομάδα	6 <sup>η</sup> εβδομάδα	Δ	X	ΔxX
	20g	40g	60/40	40/60							
C4:0	2,82	2,77	2,78	2,39	0,106	2,74	2,79	0,060	NS	NS	*
C6:0	3,29	3,19	3,22	3,98	0,331	3,54	3,27	0,190	NS	NS	NS
C8:0	3,76	3,77	3,70	3,91	0,145	3,80	3,77	0,080	NS	NS	NS
C10:0	11,71	11,75	11,62	11,79	0,432	11,98 <sup>a</sup>	11,46 <sup>b</sup>	0,252	NS	*	*
C11:0	0,18 <sup>a</sup>	0,13 <sup>ab</sup>	0,16 <sup>ab</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,026	0,14	0,1	0,013	*	NS	NS
C12:0	4,62	4,68	4,72	4,34	0,283	4,76 <sup>a</sup>	4,56 <sup>b</sup>	0,156	NS	*	NS
C13:0	0,05 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,02 <sup>ab</sup>	0,01	0,03	0,02	0,007	*	NS	NS
C14:0	10,15	9,79	10,43	9,55	0,331	10,04	9,92	0,183	NS	NS	NS
C14:1	0,31	0,28	0,30	0,28	0,016	0,30 <sup>a</sup>	0,27 <sup>b</sup>	0,010	NS	*	NS
C15:0	0,95 <sup>a</sup>	0,76 <sup>b</sup>	0,99 <sup>a</sup>	0,78 <sup>b</sup>	0,040	0,89 <sup>a</sup>	0,85 <sup>b</sup>	0,021	**	**	NS
C15:1	0,28 <sup>a</sup>	0,24 <sup>ab</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,025	0,23 <sup>a</sup>	0,20 <sup>b</sup>	0,015	**	*	*
C16:0	28,43 <sup>ab</sup>	27,36 <sup>a</sup>	29,70 <sup>b</sup>	28,62 <sup>ab</sup>	0,717	28,45	28,60	0,390	*	NS	NS
C16:1	0,42 <sup>a</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,59 <sup>b</sup>	0,52 <sup>b</sup>	0,028	0,41 <sup>a</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,018	**	***	NS

Αποτελέσματα

	20g		40g		SEM	3 <sup>η</sup> εβδομάδα	6 <sup>η</sup> εβδομάδα	SEM	Δ	X	ΔxX
	60/40	40/60	60/40	40/60							
C17:1	0,14 <sup>a</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,017	0,08 <sup>a</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,010	**	**	*
C18:0	8,09 <sup>b</sup>	7,87 <sup>b</sup>	5,78 <sup>ab</sup>	3,74 <sup>a</sup>	1,080	6,28	6,32	0,584	**	NS	NS
C18:1 Σ <i>trans</i>	5,06 <sup>a</sup>	7,83 <sup>a</sup>	7,18 <sup>a</sup>	12,05 <sup>b</sup>	1,347	7,84	8,23	0,700	**	NS	NS
<i>cis</i> -9 C18:1	13,83 <sup>a</sup>	13,14 <sup>a</sup>	11,27 <sup>ab</sup>	9,59 <sup>b</sup>	0,955	11,93	11,98	0,525	**	NS	*
C18:2 n-6 <i>trans</i>	0,42	0,40	0,41	0,35	0,036	0,41	0,38	0,019	NS	NS	NS
C18:2 n-6 <i>cis</i>	2,18 <sup>b</sup>	2,60 <sup>a</sup>	1,94 <sup>bc</sup>	1,88 <sup>c</sup>	0,103	2,10	2,21	0,065	*	NS	*
C18:3 n-3	0,42 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,46 <sup>a</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,038	0,35	0,34	0,020	**	NS	*
C20:0	0,13 <sup>a</sup>	0,11 <sup>ab</sup>	0,11 <sup>ab</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,008	0,11	0,12	0,005	*	NS	NS
C22:0	0,07 <sup>a</sup>	0,05 <sup>ab</sup>	0,03 <sup>ab</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,015	0,05 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,010	*	*	*
C20:3 n-3	0,30 <sup>b</sup>	0,31 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,48 <sup>a</sup>	0,025	0,34	0,38	0,014	***	***	NS
C20:4	0,20 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	0,58 <sup>b</sup>	0,72 <sup>c</sup>	0,038	0,34 <sup>a</sup>	0,50 <sup>b</sup>	0,023	***	***	NS
C20:5	0,00 <sup>a</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,02 <sup>ab</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,015	0,042 <sup>a</sup>	0,020 <sup>b</sup>	0,009	*	*	NS
C24:1	0,20 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,51 <sup>c</sup>	0,021	0,30 <sup>a</sup>	0,35 <sup>b</sup>	0,011	***	***	NS
C22:6 n-3	0,90 <sup>a</sup>	0,83 <sup>a</sup>	1,23 <sup>b</sup>	1,51 <sup>c</sup>	0,060	1,06 <sup>a</sup>	1,17 <sup>b</sup>	0,033	*	***	NS
C18:2 e9, t11	0,98 <sup>ba</sup>	0,78 <sup>b</sup>	1,47 <sup>ca</sup>	1,74 <sup>a</sup>	0,216	1,17	1,31	0,116	*	NS	NS
C18:2 t10, c12	0,02 <sup>b</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,11 <sup>a</sup>	0,020	0,07	0,06	0,011	*	NS	NS
C22:5 n-6	0,16 <sup>a</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0,28 <sup>b</sup>	0,34 <sup>b</sup>	0,021	0,22 <sup>a</sup>	0,27 <sup>b</sup>	0,012	***	***	NS
SCFA‡	21,70	21,60	21,48	22,46	0,728	22,21 <sup>a</sup>	21,41 <sup>b</sup>	0,400	NS	*	NS

Αποτελέσματα

	20g		40g		SEM	3 <sup>η</sup> εβδομάδα	6 <sup>η</sup> εβδομάδα	SEM	Δ	X	ΔxX
	60/40	40/60	60/40	40/60							
<b>MCFA§</b>	44,20 <sup>ab</sup>	42,59 <sup>b</sup>	45,84 <sup>a</sup>	43,40 <sup>b</sup>	0,854	44,17	43,84	0,496	*	NS	NS
<b>LCFA¶</b>	8,23 <sup>a</sup>	7,99 <sup>a</sup>	5,89 <sup>ab</sup>	3,57 <sup>b</sup>	1,087	6,40	6,44	0,586	**	NS	NS
<b>MUFA††</b>	20,23 <sup>a</sup>	22,13 <sup>ab</sup>	19,94 <sup>a</sup>	23,13 <sup>b</sup>	0,921	21,08	21,63	0,520	*	NS	NS
<b>PUFA‡‡</b>	5,58 <sup>a</sup>	5,64 <sup>a</sup>	6,82 <sup>b</sup>	7,44 <sup>b</sup>	0,248	6,09 <sup>a</sup>	6,65 <sup>b</sup>	0,146	**	***	NS
<b>SFA§§</b>	74,12 <sup>a</sup>	72,18 <sup>ab</sup>	73,21 <sup>a</sup>	69,43 <sup>b</sup>	1,065	72,78	71,69	0,606	*	NS	NS
<b>UFA¶¶</b>	25,81 <sup>a</sup>	27,77 <sup>ab</sup>	26,76 <sup>a</sup>	30,56 <sup>b</sup>	1,068	27,17 <sup>a</sup>	28,28 <sup>b</sup>	0,607	*	*	NS
<b>SFA/UFA†††</b>	2,94 <sup>a</sup>	2,65 <sup>ab</sup>	2,87 <sup>a</sup>	2,32 <sup>b</sup>	0,146	2,76 <sup>a</sup>	2,63 <sup>b</sup>	0,081	*	*	NS
<b>AI‡‡‡</b>	2,92 <sup>a</sup>	2,61 <sup>ab</sup>	2,98 <sup>a</sup>	2,38 <sup>b</sup>	0,154	2,78	2,66	0,086	*	NS	NS
<b>ω6</b>	2,98	3,44	3,27	3,39	0,135	3,13 <sup>a</sup>	3,41 <sup>b</sup>	0,083	NS	**	NS
<b>ω3</b>	1,62 <sup>a</sup>	1,43 <sup>ab</sup>	2,07 <sup>b</sup>	2,31 <sup>b</sup>	0,081	1,79 <sup>a</sup>	1,92 <sup>b</sup>	0,044	***	**	***
<b>ω6/ω3</b>	1,86 <sup>b</sup>	2,60 <sup>a</sup>	1,59 <sup>b</sup>	1,50 <sup>b</sup>	0,162	1,79	1,98	0,100	***	NS	NS
<b>TI§§§</b>	1,61 <sup>a</sup>	1,63 <sup>a</sup>	1,46 <sup>b</sup>	1,34 <sup>c</sup>	0,040	1,52	1,51	0,022	***	NS	**
<b>HPI¶¶¶</b>	0,66 <sup>a</sup>	0,67 <sup>a</sup>	0,67 <sup>ab</sup>	0,69 <sup>b</sup>	0,007	0,67	0,68	0,004	*	NS	NS
<b>Δ<sup>9</sup> αφυδρογονάση</b>											
<b>C<sub>14:1</sub> / C<sub>14:0</sub></b>	0,031	0,028	0,028	0,029	0,002	0,031 <sup>a</sup>	0,028 <sup>b</sup>	0,001	NS	*	*
<b>C<sub>16:1</sub> / C<sub>16:0</sub></b>	0,015 <sup>ac</sup>	0,014 <sup>a</sup>	0,020 <sup>b</sup>	0,018 <sup>cb</sup>	0,001	0,014	0,019	0,001	*	***	NS
<b>cis-9 C<sub>18:1</sub> / C<sub>18:0</sub></b>	1,97 <sup>a</sup>	2,26 <sup>a</sup>	2,74 <sup>ab</sup>	3,36 <sup>b</sup>	0,308	2,62	2,54	0,163	*	NS	NS



† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

‡ SCFA: Μικρής αλύσου λιπαρά οξέα =  $C_{4:0} + C_{6:0} + C_{8:0} + C_{10:0} + C_{11:0}$

§ MCFA: Μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα =  $C_{12:0} + C_{13:0} + C_{14:0} + C_{15:0} + C_{16:0}$

¶ LCFA: Μακράς αλύσου λιπαρά οξέα =  $C_{17:0} + C_{18:0} + C_{20:0} + C_{22:0} + C_{23:0} + C_{24:0}$

†† MUFA: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα =  $C_{14:1} + C_{15:1} + C_{16:1} + C_{17:1} + \text{cis-9 } C_{18:1} + C_{18:1 \text{ trans}} + C_{24:1}$

‡‡ PUFA: Πολυάκορεστα λιπαρά οξέα =  $C_{18:2 \text{ n-6 trans}} + C_{18:2 \text{ n-6 cis}} + C_{18:3 \text{ n-3}} + C_{18:2 \text{ c9, t11}} + C_{18:2 \text{ t10, c12}} + C_{20:3 \text{ n-6}} + C_{20:3 \text{ n-3}} + C_{22:5 \text{ n-6}} + C_{22:6 \text{ n-3}}$

§§ SFA: Κορεσμένα λιπαρά οξέα = SCFA + MCFA + LCFA

¶¶ UFA: Ακόρεστα λιπαρά οξέα = PUFA + MUFA

††† SFA/UFA:  $(SCFA + MCFA + LCFA) / (PUFA + MUFA)$

‡‡‡ AI: Αθηρωματικός δείκτης =  $(C_{12:0} + 4 * C_{14:0} + C_{16:0}) / (PUFA + MUFA)$

§§§ TI: Δείκτης θρόμβωσης =  $(C_{14:0} + C_{16:0} + C_{18:0}) / (0.5 * MUFA) + (0.5 * n-6 \text{ PUFA}) + (3 * n-3 \text{ PUFA}) + (n-3 \text{ PUFA} / n-6 \text{ PUFA})$

¶¶¶ HPI: Δείκτης υγείας =  $(n-6 \text{ PUFA} + n-3 \text{ PUFA} + MUFA) / (C_{12:0} + 4 * C_{14:0} + C_{16:0})$

Αποτελέσματα

Πίνακας 8.13. Συσχέτιση κατά Pearson των λιπαρών οξέων του γάλακτος και της ημερήσιας παραγωγής λίπους του γάλακτος.

	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C15:1	C16:0	C16:1	C17:1	C18:0	C18:1 t	C18:1 c	C18:2 n-6c	C18:2 n-6t	C18:3 n-3	CLA1	CLA2	C22:0	C20:3 n-3	ARA	DPA	DHA	
C4:0	1																									
C6:0	,094	1																								
C8:0	,182	,181	1																							
C10:0	-,254*	,034	,780**	1																						
C12:0	-,492**	-,092	,380**	,776**	1																					
C14:0	-,362**	-,281**	-,045	,413**	,723**	1																				
C14:1	,238*	-,140	-,071	-,178	-,057	,020	1																			
C15:0	,045	-,171	-,249*	-,165	,127	,355**	,622**	1																		
C15:1	,088	-,139	-,306**	-,318**	-,073	,083	,529**	,430**	1																	
C16:0	-,071	-,200	-,131	,083	-,099	,080	-,281**	-,121	-,452**	1																
C16:1	,100	-,047	,043	-,127	-,097	-,106	,053	,196	-,127	-,025	1															
C17:1	,068	,007	-,379**	-,399**	-,197	-,032	,345**	,475**	,479**	-,160	-,112	1														
C18:0	,005	-,220*	-,549**	-,492**	-,222*	,058	,225*	,327**	,558**	-,284**	-,284**	,418**	1													
C18:1 trans	,090	,161	,431**	,241*	-,082	-,382**	-,219*	-,506**	-,484**	,161	,243*	-,484**	-,874**	1												
C18:1 cis	,139	-,169	-,540**	-,642**	-,331**	-,100	,313**	,381**	,612**	-,490**	-,111	,627**	,850**	-,736**	1											
C18:2 n-6 t	,007	-,137	-,397**	-,356**	-,137	,122	,322**	,505**	,477**	-,258*	,028	,228*	,522**	-,470**	,487**	1										
C18:2 n-6 c	-,014	-,110	-,299**	-,401**	-,224*	-,123	,019	-,093	,326**	-,473**	-,204	,241*	,466**	-,293**	,588**	,207	1									
C18:3 n-3	,042	-,119	-,396**	-,339**	-,022	,268*	,514**	,860**	,447**	-,151	,118	,503**	,521**	-,641**	,526**	,520**	,040	1								
CLA1	,041	,181	,269*	,145	-,059	-,199	-,130	-,225*	-,438**	,246*	,437**	-,266*	-,732**	,636**	-,569**	-,317**	-,390**	-,377**	1							

Αποτελέσματα

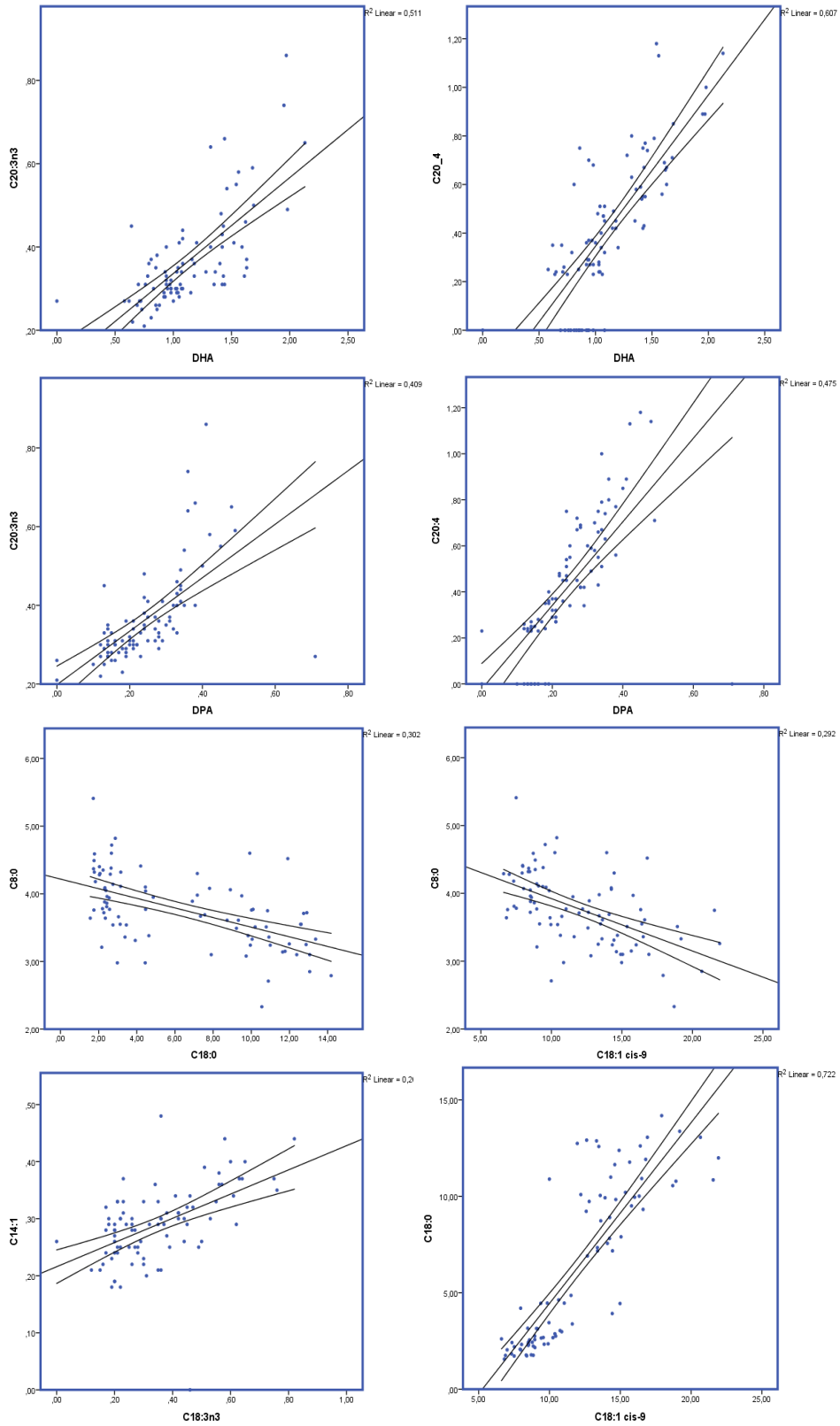
	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C15:1	C16:0	C16:1	C17:1	C18:0	C18:1 t	C18:1 c	C18:2 n-6c	C18:2 n-6t	C18:3 n-3	CLA1	CLA2	C22:0	C20:3 n-3	ARA	DPA	DHA
<b>CLA2</b>	,182	,272*	,443**	,189	-,113	-,448**	-,136	-,467**	-,351**	-,027	,194	-,339**	-,675**	,818**	-,544**	-,448**	-,144	-,577**	,474**	1					
<b>C22:0</b>	,036	,058	-,395**	-,399**	-,252*	-,123	,146	,154	,375**	-,161	-,384**	,413**	,589**	-,488**	,543**	,195	,264*	,293**	-,430**	-,374**	1				
<b>C20:3 n-3</b>	-,306**	-,057	-,038	-,046	,040	-,072	-,172	-,195	-,348**	,064	,349**	-,268*	-,408**	,424**	-,309**	-,154	-,136	-,160	,369**	,238*	-,285**	1			
<b>ARA</b>	-,181	,032	,068	-,039	-,071	-,122	-,111	-,088	-,323**	,119	,526**	-,374**	-,428**	,428**	-,389**	-,140	-,328**	-,017	,458**	,240*	-,365**	,728**	1		
<b>DPA</b>	-,032	,006	-,023	-,154	-,162	-,144	-,077	-,063	-,310**	-,013	,372**	-,375**	-,301**	,399**	-,256*	,073	-,120	-,043	,311**	,252*	-,324**	,640**	,689**	1	
<b>DHA</b>	-,157	-,011	-,034	-,123	-,108	-,067	-,067	-,118	-,251*	,069	,352**	-,335**	-,344**	,390**	-,330**	-,130	-,216*	-,003	,356**	,279**	-,204	,715**	,779**	,550**	1
<b>Λίπος</b>	,191	-,076	,141	,142	,033	,158	,136	,174	,310**	-,014	-,214*	,025	,140	-,152	,028	,163	-,029	,177	-,258*	-,095	-,006	-,484**	-,203	-,265*	-,204

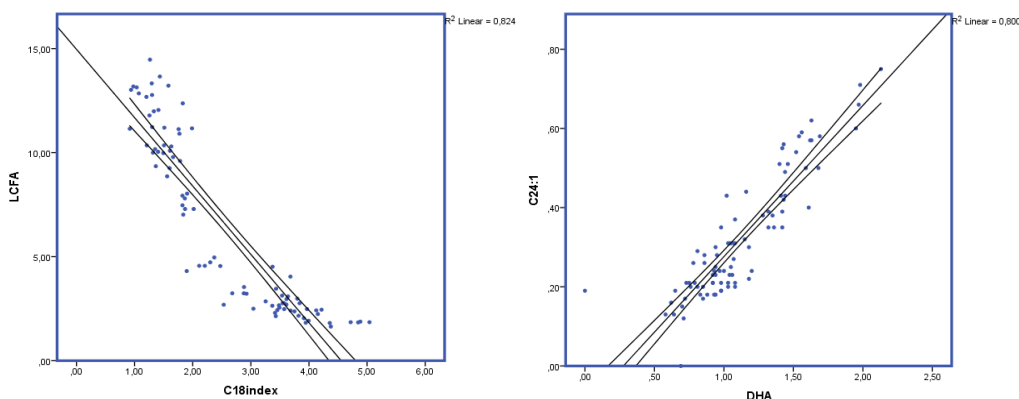
\*: Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο 0,05

\*\* : Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο 0,01

CLA1= C<sub>18:2 c9, t11</sub>

CLA2= C<sub>18:2 t10, c12</sub>



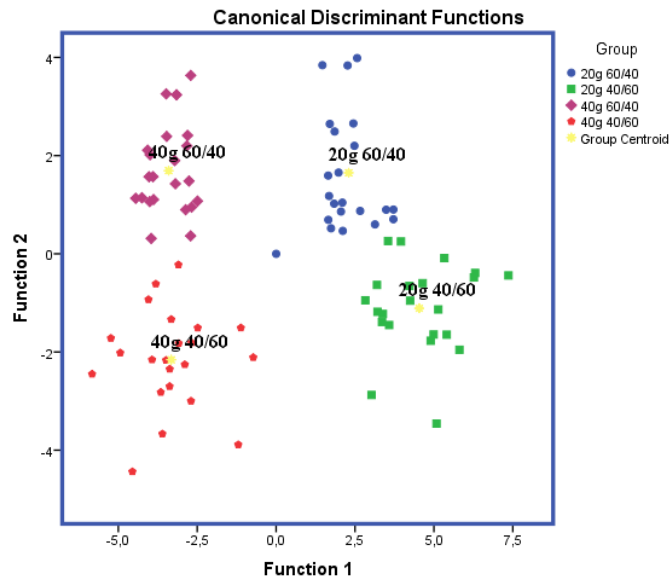


Σχήμα 8.7. Απεικόνιση κατά Pearson των σημαντικότερων συσχετίσεων των λιπαρών οξέων του γάλακτος.

Οι συσχετίσεις των λιπαρών οξέων του γάλακτος καθώς και αυτών της ημερήσιας παραγωγής λίπους σε γραμμάρια παρουσιάζονται στο Πίνακα 8.13 με τις σημαντικότερες (με βάση το  $R^2$ ) να απεικονίζονται στο Σχήμα 8.7. Συγκεκριμένα, η παραγωγή λίπους συσχετίστηκε θετικά με τη συγκέντρωση του  $C_{15:1}$ , ενώ αρνητικά με αυτή του  $C_{16:1}$ . Αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης, μεταξύ της ημερήσιας παραγωγής λίπους και της συγκέντρωσης του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος, του  $\alpha$ -διομο λινολενικού και του εικοσιδιπεντανοϊκού οξέως. Το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ συσχετίστηκε σημαντικά, θετικά, με το αραχιδονικό, το  $\alpha$ -διομο λινολενικό και το νευρονικό οξύ ( $C_{24:1}$ ). Επιπλέον, το εικοσιδιπεντανοϊκό οξύ συσχετίστηκε θετικά με τη συγκέντρωση του  $\alpha$ -διομο λινολενικού και του νευρονικού οξέος. Το στεατικό και το ελαϊκό οξύ συσχετίστηκαν αρνητικά ( $p < 0,01$ ) με το καπριλικό οξύ ( $C_{8:0}$ ). Το μυριστολεϊκό οξύ συσχετίστηκε θετικά με τη συγκέντρωση του  $\alpha$ -λινολενικού οξέος. Το ελαϊκό και το στεατικό οξύ παρουσίασαν σημαντική, θετική συσχέτιση, ενώ τα μακράς αλυσού λιπαρά οξέα συσχετίστηκαν αρνητικά με το δείκτη ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης του  $C_{18}$ .

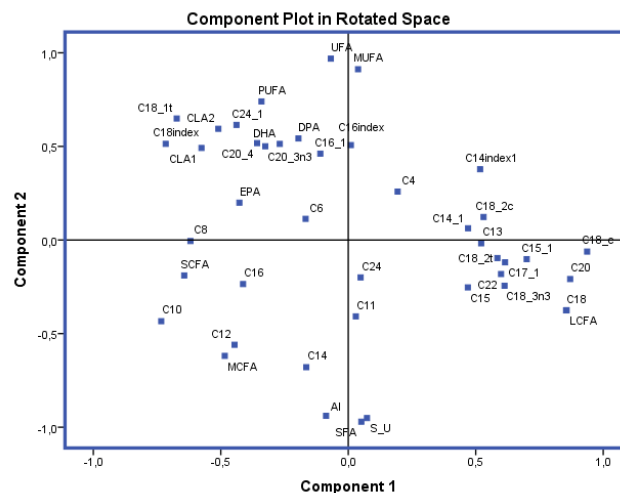
Στα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων γάλακτος εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (Σχήμα 8.8). Πενήντα-τέσσερις μεταβλητές για το γάλα εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα ογδόντα-οχτώ δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 100%. Τα λιπαρά οξέα τα οποία συνεισέφεραν περισσότερο στο διαχωρισμό ήταν: τα  $C_{24:1}$ , DHA, PUFA, DPA,  $C_{18:2n-6}$  cis,  $C_{16:1}$ ,  $C_{20:4}$  και τα CLA για τα δείγματα γάλακτος.

Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική ( $P < 0,001$ ) με τιμή Wilks' lambda 0,009 για το Function 1 και τιμή Wilks' lambda 0,121 για το Function 2..



Σχήμα 8.8. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (A, B, Γ και Δ) σύμφωνα με τα μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης.

Στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος, εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό δείκτη και την ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης των δυο ημερομηνιών δειγματοληψίας για τα δείγματα των αιγών (Σχήμα 8.9). Η τιμή KMO προσδιορίστηκε στα 0,539, δείχνοντας την ύπαρξη μεταβλητών με αρνητική συσχέτιση. Ωστόσο, από φυσιολογικής άποψης, το αποτέλεσμα αυτό δεν αποτελεί στατιστική αστοχία, αλλά μέρος των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 8.9. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για μεμονωμένα και ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα του γάλακτος, τον αθηρωματικό, θρομβωτικό και δείκτη υγείας και την ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης των δειγμάτων του γάλακτος.

## 8.5. Αντιοξειδωτικό σύστημα

### 8.5.1. Αντιοξειδωτικό σύστημα αίματος

Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων του αίματος, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και οι δείκτες της οξειδωτικής κατάστασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.14. Η δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) αυξήθηκε σημαντικά ( $p < 0,05$ ) στις ομάδες **F** και **A** με την υψηλή συμμετοχή του μικροφύκους στο σιτηρέσιο των αιγών. Η δραστηριότητα της καταλάσης μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά στην ομάδα **F** με λόγο  $XZ/\Sigma Z=60/40$  και 40 g ενσωμάτωσης του μικροφύκους κατά 46% σε σχέση με την ομάδα **B** με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$  και 20 g.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS, παρουσίασε σημαντική αύξηση στην ομάδα **F** σε σχέση με την ομάδα **A**, δηλαδή μεταξύ των 20 και των 40 g ενσωμάτωσης του μικροφύκους και λόγο  $XZ/\Sigma Z=60/40$  και για τις δυο ομάδες. Αντίθετα, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP, παρουσίασε σημαντική μείωση στην ομάδα **F** σε σχέση με τις ομάδες **A** και **B** των 20 g του μικροφύκους.

Η συγκέντρωση της μηλονική αλδεϋδης (MDA) αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα **F** σε σχέση με την ομάδα **A**, ενώ στην ομάδα **A** παρουσίασε μέγιστη τιμή στα 2,28  $\mu\text{M}$  η οποία διέφερε σημαντικά με όλες τις άλλες ομάδες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC) του πλάσματος του αίματος παρουσίασαν σημαντική αύξηση στις ομάδες των 40 g του μικροφύκους (**F** και **A**) σε σχέση με αυτές των 20 g (**A** και **B**).

Πίνακας 8.14. Δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), ολική αντιοξειδωτική κατάσταση και οξειδωτικοί δείκτες στο πλάσμα του αίματος των αιγών που διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (A, B, Γ και Δ) σε δυο δειγματοληψίες.

	Διατροφή (Δ)				SEM <sup>†</sup>	Χρόνος δειγματοληψίας			Επίδραση		
	20g		40g			Εβδομάδα			Δ	X	ΔxX
	60/40	40/60	60/40	40/60		3 <sup>η</sup>	6 <sup>η</sup>	SEM <sup>†</sup>			
A	B	Γ	Δ								
<sup>3</sup> GSTs	0,235	0,261	0,262	0,273	0,016	0,242 <sup>a</sup>	0,273 <sup>b</sup>	0,010	NS	**	NS
<sup>4</sup> GR	0,062	0,060	0,068	0,059	0,005	0,060	0,065	0,002	NS	NS	NS
<sup>5</sup> SOD	12,71 <sup>a</sup>	13,08 <sup>a</sup>	14,47 <sup>b</sup>	15,65 <sup>b</sup>	0,367	13,11 <sup>a</sup>	14,85 <sup>b</sup>	0,203	**	***	**
<sup>6</sup> GSH-Px	0,107	0,108	0,102	0,106	0,006	0,104	0,180	0,003	NS	NS	***
<sup>7</sup> CAT	6,45 <sup>ab</sup>	8,03 <sup>a</sup>	4,33 <sup>b</sup>	6,73 <sup>ab</sup>	0,983	5,88	6,89	0,585	*	NS	***
<sup>8</sup> ABTS	39,64 <sup>a</sup>	40,55 <sup>ab</sup>	42,32 <sup>b</sup>	39,74 <sup>ab</sup>	0,671	41,52 <sup>a</sup>	39,61 <sup>b</sup>	0,455	*	**	***
<sup>9</sup> FRAP	1,09 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	0,89 <sup>b</sup>	1,02 <sup>ab</sup>	0,072	1,03	1,07	0,042	*	NS	*
<sup>10</sup> MDA	1,07 <sup>a</sup>	1,38 <sup>ab</sup>	1,60 <sup>b</sup>	2,28 <sup>c</sup>	0,149	1,57	1,60	0,083	***	NS	***
<sup>11</sup> PC	3,31 <sup>a</sup>	3,57 <sup>a</sup>	4,21 <sup>b</sup>	4,21 <sup>b</sup>	0,138	2,52 <sup>a</sup>	4,14 <sup>b</sup>	0,095	***	***	NS

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

<sup>3</sup>GST: Μεταφοράση της γλουταθειόνης

<sup>4</sup>GR: Αναγωγή της γλουταθειόνης

<sup>5</sup>SOD: Δεσμουτάση του υπεροξειδίου



<sup>6</sup>GSH-Px: Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

<sup>7</sup>CAT: Κατάλαση

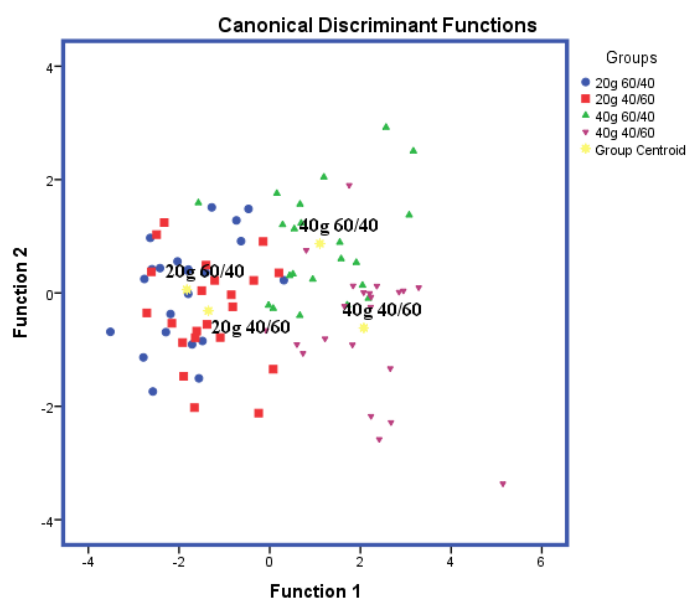
<sup>8</sup>ABTS: 2,2'-azino-di (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (αναστολή %)

<sup>9</sup>FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma (μM ασκορβικού οξέος)

<sup>10</sup>MDA: Μηλονική αλδεΐδη (μM MDA)

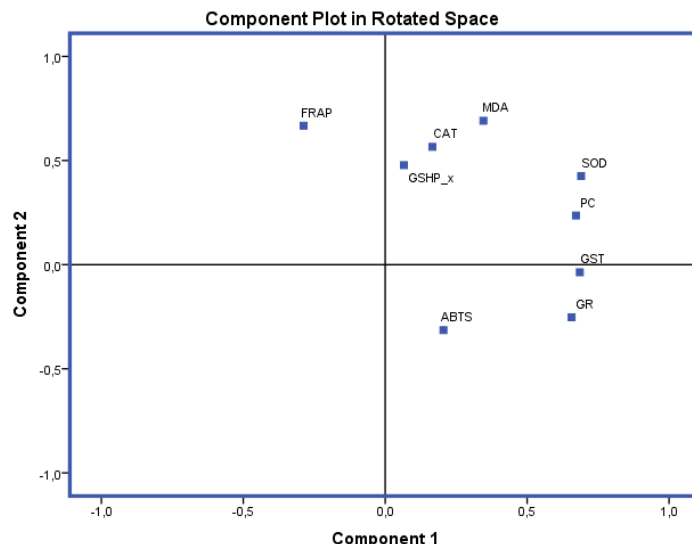
<sup>11</sup>PC: Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/ml)

Στα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού συστήματος του πλάσματος του αίματος εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (Σχήμα 8.10). Εννέα μεταβλητές για το πλάσμα του αίματος εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα ογδόντα-οχτώ δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 72,7% για το πλάσμα του αίματος. Οι μεταβλητές οι οποίες συνέβαλαν περισσότερο στο διαχωρισμό ήταν η SOD και η MDA. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο για το Function 1 ( $P < 0,001$ ) με τιμή Wilks' lambda 0,178.



Σχήμα 8.10. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Α, Β, Γ και Δ) σύμφωνα με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες του αίματος.

Στα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού συστήματος του πλάσματος του αίματος, εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες όλων των διατροφικών επεμβάσεων (Σχήμα 8.11). Η τιμή KMO προσδιορίστηκε στα 0,518.



Σχήμα 8.11. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων πλάσματος αίματος όλων των διατροφικών επεμβάσεων.

### 8.5.2. Αντιοξειδωτικό σύστημα γάλακτος

Η δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων του γάλακτος, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και οι δείκτες της οξειδωτικής κατάστασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.15. Η δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) μειώθηκε σημαντικά ( $p < 0,05$ ) στις ομάδες **Γ** και **Δ** με την υψηλή συμμετοχή του μικροφύκους στο σιτηρέσιο των αιγών σε σχέση με αυτή στις ομάδες **Α** και **Β**.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS, παρουσίασε σημαντική μείωση στην ομάδα **Δ** σε σχέση με την ομάδα **Β**, δηλαδή μεταξύ των 20 και των 40 g του μικροφύκους και λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$  και για τις δύο ομάδες. Παρομοίως, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP, παρουσίασε σημαντική μείωση στις ομάδες **Γ** και **Δ** σε σχέση με τις ομάδες **Α** και **Β** των 20 g του μικροφύκους.

Η συγκέντρωση της μηλονικής αλδεϋδης (MDA) αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες **Γ** και **Δ** σε σχέση με τις ομάδες **Α** και **Β**. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC) του γάλακτος παρουσίασαν σημαντική αύξηση στις ομάδες **Β**, **Γ** και **Δ** σε σχέση τη συγκέντρωσή τους στην ομάδα **Α** των 20 g και λόγο  $XZ/\Sigma Z=60/40$ .

Πίνακας 8.15. Δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), ολική αντιοξειδωτική κατάσταση και οξειδωτικοί δείκτες στο γάλα των αιγών που διατρέφονταν με τα τέσσερα πειραματικά σιτηρέσια (A, B, Γ και Δ) σε δύο δειγματοληψίες.

	Διατροφή (Δ)				SEM <sup>1</sup>	Χρόνος δειγματοληψίας			Επίδραση		
	20g		40g			Εβδομάδα		SEM <sup>1</sup>	Δ	X	ΔxX
	60/40	40/60	60/40	40/60		3 <sup>η</sup>	6 <sup>η</sup>				
A	B	Γ	Δ								
<sup>3</sup> SOD	38,17 <sup>a</sup>	35,02 <sup>a</sup>	28,80 <sup>b</sup>	29,37 <sup>b</sup>	0,198	32,21	33,47	1,198	**	NS	***
<sup>2</sup> LPO	0,79	0,73	0,83	0,81	0,048	0,79	0,78	0,027	NS	NS	NS
<sup>4</sup> ABTS	13,57 <sup>ab</sup>	15,27 <sup>a</sup>	13,91 <sup>ab</sup>	12,68 <sup>b</sup>	0,684	15,76 <sup>a</sup>	12,01 <sup>b</sup>	0,428	*	***	NS
<sup>5</sup> FRAP	1,68 <sup>a</sup>	1,64 <sup>a</sup>	1,23 <sup>b</sup>	1,23 <sup>b</sup>	0,077	1,47	1,37	0,047	***	NS	***
<sup>6</sup> MDA	0,40 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,79 <sup>b</sup>	0,77 <sup>b</sup>	0,061	0,60	0,60	0,036	***	NS	**
<sup>7</sup> PC	2,65 <sup>a</sup>	3,21 <sup>b</sup>	3,19 <sup>b</sup>	3,36 <sup>b</sup>	0,148	3,00	3,16	0,098	*	NS	***

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

<sup>1</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

<sup>2</sup>LPO: Λακτοϋπεροξειδάση

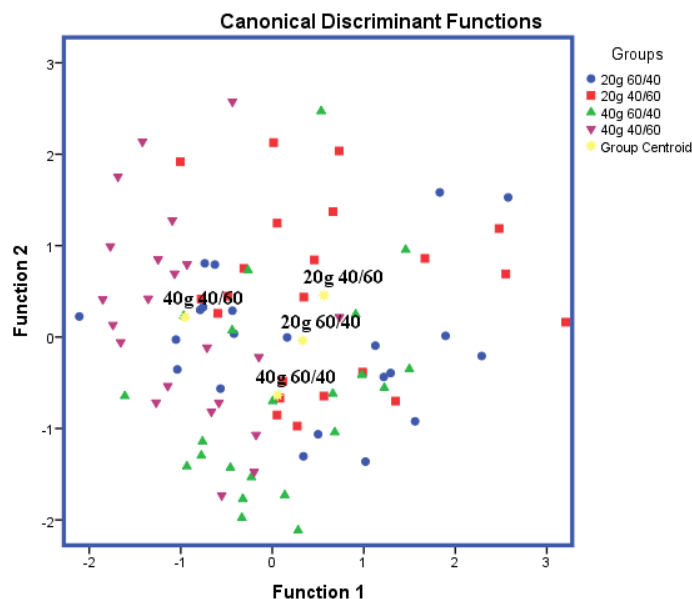
<sup>3</sup>SOD: Δεσμουτάση του υπεροξειδίου

<sup>4</sup>ABTS: 2,2'-azino-di (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (αναστολή %)

<sup>5</sup>FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma ( $\mu\text{M}$  ασκορβικού οξέος)

<sup>6</sup>MDA: Μηλονική αλδεϋδη ( $\mu\text{M}$  MDA)

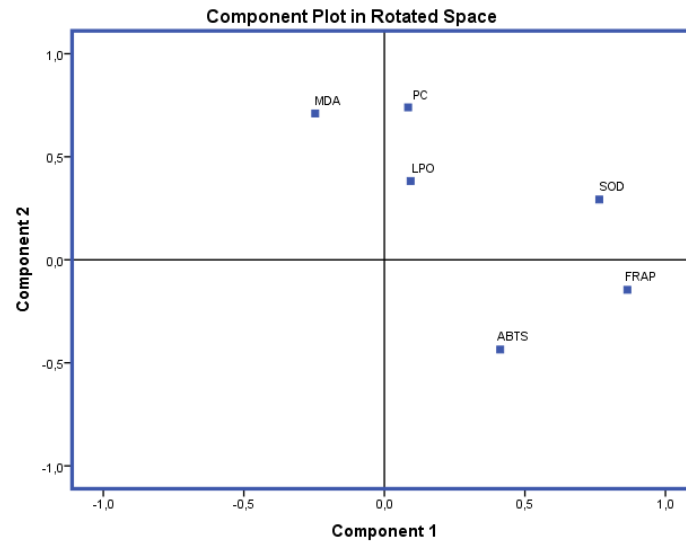
<sup>7</sup>PC: Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/ml)



Σχήμα 8.12. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Α, Β, Γ και Δ) σύμφωνα με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες του γάλακτος.

Επιπλέον, στα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού συστήματος του γάλακτος εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (Σχήμα 8.12). Έξι μεταβλητές για τα δείγματα γάλακτος εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα ογδόντα-οχτώ δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 52,3%. Οι μεταβλητές οι οποίες συνέβαλαν περισσότερο στο διαχωρισμό ήταν οι ABTS και οι FRAP. Η τιμή P-value ήταν σημαντική ( $P < 0,001$ ). Ωστόσο, η τιμή Wilks' lambda (0,558) δεν ανταποκρίθηκε σε ταξινομημένες μεταβλητές.

Στα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού συστήματος του γάλακτος, εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών στα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες στα δείγματα όλων των διατροφικών επεμβάσεων (Σχήμα 8.13). Η τιμή KMO προσδιοριστικέ στα 0,499.



Σχήμα 8.13. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τους οξειδωτικούς δείκτες των δειγμάτων του γάλακτος των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων.

## 8.6. Μικροοργανισμοί στη μεγάλη κοιλία

Στον Πίνακα 8.16, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής σάρωσης των DNA που απομονώθηκαν από το υγρό της μεγάλης κοιλίας. Καθώς ανιχνεύτηκε μεγάλος αριθμός ειδών, θα αναφερθούν αυτά με τη μεγαλύτερη συμμετοχή και αυτά με το σημαντικότερο ρόλο για τη συγκεκριμένη μελέτη. Στο φύλο *Bacteroidetes* παρουσιάστηκε αύξηση στις ομάδες των 40 g σε σχέση με αυτές των 20 g, καθώς και αύξηση υπέρ του λόγου XZ/ΣZ=40/60 σε σχέση με τις ομάδες που είχαν λόγο XZ/ΣZ=60/40. Ωστόσο, τα βακτήρια του γένους *Prevotella* παρουσίασαν μείωση στην ομάδα **B** σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Τα βακτήρια που ανήκουν στο φύλο *Firmicutes* παρουσίασαν μείωση στην ομάδα **Γ** σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Η κλάση των *Clostridia* παρουσίασε μείωση του πληθυσμού τους από την ομάδα **A** προς την ομάδα **Δ**. Η οικογένεια των *Clostridiaceae* ακολούθησε την τάση των *Clostridia*, ενώ η οικογένεια των *Lachnospiraceae* μειώθηκε όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν 40 g του μικροφύκου σε σχέση με αυτές των 20 g. Το γένος *Butyrivibrio* αυξήθηκε στην ομάδα **Δ** σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες, όπως και οι *Butyrivibrio fibrisolvens* αλλά με μικρότερη μεταξύ των ομάδων διαφορά. Οι *Butyrivibrio proteoclasticus* μειώθηκαν όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν 40 g του μικροφύκου σε σχέση με αυτές των 20 g, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν στις ομάδες με λόγο 40/60. Τα βακτήρια του είδους *Ruminococcus flavefaciens* μειώθηκαν στις ομάδες των 40g ενσωμάτωσης του μικροφύκου σε σχέση με αυτές των 20 g. Το φύλο των *Proteobacteria* μειώθηκε στις ομάδες με λόγο XZ/ΣZ=40/60 σε σχέση με αυτές των XZ/ΣZ=60/40. Τα βακτήρια της οικογένειας *Succinivibrionaceae* μειώθηκαν στις ομάδες με λόγο XZ/ΣZ=40/60 σε σχέση με αυτές των XZ/ΣZ=60/40. Τα βακτήρια του είδους *Ruminobacter amylophilus* μειώθηκαν στις ομάδες με λόγο 40/60 σε σχέση με αυτές των 60/40, όπως συνέβη και στην οικογένεια που ανήκουν. Σε αντίθεση, τα βακτήρια *Succinimonas amyolytica*, αυξήθηκαν στις ομάδες των 40g ενσωμάτωσης του μικροφύκου σε σχέση με αυτές των 20 g. Τέλος, η τάξη των *Selenomonadales* παρουσίασε αύξηση στις ομάδες με λόγο XZ/ΣZ=40/60 σε σχέση με αυτές των XZ/ΣZ=60/40.

Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 13, το ποσοστό των μη ταξινομημένων βακτηρίων στις ομάδες **A** και **B** προσδιορίστηκε στο 4% και 3% αντίστοιχα, ενώ στις ομάδες **Γ** και **Δ**, στο 6% και 9% αντίστοιχα.

Τέλος, η άλφα ποικιλομορφία (alpha diversity) δεν επηρεάστηκε μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης του μικροφύκου ενώ διπλασιάστηκε στις ομάδες που κατανάλωναν σιτηρέσιο πλούσιο σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές (Πίνακας 8.17).



Πίνακας 8.16. Μεταγονιδιωματική σάρωση των συνουθλευμάτων του γενωμικού DNA του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (% των χαρτογραφημένων διαβασμάτων).

Φύλο	Κλάση	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Είδος	20g		40g	
						60/40	40/60	60/40	40/60
						100	100	100	100
	<i>Actinobacteria</i>					0,51	1,79	1,6	0,87
		<i>Actinobacteria</i>				0,51	1,79	1,6	0,87
			<i>Actinomycetales</i>			0,17	1,39	0,39	0,16
				<i>Corynebacteriaceae</i>		M.A.	M.A.	0,15	M.A.
				<i>Dermacoccaceae</i>		0,17	1,39	0,24	0,16
			<i>Bifidobacteriales</i>			0,34	0,4	1,21	0,7
				<i>Bifidobacteriaceae</i>		0,34	0,4	1,21	0,7
				<i>Bifidobacterium</i>		M.A.	M.A.	0,1	M.A.
<i>Bacteroidetes</i>						29,66	33,75	34,08	36,5
	<i>Bacteroidia</i>					24,94	26,03	28,87	31,95
		<i>Bacteroidales</i>				24,94	26,03	28,87	31,95
				<i>Bacteroidaceae</i>		2,5	2,82	2,11	1,34
				<i>Marinilabiliaceae</i>		M.A.	M.A.	M.A.	0,23
				<i>Porphyromonadaceae</i>		4,35	3,9	2,82	2,03
				<i>Prevotellaceae</i>		16,68	18,08	23,14	28,35
					<i>Prevotella</i>	5,89	3,62	5,38	6,71
					<i>copri</i>	0,8	0,46	0,4	0,36
				<i>Rikenellaceae</i>		1,41	1,23	0,79	M.A.
	<i>Cytophagia</i>					0,15	0,22	M.A.	M.A.
		<i>Cytophagales</i>				0,15	0,22	M.A.	M.A.
				<i>Cytophagaceae</i>		0,15	0,22	M.A.	M.A.
	<i>Flavobacteriia</i>					3,86	7,16	2,58	2,59

Αποτελέσματα

Φύλο	Κλάση	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Είδος				
		<i>Flavobacteriales</i>				3,86	7,16	2,58	2,59
			<i>Flavobacteriaceae</i>			3,86	7,16	2,58	2,59
	<i>Sphingobacteriia</i>					0,71	0,34	2,63	1,96
		<i>Sphingobacteriales</i>				0,71	0,34	2,63	1,96
			<i>Sphingobacteriaceae</i>			0,71	0,34	2,63	1,96
<i>Firmicutes</i>						36,30	33,66	24,10	32,30
	<i>Bacilli</i>					1,36	2,58	0,83	0,83
		<i>Bacillales</i>				0,58	1,97	0,25	0,83
			<i>Bacillaceae</i>			0,32	1,13	0,13	0,16
			<i>Staphylococcaceae</i>			0,26	0,85	0,12	0,67
		<i>Lactobacillales</i>				0,78	0,61	0,58	M.A.
			<i>Carnobacteriaceae</i>			0,78	0,61	0,58	M.A.
	<i>Clostridia</i>					19,19	16,83	12,49	13,21
		<i>Clostridiales</i>				19,19	15,1	12,49	13,21
			<i>Christensenellaceae</i>			0,64	0,19	0,36	0,34
			<i>Clostridiaceae</i>			5,24	2,54	2,11	1,67
			<i>Clostridiales Family XI, Incertae Sedis</i>			1,27	0,64	0,64	0,44
			<i>Eubacteriaceae</i>			0,49	0,52	1,38	0,93
			<i>Gracilibacteraceae</i>			0,17	0,34	0,11	M.A.
			<i>Heliobacteriaceae</i>			M.A.	M.A.	M.A.	0,26
			<i>Lachnospiraceae</i>			6,04	6,01	3,92	4,86
				<i>Butyrivibrio</i>		1,1	0,25	0,66	2,39
				<i>fibrisolvens</i>		0,35	M.A.	0,27	0,44
				<i>proteoclasticus</i>		0,58	M.A.	0,17	M.A.
				<i>Coprococcus</i>		0,64	0,4	0,24	0,29
				<i>eutactus</i>		0,64	0,4	0,24	0,29
				<i>Lachnospira</i>		0,2	M.A.	M.A.	M.A.
				<i>[Ruminococcus]</i>		2,59	1,16	0,78	0,38

Αποτελέσματα

Φύλο	Κλάση	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Είδος				
					<i>gnavus</i>	0,17	0,15	M.A.	M.A.
			<i>Oscillospiraceae</i>			0,32	0,21	0,42	M.A.
			<i>Peptococcaceae</i>			0,17	M.A.	0,1	M.A.
			<i>Ruminococcaceae</i>			4,54	4,29	2,83	3,81
				<i>Faecalibacterium</i>		0,2	0,7	0,45	2,37
				<i>prausnitzii</i>		0,2	0,53	0,24	M.A.
				<i>Ruminococcus</i>		1,18	0,74	1,28	0,16
				<i>flavefaciens</i>		0,84	0,36	0,11	0,16
			<i>Veillonellaceae</i>			0,31	0,37	0,62	0,88
		<i>Thermoanaerobacterales</i>				M.A.	1,74	M.A.	M.A.
			<i>Thermoanaerobacterales Family III, Incertae Sedis</i>			M.A.	1,74	M.A.	M.A.
	<i>Erysipelotrichi</i>					1,55	0,47	0,54	0,61
		<i>Erysipelotrichales</i>				1,55	0,47	0,54	0,61
			<i>Erysipelotrichaceae</i>			1,55	0,47	0,54	0,61
	<i>Erysipelotrichia</i>					0,15	M.A.	0,41	0,93
		<i>Erysipelotrichales</i>				0,15	M.A.	0,41	0,93
			<i>Erysipelotrichaceae</i>			0,15	M.A.	0,41	0,93
	<i>Negativicutes</i>					14,04	13,78	9,83	16,71
		<i>Selenomonadales</i>				14,04	13,78	9,83	16,71
			<i>Acidaminococcaceae</i>			10,64	8,85	7,97	10,79
				<i>Succiniclaticum</i>		2,82	1,97	3,36	4,26
				<i>ruminis</i>		M.A.	M.A.	0,11	0,36
			<i>Veillonellaceae</i>			3,4	4,92	1,86	5,93
				<i>Anaerovibrio</i>		1,13	0,87	0,38	1,31
				<i>Selenomonas</i>		M.A.	M.A.	0,13	M.A.
<i>Proteobacteria</i>						33,34	29,93	38,82	27,25
	<i>Alphaproteobacteria</i>					0,61	M.A.	0,09	0,56

Αποτελέσματα

Φύλο	Κλάση	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Είδος				
		<i>Sphingomonadales</i>				0,61	M.A.	0,09	0,38
			<i>Erythrobacteraceae</i>			0,61	M.A.	0,09	0,38
		<i>Sneathiellales</i>				M.A.	M.A.	M.A.	0,18
			<i>Sneathiellaceae</i>			M.A.	M.A.	M.A.	0,18
	<i>Betaproteobacteria</i>					5,1	5,74	5,8	5,63
		<i>Burkholderiales</i>				5,1	5,74	5,69	5,47
			<i>Oxalobacteraceae</i>			5,1	5,74	5,69	5,47
		<i>Neisseriales</i>				M.A.	M.A.	M.A.	0,16
			<i>Neisseriaceae</i>			M.A.	M.A.	M.A.	0,16
		<i>Rhodocyclales</i>				M.A.	M.A.	0,11	M.A.
			<i>Rhodocyclaceae</i>			M.A.	M.A.	0,11	M.A.
	<i>Deltaproteobacteria</i>					2,61	2,73	2,92	4,35
		<i>Desulfovibrionales</i>				2,13	2,58	2,6	3,86
			<i>Desulfovibrionaceae</i>			2,13	2,58	2,6	3,86
				<i>Desulfovibrio</i>		M.A.	M.A.	0,09	M.A.
				<i>D168</i>		M.A.	M.A.	0,09	M.A.
		<i>Syntrophobacterales</i>				0,48	0,15	0,31	0,49
			<i>Syntrophaceae</i>			0,48	0,15	0,31	0,49
	<i>Epsilonproteobacteria</i>					0,18	M.A.	M.A.	M.A.
		<i>Campylobacterales</i>				0,18	M.A.	M.A.	M.A.
			<i>Campylobacteraceae</i>			0,18	M.A.	M.A.	M.A.
	<i>Gammaproteobacteria</i>					24,83	21,46	30,01	16,71
		<i>Aeromonadales</i>				17,41	7,06	15,26	10,44
			<i>Succinivibrionaceae</i>			17,41	7,06	15,25	10,45
				<i>Ruminobacter</i>		15,5	5,78	12,66	4,86
				<i>amylophilus</i>		15,07	5,61	12,21	3,44
				<i>Succinimonas</i>		0,37	0,49	1,52	1,33

Αποτελέσματα

Φύλο	Κλάση	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Είδος				
					<i>amylolytica</i>	0,37	0,49	1,52	1,33
					<i>Succinivibrio</i>	0,2	M.A.	0,11	0,39
		<i>Enterobacteriales</i>				1,47	2,4	0,14	M.A.
			<i>Enterobacteriaceae</i>			1,47	2,4	0,14	M.A.
		<i>Oceanospirillales</i>				0,66	0,8	1,78	M.A.
			<i>Oceanospirillaceae</i>			0,66	0,8	1,78	M.A.
		<i>Orbales</i>				0,43	0,21	1,64	M.A.
			<i>Orbaceae</i>			0,43	0,21	1,64	M.A.
		<i>Pasteurellales</i>				0,89	2,65	1,17	0,64
			<i>Pasteurellaceae</i>			0,89	2,65	1,17	0,64
		<i>Pseudomonadales</i>				0,84	4,64	1,67	2,93
			<i>Moraxellaceae</i>			0,84	4,64	1,67	2,93
				<i>Moraxella</i>		0,84	3,49	1,54	2,41
				<i>canis</i>		M.A.	1,25	M.A.	M.A.
		<i>Vibrionales</i>				2,97	3,34	8,35	2,54
			<i>Vibrionaceae</i>			2,97	3,34	8,35	2,54
		<i>Xanthomonadales</i>				0,15	0,36	M.A.	0,16
			<i>Xanthomonadaceae</i>			0,15	0,36	M.A.	0,16
<i>Spirochaetes</i>						M.A.	M.A.	M.A.	0,16
	<i>Spirochaetia</i>					M.A.	M.A.	M.A.	0,16
		<i>Spirochaetales</i>				M.A.	M.A.	M.A.	0,16
			<i>Spirochaetaceae</i>			M.A.	M.A.	M.A.	0,16
<i>Synergistetes</i>						0,2	0,86	1,15	2,5
	<i>Synergistia</i>					0,2	0,86	1,15	2,5
		<i>Synergistales</i>				0,2	0,86	1,15	2,5
			<i>Dethiosulfovibrionaceae</i>			M.A.	M.A.	M.A.	0,36
			<i>Synergistaceae</i>			0,2	0,86	1,15	2,14
<i>Tenericutes</i>						M.A.	M.A.	0,14	M.A.

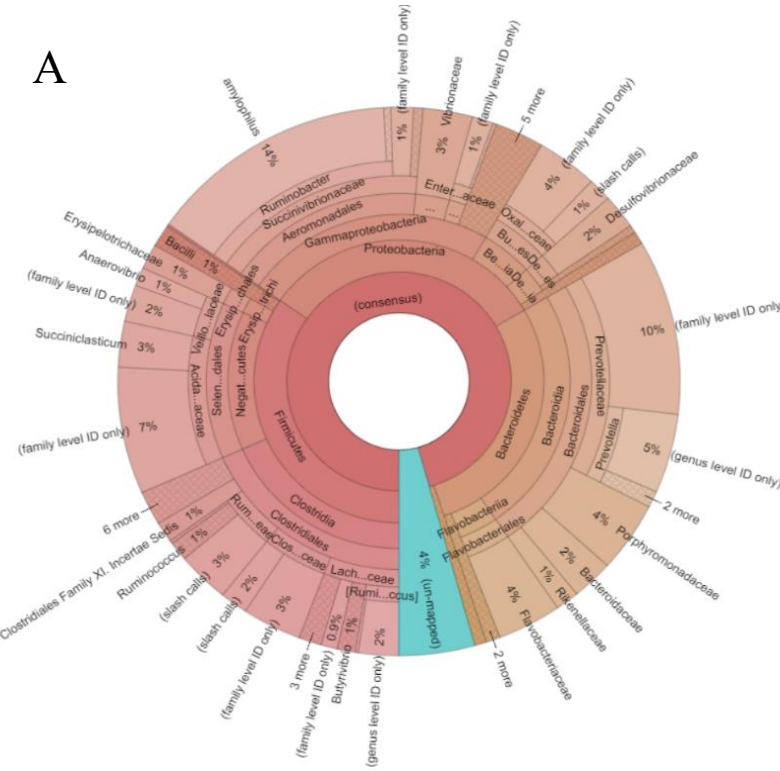
Αποτελέσματα

Φύλο	Κλάση	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Είδος				
	<i>Mollicutes</i>					M.A.	M.A.	0,14	M.A.
		<i>Entomoplasmatales</i>				M.A.	M.A.	0,14	M.A.
			<i>Entomoplasmataceae</i>			M.A.	M.A.	0,14	M.A.
<i>Verrucomicrobia</i>						M.A.	M.A.	0,11	0,41
	<i>Verrucomicrobiae</i>					M.A.	M.A.	0,11	0,41
		<i>Verrucomicrobiales</i>				M.A.	M.A.	0,11	0,23
			<i>Verrucomicrobiaceae</i>			M.A.	M.A.	0,11	0,23
		<i>Puniceicoccales</i>				M.A.	M.A.	M.A.	0,18
			<i>Puniceicoccaceae</i>			M.A.	M.A.	M.A.	0,18

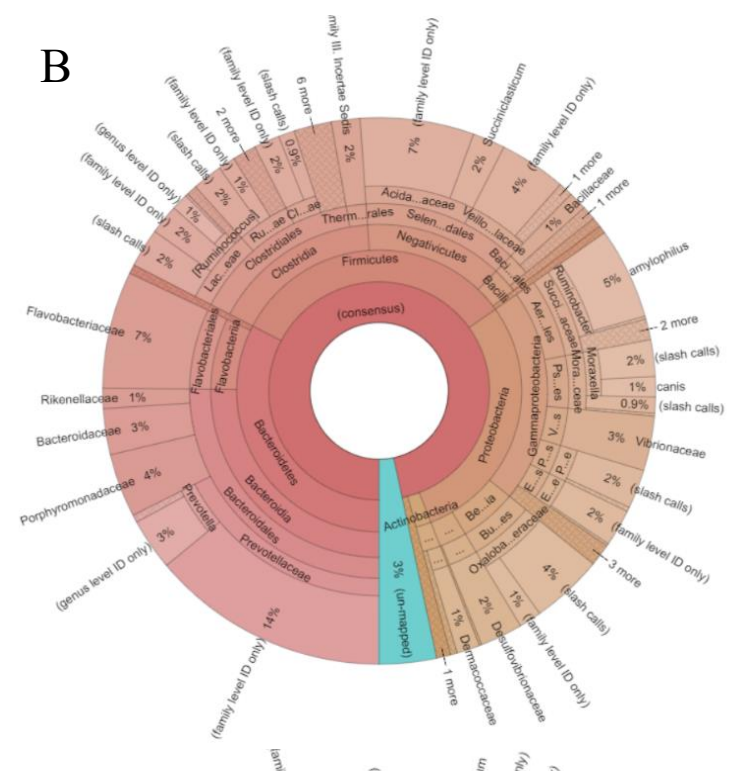
M.A. = Μη ανιχνεύσιμο

Σχήμα 8.14. Μεταγονιδιωματική ανάλυση των συνονθυλευμάτων του γενωμικού DNA του υγρού της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (% των χαρτογραφημένων διαβασμάτων) και των μη χαρτογραφημένων αλληλουχιών.

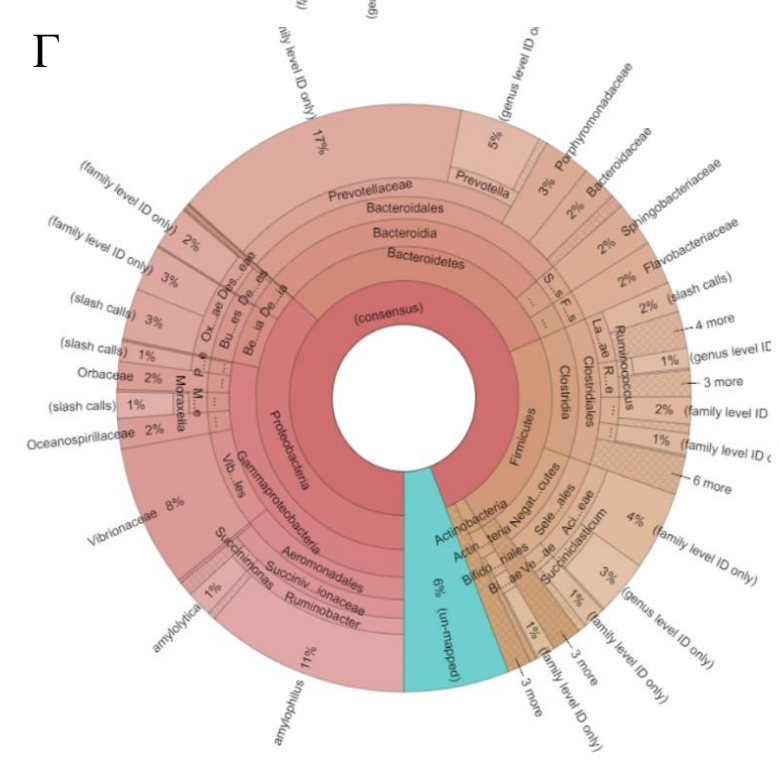
A



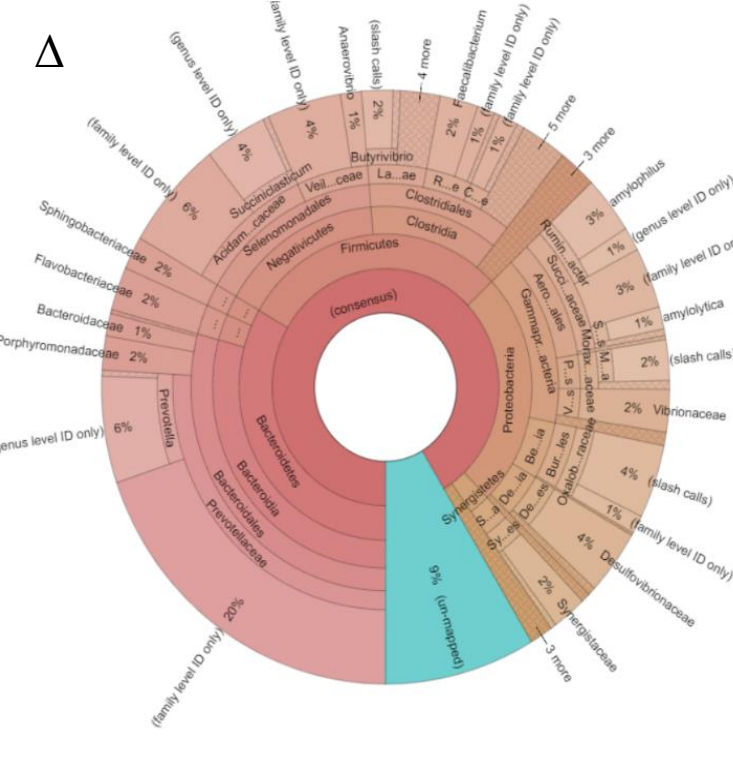
B



Γ



Δ



Πίνακας 8.17. Άλφα ποικιλομορφία (alpha diversity) της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης των τεσσάρων ομάδων κατά Chao1, Simpson και Shannon.

**Ομάδα Α (60/40 +20g):**

Αλληλουχίες/δείγμα	Ποικιλομορφία κατά Chao1	Παρατηρήσεις ειδών	Ποικιλομορφία κατά Shannon	Ποικιλομορφία κατά Simpson
10.0	3.100	2.600	0.778	0.290
133.0	8.850	8.500	1.411	0.403
256.0	8.900	8.900	1.299	0.365
379.0	9.000	9.000	1.334	0.371
502.0	9.000	9.000	1.261	0.347
625.0	9.000	9.000	1.287	0.355
748.0	9.000	9.000	1.300	0.360
871.0	9.000	9.000	1.311	0.363
994.0	9.000	9.000	1.304	0.360
1117.0	9.000	9.000	1.324	0.366
1240.0	9.000	9.000	1.323	0.366

**Ομάδα Β (40/60 +20g):**

Αλληλουχίες/δείγμα	Ποικιλομορφία κατά Chao1	Παρατηρήσεις ειδών	Ποικιλομορφία κατά Shannon	Ποικιλομορφία κατά Simpson
10.0	5.950	3.800	1.419	0.522
71.0	7.833	7.800	1.914	0.581
132.0	8.000	8.000	1.910	0.584
193.0	8.000	8.000	1.926	0.587
254.0	7.900	7.900	1.915	0.585
315.0	8.000	8.000	1.994	0.610
376.0	8.000	8.000	1.959	0.600
437.0	8.000	8.000	1.976	0.601
498.0	8.000	8.000	1.983	0.603
559.0	8.000	8.000	1.984	0.604
620.0	8.000	8.000	1.978	0.602



**Ομάδα Γ (60/40 +40g):**

Αλληλουχίες/δείγμα	Ποικιλομορφία κατά Chao1	Παρατηρήσεις ειδών	Ποικιλομορφία κατά Shannon	Ποικιλομορφία κατά Simpson
<b>10.0</b>	2.500	2.300	0.676	0.264
<b>175.0</b>	11.462	9.700	1.224	0.360
<b>340.0</b>	9.800	9.800	1.260	0.368
<b>505.0</b>	9.900	9.900	1.236	0.362
<b>670.0</b>	10.000	10.000	1.216	0.351
<b>835.0</b>	10.000	10.000	1.228	0.355
<b>1000.0</b>	10.000	10.000	1.228	0.356
<b>1165.0</b>	10.000	10.000	1.253	0.363
<b>1330.0</b>	10.000	10.000	1.231	0.356
<b>1495.0</b>	10.000	10.000	1.237	0.356
<b>1660.0</b>	10.000	10.000	1.238	0.356

**Ομάδα Δ (40/60 +40g):**

Αλληλουχίες/δείγμα	Ποικιλομορφία κατά Chao1	Παρατηρήσεις ειδών	Ποικιλομορφία κατά Shannon	Ποικιλομορφία κατά Simpson
<b>10.0</b>	4.600	3.400	1.353	0.526
<b>48.0</b>	6.600	6.400	1.884	0.622
<b>86.0</b>	6.900	6.900	2.072	0.671
<b>124.0</b>	7.000	7.000	2.040	0.660
<b>162.0</b>	7.000	7.000	1.995	0.651
<b>200.0</b>	7.000	7.000	1.985	0.645
<b>238.0</b>	7.000	7.000	2.012	0.652
<b>276.0</b>	7.000	7.000	2.020	0.650
<b>314.0</b>	7.000	7.000	2.024	0.651
<b>352.0</b>	7.000	7.000	2.029	0.654
<b>390.0</b>	7.000	7.000	2.027	0.653

Στους παρακάτω Πίνακες 8.18 και 8.19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας όπως προσδιορίστηκαν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στο απομονωθέν DNA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 8.18, τα μεθανοβακτήρια και οι *Fibrobacter succinogenes* αυξήθηκαν σημαντικά κατά 105 % και 65 % αντίστοιχα στις ομάδες των 40 g ενσωμάτωσης του μικροφύκου έναντι αυτών των 20 g, ενώ ο πληθυσμός των *Ruminococcus flavefaciens* μειώθηκε κατά 69% στις ίδιες ομάδες.

Επιπλέον, η σχετική αφθονία των *Ruminococcus albus* μειώθηκε σημαντικά κατά 31 % στις ομάδες με λόγο ΧΖ/ΣΖ=40/60 σε σχέση με αυτές με λόγο ΧΖ/ΣΖ=60/40. Ο πληθυσμός των *Streptococcus bovis* μειώθηκε σημαντικά (85 %) στις ομάδες των 40 g ενσωμάτωσης του μικροφύκου έναντι αυτών των 20 g, ενώ ο πληθυσμός των *Prevotella sp* αυξήθηκε σημαντικά (36 %) στις εν λόγω ομάδες.

Όσον αφορά τα μεθανοβακτήρια, οι *Methanobrevibacter spp.* και οι *Methanobacterium formicicum* μειώθηκαν σημαντικά κατά 46 % και 22 % αντίστοιχα στις ομάδες των 40 g ενσωμάτωσης του μικροφύκου έναντι αυτών των 20 g, ενώ σημαντική αύξηση (42 %) παρατηρήθηκε για τον πληθυσμό των *Methanobacterium formicicum* στις ομάδες με λόγο ΧΖ/ΣΖ=40/60 σε σχέση με αυτές των 60/40.

Πίνακας 8.18. Σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης πολλών παραγόντων.

	Διατροφή (A)						Χρόνος (X)			Επίδραση						
	XZ/ΣZ (A)		Μικροφύκος (M)				Χρόνος δειγματοληψίας			Επίδραση		Αλληλεπίδραση				
	60/40	40/60	SEM <sup>†</sup>	20g	40g	SEM <sup>†</sup>	3 <sup>η</sup>	6 <sup>η</sup>	SEM <sup>†</sup>	A	M	X	MxA	XxA	MxX	MxXxA
<i>Archaea (Αρχαία)</i>	1,31	1,68	0,174	1,48	1,51	0,155	1,33	1,66	0,140	NS	NS	*	NS	NS	***	NS
<i>Protozoa (Πρωτόζωα)</i>	0,81	0,92	0,064	0,85	0,87	0,060	0,94	0,79	0,060	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
<i>Total fungi (Μύκητες)</i>	1,93	1,76	0,167	1,87	1,82	0,178	1,78	1,90	0,172	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS
<i>Methanogen (Μεθανοβακτήρια)</i>	1,30	1,13	0,169	0,80	1,64	0,155	1,49	0,94	0,155	NS	**	*	NS	NS	NS	NS
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	1,48	1,57	0,136	1,63	1,41	0,113	1,25	1,79	0,116	NS	NS	**	NS	NS	*	NS
<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	1,77	1,69	0,283	1,91	1,55	0,220	1,54	1,91	0,233	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0,72	0,52	0,148	0,94	0,29	0,110	0,41	0,83	0,115	NS	***	**	NS	NS	*	NS
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	2,07	1,34	0,361	1,29	2,11	0,257	2,05	1,36	0,302	NS	**	*	NS	NS	NS	NS
<i>Ruminococcus albus</i>	0,67	0,46	0,075	0,59	0,54	0,062	0,50	0,63	0,055	*	NS	*	NS	NS	*	NS
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	10,53	5,11	2,818	5,39	10,26	2,675	10,05	5,59	2,355	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Streptococcus bovis</i>	0,90	0,64	0,231	1,34	0,20	0,180	0,47	1,06	0,180	NS	**	*	NS	NS	*	NS
<i>Selenomonas ruminantium</i>	2,61	3,04	0,263	2,69	2,96	0,243	2,64	3,01	0,225	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS
<i>Prevotella sp</i>	2,26	2,44	0,182	1,99	2,71	0,185	2,35	2,35	0,171	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	0,73	0,70	0,152	0,72	0,71	0,117	0,54	0,88	0,120	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS

Αποτελέσματα

<i>Methanobacterium formicicum</i>	0,86	1,22	0,099	1,17	0,91	0,092	0,69	1,39	0,090	*	T	***	NS	*	*	NS
<i>Methanomicrobium mobile</i>	1,62	1,98	0,219	1,72	1,88	0,193	1,92	1,97	0,175	NS	NS	*	NS	NS	*	NS
<i>Methanobrevibacter spp.</i>	1,02	1,09	0,172	1,36	0,73	0,135	0,56	1,53	0,132	NS	**	***	NS	NS	*	NS

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

T=  $p < 0,10$  Trent (αριθμητική τάση)

Πίνακας 8.19. Σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

Μικροφύκος <i>XZ/ΣZ</i>	Διατροφή (Δ)				SEM <sup>†</sup>	Χρόνος δειγματοληψίας (X)			Επίδραση		
	20g		40g			3 <sup>η</sup> εβδομάδα	6 <sup>η</sup> εβδομάδα	SEM <sup>†</sup>	Δ	X	ΔxX
	Α	Β	Γ	Δ							
<i>Archaea (Αρχαία)</i>	1,37	1,60	1,20	1,77	0,222	1,31 <sup>a</sup>	1,66 <sup>b</sup>	0,135	NS	*	NS
<i>Protozoa (Πρωτόζωα)</i>	0,78	0,92	0,81	0,91	0,083	0,92	0,79	0,057	NS	T	NS
<i>Total fungi (Μύκητες)</i>	1,82	1,92	2,27	1,60	0,272	1,79	2,01	0,175	NS	NS	T
<i>Methanogen (Μεθανοβακτήρια)</i>	0,74 <sup>a</sup>	0,80 <sup>a</sup>	1,75 <sup>b</sup>	1,42 <sup>b</sup>	0,216	1,43 <sup>a</sup>	0,93 <sup>b</sup>	0,129	**	**	NS
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	1,61	1,65	1,31	1,49	0,159	1,23 <sup>a</sup>	1,79 <sup>b</sup>	0,106	NS	***	**
<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	2,07	1,76	1,45	1,62	0,316	1,52	1,92	0,181	NS	T	NS
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	1,03 <sup>a</sup>	0,85 <sup>a</sup>	0,54 <sup>ab</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,182	0,43 <sup>a</sup>	0,87 <sup>b</sup>	0,100	*	***	*
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	1,67	0,91	2,35	1,76	0,391	2,01 <sup>a</sup>	1,33 <sup>b</sup>	0,238	T	*	NS
<i>Ruminococcus albus</i>	0,73	0,46	0,63	0,46	0,086	0,050 <sup>a</sup>	0,064 <sup>b</sup>	0,056	T	*	*
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	6,83	3,95	14,40	6,28	3,721	10,23	5,50	2,252	NS	T	T
<i>Streptococcus bovis</i>	1,58 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,306	0,47 <sup>a</sup>	1,06 <sup>b</sup>	0,188	**	*	*
<i>Selenomonas ruminantium</i>	2,52	2,87	2,73	3,21	0,331	2,61	3,05	0,216	NS	NS	*
<i>Prevotella sp</i>	1,99 <sup>a</sup>	1,98 <sup>a</sup>	2,55 <sup>ab</sup>	2,89 <sup>b</sup>	0,256	2,34	2,36	0,166	*	NS	NS
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	0,71	0,72	0,74	0,67	0,164	0,53 <sup>a</sup>	0,89 <sup>b</sup>	0,102	NS	*	NS
<i>Methanobacterium formicicum</i>	1,00 <sup>ab</sup>	1,33 <sup>b</sup>	0,70 <sup>a</sup>	1,10 <sup>b</sup>	0,132	0,68 <sup>a</sup>	1,39 <sup>b</sup>	0,098	*	***	***
<i>Methanomicrobium mobile</i>	1,59	1,84	1,59	2,11	0,270	1,59	1,97	0,175	NS	T	***

Αποτελέσματα

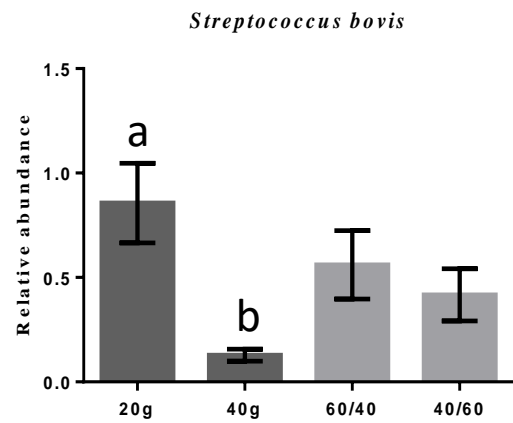
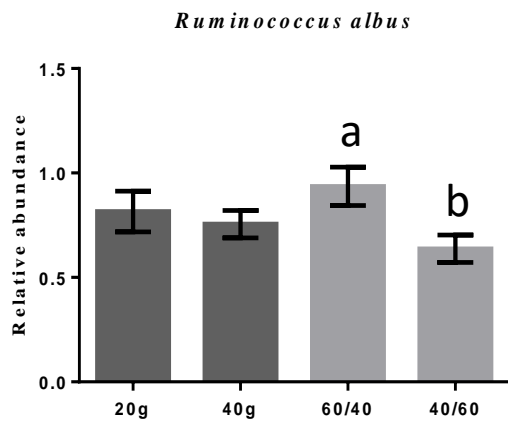
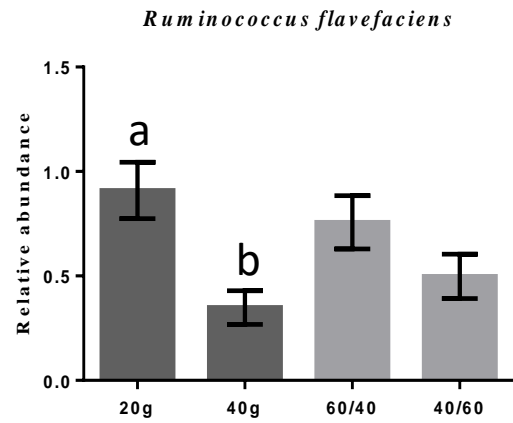
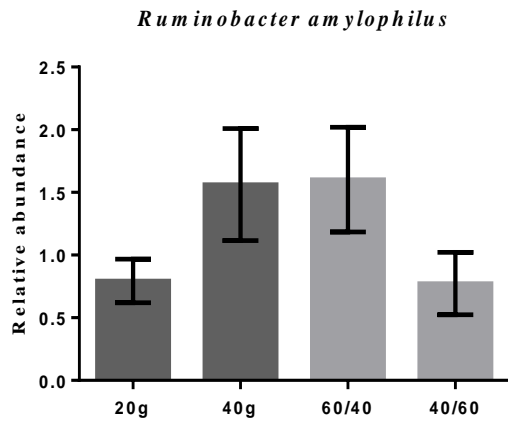
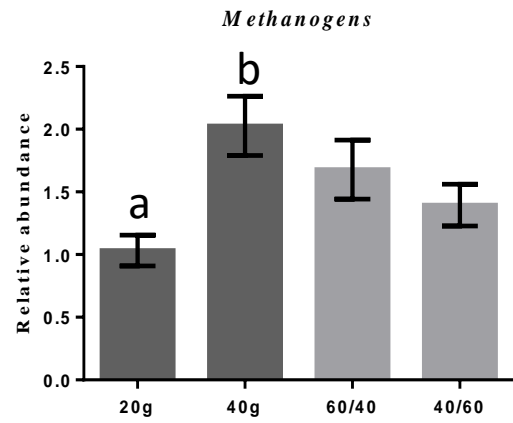
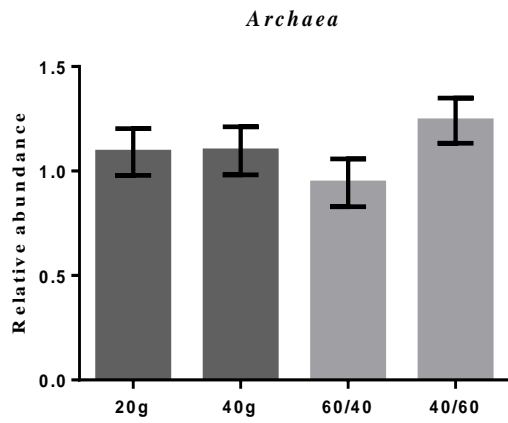
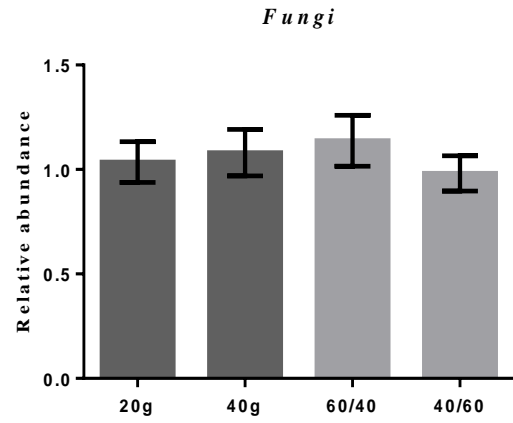
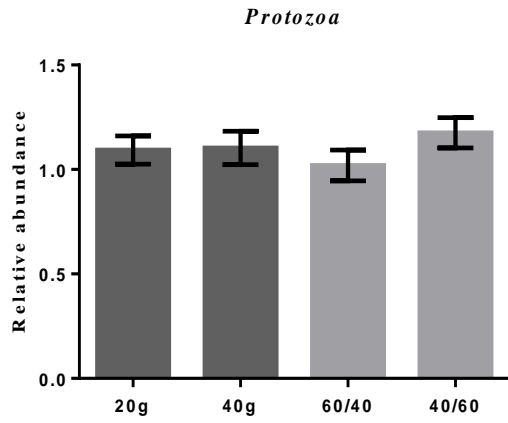
<i>Methanobrevibacter spp.</i>	1,38 <sup>a</sup>	1,35 <sup>a</sup>	0,61 <sup>b</sup>	0,83 <sup>b</sup>	0,193	0,55 <sup>a</sup>	1,53 <sup>b</sup>	0,120	*	***	**
--------------------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------	-------------------	-------------------	-------	---	-----	----

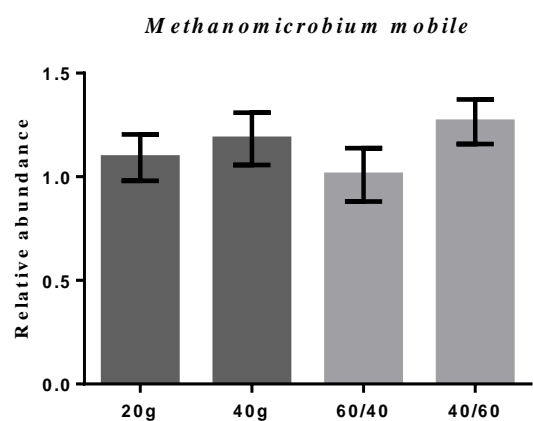
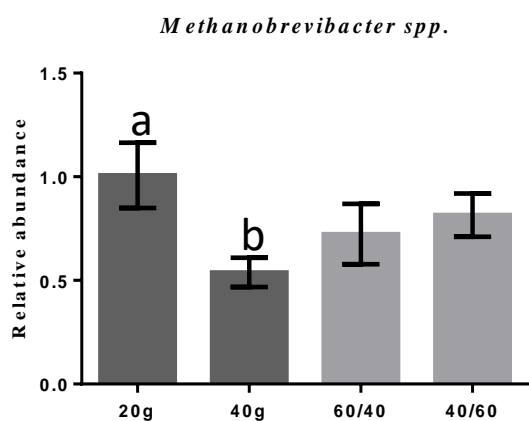
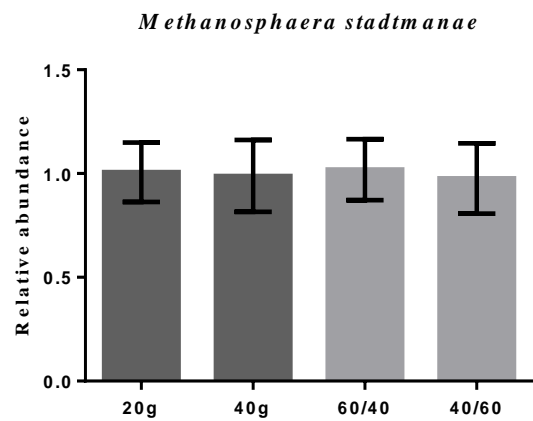
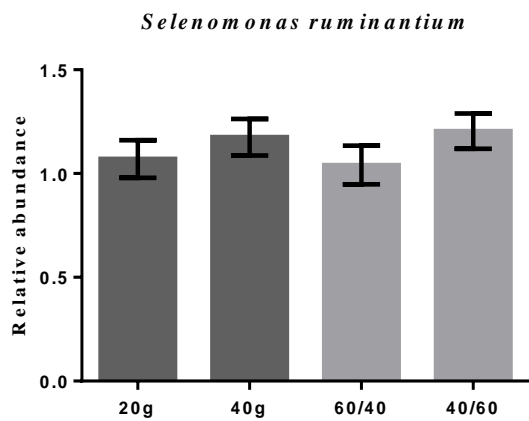
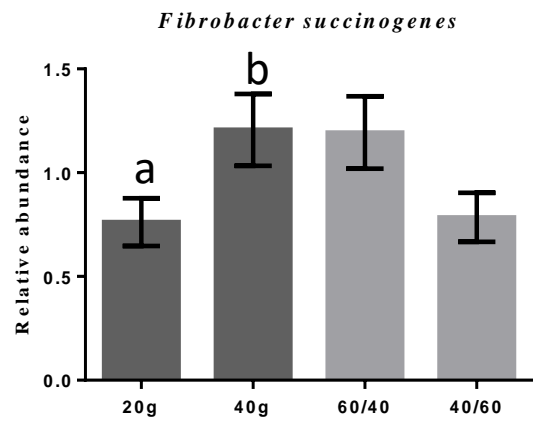
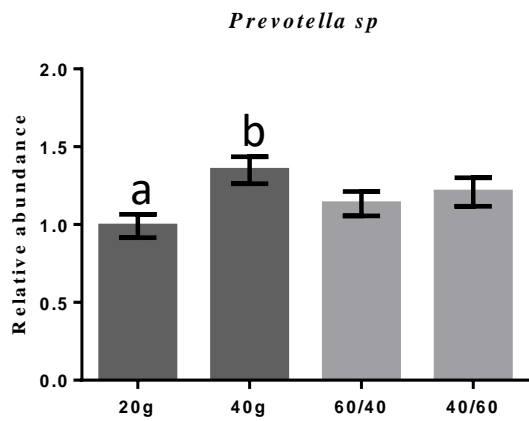
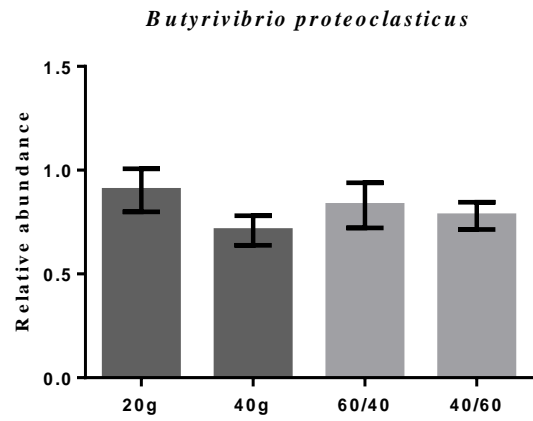
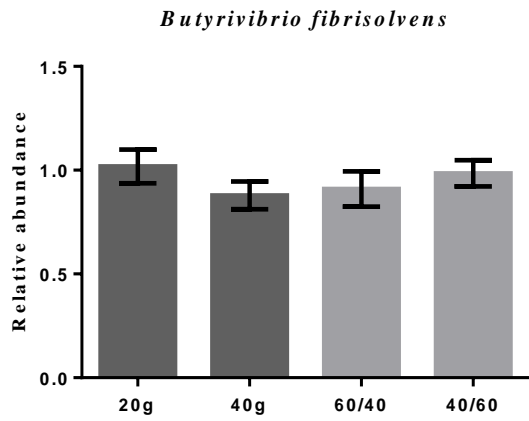
Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (a, b) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και (a, b) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

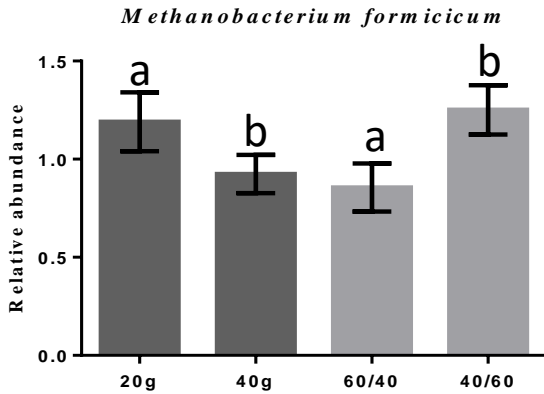
† SEM: Τυπικό σφάλμα των μέσων

T=  $p < 0,10$  Trent (αριθμητική τάση)



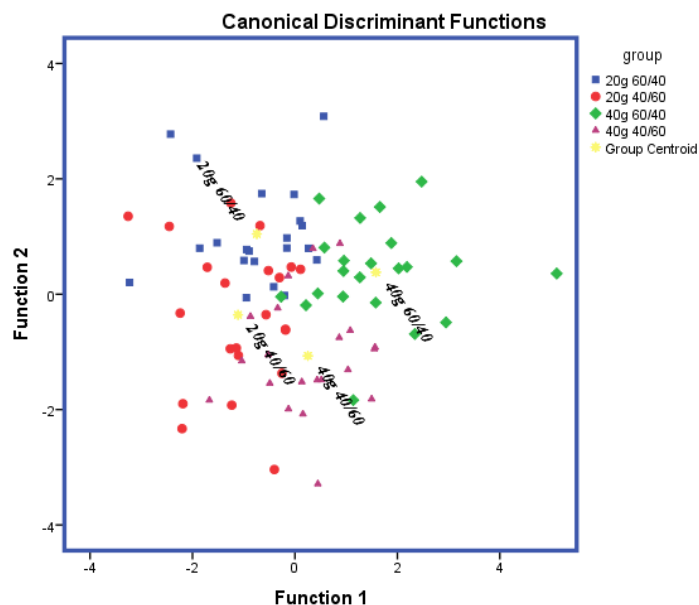






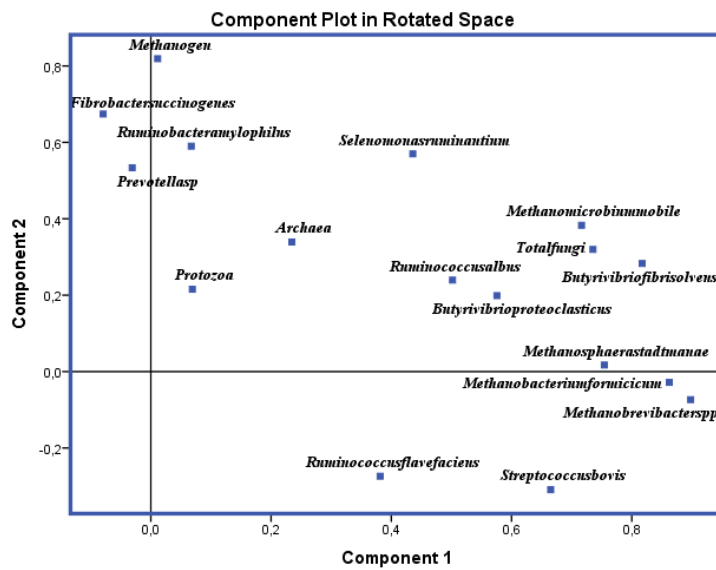
Σχήμα 8.15. Σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας. Σύγκριση μεταξύ των δύο επιπέδων ενσωμάτωσης του μικροφύκου και μεταξύ των δύο λόγων χονδροειδών προς συμπυκνωμένες ζωοτροφές.

Στα αποτελέσματα των μικροοργανισμών του υγρού της μεγάλης κοιλίας εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (Σχήμα 8.16). Δεκαεπτά μεταβλητές εισήχθησαν ώστε να αναπτύξουν ένα μοντέλο προκειμένου να διαχωρίσει τα ογδόντα-οχτώ δείγματα. Το ποσοστό που ταξινομήθηκε επιτυχώς ήταν 72,1%. Οι μεταβλητές οι οποίες συνέβαλαν περισσότερο στο διαχωρισμό ήταν ο πληθυσμός των *Streptococcus bovis*, τα ολικά μεθανοβακτήρια, τα *Methanobrevibacter spp.*, *Fibrobacter succinogenes*, *Methanobacterium formicicum* και οι *Butyrivibrio fibrisolvens*. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο για το Function 1 ( $P < 0,001$ ) με τιμή Wilks' lambda 0,228.



Σχήμα 8.16. Διαχωριστική απεικόνιση των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Α, Β, Γ και Δ) σύμφωνα με το προφίλ των μικροοργανισμών του υγρού της μεγάλης κοιλίας.

Στο προφίλ των μικροοργανισμών του υγρού της μεγάλης κοιλίας, εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών στα δείγματα όλων των διατροφικών επεμβάσεων (Σχήμα 8.17). Η τιμή ΚΜΟ προσδιορίστηκε στα 0,767 και οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες συνεισέφεραν κατά 47,76%.



Σχήμα 8.17. Στατιστική ανάλυση κύριων συνιστωσών των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Α, Β, Γ και Δ) σύμφωνα με το προφίλ των μικροοργανισμών του υγρού της μεγάλης κοιλίας.

## 9. Σχολιασμός αποτελεσμάτων 2<sup>ου</sup> πειράματος

### 9.1. Κατανάλωση τροφής

Στις ομάδες *Γ* και *Δ* παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της κατανάλωσης των συμπυκνωμένων ζωοτροφών (Πίνακας 8.4). Απόρροια αυτού ήταν η μειωμένη πρόσληψη του μικροφύκου από τα 40 g/ημέρα/ζώο στα 33,7 και 33,2 g/ημέρα/ζώο αντίστοιχα. Η μείωση της κατανάλωσης της τροφής επέφερε και τροποποιήσεις στους λόγους ΧΖ/ΣΖ πάρα τις προσπάθειες βελτίωσης της ελκυστικότητας των τροφών κατά τη διάρκεια του πειραματισμού. Συγκεκριμένα, στην ομάδα *Γ* προσδιορίστηκε στο ΧΖ/ΣΖ=62/38 και στην ομάδα *Δ*, ΧΖ/ΣΖ=44/56 έναντι των στόχων ΧΖ/ΣΖ=60/40 και ΧΖ/ΣΖ=40/60 αντίστοιχα. Ωστόσο, η μείωση της πρόσληψης του μικροφύκου στα 33 περίπου γραμμάρια/ζώο/ημέρα πιθανόν να σχετίζεται με τους λόγους ΧΖ/ΣΖ που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς η πρόσληψη των 40 γραμμάρων/ζώο/ημέρα με λόγο 50/50 δεν είχε επηρεάσει την κατανάλωση της τροφής (Manrommatis *et al.*, 2018). Η μείωση της κατανάλωσης της τροφής και κατ' επέκταση του μικροφύκου σε σχέση με τον πρώτο πειραματισμό, πιθανόν να συνδέεται με διαφορετική κορεστική ικανότητα του σιτηρεσίου που προέκυψε από τη μεταβολή του λόγου ΧΖ/ΣΖ, είτε από την εφαρμογή της ομαδικής διατροφής.

### 9.2. Ημερήσια παραγωγή γάλακτος και χημική σύσταση

Παρά τις αριθμητικές διακυμάνσεις, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή για καμία από τις παραμέτρους της γαλακτοπαραγωγής και της χημικής σύστασης. Η στατιστική που αφορά την ταυτόχρονη επίδραση του μικροφύκου και της τροποποίησης του λόγου ΧΖ/ΣΖ εφαρμόστηκε ανά πειραματική δοκιμή (για τις δυο επεμβάσεις των 20 g, και για τις επεμβάσεις των 40 g) καθώς η προσθήκη των 20 g γραμμαρίων και των δυο υπό μελέτη λόγων ΧΖ/ΣΖ προηγήθηκε χρονικά αυτή των 40 g. Λόγω αυτού δεν θα σχολιαστούν αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση του μικροφύκου αυτού κάθε αυτού (καθώς παρουσιάζονται στο πρώτο πείραμα) αλλά της αλληλεπίδρασης αυτού με τους δύο λόγους.

Στην εργασία των Argon-Argaman *et al.* (2014), αναφέρεται μείωση της γαλακτοπαραγωγής, της περιεκτικότητας του γάλακτος σε λακτόζη, της ημερήσιας παραγωγής λίπους και της πρωτεϊνοπεριεκτικότητας στο γάλα αγελάδων που κατανάλωναν σιτηρέσιο με λόγο ΧΖ/ΣΖ=65/35 έναντι αυτών με λόγο ΧΖ/ΣΖ=35/65. Ωστόσο, πέραν της μεταξύ των ειδών παραλλακτικότητας και της μικρότερης

διαφοράς των δυο λόγων της παρούσας μελέτης με αυτής των Argon-Argaman *et al.* (2014), η προσθήκη των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μέσω του μικροφύκους πιθανόν επηρέασε τη χημική σύσταση του γάλακτος όπως παρατηρήθηκε και στο πρώτο πείραμα (μεταξύ μάρτυρα και επεμβάσεων), μειώνοντας την επίδραση του λόγου ΧΖ/ΣΖ. Η υπόθεση αυτή πιθανόν επιβεβαιώνεται με την εργασία των Mele *et al.* (2006), όπου η ταυτόχρονη ενσωμάτωση σογιελαίου και δυο διαφορετικών λόγων ΧΖ/ΣΖ σε πρόβατα φυλής Sarda δεν επηρέασε το ύψος της γαλακτοπαραγωγής και την περιεκτικότητα του γάλακτος σε πρωτεΐνη, λίπος και λακτόζη. Επιπλέον, οι Machado *et al.* (2014), διερευνώντας την επίδραση διαφορετικών λόγων ΧΖ/ΣΖ (65/35, 55/45 και 45/55) σε αγελάδες μη υπερπαραγωγικές (18,4 κιλά/ημέρα) δεν παρατήρησαν σημαντικές μεταβολές στο ύψος της γαλακτοπαραγωγής και τη χημική σύσταση του γάλακτος.

### 9.3. Προφίλ λιπαρών οξέων

#### 9.3.1. Προφίλ λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας

Το καπροϊκό οξύ ( $C_{6:0}$ ), το καπρικό οξύ ( $C_{10:0}$ ) και το λαυρικό οξύ ( $C_{12:0}$ ) αυξήθηκαν σημαντικά στα 40g ενσωμάτωσης του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20g. Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι συγκρίσιμα βιβλιογραφικά, καθώς δεν συμπεριλαμβάνονται (ως μη ανιχνεύσιμα) στη διεθνή βιβλιογραφία όπου έγιναν παρόμοιες διατροφικές επεμβάσεις (Boeckaert *et al.*, 2008, Shingfield *et al.*, 20013, Jalč *et al.*, 2009). Επιπλέον, παρά την αύξησή τους με την ενσωμάτωση του υψηλότερου επιπέδου του μικροφύκους, δεν μπορούν να αποδοθούν αυτού κάθε αυτού στη μεταφορά τους από το μικροφύκος, καθώς δεν απαντώνται στο προφίλ των λιπαρών του οξέων. Το μυριστικό οξύ ( $C_{14:0}$ ) αυξήθηκε σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν 40 g του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20 g λόγω της αυξημένης πρόσληψής του από το μικροφύκος όπως και στο πρώτο πείραμα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των λόγων ΧΖ/ΣΖ και του επιπέδου του μικροφύκους καθώς το  $C_{14:0}$  αυξήθηκε μεταξύ των 20 g και των 40 g, αλλά μειώθηκε αριθμητικά μεταξύ του λόγου ΧΖ/ΣΖ=60/40 και ΧΖ/ΣΖ=40/60. Εν συνεχεία, η μείωση του πενταδεκανοϊκού οξέος ( $C_{15:0}$ ) στις ομάδες με λόγο ΧΖ/ΣΖ=40/60 οφείλεται στην πιθανή τροποποίηση του μικροβιακού πληθυσμού όπως εξηγήθηκε στο κεφάλαιο 6.4.1. (Nepsen *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2017). Το παλμιτικό ( $C_{16:0}$ ) και το παλμιτολεϊκό οξύ ( $C_{16:1}$ ) αυξήθηκαν σημαντικά στα 40 g ενσωμάτωσης

του μικροφύκουσ όπως παρατηρήσαμε και κεφάλαιο **6.4.1.**, ενώ δεν επηρεάστηκε μεταξύ των λόγων XZ/ΣZ.

Το στεατικό οξύ (C<sub>18:0</sub>) μειώθηκε σημαντικά στα 40 g του μικροφύκουσ σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20 g ενώ δεν μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες υψηλής συμμετοχής συμπυκνωμένων ζωοτροφών όπως παρατηρήθηκε από τους Vlaeminck *et al.* (2006). Ωστόσο, πάρα την αριθμητική μείωση του στεατικού οξέος στο πρώτο πειραματισμό μεταξύ των 20 g και 40 g δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όπως στο δεύτερο πείραμα, αποτέλεσμα που δείχνει την αλληλεπίδραση του λόγου XZ/ΣZ.

Το βασσενικό οξύ (*trans-11* C<sub>18:1</sub>) και το ενδιάμεσο προϊόν της βιοϋδρογόνωσης, *trans-10* C<sub>18:1</sub> αυξήθηκαν σημαντικά στις ομάδες με την υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Ωστόσο, τα λιπαρά αυτά οξέα δεν επηρεάστηκαν μεταξύ 20 g και 40 g παρόμοια με τον πρώτο πειραματισμό. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Vlaeminck *et al.* (2006) όπου το *trans-10* C<sub>18:1</sub> έβαινε αυξανόμενο στο υγρό της μεγάλης κοιλίας αγελάδων με την αύξηση των συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Το ελαϊκό οξύ (*cis-9* C<sub>18:1</sub>) αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες με λόγο XZ/ΣZ=40/60 λόγω της αυξημένης πρόσληψης του καθώς αποτελεί το κυρίαρχο λιπαρό οξύ των συμπυκνωμένων ζωοτροφών (Πίνακας 7.2. Υλικά και μέθοδοι, 2<sup>ο</sup> πειράματος). Το λινολενικό οξύ (C<sub>18:3n-3</sub>) μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες με λόγο XZ/ΣZ=40/60, λόγω της μειωμένης πρόσληψης στις ομάδες αυτές καθώς αποτελεί το κυρίαρχο λιπαρό οξύ της μηδικής (XZ/ΣZ=60/40).

Το εικοσιδυπενταενοϊκό (DPA) και το εικοσαδιεξανοϊκό οξύ (DHA) μειώθηκαν σημαντικά στις ομάδες με την υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών ενώ αυξήθηκαν σημαντικά με την αύξηση του επιπέδου του μικροφύκουσ. Αυτές οι μεταβολές των προαναφερθέντων λιπαρών οξέων μεταξύ του λόγου XZ/ΣZ και του επιπέδου ενσωμάτωσης του μικροφύκουσ επέφεραν σημαντική αλληλεπίδραση του λόγου προς το μικροφύκος. Η αύξηση μεταξύ του επιπέδου ενσωμάτωσης του μικροφύκουσ αποδίδεται στην υψηλή του συμμετοχή σε αυτά τα λιπαρά οξέα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε σημαντική αποικοδόμηση αυτών των μακράς αλύσου λιπαρών οξέων με την υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Η αυξημένη αποικοδόμηση αυτών των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σύμφωνα με τους Fuentes *et al.* (2009) μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη συγκέντρωση του μικροοργανισμού *Anaerovibrio lipolytica* σε σιτηρέσια πλούσια σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές. Οι *Anaerovibrio lipolytica* αποτελούν το κυριότερο λιπολυτικό βακτήριο των δι- και τριγλυκεριδίων (Nagaraja, 2016). Σε συνδυασμό με το υψηλό ποσοστό του *Schizochytrium sp* σε

τριγλυκερίδια (Ashford *et al.*, 2000), η προαναφερθείσα υπόθεση θα μπορούσε να αποτελέσει έναν πιθανό μηχανισμό αποδόμησης.

Τα αποτελέσματα της διαχωριστικής ανάλυσης το λιπαρών οξέων του υγρού της μεγάλης κοιλίας (Σχήμα 8.3) παρουσιάζουν σημαντική ταξινόμηση όλων των μεταβλητών ανά διατροφική επέμβαση. Όμως, φαίνεται ότι ο παράγοντας επιπέδου ενσωμάτωσης του μικροφύκους είναι ισχυρότερος.

### 9.3.2. Προφίλ λιπαρών οξέων πλάσματος αίματος

Το μυριστικό ( $C_{14:0}$ ), το παλμιτικό ( $C_{16:0}$ ) και το παλμιτολεϊκό οξύ ( $C_{16:1}$ ) αυξήθηκαν σημαντικά στα 40 g ενσωμάτωσης του μικροφύκους σε σχέση με τα αντίστοιχα στις ομάδες των 20 g λόγω της αύξησης αυτών των λιπαρών οξέων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας. Το στεατικό οξύ ( $C_{18:0}$ ) μειώθηκε σημαντικά όταν στο σιτηρέσιο ενσωματώθηκαν 40 g του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20 g ακολουθώντας την τάση που παρατηρήθηκε στο υγρό της μεγάλης κοιλίας. Σε αντίθεση με το υγρό της μεγάλης κοιλίας, το βασσενικό οξύ (*trans-11*  $C_{18:1}$ ) αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες των 40 g ενσωμάτωσης του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20 g ενώ δεν επηρεάστηκε σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών λόγων, καθώς αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε μεταξύ του λόγου  $XZ/\Sigma Z$  και του επιπέδου ενσωμάτωσης του μικροφύκους. Παρόμοια, και το ελαϊκό οξύ (*cis-9*  $C_{18:1}$ ) παρουσίασε διαφορετική εικόνα από αυτή στη μεγάλη κοιλία καθώς μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες με τα 40 g του μικροφύκους σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20 g. Το λινολενικό οξύ ( $C_{18:3\ n-3}$ ) μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$  όπως αναφέρθηκε και στη μεγάλη κοιλία. Το  $C_{20:3\ n-6}$ , το  $C_{20:3\ n-3}$  και το  $C_{22:2\ n-6}$  αυξηθήκαν σημαντικά με την αύξηση της προσθήκης του μικροφύκους ως πιθανά αποδομιθέντα προϊόντα του εικοσαδουεξανοϊκού και εικοσιδιπεντανοϊκού οξέως. Επιπλέον, σημαντική αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε για το λόγο προς το επίπεδο του μικροφύκους για το  $C_{20:3\ n-3}$  και το  $C_{22:2\ n-6}$ . Το εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ (DPA) και το εικοσαδιεξανοϊκό οξύ (DHA) αυξήθηκαν σημαντικά με την αύξηση του επιπέδου του μικροφύκους ενώ δεν επηρεάστηκαν για τον λόγο  $XZ/\Sigma Z$  όπως συνέβη στη μεγάλη κοιλία.

### 9.3.3. Προφίλ λιπαρών οξέων γάλακτος

Τα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων του γάλακτος σχολιάζονται με βάση τον Πίνακα 8.11. Το πενταδεκανοϊκό οξύ ( $C_{15:0}$ ) μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$  λόγω της μειωμένης του παραγωγής όπως παρατηρήθηκε στην μεγάλη κοιλιά και εξηγήθηκε στο κεφάλαιο 6.4.1. (Nepsen *et al.*, 2005). Το παλμιτικό οξύ ( $C_{16:0}$ ) και το παλμιτολεϊκό οξύ ( $C_{16:1}$ ) αυξήθηκαν σημαντικά στις ομάδες των 40 g ενσωμάτωσης του μικροφύκου, σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20 g. Τα αποτελέσματα αυτά παρατηρήθηκαν στον πρώτο πειραματισμό και ο μηχανισμός της *de novo* σύνθεσης του παλμιτικού με την αύξηση των μικροφυκών εξηγήθηκε εκτενώς. Το στεατικό οξύ ( $C_{18:0}$ ) μειώθηκε σημαντικά στα 40 g του μικροφύκου σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20 g, ενώ το σύνολο των *trans* ακόρεστων ισομερών του στεατικού οξέος συμπεριλαμβανομένων του βασενικού οξέος (*trans-11*  $C_{18:1}$ ) και του ενδιάμεσου *trans-10*  $C_{18:1}$ , αυξήθηκαν σημαντικά στις ομάδες με την υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών και με την αύξηση του επιπέδου ενσωμάτωσης του μικροφύκου αντίστοιχα. Στην εργασία των Gomez-Cortex *et al.* (2011) η υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών στο σιτηρέσιο προβατινών αύξησε σημαντικά την περιεκτικότητα του γάλακτος σε ισομερή *trans*  $C_{18:1}$ , ως προϊόντα της αποδόμησης του λινελαϊκού οξέος των συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην εργασία των Schmidely *et al.* (2011), όπου τα ολικά ισομερή *trans*  $C_{18:1}$  αυξήθηκαν σημαντικά με την ταυτόχρονη ενσωμάτωση ελαίων πλούσιων σε πολυάκορεστα λιπαρά οξέα και την υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Το ελαϊκό οξύ (*cis-9*  $C_{18:1}$ ) αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$ , ενώ μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες των 40 g του μικροφύκου, σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20 g. Επιπλέον, όσον αφορά το ελαϊκό οξύ, παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση για τους δυο κύριους προς μελέτη παράγοντες. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το ελαϊκό οξύ δεν επηρεάστηκε στη μεγάλη κοιλιά, όσον αφορά το επίπεδο ενσωμάτωσης του μικροφύκου. Ο λόγος για τον οποίο παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο γάλα, συνδέεται με τη μείωση του στεατικού οξέος στο μαστικό αδένια για τη *de novo* σύνθεση ελαϊκού μέσω του ενζύμου  $\Delta^9$  αφυδρογονάση (Toral *et al.*, 2016). Το λινελαϊκό οξύ ( $C_{18:2\ n-6\ cis}$ ) μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες των 40 g ενσωμάτωσης του μικροφύκου σε σχέση με αυτό στις ομάδες των 20 g, ενώ το λινολενικό οξύ ( $C_{18:3\ n-3}$ ) μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$ . Τα λιπαρά αυτά οξέα,

καθώς προέρχονται αποκλειστικά από την κυκλοφορία του αίματος στο μαστό εμφάνισαν ίδια τάση με αυτή του αίματος (Lanier *et al.*, 2013).

Το συζευγμένο ισομερές  $n-7$  του λινελαϊκού οξέος ( $C_{18:2\ c9, \ i11}$ ) αυξήθηκε στις ομάδες με την υψηλότερη ενσωμάτωση του μικροφύκους πάρα το γεγονός ότι το βασσενικό οξύ που αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος αυξήθηκε και υπερ των ομάδων με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$ . Ο πιθανός μηχανισμός για τον οποίο το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ δεν επηρεάστηκε από το λόγο  $XZ/\Sigma Z$  αλλά μόνο ως προς το επίπεδο ενσωμάτωσης του μικροφύκους σχετίζεται με την αυξημένη ενεργότητα της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης με την αύξηση των μικροφυκών όπως παρατηρείται από το δείκτη  $C_{18:1}$  (Caroprese *et al.*, 2010). Το δεύτερο συζευγμένο ισομερές  $n-6$  του λινελαϊκού οξέος ( $C_{18:2\ i10, \ c12}$ ) αυξήθηκε στις ομάδες με την υψηλότερη συμμετοχή των συμπυκνωμένων ζωοτροφών και με τη μέγιστη ενσωμάτωση του μικροφύκους. Η αύξηση του  $C_{18:2\ i10, \ c12}$  στο γάλα των αιγών των ομάδων αυτών σχετίζεται με την πιθανή αναστολή της βιοϋδρογόνωσης του σε ελαϊκό και στεατικό οξύ λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε PUFA στη μεγάλη κοιλία. Στην ίδια κατεύθυνση παρατηρήθηκαν τα αποτελέσματα της εργασίας των Thanh και Suksombat (2015), όπου η υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών συνοδευόμενη με ταυτόχρονη ενσωμάτωση ελαίων πλούσιων σε πολυάκορεστα λιπαρά οξέα, αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση του  $C_{18:2\ i10, \ c12}$  στο γάλα αγελάδων. Το εικοσιδυπενταενοϊκό (DPA) και το εικοσαδιεξανοϊκό οξύ (DHA) αυξήθηκαν σημαντικά με την αύξηση του επιπέδου του μικροφύκους όπως είχε παρατηρηθεί και στο πρώτο πείραμα. Επιπλέον, όσον αφορά τα DHA λιπαρά οξέα, οι αλληλεπιδράσεις όλων των παραμέτρων ήταν σημαντικές. Ωστόσο, η συγκέντρωση αυτών των λιπαρών οξέων στο γάλα ήταν σημαντικά μικρότερη αυτής στη μεγάλη κοιλία και το πλάσμα του αίματος, επαληθεύοντας τη μειωμένη αποτελεσματικότητα της μεταφοράς τους από την τροφή στο γάλα (Farina *et al.*, 2015). Ο λόγος για τον οποίο το DPA και το DHA παρουσιάζουν πολύ χαμηλή αποτελεσματικότητα πιθανόν να σχετίζεται με την προτίμηση αυτών των λιπαρών οξέων όταν εισέρχονται στη κυκλοφορία του αίματος, να ενσωματώνονται στα φωσφολιπίδια (όπως αναφέρθηκε και στο πρώτο πείραμα σχετικά με το ανοσοποιητικό σύστημα) και τους χολιστερικούς εστέρες και όχι στα τριγλυκερίδια. Ο μηχανισμός αυτός καθιστά αυτά τα λιπαρά οξέα μη διαθέσιμα για απορρόφηση από το μαστό μέσω της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL) (Lanier *et al.*, 2013).



Τα μεσαία αλύσου λιπαρά οξέα μειωθήκαν στις ομάδες της υψηλής συμμετοχής συμπυκνωμένων ζωοτροφών υποδεικνύοντας πιθανές μεταβολές των λιπογενετικών ενζύμων του μαστού λόγω της μείωσης των χονδροειδών ζωοτροφών (Mele *et al.*, 2006). Ειδικότερα, η υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αυξάνει τα ανασταλτικά στη λιπογένεση λιπαρά οξέα ( $C_{18:2n10}$ ,  $c_{12}$  και *trans-10*  $C_{18:1}$ ), τα οποία επηρεάζουν την ενεργότητα των λιπογενετικών ενζύμων (Piperova *et al.*, 2000). Αντίθετα, τα μακράς αλύσου παρουσίασαν σημαντική μείωση στο γάλα των ζώων που καταλάωναν 40 g του μικροφύκους λόγω της μείωσης του στεατικού οξέος όπως εξηγήθηκε και στο πρώτο πειραματισμό.

Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα αυξήθηκαν στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$  λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης του ελαϊκού και των ολικών ισομερών *trans*  $C_{18:1}$  όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ενώ τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αυξήθηκαν σημαντικά στις ομάδες με την υψηλή συμμετοχή του μικροφύκους στη διατροφή των αιγών όπως ήταν αναμενόμενο.

Τα  $\omega 6$  λιπαρά οξέα αυξήθηκαν σημαντικά στις ομάδες της υψηλής συμμετοχής συμπυκνωμένων ζωοτροφών λόγω της μεγαλύτερης πρόσληψης του λινελαϊκού οξέος από της  $\Sigma Z$  ενώ τα  $\omega 3$  αυξήθηκαν με την υψηλότερη ενσωμάτωση του μικροφύκους στη διατροφή των αιγών κυρίως λόγω της αύξησης του εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος, επιφέροντας επιπλέον αλληλεπιδράσεις σε όλες τις παραμέτρους. Οι μεταβολές αυτές μείωσαν σημαντικά το λόγο  $\omega 6/\omega 3$  λιπαρά οξέα προς την επιθυμητή, από πλευράς υγείας του καταναλωτή κατεύθυνση, όσον αφορά την επίδραση των 40 g του μικροφύκους (Simopoulos 2002).

Ο αθηρωματικός δείκτης μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες με λόγο  $XZ/\Sigma Z=40/60$  ενώ ο θρομβωτικός δείκτης μειώθηκε στις ομάδες υψηλής ενσωμάτωσης του μικροφύκους. Σύμφωνα με τους Poppitt *et al.* (2002) η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων με χαμηλό αθηρωματικό δείκτη, σχετίζεται με τη μείωση της χοληστερόλης και της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα ανθρώπων-καταναλωτών. Ωστόσο, οι Edmondson *et al.* (1974) μελετώντας οργανοληπτικά χαρακτηριστικά γάλακτος με χαμηλό αθηρωματικό δείκτη, διεπίστωσαν μια δυσάρεστη γεύση η οποία αποτελεί μειονέκτημα για τη βιομηχανία. Η δυσάρεστη αυτή γεύση πιθανόν να σχετίζεται με την οξειδωση των επιρρεπών σε αυτή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που μείωσαν τον αθηρωματικό δείκτη. Εντούτοις, όπως παρατηρήθηκε και στον πρώτο πειραματισμό, τα φυσικά αντιοξειδωτικά του μικροφύκους, δύνανται να ενισχύουν την οξειδωτική σταθερότητα του γάλακτος στην ενσωμάτωση των 20 g.

Οι δείκτες της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης σχετικά με το  $C_{16:1}$  και  $C_{18:1}$  αυξήθηκαν σημαντικά στο γάλα των ομάδων της υψηλής ενσωμάτωσης του μικροφύκου υποδηλώνοντας αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου αυτού (Caroprese *et al.*, 2010). Η αύξηση της ενεργότητας της  $\Delta^9$  αφυδρογονάσης έχει υψηλή σημασία στην ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων καθώς εμπλέκεται στη μετατροπή κορεσμένων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και τη σύνθεση του  $C_{18:2\ c9, t11}$  το οποίο σχετίζεται με ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του καταναλωτή (Griinari *et al.*, 2009).

Όσον αφορά τις συσχετίσεις κατά Pearson (Σχήμα 8.7) το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ συσχετίστηκε σημαντικά, θετικά, με το αραχιδονικό, το  $\alpha$ -διομο-λινολενικό και το νευρονικό οξύ ( $C_{24:1}$ ). Καθώς τα λιπαρά αυτά οξέα δεν συντίθενται στο μαστό και δεν ανιχνεύθηκαν σε υψηλή συγκέντρωση στις πειραματικές τροφές, ενισχύεται η υπόθεση που έγινε στο πρώτο πείραμα σχετικά με την προέλευσή τους από την αποδόμηση του εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος. Όμως, το εικοσιδιπεντανοϊκό οξύ συσχετίστηκε θετικά με τη συγκέντρωση του  $\alpha$ -διομο λινολενικού και του νευρονικού οξέος, ενώ, το στεατικό και το ελαϊκό οξύ συσχετίστηκαν αρνητικά ( $P < 0,01$ ) με το καπρυλικό οξύ ( $C_{8:0}$ ) δείχνοντας την ύπαρξη ανταγωνισμού αυτών των λιπαρών οξέων. Το αποτέλεσμα αυτό έχει μεγάλη σημασία όσον αφορά τη σύσταση του γάλακτος και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, καθώς το στεατικό και ελαϊκό οξύ σχετίζονται θετικά με τη λιποπεριεκτικότητα (Bichi *et al.*, 2013) ενώ η συγκέντρωση του καπρυλικού και των υπολοίπων μικρής αλύσου λιπαρών οξέων σχετίζονται με την παραδοσιακή γεύση του αιγείου γάλακτος (Tsiplakou *et al.*, 2013).

Το ελαϊκό και το στεατικό οξύ παρουσίασαν σημαντική, θετική συσχέτιση όπως έχει παρατηρηθεί από πλήθος ερευνητικών εργασιών (Bichi *et al.*, 2013, Toral *et al.*, 2016 2017, Chilliard *et al.* 2003, 2007).

Τέλος, η παραγωγή λίπους συσχετίστηκε θετικά με τη συγκέντρωση του  $C_{15:1}$ . Το  $C_{15:1}$  και τα υπόλοιπα μονής και διακλαδισμένης αλύσου λιπαρά οξέα παράγονται από τα κυτταρινολυτικά βακτήρια που αποικούν τη μεγάλη κοιλία (Nepsen *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2017). Η υψηλή συγκέντρωση του  $C_{15:1}$ , σχετίζεται με την αυξημένη παρουσία των κυτταρινολυτικών βακτηρίων τα οποία παράγουν οξικό οξύ που σχετίζεται με την αύξηση της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος.

## 9.4. Αντιοξειδωτικό σύστημα

### 9.4.1. Αντιοξειδωτικό σύστημα αίματος

Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων του αίματος, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και οι δείκτες της οξειδωτικής κατάστασης παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 8.14. Η δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) αυξήθηκε σημαντικά ( $p < 0,05$ ) στις ομάδες *Γ* και *Δ* με την υψηλή συμμετοχή του μικροφύκου στο σιτηρέσιο των αιγών όπως παρατηρήθηκε και στο πρώτο πείραμα μεταξύ των 20 και 40 g. Η αύξηση της δραστηριότητας της SOD πιθανόν να σχετίζεται με την παρουσία αυξημένων ανιόντων του υπεροξειδίου όπως εξηγήθηκε στο πρώτο πείραμα (Đuričić *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2014). Η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT) μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά στην ομάδα *Γ* με λόγο XZ/ΣZ=60/40 και 40 g του μικροφύκου σε σχέση με την ομάδα *Β* με λόγο 40/60 και 20 g. Μια δεύτερη στατιστική ανάλυση, διερευνώντας ξεχωριστά τους δυο κύριους διατροφικούς παράγοντες, δείχνει ότι η CAT μειώθηκε στις ομάδες υψηλής συμμετοχής του μικροφύκου ενώ παρουσίασε τάση αύξησης για τις ομάδες υψηλής συμμετοχής συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Αναφορικά με τον παράγοντα ενσωμάτωση του μικροφύκου, τα αποτελέσματα αυτά αποδίδονται στην αύξηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από τη δράση της SOD το οποίο μετατράπηκε σε ρίζα υδροξυλίου ( $OH^\cdot$ ) μέσω της αντίδρασης Fenton ( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\cdot$ ) (Winterbourn, 1995) και ενδεχομένως έδρασε ανασταλτικά στη δράση του ενζύμου όπως παρατηρήθηκε και στο πρώτο πείραμα (Pigeolet *et al.*, 1990). Όσον αφορά το λόγο XZ/ΣZ, παρατηρήθηκε τάση αύξησης της CAT υπέρ των ομάδων που κατανάλωναν σιτηρέσιο με υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Η αύξηση αυτή πιθανόν συνδέεται με την υψηλή πρόσληψη αμύλου, που σχετίζεται με αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης (Song *et al.*, 2018).

Η συγκέντρωση της μηλονικής αλδεϋδης (MDA) αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα *Γ*, σε σχέση με την ομάδα *Α*, ενώ στην ομάδα *Δ* παρουσίασε μέγιστη τιμή τα 2,28  $\mu M$  η οποία διέφερε σημαντικά με όλες τις άλλες ομάδες. Η αύξηση αυτή της MDA παρατηρήθηκε και στο πρώτο πειραματισμό και συσχετίστηκε με την αυξημένη πρόσληψη των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Wullepit *et al.*, 2012). Όσον αφορά τη σημαντική αύξηση της MDA στην ομάδα *Δ*, με την ταυτόχρονη ενσωμάτωση των 40 g του μικροφύκου και του σιτηρεσίου πλούσιου σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές, φαίνεται να σχετίζεται με τη συσσώρευση λιποπολυσακχαριτών (LPS) στη μεγάλη

κοιλία των ζώων, λόγω της αυξημένης πρόσληψης αμύλου (Ma *et al.*, 2018). Η υψηλή συμμετοχή αμύλου, σε συνδυασμό με την ενσωμάτωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, πιθανόν μείωσε το pH της μεγάλης κοιλίας με αποτέλεσμα τη συσσώρευση λιποπολυσακχαριτών που σημαίνει ανοσοποιητική απάντηση και αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (Ma *et al.*, 2018, Hou *et al.*, 2008, Guo *et al.*, 2013). Επιπλέον, η αυξημένη συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών (άρα και αμύλου) στη διατροφή των μηρυκαστικών επιφέρει αύξηση της αποδόμησης των βιταμινών A, E και των καροτινοειδών στη μεγάλη κοιλία. Οι προαναφερθείσες ενώσεις έχουν αντιοξειδωτική δράση και η μείωσή τους στο αίμα επιφέρει μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και αύξηση της οξειδωτικής καταπόνησης (Gabai *et al.*, 2004, Rode *et al.*, 1990)

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια του πλάσματος του αίματος παρουσίασαν σημαντική αύξηση στις ομάδες των 40 g του μικροφύκου (*F* και *A*) σε σχέση με αυτές των 20 g (*A* και *B*) όπως παρατηρήθηκε και στο πρώτο πειραματισμό και συνδέεται με την αύξηση της MDA (Yuan *et al.*, 2007).

#### 9.4.2. Αντιοξειδωτικό σύστημα γάλακτος

Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων του γάλακτος, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και οι δείκτες της οξειδωτικής κατάστασης παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 8.15. Η δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) μειώθηκε σημαντικά ( $p < 0,05$ ) στις ομάδες *F* και *A* με την υψηλή συμμετοχή του μικροφύκου στο σιτηρέσιο των αιγών σε σχέση με αυτή στις ομάδες *A* και *B*. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό είναι αντίθετο σε σχέση με την δραστηριότητα της SOD στο αίμα, η οποία αυξήθηκε στις ομάδες *F* και *A*. Η διαφορά αυτή ίσως μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική διαχείριση του οξειδωτικού στρες του οργανισμού στο αίμα και στο γάλα. Παρατηρώντας το Σχήμα 8.11 με την ανάλυση κύριων συνιστωσών στο αίμα, η SOD και η MDA τοποθετούνται στο ίδιο τεταρτημόριο δείχνοντας θετική συσχέτιση. Αντίθετα στο Σχήμα 8.13 με την ανάλυση κύριων συνιστωσών στο γάλα, η SOD και η MDA τοποθετούνται σε διαφορετικό τεταρτημόριο, παραπέμποντας σε αρνητική συσχέτιση. Στην εργασία των Eslami *et al.* (2015) η πρόκληση οξειδωτικού στρες αύξησε τη συγκέντρωση της MDA στο γάλα ποντικών ενώ η δραστηριότητα της SOD μειώθηκε σημαντικά. Αντίθετα, η πρόκληση οξειδωτικού στρες λόγω της υψηλής συμμετοχής PUFA στο σιτηρέσιο αιγών

(Mavrommatis *et al.*, 2018) αύξησε σημαντικά τη δραστηριότητα της SOD στο πλάσμα του αίματος.

Η συγκέντρωση της μηλονικής αλδεϋδης (MDA) αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα *F* και *A* σε σχέση με τις ομάδες *A* και *B*, ενώ τα πρωτεϊνικά καρβονύλια του γάλακτος παρουσίασαν σημαντική αύξηση στις ομάδες *B*, *F* και *A* σε σχέση τη συγκέντρωσή τους στην ομάδα *A* των 20 g και λόγο ΧΖ/ΣΖ=60/40 δείχνοντας παρόμοια εικόνα με αυτή του αίματος.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS, παρουσίασε σημαντική μείωση στην ομάδα *A* σε σχέση με την ομάδα *B*, δηλαδή μεταξύ των 20 και των 40 g του μικροφύκους και λόγο ΧΖ/ΣΖ=40/60 και για τις δυο ομάδες. Παρομοίως, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP, παρουσίασε σημαντική μείωση στην ομάδα *F* και *A* σε σχέση με τις ομάδες *A* και *B* των 20 g του μικροφύκους. Η μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του γάλακτος με την προσθήκη των 40 g του μικροφύκους σε συνάρτηση με τη αύξηση της MDA ενισχύει την υπόθεση πρόκλησης οξειδωτικού στρες στις ομάδες *F* και *A*. Εκτός, της μείωσης τη ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του γάλακτος από την επίδραση του επιπέδου ενσωμάτωσης του μικροφύκους, αυτή φαίνεται να μειώνεται περαιτέρω στην ομάδα *A* με λόγο ΧΖ/ΣΖ=40/60. Σύμφωνα με τους Hou *et al.* (2008) και τους Guo *et al.* (2013), η υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών, αυξάνει την αποδόμηση των βιταμινών A, E και των καροτινοειδών με αποτέλεσμα τη μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Συμπερασματικά, φαίνεται η πρόκληση του οξειδωτικού στρες μεταξύ αίματος (οργανισμού) και γάλακτος να παρουσιάζει θετική συσχέτιση, ενώ οι μηχανισμοί αντιμετώπισης του να διαφέρουν.

Τέλος, διαφορές στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, τους οξειδωτικούς δείκτες και την ολική αντιοξειδωτική κατάσταση μεταξύ διαφορετικών ιστών μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα της απορρόφησης πολυφαινολικών μεταβολιτών και άλλων αντιοξειδωτικών ενώσεων του μικροφύκους από τους ιστούς. Επιπλέον, η προστατευτική επίδραση των αντιοξειδωτικών έχει επισημανθεί κυρίως στους πιο «ευαίσθητοποιημένους» ιστούς καθώς και η λιπιδική υπεροξειδωση φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των ιστών (Côrtes *et al.*, 2012).

### 9.5. Μικροοργανισμοί στη μεγάλη κοιλία

Τα αποτελέσματα του πληθυσμού των μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο στον Πίνακα 8.18 και στο Σχήμα 8.15. Όσον αφορά τα πρωτόζωα και τους μύκητες στο υγρό της μεγάλης κοιλίας, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές για τους δύο κύριους διατροφικούς παράγοντες. Παρόμοια με τον πρώτο πειραματισμό και το σχολιασμό αναφορικά με τον πληθυσμό των πρωτοζώων, μυκήτων και αρχαίων, το επίπεδο ενσωμάτωσης του μικροφύκου στα 20 και 40 g ανά ημέρα δεν επηρέασε τους εν λόγω μικροοργανισμούς. Στον πληθυσμό των πρωτοζώων παρουσιάστηκε αριθμητική αύξηση του πληθυσμού τους στις ομάδες των XZ/ΣZ=40/60. Στην εργασία των Cantalapedra-Hijar *et al.* (2009) ο πληθυσμός των πρωτοζώων αυξήθηκε στη μεγάλη κοιλία αιγών που κατανάλωναν σιτηρέσιο αποτελούμενο από 30% σανό μηδικής και 70% συμπυκνωμένες ζωοτροφές έναντι αυτών με λόγο 70/30. Επιπλέον, στην εργασία των Franzolin και Dehority (1996), ο πληθυσμός των πρωτοζώων αυξήθηκε σημαντικά στη μεγάλη κοιλία μόσχων, οι οποίοι διατρέφονταν με σιτηρέσιο με λόγο XZ/ΣZ=50/50 σε σχέση με αυτούς που κατανάλωναν αποκλειστικά χονδροειδείς ζωοτροφές. Αντίθετα, οι λόγοι XZ/ΣZ της παρούσας μελέτης είχαν μικρότερη μεταξύ τους διαφορά σε σχέση με αυτούς των προαναφερθέντων μελετών. Επιπροσθέτως, στην εργασία των Zhang *et al.* (2017) ο πληθυσμός των αναερόβιων μυκήτων και των αρχαίων δεν επηρεάστηκε σημαντικά μεταξύ διαφορετικών λόγων XZ/ΣZ από 80/20 ως 20/80 στη διατροφή μοσχίδων.

Αναφορικά με τον πληθυσμό των μεθανοβακτηρίων, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στις ομάδες ενσωμάτωσης των 40 g του μικροφύκου σε σχέση με αυτές των 20 g. Κατά τον πρώτο πειραματισμό με λόγο XZ/ΣZ=50/50, όσον αφορά τα εν λόγω επίπεδα ενσωμάτωσης παρατηρήθηκε τάση αύξησης. Ο λόγος για τον οποίο ο πληθυσμός των μεθανοβακτηρίων αυξήθηκε με την υψηλότερη συμμετοχή του μικροφύκου και κατ' επέκταση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη διατροφή των αιγών χρήζει περαιτέρω διερεύνησης καθώς τα βιβλιογραφικά στοιχεία είναι περιορισμένα σχετικά με τη συμπλήρωση σιτηρεσίων με DHA και DPA σε αυξανόμενες δοσολογίες. Όσον αφορά τον παράγοντα XZ/ΣZ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές για τον πληθυσμό των μεθανοβακτηρίων παρά μόνο αριθμητική μείωση στις ομάδες με λόγο 40/60. Ομοίως, στην εργασία των Zhang *et al.* (2017) τα *Methanosphaera* και τα *Methanobrevibacter* μειώθηκαν αλλά όχι σημαντικά στις ομάδες υψηλής συμμετοχής συμπυκνωμένων ζωοτροφών.

Ο πληθυσμός των *Methanobrevibacter spp.* και των *Methanobacterium formicicum* παρουσίασε σημαντική μείωση στις ομάδες των 40 g ενσωμάτωσης του μικροφύκου σε σχέση με αυτές των 20 g προς επιβεβαίωση της τάσης μείωσης και της στατιστικώς σημαντικής μείωσης αντίστοιχα που παρατηρήθηκε στον πρώτο πειραματισμό. Επιπλέον, σχετική αφθονία των *Methanobacterium formicicum* αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες με λόγο ΧΖ/ΣΖ=40/60 σε σχέση με αυτό στις ομάδες ΧΖ/ΣΖ=60/40.

Ο πληθυσμός των *Ruminococcus flavefaciens* μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες των 40 g ενσωμάτωσης του μικροφύκου σε σχέση με αυτές των 20 g. Ωστόσο, κατά τον πρώτο πειραματισμό η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Η διαφορά αυτή μεταξύ των δύο πειραματισμών οφείλεται στην αριθμητική μείωση που παρατηρήθηκε στις ομάδες με λόγο ΧΖ/ΣΖ=40/60 έναντι αυτών με λόγο 60/40, χωρίς όμως να είναι στατιστικώς σημαντικές (Πίνακας 8.19). Ωστόσο, όταν η ανάλυση προσεγγίστηκε ανά διατροφικό παράγοντα (Πίνακας 8.18), οι προαναφερθείσες αριθμητικές τάσεις οδήγησαν στη σημαντική μείωση μεταξύ 20 και 40 g. Αντίστοιχα, στην εργασία των Ribeiro *et al.* (2015) η υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΧΖ/ΣΖ=20/80) στο σιτηρέσιο μόσχων μείωσε σημαντικά το πληθυσμό των *Ruminococcus flavefaciens*.

Οι *Ruminococcus albus* παρουσίασαν σημαντική μείωση στις ομάδες με λόγο ΧΖ/ΣΖ=40/60 σε σχέση με τις ομάδες ΧΖ/ΣΖ=60/40. Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη βρίσκονται τα αποτελέσματα της εργασίας των Ribeiro *et al.* (2015), στην οποία η υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΧΖ/ΣΖ=20/80) μείωσε τον πληθυσμό των εν λόγω μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας μοσχαριών. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται από τους Ribeiro *et al.* (2015) στην πτώση του pH της μεγάλης κοιλίας.

Ο πληθυσμός των *Streptococcus bovis* μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες των 40 g σε σχέση με αυτές των 20 g. Κατά τον πρώτο πειραματισμό διαπιστώθηκε μείωση των *Streptococcus bovis* καθώς αυξάνονταν η συμμετοχή του μικροφύκου στο σιτηρέσιο των αιγών, χωρίς όμως να είναι στατιστικώς σημαντική. Η συνεργητική δράση των δύο διαφορετικών παραγόντων, πιθανόν αύξησε τη μεταξύ των ομάδων διαφορά δίνοντας σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο επιπέδων ενσωμάτωσης του μικροφύκου. Επιπλέον, στην εργασία των Vargas *et al.* (2017) ο πληθυσμός των *Streptococcus bovis* μειώθηκε σημαντικά στο υγρό της μεγάλης κοιλίας σε *in vitro* φλάσκες Rusitec με την

προσθήκη μικροφυκών σε σχέση με την προσθήκη ιχθυελαίου και ηλιελαίου. Στην προαναφερθείσα εργασία ο πληθυσμός των βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Prevotella* αυξήθηκε σημαντικά με την προσθήκη ιχθυελαίου και μικροφυκών σε σχέση με την προσθήκη ηλιέλαιου ή ενός σιτηρεσίου χωρίς προσθήκη ελαίων. Τα αποτελέσματα αυτά επαναλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη, καθώς ο πληθυσμός των *Prevotella sp.* αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες των 40 g σε σχέση με αυτές των 20 g.

Ο πληθυσμός των *Fibrobacter succinogenes* αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες των 40 g σε σχέση με αυτές των 20 g, ενώ παρουσίασε τάση αύξησης υπέρ των ομάδων που έγινε υψηλή χορήγηση χονδροειδών ζωοτροφών. Στη μελέτη των Huws *et al.* (2010) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του εν λόγω μικροοργανισμού στο στερεό περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας μόσχων με την αύξηση του επιπέδου ενσωμάτωσης ιχθυελαίου. Επιπλέον, στη μελέτη Ribeiro *et al.* (2015) η υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών (XZ/ΣZ=20/80) μείωσε τον πληθυσμό των *Fibrobacter succinogenes* στο υγρό της μεγάλης κοιλίας μοσχαριών.



## 10. Γενικός σχολιασμός

Συμπερασματικά, με βάση το σύνολο των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, η προσθήκη των 20 g του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* αύξησε σημαντικά την περιεκτικότητα του γάλακτος των αιγών σε πολυάκορεστα λιπαρά οξέα και συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (CLA) και εμπλούτισε το γάλα με εικοδιπεντανοϊκό (DPA) και εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA) χωρίς να επηρεάσει σημαντικά τη χημική του σύσταση. Το αποτέλεσμα αυτό, ελκύει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον επιστημόνων και καταναλωτών, καθώς η πρόσληψη αυτών των λιπαρών οξέων με την τροφή από τον άνθρωπο συνδέεται με ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του. Επιπλέον, ο κατακλυσμός των μέσων ενημέρωσης και οι προωθητικές ενέργειες των φαρμακοβιομηχανιών σχετικά με την προώθηση συμπληρωμάτων διατροφής με EPA και DHA, ανοίγουν το δρόμο για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων (functional food), εμπλουτισμένα με φυσικό τρόπο, με αυτά τα ευεργετικά της υγείας λιπαρά οξέα.

Η βιομηχανία γάλακτος, αντιλαμβανόμενη τις απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού διερευνά τη δυνατότητα εφαρμογής διατροφικών τεχνικών προκειμένου να καλύψει αυτές τις συνεχώς μεταβαλλόμενες καταναλωτικές ανάγκες με φυσικό τρόπο. Ωστόσο, στην παγκόσμια αγορά, σύμφωνα με τον ισχύοντα κανονισμό και τον παγκόσμιο οργανισμό για τα EPA και DHA ωμέγα 3 λιπαρά οξέα (GOED), τα τρόφιμα που πρόκειται να χαρακτηρίζονται ως «DHA+EPA ενισχυμένα», πρέπει να περιέχουν τουλάχιστον 40 mg /100 g από τα προαναφερθέντα λιπαρά οξέα. Στην παρούσα εργασία η μέγιστη περιεκτικότητα που επετεύχθη με την προσθήκη των 20 g του μικροφύκου και λόγο XZ/ΣZ=60/40 στο σιτηρέσιο ήταν, 31 mg /100 ml γάλακτος. Στην αγορά των Ηνωμένων Πολιτειών, τα προϊόντα αυτά φέρουν την ετικέτα «DHA+EPA ενισχυμένα» ακόμα και με 32 mg /100 ml. Είναι φανερό λοιπόν ότι η πίεση που ασκείται από τη βιομηχανία καθιστά διαλλακτικό τον κανονισμό αυτό και με βάση τις πρόσφατες δημοσιεύσεις της EFSA στις οποίες τα DPA λιπαρά οξέα συγκαταλέγονται μαζί με τα EPA και DHA στα ευεργετικά για την υγεία του καταναλωτή, πιθανόν να υπάρξει αναθεώρηση του κανονισμού της GOED. Περαιτέρω όμως μελέτη, σχετικά με τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της μεταφοράς των DHA από την τροφή στο γάλα πιθανόν να οδηγήσει στην επιθυμητή περιεκτικότητα-στόχο των 40 mg /100 g.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα του γάλακτος, η προσθήκη 20 g του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* στο σιτηρέσιο δεν επηρέασε κανένα οξειδωτικό

δείκτη κατά τον πρώτο πειραματισμό, ενώ ο συνδυασμός του με λόγο ΧΖ/ΣΖ=60/40 παρουσίασε τη μεγαλύτερη δραστηριότητα του κύριου αντιοξειδωτικού ενζύμου SOD και τη μικρότερη περιεκτικότητα σε MDA και PC. Το αποτέλεσμα αυτό συνδέεται με επιθυμητά χαρακτηριστικά για τη βιομηχανία, η οποία επιζητά τη μέγιστη οξειδωτική σταθερότητα των προϊόντων, προκειμένου να καθίσταται ασφαλής η μεταφορά τους από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωση. Επιπλέον, η μεταφορά των εξωγενών αντιοξειδωτικών του μικροφύκους στο γάλα, πιθανόν να επηρεάζουν θετικά τη οξειδωτική σταθερότητα του προϊόντος στο ράφι (shelf life). Αντίθετα, μεγαλύτερο ποσοστό ενσωμάτωσης των μικροφυκών στο σιτηρέσιο των αιγών, αύξησε σημαντικά τους οξειδωτικούς δείκτες του αίματος και του γάλακτος καθιστώντας την ενσωμάτωση των 20 g ως την πλέον ασφαλή.

Ο μη επηρεασμός των παραγωγικών χαρακτηριστικών, όπως το ύψος της γαλακτοπαραγωγής και της χημικής σύστασης του παραγόμενου γάλακτος, σχετίζονται με την ομαλή λειτουργία των ζυμωτικών φαινομένων όπως έδειξε η μελέτη των κύριων μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας. Συγκεκριμένα, εκτός της μείωσης των *Ruminococcus flavofaciens* δεν παρατηρήθηκε άλλη διαφοροποίηση για τους πρωτεολυτικούς, κυτταρολυτικούς, αμυλολυτικούς και λιπολυτικούς μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας με την ενσωμάτωση των 20 g του μικροφύκους *Schizochytrium sp.* Τα αποτελέσματα αυτά έχουν μεγάλη φυσιολογική σημασία καθώς η εκμετάλλευση των κυτταρικών τοιχωμάτων των ζωοτροφών και της αμμωνίας που παράγεται στη μεγάλη κοιλία παίζουν σημαντικό ρόλο στη θρέψη των μηρυκαστικών ζώων.

Πέραν της εφαρμογής της εν λόγω διατροφικής επέμβασης με σκοπό τη δημιουργία ενός λειτουργικού τροφίμου, η προσθήκη μικροφυκών στη διατροφή των ζώων έχει διττό ρόλο. Η υποβάθμιση των χερσαίων επιφανειών για την καλλιέργεια συμβατικών ζωοτροφών, η λειψυδρία ολόενα και μεγαλύτερου ποσοστού καλλιεργήσιμων εκτάσεων και η δραστική κλιματική αλλαγή αποτελούν μεγάλες προκλήσεις για τη βιωσιμότητα της γεωργίας και της κτηνοτροφίας, οι οποίες επιτάσσουν τη μελέτη καινοτόμων πρώτων υλών. Κατά συνέπεια, οι βιώσιμες αυτές πρώτες ύλες και η βελτίωση της αποτελεσματικότητας των πόρων θα διαδραματίσουν ζωτικό ρόλο για τη μελλοντική πορεία των συστημάτων ζωικής παραγωγής.

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενα κεφάλαια της ανά χείρας μελέτης, η συνεισφορά της ζωικής παραγωγής στα αέρια του θερμοκηπίου εκτιμάται στο 18% των συνολικών ανθρωπογενών εκπομπών. Από το ποσοστό αυτό, τα μηρυκαστικά ζώα ευθύνονται για το 80%. Η προσθήκη του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* στο σιτηρέσιο αιγών μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των μεθανοβακτηρίων και ως εκ τούτου πιθανόν να βαίνουν μειούμενες και οι συνολικές εκπομπές μεθανίου. Το αποτέλεσμα αυτό συνδέεται άμεσα με τις στρατηγικές αντιμετώπισης της κλιματικής αλλαγής.

Η εφαρμογή της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης στο μικροβίωμα της μεγάλης κοιλίας, πέραν των σημαντικών στοιχείων που παρείχε στην παρούσα μελέτη, ανοίγει το δρόμο για μία νέα γενιά ολιστικής μελέτης του μικροβιώματος της μεγάλης κοιλίας και κατ' επέκταση τη μοντελοποίησή του, προκειμένου να αποτελέσει δείκτη πρόβλεψης παραγωγικών και βιοχημικών παραμέτρων. Ειδικότερα, σύμφωνα με τους θεμελιωτές της μελέτης του μικροβιώματος των μηρυκαστικών, C.J. Newbold και D. P. Morgavi, στόχος του άμεσου μέλλοντος είναι η χρησιμοποίηση εξισώσεων στις οποίες τα εισαχθέντα στοιχεία θα αποτελούν τα αποτελέσματα μια απλής και γρήγορης μεταγονιδιωματικής ανάλυσης του μικροβιώματος της μεγάλης κοιλίας, και τα αποτελέσματα θα αφορούν παραγωγικούς και βιοχημικούς δείκτες των μηρυκαστικών ζώων.

Εν κατακλείδι, η μελέτη του ανοσοποιητικού συστήματος παρείχε πλήθος νέων δεδομένων αναφορικά με τη μεταγωγή του σήματος από τους υποδοχείς των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων στη μεταγραφή των κυτοκινών και χημειοκινών. Η μείωση της σχετικής έκφρασης των προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών αποτελεί πιθανό θετικό αποτέλεσμα καθώς συνδέεται με τη μείωση της χρόνιας φλεγμονής και την πιθανή, αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση παθογόνων. Επιπλέον, η διαφορετική ανταπόκριση των δύο ιστών (μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα) στη διατροφική επέμβαση παρέχει αποτελέσματα σχετικά με την εξειδίκευση των ιστών από την επίδραση της διατροφής. Ωστόσο, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων του ανοσοποιητικού συστήματος δημιούργησε πληθώρα ερευνητικών υποθέσεων όπως η εν τω βάθει τρανσκριπτομική μελέτη των εικοσανοειδών και των ενζύμων που τα παράγουν. Τέλος, η ενσωμάτωση των μικροφυκών *Schizochytrium sp.* στο σιτηρέσιο των αιγών και η ταυτόχρονη επιμόλυνση με παθογόνο ή η προσομοίωση στρεσογόνων

συνθηκών όπως η θερμική καταπόνηση, θα έδινε σαφέστερα στοιχεία σχετικά με την ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος.

## 11. Συμπεράσματα

- Η μέγιστη δυνατή κατανάλωση του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* στο σιτηρέσιο γαλακτοπαραγωγών αιγών προσδιορίστηκε στα 40 g/ ζώο ημερησίως με λόγο XZ/ΣZ=50/50.
- Η ενσωμάτωση των 40 g του μικροφύκου μείωσε σημαντικά τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος ενώ αυτή των 20 g δεν την επηρέασε.
- Το προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος τροποποιήθηκε προς την επιθυμητή, από πλευράς υγείας του καταναλωτή, κατεύθυνση με αύξηση των PUFA και των ευεργετικών λιπαρών οξέων DHA και DPA.
- Η προσθήκη των 20 g του μικροφύκου στο σιτηρέσιο δεν επηρέασε την οξειδωτική κατάσταση των ζώων και του γάλακτος, ενώ η μεγαλύτερη ενσωμάτωση επέφερε οξειδωτικό στρες.
- Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στα ζυμωτικά φαινόμενα της μεγάλης κοιλίας δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την προσθήκη των 20 g του μικροφύκου στο σιτηρέσιο, ενώ οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί, υπεύθυνοι για τη μεθανογένεση, μειώθηκαν σημαντικά.
- Η έκφραση των γονιδίων των προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών μειώθηκε σημαντικά στα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα των αιγών που κατανάλωναν το μικροφύκος σε 20 και 40 g/ ζώο ημερησίως.
- Η ενσωμάτωση 40 g του μικροφύκου σε σιτηρέσιο πλούσιο σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές, επέφερε το βέλτιστο προφίλ λιπαρών οξέων στο γάλα σύμφωνα με τις διατροφικές οδηγίες για την υγεία του ανθρώπου-καταναλωτή. Ωστόσο η οξειδωτική του κατάσταση δεν ήταν η επιθυμητή.
- Η ενσωμάτωση 20 g του μικροφύκου σε σιτηρέσιο με λόγο XZ/ΣZ υπέρ των XZ επέφερε το βέλτιστο μικροβιακό προφίλ, από πλευράς ομοιοστασίας των ζυμωτικών φαινομένων, στη μεγάλη κοιλία.

Εν κατακλείδι, η προσθήκη των 20 g του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* στο σιτηρέσιο γαλακτοπαραγωγών αιγών με λόγο XZ/ΣZ=60/40 αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική τροποποίησης του προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων προς την επιθυμητή κατεύθυνση χωρίς καμία σημαντική, αρνητική επίδραση στη χημική σύσταση και την οξειδωτική του σταθερότητα. Επιπλέον, η μείωση των μεθανοβακτηρίων της μεγάλης κοιλίας, πιθανόν

συνδέεται με τη μείωση των εκπομπών μεθανίου και κατ' επέκταση τη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος του γάλακτος.

## 12. Προοπτικές

Η ανά χείρας μελέτη απάντησε σε πλήθος ερευνητικών ερωτημάτων, ενώ παράλληλα δημιούργησε νέα. Ειδικότερα, όσον αφορά τον πρωταρχικό στόχο της μελέτης σχετικά με τη συμπλήρωση του γάλακτος με πολυάκορεστα λιπαρά οξέα, δημιουργήθηκε το ερώτημα για την ενσωμάτωση στο σιτηρέσιο των αιγών δύο ειδών μικροφυκών. Συγκεκριμένα, η συμπλήρωση αυτοτροφικών μικροφυκών όπως το *Nannochloropsis* και το *Tetraselmis* τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό σε EPA λιπαρά οξέα, σε συνδυασμό με το μελετηθέν μικροφύκος, πιθανόν να βελτιώνει την περιεκτικότητα του γάλακτος σε DHA και EPA ώστε να επιτευχθεί ο στόχος των 40 mg/100 ml.

Η υψηλή συμμετοχή του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* (40 και 60 g) στο σιτηρέσιο των αιγών μείωσε τη λιποπεριεκτικότητα, καθώς επίσης, τα δύο κυρίαρχα ανασταλτικά της λιπογένεσης λιπαρά οξέα αυξήθηκαν στο γάλα των ομάδων αυτών. Έτσι, άλλο ένα ερευνητικό ερώτημα που προέκυψε, αφορά τη μελέτη περισσότερων ισομερών που δύνανται να δρουν ανασταλτικά της λιπογένεσης, την επίδραση αυτών των λιπαρών οξέων στην έκφραση λιπογενετικών γονιδίων στο μαστικό αδένα και η μεταξύ τους συσχέτιση.

Επιπλέον, η μεταγονιδιωματική ανάλυση στο υγρό της μεγάλης κοιλίας παρείχε σημαντικά στοιχεία σχετικά με την επίδραση της διατροφικής επέμβασης στα βακτήρια της μεγάλης κοιλίας. Ωστόσο, το απομονωθέν γονιδίωμα που μελετήθηκε μπορεί να προέρχεται είτε από νεκρά βακτήρια, είτε από μη δραστικά. Σαφέστερα αποτελέσματα μπορούν να αντληθούν από την αλληλούχηση απομονωθέντος RNA και τη μελέτη συγκεκριμένων περιοχών, χαρακτηριστικών των υπό μελέτη μικροοργανισμών. Ακόμα ένα ερευνητικό ερώτημα που προέκυψε από την παρούσα μελέτη είναι ο σχεδιασμός εκκινήτων σε υπερμεταβλητές περιοχές του γονιδίου 18s rRNA με σκοπό την αλληλούχηση και τη βιοπληροφορική ανίχνευση των Αρχαίων στα οποία ταξινομούνται τα μεθανοβακτήρια.

Τέλος, η ολιστική προσέγγιση του εκπεμπόμενου μεθανίου των αιγών στο σιτηρέσιο των οποίων προστέθηκαν τα μικροφύκη σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα θα παρείχε μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με την τυχόν μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος της όλης παραγωγικής διαδικασίας των προϊόντων.

### 13. Βιβλιογραφία

#### Ελληνική:

Ζέρβας Π. Γεώργιος 2007 Κατάρτιση σιτηρεσιών παραγωγικών ζώων Εκδόσεις Σταμούλη

Ζέρβας Π. Γεώργιος 2013 Διατροφή μηρυκαστικών Εκδόσεις Σταμούλη ISBN: 978-960-351-941-6

Κανδύλης Κωνσταντίνος 2006 Πέψη και μεταβολισμός στα μηρυκαστικά Εκδόσεις Σταμούλη

#### Διεθνής:

##### A

Abuelfatah K., Zuki A., Goh Y., Sazili A., Abubakr A. 2016 Effects of feeding whole linseed on ruminal fatty acid composition and microbial population in goats, *Animal Nutrition*, Vol. 2, Is. 4, p. 323-328, <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.10.004>.

Albert, C. M., Hennekens, C. H., O'Donnell, C. J., Ajani, U. A., Carey, V. J., Willett, W. C., Ruskin, J. N. & Manson, J. E. 1998 Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *J. Am. Med. Assoc.* 279: 23–28.

Aldinucci, D., & Colombatti, A. (2014). The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–12. doi:10.1155/2014/292376

Atwell, D. M., Grichnik, K. P., Newman, M. F., Reves, J. G., & McBride, W. T. (1998). Balance of proinflammatory and antiinflammatory cytokines at thoracic cancer operation. *The Annals of Thoracic Surgery*, 66(4), 1145–1150. doi:10.1016/s0003-4975(98)00592-x

Argov-Argaman, N., Mesilati-Stahy, R., Magen, Y., & Moallem, U. (2014). Elevated concentrate-to-forage ratio in dairy cow rations is associated with a shift in the diameter of milk fat globules and remodeling of their membranes. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6286–6295. doi:10.3168/jds.2014-8174

Ashford, A., Barclay, W. R., Weaver, C. A., Giddings, T. H., & Zeller, S. (2000). Electron microscopy may reveal structure of docosaheptaenoic acid-rich oil within *Schizochytrium* sp. *Lipids*, 35(12), 1377–1387. doi:10.1007/s11745-000-0655-2



**B**

Bach A., Calsamiglia S., and Stern M. D. 2005 Nitrogen Metabolism in the Rumen J. Dairy Sci. 88:(E. Suppl.) E9–E21

Baldie, G., Kaimakamis, D., & Rotondo, D. (1993). Fatty acid modulation of cytokine release from human monocytic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1179(2), 125–133. doi:10.1016/0167-4889(93)90133-a

Bessa, R.J.B., Santos-Silva, J., Ribeiro, J.M.R., Portugal, A.V., 2000. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livest. Prod. Sci.* 63, 201–211.

Bellance N., Lestienne P., Rossignol R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis *Frontiers in Bioscience* 14, 4015-4034, January 1, 2009

Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239 (1), 70–76.

Bondia-Pons, I., Castellote, M., Lopez-Sabater, M., 2004. Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *J. Chromatogr. B* 809, 339–344

Boeckaert C., Fievez V., Van Hecke D., Verstraete W., Boon N. (2007). Changes in rumen biohydrogenation intermediates and ciliates after algae supplementation to dairy cattle. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 109. 10.1002/ejlt.200700052.

Boeckaert C., Vlaeminck B., Fievez V., Maignien L., Dijkstra J., Boon N. (2008). Accumulation of trans C-18:1 Fatty Acids in the Rumen after Dietary Algal Supplementation Is Associated with Changes in the *Butyrivibrio* Community. *Applied and environmental microbiology.* 74. 10.1128/AEM.01473-08.

Boeckaert, C., Mestdagh, J., Vlaeminck, B., Clayton, D., & Fievez, V. (2006). Microalgae as potent rumen methane inhibitors and modifiers of rumen lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acid. *International Congress Series*, 1293, 184–188. doi:10.1016/j.ics.2006.01.016

Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Buccioni A., Decandia M., Minieri S., Molle G., Cabidda A. 2012 Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors *Animal Feed Science and Technology* 174 (2012) 1–25

Buddle, B. M., Denis, M., Attwood, G. T., Altermann, E., Janssen, P. H., Ronimus, R. S., Neil Wedlock, D. (2011). Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*, 188(1), 11–17. doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.019

## C

Calder Philip C. 2001 Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation, and Immunity *Lipids*, Vol. 36, no. 9 (2001)

Calder, P. C., & Newsholme, E. A. (1992). Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. *Clinical Science*, 82(6), 695–700. doi:10.1042/cs0820695

Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D. R., Martín-García, A. I., & Molina-Alcaide, E. (2009). Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science*, 87(2), 622–631. doi:10.2527/jas.2008-1142

Caroprese, M., Marzano, A., Marino, R., Gliatta, G., Muscio, A., & Sevi, A. (2010). Flaxseed supplementation improves fatty acid profile of cow milk. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2580–2588. doi:10.3168/jds.2008-2003

Castro-Carrera T., Toral P. G., Frutos P., McEwan N. R., Hervás G., Abecia L., Pinloche E., Girdwood S. E., Belenguer A. 2014 Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. *J Dairy Sci.* 2014 Mar; 97(3): 1661–1669. Published online 2014 Jan 17. doi: 10.3168/jds.2013-7243

Chaves, A.V., He, M.L., Yang, W.Z., Hristov, A.N., McAllister, T.A., Benchaar, C., 2008. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Canadian Journal of Animal Science* 88, 117–122.

Chilliard Y., Glasser F., Ferlay A., Bernard L., Rouel J., Doreau M. 2007 Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109 (2007) 828–855

Chilliard, Y., A. Ferlay, J. Rouel, and G. Lamberet. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86:1751–1770

Clarke, R. T. J. Bauchop T. *Microbial ecology of the gut* Academic Press, 1977

Cosgrove, G.P., Waghorn, G.C., Anderson, C.B., Peters, J.S., Smith, A., Molano, G., Deighton, M., 2008. The effect of oils fed to sheep on methane production and digestion of ryegrass pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48, 189–192.

Cotta M. A. 1988 Amylolytic Activity of Selected Species of Ruminal Bacteria Applied and environmental microbiology. p. 772-776

Côrtés, C., Palin, M.-F., Gagnon, N., Benchaar, C., Lacasse, P., & Petit, H. V. (2012). Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and concentration of the mammalian lignan enterolactone in milk and plasma of dairy cows fed flax lignans and infused with flax oil in the abomasum. *British Journal of Nutrition*, 108(08), 1390–1398. doi:10.1017/s0007114511006829

## D

Dagnaw, Gashaw & A, Mebrat & A, Wubie & H, Kendie. (2016). Review on Goat Milk Composition and its Nutritive Value. *Journal of Nutrition and Health Sciences.* 3. 10.15744/2393-9060.3.401.

Dangi, B., Obeng, M., Nauroth, J. M., Chung, G., Bailey-Hall, E., Hallenbeck, T., *et al.* Metabolism and biological production of resolvins derived from docosapentaenoic acid (DPAn-6). *Biochem. Pharmacol.* 2010;79(2):251-60.

Drawu Tseten Scanning Electron Microscopy: Examining Attachment of Cellulolytic Rumen Microbes to Cellulose *Biol* 3410

Dehority, B.A., 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 372 pp.

Devillard, E., McIntosh, F.M., Castet, R.J., Wallace, J., Newbold, C.J., 2004. Conjugated linoleic acid composition of rumen bacterial and protozoal populations. *Reprod. Nutr. Dev.* 44 (Suppl. 1), 60.

Devillard, E., McIntosh, F.M., Newbold, C.J., Wallace, R.J., 2006. Rumen ciliate protozoan contain high concentration of conjugated linoleic acids and vaccenic acid, yet do not hydrogenate linoleic acid or desaturate stearic acid. *Brit. J. Nutr.* 96, 697–704.

Dewanckele L, Vlaeminck B., Hernandez-Sanabria E., Ruiz-González A., Debruyne S., Jeyanathan J., Fievez V. 2018 Rumen Biohydrogenation and Microbial Community Changes Upon Early Life Supplementation of 22:6n-3 Enriched Microalgae to Goats. *Front Microbiol.* 2018 Mar 27;9:573. doi: 10.3389/fmicb.2018.00573.

Duval, S. M., McEwan, N. R., Graham, R. C., Wallace, R. J., & Newbold, C. J. (2007). Effect of a blend of essential oil compounds on the colonization of starch-rich substrates by bacteria in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2132–2141. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03455.x

## **E**

Edmondson, L., R. Yoncoskie, N. Rainey, F. Douglas, Jr. and J. Bitman, 1974. Feeding encapsulated oils to increase the polyunsaturation in milk and meat fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51: 7276.

El-Sabagh, Mabrouk. (2014). Effects of *Spirulina Platensis* Algae on Growth Performance, Antioxidative Status and Blood Metabolites in Fattening Lambs. *Journal of Agricultural Science/ Canadian Center of Science and Education*. 6. 92.

Eisen, H. N., & Chakraborty, A. K. (2010). Evolving concepts of specificity in immune reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(52), 22373–22380. doi:10.1073/pnas.1012051108

## **F**

Fay, J.P., Jakober, K.D., Cheng, K.J., Costerton, J.W., 1990. Esterase activity of pure cultures of rumen bacteria as expressed by the hydrolysis of p-nitrophenylpalmitate. *Can. J. Microbiol.* 36, 585–589.

Fenton, J. I., Hord, N. G., Ghosh, S., & Gurzell, E. A. (2013). Immunomodulation by dietary long chain omega-3 fatty acids and the potential for adverse health outcomes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 89(6), 379–390. doi:10.1016/j.plefa.2013.09.011

Fernando S. C., Purvis H. T., Najar II, F. Z., Sukharnikov L. O., Krehbiel C. R., Nagaraja T. G., Roe B. A., DeSilva U. 2010 Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet *Appl Environ Microbiol.* 2010 Nov; 76(22): 7482–7490. Published online 2010 Sep 17. doi: 10.1128/AEM.00388-10

Fievez, V., Dohme, F., Danneels, M., Raes, K., & Demeyer, D. (2003). Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation in vitro and in vivo. *Animal Feed Science and Technology*, 104(1-4), 41–58. doi:10.1016/s0377-8401(02)00330-9

Fievez, V., Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Mestdagh, J., & Demeyer, D. (2007). In vitro examination of DHA-edible micro-algae. *Animal Feed Science and Technology*, 136(1-2), 80–95. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.08.016

Finlay B., Esteban G., Clarke K., Williams A., Embley M. and Hirt R. (1994) Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens *FEMS Microbiology Letters* 117 157-162

Fonknechten, N.; Perret, A.; Perchat, N.; Tricot, S.; Lechaplais, C.; Vallenet, D.; Vergne, C.; Zapparucha, A.; Le Paslier, D.; Weissenbach, J.; Marcel Salanoubat, M., 2009: A conserved gene cluster rules anaerobic oxidative degradation of Lornithine. *Journal of Bacteriology* 191, 3162–3167.

Franzolin, R., & Dehority, B. A. (1996). Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *Journal of Animal Science*, 74(11), 2803. doi:10.2527/1996.74112803x

Fricke, Henning Seedorf, Anke Henne, Markus Krüer, Heiko Liesegang, Reiner Hedd erich, Gerhard Gottschalk, Rudolf K. Thauer 2006 The Genome Sequence

of *Methanosphaera stadtmanae* Reveals Why This Human Intestinal Archaeon Is Restricted to Methanol and H<sub>2</sub> for Methane Formation and ATP Synthesis Wolfgang Journal of Bacteriology Dec 2005, 188 (2) 642-658; DOI: 10.1128/JB.188.2.642-658.2006

## G

Gabai G, Testoni S, Piccinini R, Marinelli L, Stradaioli G: Oxidative stress in primiparous cows in relation to dietary starch and the progress of lactation. *Anim Sci* 2004, 79:99–108

Gama, M. A. S., P. C. Garnsworthy, J. M. Griinari, P. R. Leme, P. H. M. Rodrigues, L. W. O. Souza, and D. P. D. Lanna. 2008. Diet-induced milk fat depression: Association with changes in milk fatty acid composition and fluidity of milk fat. *Livest. Sci.* 115:319–331

Gill, R., Tsung, A., & Billiar, T. (2010). Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(9), 1121–1132. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.006

Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., De Cooman, L., 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J. Appl. Phycol.* 24, 1477–1486.

Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V., & Bauman, D. E. (2000). Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by  $\Delta^9$ -Desaturase. *The Journal of Nutrition*, 130(9), 2285–2291. doi:10.1093/jn/130.9.2285

Gruby, D. & Delafond, H. M. (1843). Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 17: 1304-1308.

Guo, Y., Xu, X., Zou, Y., Yang, Z., Li, S., & Cao, Z. (2013). Changes in feed intake, nutrient digestion, plasma metabolites, and oxidative stress parameters in dairy cows with subacute ruminal acidosis and its regulation with pelleted beet pulp. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 31. doi:10.1186/2049-1891-4-31

**H**

Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M.A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R., Nafissi-Varcheh, N., 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J. Appl. Phycol.* 22, 43–50.

Hayashi, N., Tashiro, T., Yamamori, H., Takagi, K., Morishima, Y., Otsubo, Y., Sugiura, T., Furukawa, K., Nitta, H., Nakajima, N., Suzuki, N., and Ito, I. (1998) Effects of Intravenous Omega-3 and Omega-6 Fat Emulsion on Cytokine Production and Delayed Type Hypersensitivity in Burned Rats Receiving Total Parenteral Nutrition, *J. Parenter. Enteral Nutr.* 22, 363–367.

Hou Z, Wang Z, Chai T, Jia Y, Gong Q, Ma J, Wang Y: Effects of forage to concentrate ratio on homeostasis of rumen and oxidative stress in cows. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences* 2008, 39:455–459.

Henderson, C., 1971. A study of the lipase produced by *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 65, 81–89.

Hughes, P.E., Hunter, W.J., Tove, S.B., 1982. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of cis-9, trans-11-octadecadienoate reductase. *J. Biol. Chem.* 257, 3643–3649.

Hutchins, A. P., Diez, D., & Miranda-Saavedra, D. (2013). The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Briefings in Functional Genomics*, 12(6), 489–498. doi:10.1093/bfpg/elt028

Hussain, S. K. A., Srivastava, A., Tyagi, A., Shandilya, U. K., Kumar, A., Kumar, S., Tyagi, A. K. (2016). Characterization of CLA-producing *Butyrivibrio* spp. reveals strain-specific variations. *3 Biotech*, 6(1). doi:10.1007/s13205-016-0401-2

Huws, S. A., Lee, M. R. F., Muetzel, S. M., Scott, M. B., Wallace, R. J., & Scollan, N. D. (2010). Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiology Ecology*, no–no. doi:10.1111/j.1574-6941.2010. 00892.x

**I**

Ivan M., Petit V., Chiquette J., Wright A. 2012. Rumen fermentation and microbial population in lactating dairy cows receiving diets containing oilseeds rich in C-18 fatty acids. *The British journal of nutrition.* 109. 1-8. 10.1017/S0007114512003030.

**J**

Jalc, D., Čertík, M., Kundrliková, K., & Kubelková, P. (2009). Effect of microbial oil and fish oil on rumen fermentation and metabolism of fatty acids in artificial rumen.

Jenkins, T. C., R. J. Wallace, P. J. Moate, and E. E. Mosley. 2008. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86:397–412.

Jeyanathan, J., Escobar, M., Wallace, R. J., Fievez, V., and Vlaeminck, B. (2016). Biohydrogenation of 22:6n-3 by *Butyrivibrio proteoclasticus* P18. *BMC Microbiol.* 16:104. doi: 10.1186/s12866-016-0720-9

Jun H. S., , C M. Qi, J. K. Ha. Forsberg W. 2007 *Fibrobacter succinogenes*, a Dominant Fibrolytic Ruminant Bacterium: Transition to the Post Genomic Era Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 2007;20(5): 802-810. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.802> Published online March 5, 2007.

**K**

Kaneda, T., 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* 55, 288–302.

Kelly, W. J., Leahy, S. C., Li, D., Perry, R., Lambie, S. C., Attwood, G. T., & Altermann, E. (2014). The complete genome sequence of the rumen methanogen *Methanobacterium formicicum* BRM9. *Standards in Genomic Sciences*, 9(1), 15. doi:10.1186/1944-3277-9-15

Kemp, P., White, R. W., and Lander, D. J. (1975). The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *Microbiology* 90, 100–114. doi: 10.1099/00221287-90-1-100

Kepler, C.R., Hirons, K.I., McNeill, P.H., Tove, S.B., 1966. Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241, 1350–1354.

Kepler, C.R., Tove, S.B., 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: III. Purification and properties of a linoleate  $\Delta^2$ -cis,  $\Delta^11$ -trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 242, 5686–5692.



Kim, E.J., Huws, S.A., Lee, M.R.F., Wood, J.D., Muetzel, S.M., Wallace, R.J., Scollan, N.D., 2008. Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and trans-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. *J. Nutr.* 138, 889–896.

Kim M, Park T, Yu Z. 2017 Metagenomic investigation of gastrointestinal microbiome in cattle. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2017 Nov;30(11):1515-1528. doi: 10.5713/ajas.17.0544. Epub 2017 Aug 22.

Kramer, J.K.G., Cruz-Hernandez, C., Deng, Z., Zhou, J., Jahreis, G., Dugan, M.E.R., 2004. Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 11375–11445.

Kohli, P., & Levy, B. D. (2009). Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 158(4), 960–971. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00290.x

## L

Laemmli, UK., 1970. Cleavage and structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lanier S., J., Suagee, J. K., Becvar, O., & Corl, B. A. (2013). Mammary Uptake of Fatty Acids Supplied by Intravenous Triacylglycerol Infusion to Lactating Dairy Cows. *Lipids*, 48(5), 469–479. doi:10.1007/s11745-013-3782-6

Lee, J. Y., Ye, J., Gao, Z., Youn, H. S., Lee, W. H., Zhao, L., Hwang, D. H. (2003). Reciprocal Modulation of Toll-like Receptor-4 Signaling Pathways Involving MyD88 and Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT by Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37041–37051. doi:10.1074/jbc.m305213200

Leahy, S. C., Kelly, W. J., Li, D., Li, Y., Altermann, E., Lambie, S. C., Attwood, G. T. (2013). The Complete Genome Sequence of *Methanobrevibacter* sp. AbM4. *Standards in Genomic Sciences*, 8(2), 215–227. doi:10.4056/sigs.3977691

Liu K, Hao X, Li Y, Luo G, Zhang Y, Xin H. The relationship between odd- and branched-chain fatty acids and microbial nucleic acid bases in rumen. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2017;30(11):1590-1597.

Liu, S. J., Bu, D. P., Wang, J. Q., Liu, L., Liang, S., Wei, H. Y., Loo, J. J. (2011). Effect of incremental levels of fish oil supplementation on specific bacterial populations in bovine ruminal fluid. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(1), 9–16. doi:10.1111/j.1439-0396.2010.01113.x

## M

Ma, N., Abaker, J. A., Bilal, M. S., Dai, H., & Shen, X. (2018). Sodium butyrate improves antioxidant stability in sub-acute ruminal acidosis in dairy goats. *BMC Veterinary Research*, 14(1). doi:10.1186/s12917-018-1591-0

Machado, S. C., McManus, C. M., Stumpf, M. T., & Fischer, V. (2014). Concentrate: forage ratio in the diet of dairy cows does not alter milk physical attributes. *Tropical Animal Health and Production*, 46(5), 855–859. doi:10.1007/s11250-014-0576-7

Machmüller, A., Soliva, C. R., & Kreuzer, M. (2003). Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *British Journal of Nutrition*, 90(03), 529. doi:10.1079/bjn2003932

Madeira, M. S., Cardoso, C., Lopes, P. A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N. M., & Prates, J. A. M. (2017). Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock Science*, 205, 111–121. doi:10.1016/j.livsci.2017.09.020

Maia, M. R. G., Fonseca, A. J. M., Oliveira, H. M., Mendonça, C., & Cabrita, A. R. J. (2016). The Potential Role of Seaweeds in the Natural Manipulation of Ruminal Fermentation and Methane Production. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep32321

Matsumura, S., & Demaria, S. (2010). Up-regulation of the Pro-inflammatory Chemokine CXCL16 is a Common Response of Tumor Cells to Ionizing Radiation. *Radiation Research*, 173(4), 418–425. doi:10.1667/rr1860.1

Martin, C., Morgavi, D. P., & Doreau, M. (2009). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4(03), 351–365. doi:10.1017/s1751731109990620

Mavangira V., Sordillo L. (2017). Role of lipid mediators in the regulation of oxidative stress and inflammatory responses in dairy cattle. *Research in Veterinary Science*. 116. 10.1016/j.rvsc.2017.08.002.

Mavrommatis A., Chronopoulou G., Sotirakoglou K., Labrou N., Zervas G., Tsiplakou E. 2018 The impact of the dietary supplementation level with schizochytrium sp, on the oxidative capacity of both goats' organism and milk. *Livestock Science*, Vol. 218, P. 37-43, ISSN 1871-1413, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.10.014>.

McCann S. and Roulston C. NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives *Brain Sci.* 2013, 3(2), 561-598; doi:10.3390/brainsci3020561

McKain, N., Shingfield, K.J., Wallace, R.J., 2010. Metabolism of conjugated linoleic acids and 18:1 fatty acids by ruminal bacteria: products and mechanisms. *Microbiology* 156, 579–588

Mele, M., Buccioni, A., Petacchi, F., Serra, A., Banni, S., Antongiovanni, M., & Secchiari, P. (2006). Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on milk yield, and composition from Sarda ewes. *Animal Research*, 55(4), 273–285. doi:10.1051/animres:2006019

Millen D., Arrigoni M., Pacheco R. 2016 *Rumenology* Springer ISBN 978-3-319-30533-2

Moate, P. J., Williams, S. R. O., Hannah, M. C., Eckard, R. J., Auldist, M. J., Ribaux, B. E., Wales, W. J. (2013). Effects of feeding algal meal high in docosahexaenoic acid on feed intake, milk production, and methane emissions in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 3177–3188. doi:10.3168/jds.2012-6168

Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *SJST* 26 (2), 211–219.

Moon, C.D., Pacheco, D.M., Kelly, W.J., Leahy, S.C., Li, D., Kopecny, J., Attwood, G.T., 2008. Reclassification of *Clostridium proteoclasticum* as *Butyrivibrio proteoclasticus* comb. nov., a butyrate-producing ruminal bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2041–2045.

## N

Nagaraja T.G. Chapter 2 *Microbiology of the Rumen* Springer International Publishing Switzerland 2016 D.D. Millen *et al.* (eds.), *Rumenology*, DOI 10.1007/978-3-319-30533-2\_2

Nam, I.S., Garnsworthy, P.C., 2007. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 103, 551–556.

National Research, Council, 2007. Nutrient Requirements of Small ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. The National Academies Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.17226/11654>.

Nauroth, J. M., Liu, Y. C., Van Elswyk, M., Bell, R., Hall, E. B., Chung, G., *et al.* Docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA<sub>n</sub>-6) algal oils reduce inflammatory mediators in human peripheral mononuclear cells in vitro and paw edema in vivo. *Lipids.* 2010;45(5):375-84.

Niwińska B. 2012 Digestion in Ruminants BOOK: Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology", Chuan-Fa Chang, ISBN 978-953-51-0864-1

Norris, P. C., & Dennis, E. A. (2012). Omega-3 fatty acids cause dramatic changes in TLR4 and purinergic eicosanoid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), 8517–8522. doi:10.1073/pnas.1200189109

## O

O'Fallon, J., 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, 1511–1521.

Oh, D. Y., Talukdar, S., Bae, E. J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulinsensitizing effects. *Cell.* 2010;142(5):687-98.

Orpin CG. 1975 Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis* *Journal of General Microbiology* 91, 249-262

## P

Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., & Stanton, C. (2012). Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012, 1–16. doi:10.1155/2012/539426

Patra, A. K., & Yu, Z. (2013). Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 897–905. doi:10.1007/s00253-013-4930-x

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26(6): 509–515

Piperova, L. S., Teter, B. B., Bruckental, I., Sampugna, J., Mills, S. E., Yurawecz, M. P., Erdman, R. A. (2000). Mammary Lipogenic Enzyme Activity, trans Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acids Are Altered in Lactating Dairy Cows Fed a Milk Fat–Depressing Diet. *The Journal of Nutrition*, 130(10), 2568–2574. doi:10.1093/jn/130.10.2568

Poppitt, S., G. Keogh, T. Mulvey, B. McArdle, A. MacGibbon and G. Cooper, 2002. Lipid-lowering effects of a modified butter-fat: a controlled intervention trial in healthyman. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 56: 6471.

## Q

## R

Reiser, R., 1951. Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by the ruminant. *Fed. Proc.* 10, 236.

Ribeiro, C. S., Granja-Salcedo, Y. T., Messana, J. D., Neto, A. J., Canesin, R. C., Fiorentini, G., Berchiekki, T. T. (2015). Feeding increasing concentrate to Tifton 85 hay ratios modulated rumen fermentation and microbiota in Nellore feedlot steers. *The Journal of Agricultural Science*, 153(06), 1116–1127. doi:10.1017/s0021859615000337

Riggion, M. R.; Lennon, A., 2002: Development of a PCR assay specific for *Peptostreptococcus anaerobius*. *Journal of Medical Microbiology* 51, 1097–1101.

Rode, L. M., McAllister, T. A., & Cheng, K.-J. (1990). Microbial degradation of vitamin A in rumen fluid from steers fed concentrate hay or straw diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 70(1), 227–233. doi:10.4141/cjas90-026

## S

Sagi, M., Fluhr, R., 2001. Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 126, 1281–1290.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH image to imageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9 (7), 671.

Schmidely, P., & Andrade, P. V. D. (2011). Dairy performance and milk fatty acid composition of dairy goats fed high or low concentrate diet in combination with soybeans or canola seed supplementation. *Small Ruminant Research*, 99(2-3), 135–142. doi:10.1016/j.smallrumres.2011.04.010

Shingfield, K., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Ärölä, A., Nurmela, K., Huhtanen, P., & Griinari, J. (2003). Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science*, 77(1), 165-179. doi:10.1017/S1357729800053765

Shingfield, K.J., Ahvenjarvi, S., Toivonen, V., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Griinari, J.M., 2008. Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *Brit. J. Nutr.* 99, 971–983

Shingfield KJ, Chilliard Y, Toivonen V, Kairenius P & Givens 565 D I 2008 Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 606 3-65

Shingfield K., Kairenius P., Ärölä A., Paillard D., Muetzel S., Ahvenjärvi S., Vanhatalo A., Huhtanen P., Toivonen, V., Mikko G., Wallace J. (2012). Dietary Fish Oil Supplements Modify Ruminal Biohydrogenation, Alter the Flow of Fatty Acids at the Omasum, and Induce Changes in the Ruminal Butyrivibrio Population in Lactating Cows. *The Journal of nutrition.* 142. 1437-48. 10.3945/jn.112.158576.

Simopoulos, A. P. 1998 Redefining dietary reference values and food safety. *World Review of Nutrition and Dietetics* 83 219=222

Simopoulos, A. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(8), 365–379. doi:10.1016/s0753-3322(02)00253-6

Singh, S., Hawke, J.C., 1979. The *in vitro* lipolysis and biohydrogenation of monogalactosyldiglyceride by whole rumen content and its fractions. *J. Sci. Food Agric.* 30, 603–612

Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM 2010 Saturated fatty acids and risk of coronary heart disease: modulation by replacement nutrients. *Curr Atheroscler Rep.* 12 (6) 384-390 DOI: 10.1007/s11883-010-0131-6

Srivastava, P. K., Hull, R. P., Behmoaras, J., Petretto, E., & Aitman, T. J. (2013). JunD/AP1 regulatory network analysis during macrophage activation in a rat model of crescentic glomerulonephritis. *BMC Systems Biology*, 7(1), 93. doi:10.1186/1752-0509-7-93

Song, M.-Q., Shi, C.-M., Lin, S.-M., Chen, Y.-J., Shen, H.-M., & Luo, L. (2018). Effect of starch sources on growth, hepatic glucose metabolism and antioxidant capacity in juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture*, 490, 355–361. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.03.002

Szczechowiak J., Szumacher M., El-Sherbiny et al. 2016 Rumen fermentation, methane concentration and fatty acid proportion in the rumen and milk of dairy cows fed condensed tannin and/or fish-soybean oils blends. *Animal feed science and technology* 216

## T

Tappia, P. S., Man, W. J., & Grimble, R. F. (1995). Influence of unsaturated fatty acids on the production of tumour necrosis factor and interleukin-6 by rat peritoneal macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 143(2), 89–98. doi:10.1007/bf01816941

Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2006). Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology*, 117(4), 433–442. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02321.x

Teague, H., Phaner, C. J., Harris, M., Duriancik, D. M., Reid, G. E., & Shaikh, S. R. (2013). n-3 PUFAs enhance the frequency of murine B-cell subsets and restore the

impairment of antibody production to a T-independent antigen in obesity. *Journal of Lipid Research*, 54(11), 3130–3138. doi:10.1194/jlr.m042457

Teunissen M. and Op den Camp H. 1993 Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes *Antonie van Leeuwenhoek*, Volume 63, Issue 1, pp 63–76

Thanh, L. P., & Suksombat, W. (2015). Milk Yield, Composition, and Fatty Acid Profile in Dairy Cows Fed a High-concentrate Diet Blended with Oil Mixtures Rich in Polyunsaturated Fatty Acids. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(6), 796–806. doi:10.5713/ajas.14.0810

Timmen, H., and S. Patton. 1988. Milk fat globules: Fatty-acid composition, size and in vivo regulation of fat liquidity. *Lipids* 23:685– 689.

Toral, P. G., Frutos, P., Carreño, D., & Hervás, G. (2017). Endogenous synthesis of milk oleic acid in dairy ewes: In vivo measurement using <sup>13</sup>C-labeled stearic acid. *Journal of Dairy Science*, 100(7), 5880–5887. doi:10.3168/jds.2016-12097

Tsiplakou E., Abdullah A. M., Skliros D., Chatzikonstantinou M., Flemetakis E., Labrou N., Zervas G. (2016). The effect of dietary *Chlorella vulgaris* supplementation on micro-organism community, enzyme activities and fatty acid profile in the rumen liquid of goats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 101. 10.1111/jpn.12521.

Tsiplakou, E., Mitsiopolou, C., Mavrommatis, A., Karaiskou, C., Chronopoulou, E.G., Mavridis, G., Sotirakoglou, K., Labrou, N.E., Zervas, G., 2017c. Effect of under- and over-feeding on sheep and goat milk and plasma enzymes activities related with oxidation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102, e288–e298. <https://doi.org/10.1111/jpn.12741>

Tsiplakou E., Mavrommatis A., Skliros D., Sotirakoglou K., Flemetakis E., Zervas G. 2018 The effects of dietary supplementation with rumen-protected amino acids on the expression of several genes involved in the immune system of dairy sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2018 Jul 24. doi: 10.1111/jpn.12968.

Tsiplakou, E., Abdullah, M. A. M., Skliros, D., Chatzikonstantinou, M., Flemetakis, E., Labrou, N., & Zervas, G. (2016). The effect of dietary *Chlorella vulgaris* supplementation on micro-organism community, enzyme activities and fatty acid



profile in the rumen liquid of goats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(2), 275–283. doi:10.1111/jpn.12521

Tsiplakou, E., Mavrommatis, A., Skliros, D., Sotirakoglou, K., Fliemetakis, E., & Zervas, G. (2018). The effects of dietary supplementation with rumen-protected amino acids on the expression of several genes involved in the immune system of dairy sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. doi:10.1111/jpn.12968

## U

## V

Van de Vossenberg, J.L., Joblin, K.N., 2003. Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 424–428

Van Nespen, Tom & Vlaeminck, Bruno & Wanzele, Wim & van Straalen, Wilfried & Fievez, Veerle. (2005). Use of specific milk fatty acids as diagnostic tool for rumen acidosis in dairy cows. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 70. 277-80.

Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.

Vargas-Bello-Pérez, E., Cancino-Padilla, N., Romero, J., & Garnsworthy, P. C. (2016). Quantitative analysis of ruminal bacterial populations involved in lipid metabolism in dairy cows fed different vegetable oils. *Animal*, 10(11), 1821–1828. doi:10.1017/s1751731116000756

Vargas, J. E., Andrés, S., Snelling, T. J., López-Ferreras, L., Yáñez-Ruíz, D. R., García-Estrada, C., & López, S. (2017). Effect of Sunflower and Marine Oils on Ruminal Microbiota, In vitro Fermentation and Digesta Fatty Acid Profile. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01124

Vlaeminck, B., Dewhurst, R.J., Demeyer, D., Fievez, V., 2004a. Odd and branched chain fatty acids to estimate proportions of cellulolytic and amylolytic particle associated bacteria. *J. Anim. Feed Sci.* 13, 235–238.

Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A.R.J., Fonseca, A.J.M., Dewhurst, R.J., 2006a. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 389–417.

Vorachek, W., Hujerjiletu Bobe, G., & Hall, J. (2013). Reference gene selection for quantitative PCR studies in sheep neutrophils. *International Journal of Molecular Science*, 14, 11484–11495. <https://doi.org/10.3390/ijms140611484>

## W

Wallace, R. J., Onodera R., and Cotta M. A. 1997. Metabolism of nitrogen-containing compounds. Pages 283–328 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed. P. N. Hobson and C. S. Stewart, ed. Chapman & Hall, London, UK.

Wallace FA, Miles EA, Calder PC. 2000 Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cytokine*. 2000 Sep;12(9):1374-9.

Wallace, R. J., Chaudhary, L. C., McKain, N., McEwan, N. R., Richardson, A. J., Vercoe, P. E., *et al.* (2006). *Clostridium proteoclasticum*: a ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 265, 195–201. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00487.x

Ward, P.F.V., Scott, T.W., Dawson, R.M.C., 1964. The hydrogenation of unsaturated fatty acids in the ovine digestive tract. *J. Biochem.* 92, 60–68.

Wilde, P.F., Dawson, R.M.C., 1966. The biohydrogenation of  $\omega$ -linolenic and oleic acid by rumen micro-organisms. *J. Biochem.* 98, 469–475.

Wu, T., Geigerman, C., Lee, Y.-S., & Wander, R. C. (2002). Enrichment of LDL with EPA and DHA decreased oxidized LDL-induced apoptosis in U937 cells. *Lipids*, 37(8), 789–796. doi:10.1007/s11745-002-0962-7

## X

## Y

Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., & Takriff, M. (2014). An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21(1), 6. doi:10.1186/2241-5793-21-6

Yang, S. L., Bu, D. P., Wang, J. Q., Hu, Z. Y., Li, D., Wei, H. Y., Loo, J. J. (2009). Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal*, 3(11), 1562–1569. doi:10.1017/s1751731109990462

Yaqoob, P., & Calder, P. (1995). Effects of Dietary Lipid Manipulation upon Inflammatory Mediator Production by Murine Macrophages. *Cellular Immunology*, 163(1), 120–128. doi:10.1006/cimm.1995.1106

Youn, H. S., Saitoh, S. I., Miyake, K., & Hwang, D. H. (2006). Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochemical Pharmacology*, 72(1), 62–69. doi:10.1016/j.bcp.2006.03.022

## Z

Zhang, J., Shi, H., Wang, Y., Li, S., Cao, Z., Ji, S., Zhang, H. (2017). Effect of Dietary Forage to Concentrate Ratios on Dynamic Profile Changes and Interactions of Ruminal Microbiota and Metabolites in Holstein Heifers. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02206

Zhou, Y. W.; McSweeney, C. S.; Wang, J. K.; Liu, J. X., 2012: Effects of disodium fumarate on ruminal fermentation and microbial communities in sheep fed on high-forage diets. *Animal* 5, 815–823.

Zhou, Y. W.; Hernandez-Sanabria, E.; Guan, L. L., 2009: Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6524–6533.

## 14. Παράρτημα

Πίνακας 1. Σχετική έκφραση γονιδίων σε μονοκύτταρα αίματος.

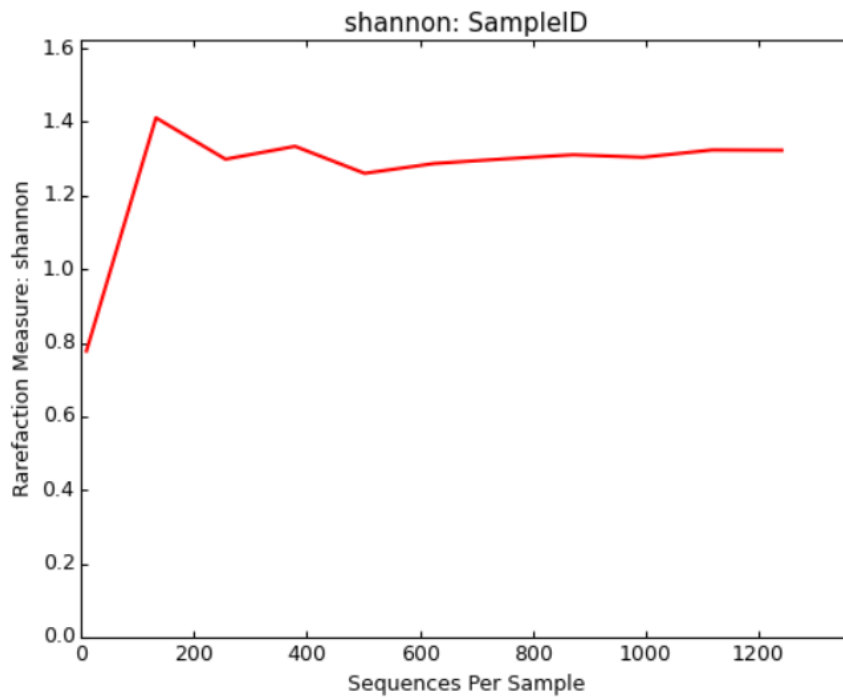
	Διατροφή (Δ)					Χρόνος δειγματοληψίας (Χ)				Επίδραση		
	CON	ALG20	ALG40	ALG60	SEM	20	40	60	SEM	Δ	Χ	ΔxΧ
<i>TLR4</i>	1.52 <sup>b</sup>	0.48 <sup>a</sup>	0.38 <sup>a</sup>	0.39 <sup>a</sup>	0.180	0.42 <sup>a</sup>	0.82 <sup>b</sup>	0.84 <sup>b</sup>	0.134	0.000	0.030	0.289
<i>MYD88</i>	16.64 <sup>b</sup>	9.57 <sup>a</sup>	9.19 <sup>a</sup>	10.24 <sup>a</sup>	1.791	7.58 <sup>a</sup>	11.17 <sup>ab</sup>	15.49 <sup>b</sup>	2.153	0.025	0.012	0.753
<i>TRIF</i>	0.40 <sup>ab</sup>	0.44 <sup>ab</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.56 <sup>b</sup>	0.083	0.52 <sup>b</sup>	0.23 <sup>a</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.056	0.047	0.001	0.152
<i>TRAF3</i>	0.53 <sup>ab</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.31 <sup>a</sup>	0.65 <sup>b</sup>	0.057	0.47 <sup>ab</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.55 <sup>b</sup>	0.044	0.003	0.026	0.273
<i>CHUK</i>	2.24 <sup>b</sup>	1.88 <sup>ab</sup>	1.64 <sup>a</sup>	1.55 <sup>a</sup>	0.173	2.05 <sup>b</sup>	2.31 <sup>b</sup>	1.19 <sup>a</sup>	0.174	0.048	0.002	0.058
<i>JUND</i>	2.87	2.72	2.55	2.64	0.313	2.39	2.70	3.01	0.255	0.901	0.170	0.008
<i>MAPK</i>	2.84 <sup>b</sup>	1.91 <sup>a</sup>	1.71 <sup>a</sup>	2.06 <sup>a</sup>	0.264	1.99	1.88	2.52	0.217	0.033	0.225	0.813
<i>IRF3</i>	4.87 <sup>b</sup>	3.01 <sup>a</sup>	2.69 <sup>a</sup>	3.40 <sup>a</sup>	0.454	2.64 <sup>a</sup>	3.38 <sup>a</sup>	4.47 <sup>b</sup>	0.528	0.015	0.010	0.185
<i>IRF5</i>	1.70	1.56	1.72	1.80	0.219	1.75	1.30	2.04	0.189	0.892	0.053	0.290
<i>STAT3</i>	0.40 <sup>b</sup>	0.28 <sup>ab</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.35 <sup>ab</sup>	0.060	0.30	0.25	0.34	0.040	0.048	0.284	0.828
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	16.77 <sup>b</sup>	4.98 <sup>a</sup>	5.18 <sup>a</sup>	3.76 <sup>a</sup>	2.739	8.05	10.27	4.71	1.741	0.010	0.176	0.008
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	1.27 <sup>b</sup>	0.37 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.096	0.39 <sup>b</sup>	0.83 <sup>c</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.083	0.000	0.002	0.033
<i>IL-2</i>	2.30 <sup>b</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>	0.164	1.04	1.05	0.83	0.141	0.000	0.548	0.480
<i>IL-6</i>	0.45	0.31	0.47	0.57	0.094	0.35	0.68	0.32	0.073	0.296	0.052	0.040
<i>IL-8</i>	5.72 <sup>b</sup>	1.46 <sup>a</sup>	0.55 <sup>a</sup>	0.85 <sup>a</sup>	0.496	1.22 <sup>a</sup>	3.18 <sup>b</sup>	2.04 <sup>ab</sup>	0.395	0.000	0.013	0.142
<i>IL-10</i>	0.47	0.32	0.42	0.41	0.065	0.41 <sup>b</sup>	0.57 <sup>c</sup>	0.24 <sup>a</sup>	0.047	0.443	0.000	0.023
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	0.94 <sup>b</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.54 <sup>a</sup>	0.49 <sup>a</sup>	0.115	0.56	0.58	0.61	0.070	0.011	0.904	0.052
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	1.54	0.78	0.97	0.99	0.202	1.05 <sup>b</sup>	0.61 <sup>a</sup>	1.55 <sup>b</sup>	0.127	0.078	0.003	0.027
<i>CXCL-5</i>	12.10 <sup>b</sup>	5.47 <sup>a</sup>	4.65 <sup>a</sup>	5.05 <sup>a</sup>	1.578	6.92	7.74	6.02	0.988	0.011	0.444	0.474
<i>CXCL-16</i>	1.79 <sup>b</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.38 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.261	0.31 <sup>a</sup>	0.71 <sup>b</sup>	1.20 <sup>b</sup>	0.175	0.002	0.011	0.062

Πίνακας 2. Σχετική έκφραση γονιδίων σε ουδετερόφιλα κύτταρα αίματος.

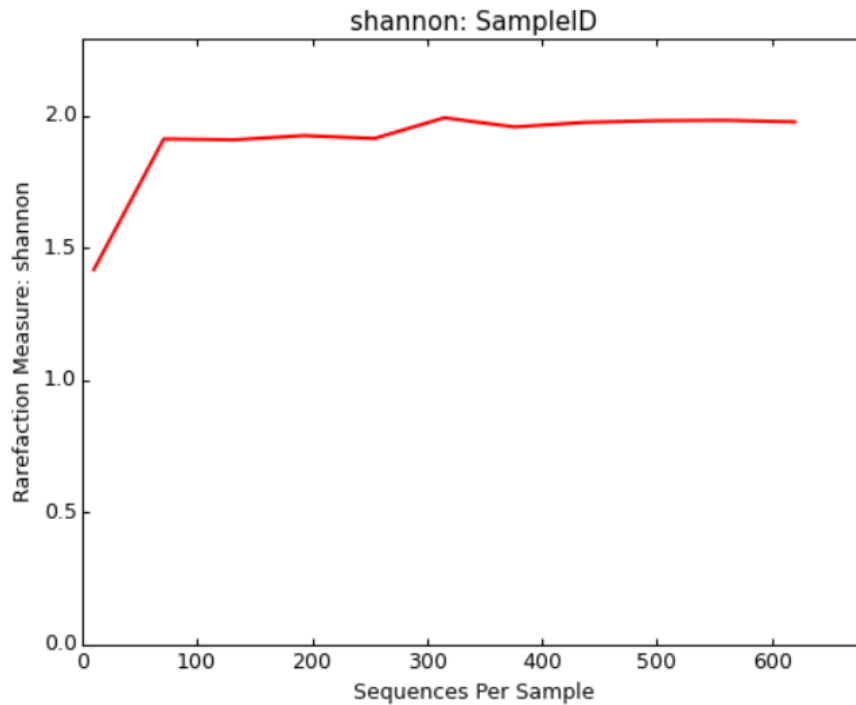
	Διατροφή (Δ)					Χρόνος δειγματοληψίας (X)				Επίδραση		
	CON	ALG20	ALG40	CON	ALG20	20	40	60	SEM	Δ	X	ΔxX
<i>TLR4</i>	2.82	1.84	2.09	2.12	0.271	2.75	1.88	2.03	0.274	0.094	0.102	0.209
<i>MYD88</i>	65.16	44.84	83.62	90.17	14.321	45.69 <sup>a</sup>	59.13 <sup>a</sup>	108.03 <sup>b</sup>	10.503	0.151	0.003	0.259
<i>TRIF</i>	0.81	0.81	0.83	0.81	0.116	0.75	0.90	0.80	0.100	0.999	0.561	0.171
<i>TRAF3</i>	0.28	0.32	0.30	0.40	0.040	0.37	0.27	0.34 <sup>1</sup>	0.036	0.203	0.075	0.887
<i>CHUK</i>	1.27	0.91	0.84	1.09	0.139	0.97	1.20	0.91	0.102	0.161	0.156	0.177
<i>JUND</i>	3.59 <sup>b</sup>	2.30 <sup>ac</sup>	2.06 <sup>a</sup>	3.17 <sup>cb</sup>	0.318	4.11 <sup>b</sup>	2.24 <sup>a</sup>	1.99 <sup>a</sup>	0.268	0.008	0.000	0.014
<i>MAPK</i>	3.48 <sup>b</sup>	1.84 <sup>a</sup>	3.44 <sup>b</sup>	3.25 <sup>b</sup>	0.363	3.51 <sup>b</sup>	2.44 <sup>a</sup>	3.05 <sup>ab</sup>	0.309	0.013	0.043	0.029
<i>IRF3</i>	9.07	6.64	5.80	5.95	1.060	6.85	6.90	6.84	0.824	0.141	0.999	0.490
<i>IRF5</i>	2.89	1.72	2.49	2.82	0.356	3.04 <sup>b</sup>	1.97 <sup>a</sup>	2.43 <sup>ab</sup>	0.303	0.110	0.023	0.051
<i>STAT3</i>	1.13 <sup>b</sup>	0.54 <sup>a</sup>	0.86 <sup>ab</sup>	0.78 <sup>ab</sup>	0.138	0.81	0.73	0.94	0.120	0.048	0.535	0.289
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	2.03	1.83	1.69	1.44	0.333	2.48 <sup>b</sup>	1.53 <sup>a</sup>	1.19 <sup>a</sup>	0.261	0.660	0.032	0.696
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	1.63 <sup>a</sup>	0.96 <sup>a</sup>	2.61 <sup>b</sup>	1.21 <sup>a</sup>	0.255	1.41	1.80	1.59	0.219	0.001	0.357	0.747
<i>IL-2</i>	0.55 <sup>b</sup>	0.49 <sup>b</sup>	0.42 <sup>ab</sup>	0.33 <sup>a</sup>	0.050	0.32	0.57	0.45	0.045	0.035	0.002	0.138
<i>IL-6</i>	0.17 <sup>b</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.13 <sup>ab</sup>	0.018	0.11	0.13	0.12	0.017	0.020	0.429	0.052
<i>IL-8</i>	7.36	3.60	7.96	8.43	1.586	4.34 <sup>a</sup>	10.21 <sup>b</sup>	5.96 <sup>ab</sup>	1.262	0.158	0.028	0.681
<i>IL-10</i>	0.32	0.27	0.46	0.38	0.053	0.36	0.36	0.37	0.041	0.085	0.941	0.750
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	2.11	1.41	2.21	2.45	0.428	2.17	1.60	2.07	0.222	0.372	0.314	0.197
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	2.33 <sup>b</sup>	1.25 <sup>a</sup>	1.95 <sup>ab</sup>	1.68 <sup>ab</sup>	0.247	1.67	1.66	2.13	0.216	0.038	0.389	0.331
<i>CXCL-5</i>	12.07	14.76	10.69	13.26	2.080	10.69	13.38	14.07	1.629	0.567	0.131	0.884
<i>CXCL-16</i>	2.10	1.75	2.45	1.41	0.274	2.27	1.63	1.88	0.214	0.077	0.107	0.121

Σχήματα 1. Γραφική απεικόνιση της άλφα ποικιλομορφίας κατά Shannon.

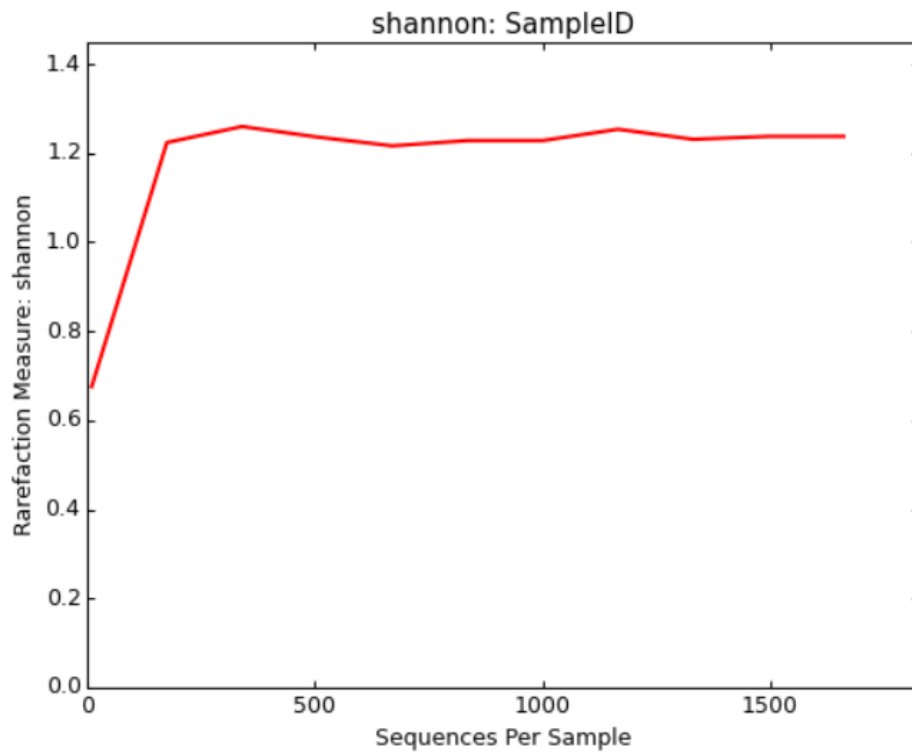
**Ομάδα Α (60/40 +20g):**



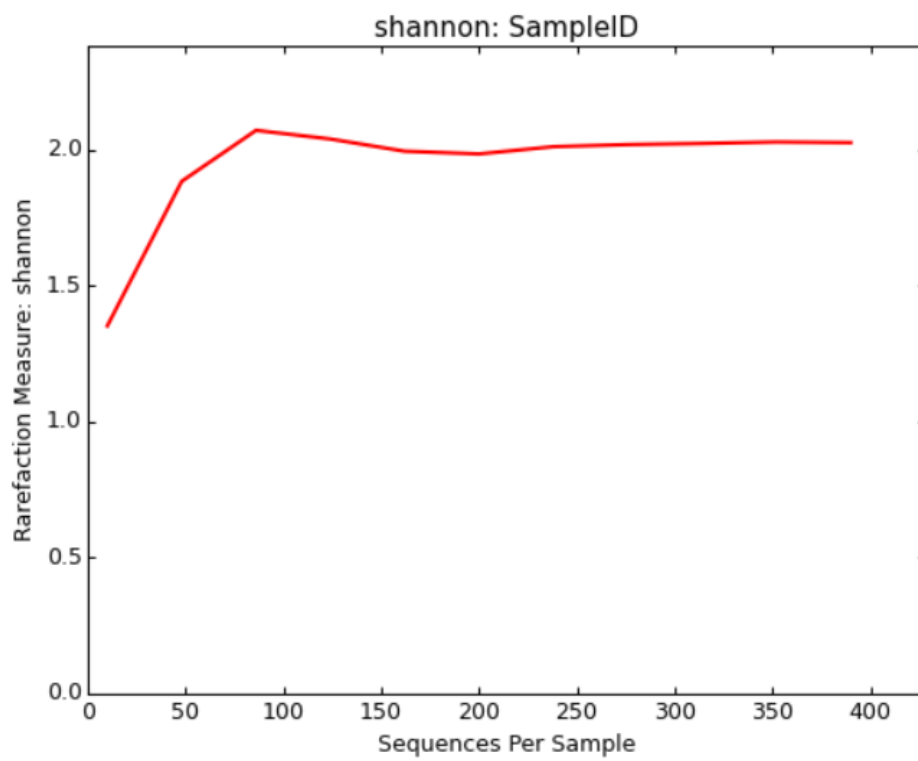
**Ομάδα Β (40/60 +20g):**

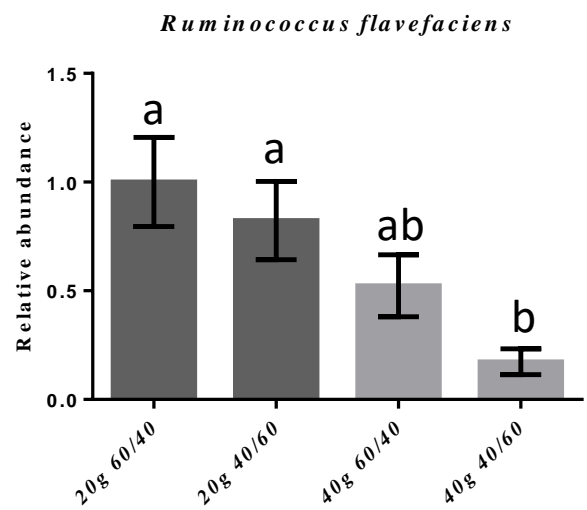
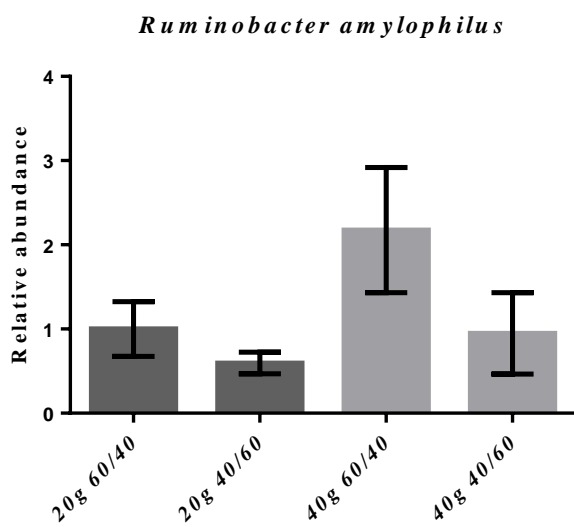
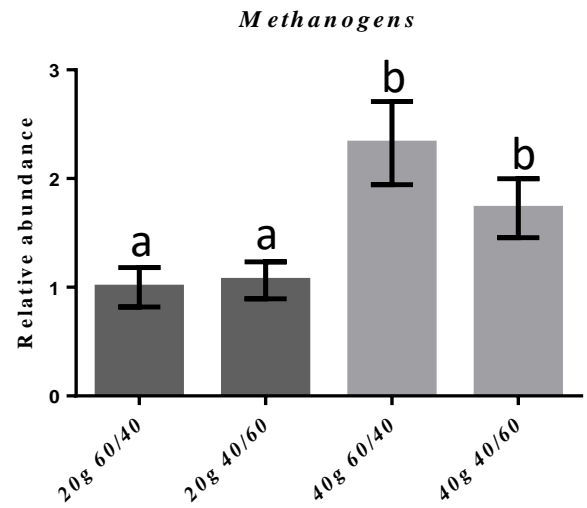
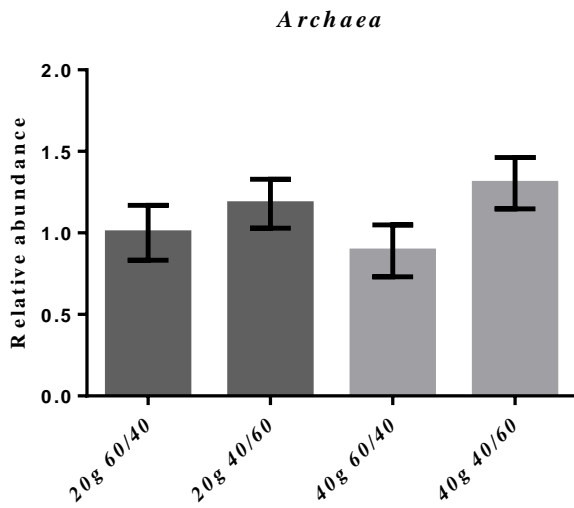
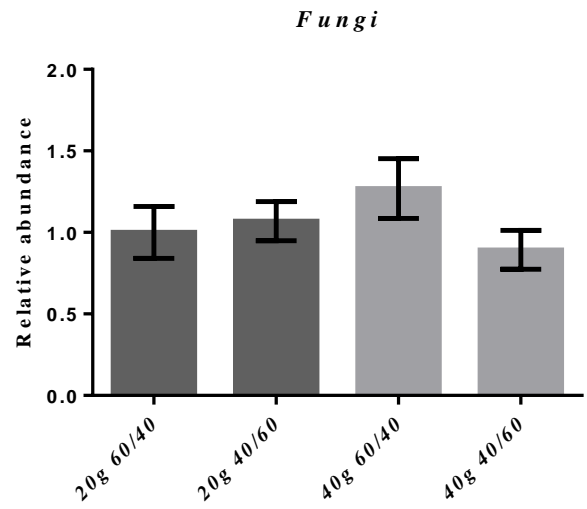
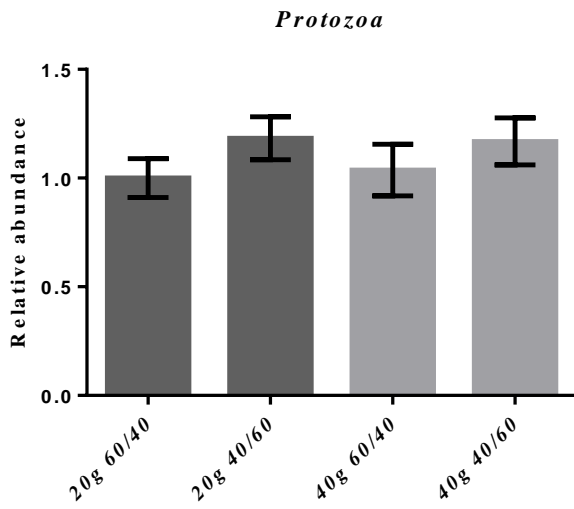


**Ομάδα Γ (60/40 +40g):**



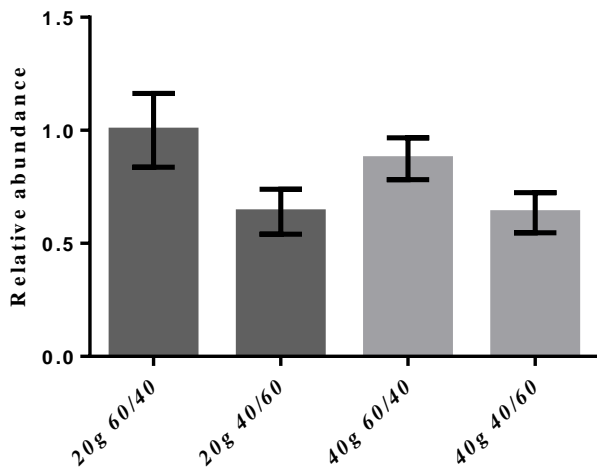
**Ομάδα Δ (40/60 +40g):**



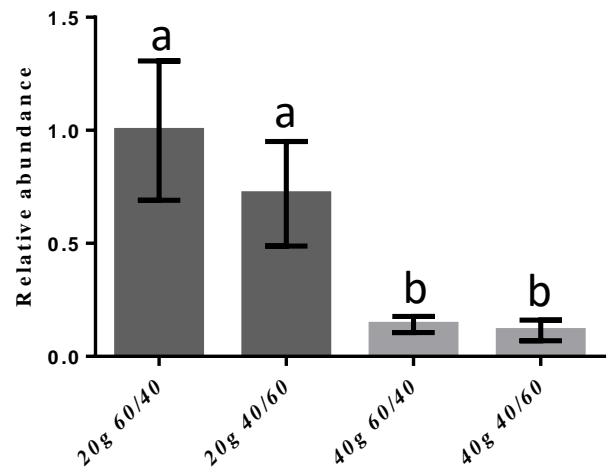




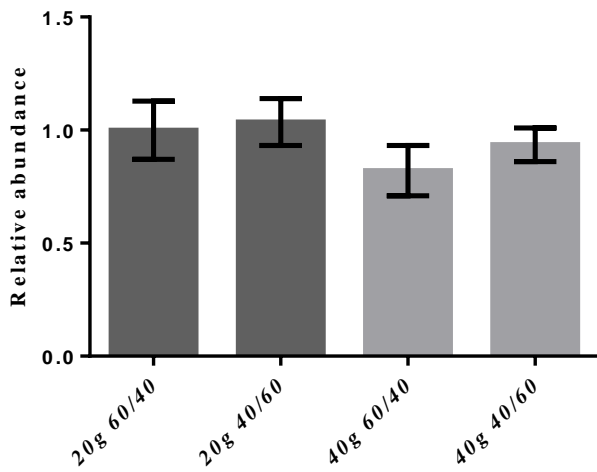
*Ruminococcus albus*



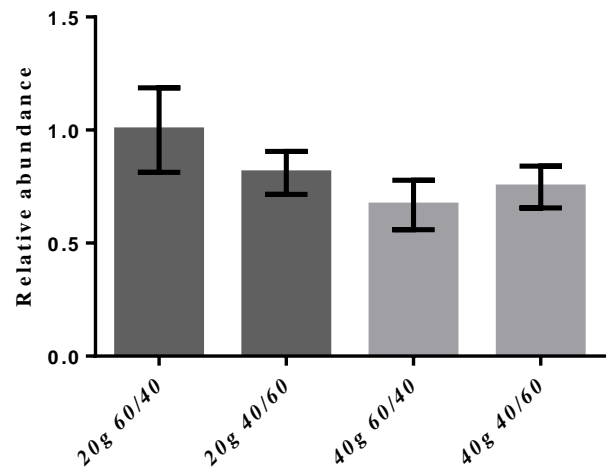
*Streptococcus bovis*



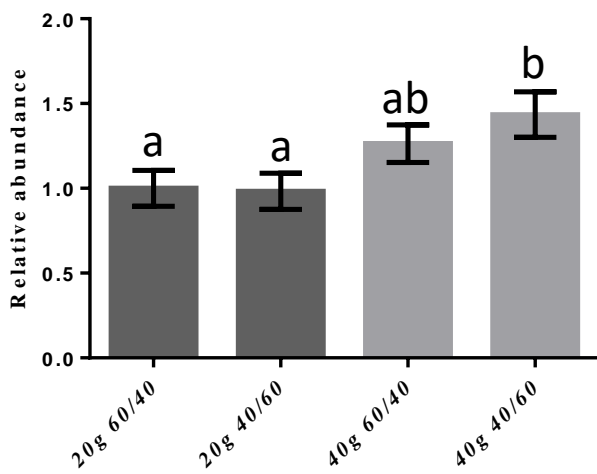
*Butyrivibrio fibrisolvens*



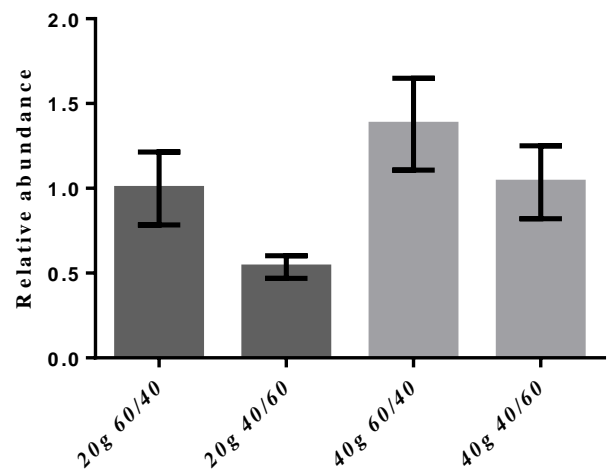
*Butyrivibrio proteoclasticus*

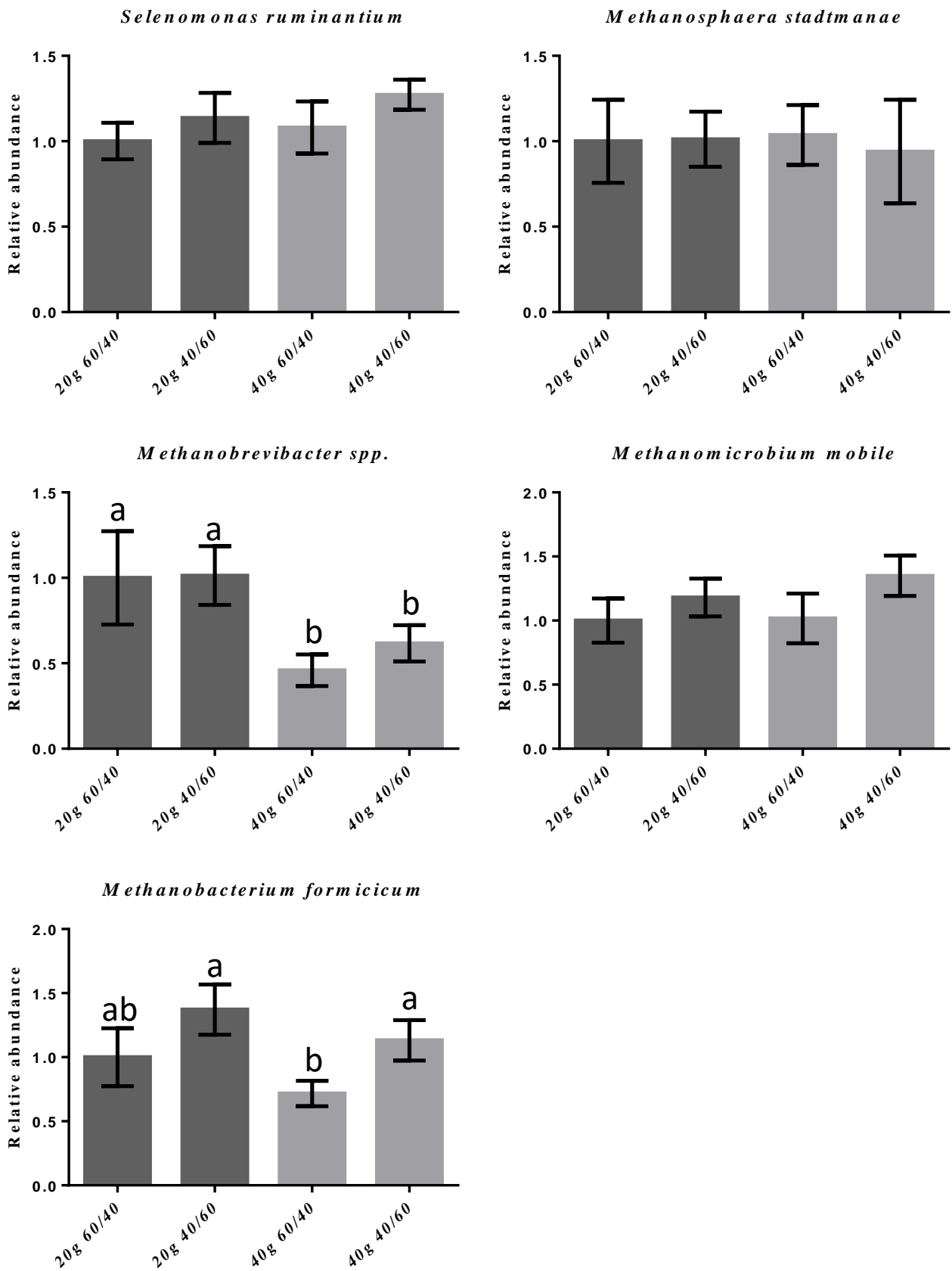


*Prevotella sp*



*Fibrobacter succinogenes*





Σχήμα 2. Σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Πείραμα 2).

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### A. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα : Αλέξανδρος  
Επώνυμο : Μαυρομάτης  
Ημερομηνία γεννήσεως : 14 Ιουνίου 1991  
Email : [a.mavrommatis@yahoo.com](mailto:a.mavrommatis@yahoo.com)

### B. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

**10/2009-10/2014** BSc, MSc Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Αποφοίτηση: 2<sup>ος</sup>  
Βαθμός: 7,14 (*ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ*)

**Διπλωματική:** Η επίδραση της προσθήκης μεθειονίνης, βεταΐνης και χολίνης στο μείγμα προβατινών στην ποσότητα και τη χημική σύσταση του γάλακτος **Βαθμός: 10** (*Δέκα*)

**5/2015-σήμερα** Υποψήφιος Διδάκτωρ του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής Αγροτικών Ζώων)

**Διδακτορική Διατριβή:** Επίδραση της ενσωμάτωσης του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* στο σιτηρέσιο αιγών στα παραγωγικά χαρακτηριστικά και σε ορισμένες βιοχημικές παραμέτρους.

### Γ. ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

**Αγγλικά:**

ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ		ΟΜΙΛΙΑ		ΓΡΑΦΗ
Προφορική	Γραπτή (ανάγνωση)	Επικοινωνία	Προφορική έκφραση	
B2	B2	B2	B2	B2
Certificate of Competency in English University of Michigan (B2)				



## Δ. ΨΗΦΙΑΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

### Microsoft Office:



ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ		
Word	Excel	PowerPoint
Έμπειρος χρήστης	Έμπειρος χρήστης	Έμπειρος χρήστης

**NUT3000:** Πρόγραμμα κατάρτισης σιτηρεσιών (Έμπειρος χρήστης)

  : Πολύ καλή γνώση

 : Real Time PCR software

## Ε. ΒΡΑΒΕΙΑ-ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

**10/2016- 12/2016**

Υπότροφος στο Εκπαιδευτικό Πρόγραμμα Ερευνητών  
“Ευρωπαϊκή Αγροτική Διακυβέρνηση” του  
Ευρωπαϊκού Κέντρου Αριστείας Jean Monnet του  
Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών  
(ΕΚΠΑ)

**2012-2013**

Έπαινος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών  
για την υψηλότερη βαθμολογία για το ακαδημαϊκό  
έτος 2012-2013

## Ζ. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΣΗ

1. Tsiplakou E., Chatzikonstantinou M., Mitsiopolou C., Karaiskou C., **Mavrommatis A.**, Labrou N., Zervas G. 2016 The effect of soybean and fish oil inclusion in sheep and goat diets on their milk and plasma enzymes related with oxidation. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. DOI: 10.1111/jpn.12516 **I.F. 1.61**
2. Tsiplakou E., **Mavrommatis A.**, Kalogeropoulos T., Chatzikonstantinou M., Koutsouli P., Labrou N., Zervas G. 2016 The effect of dietary supplementation with rumen protected methionine alone or in combination with rumen protected choline and betaine on sheep milk and antioxidant capacity. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2016 Jun 9. DOI: 10.1111/jpn.12537 **I.F. 1.61**

3. Tsiplakou E., Abdullah M., **Mavrommatis A.**, Chatzikonstantinou M., Skliros D., Flemetakis E., Labrou N., Zervas G. 2017 The effect of dietary *Chlorella vulgaris* inclusion on goat's milk chemical composition, fatty acids profile and enzymes activities related to oxidation. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. DOI: 10.1111/jpn.12671 **I.F. 1.61**
4. Tsiplakou E., Abdullah M., **Mavrommatis A.**, Chatzikonstantinou M., Skliros D., Flemetakis E., Labrou N., Zervas G. 2017 The effect of dietary *Chlorella pyrenoidosa* inclusion on goat's milk chemical composition, fatty acids profile and enzymes activities related to oxidation Livestock Science DOI: 10.1016/j.livsci.2017.01.014 **I.F. 1.20**
5. Tsiplakou E., Yasoumis L., Maragkou A., **Mavrommatis A.**, Sotirakoglou K., Moatsou G., Zervas G. 2017 The response of goats to different starch/NDF ratio of concentrates on milk chemical composition, fatty acids profile, caseins fractions and rennet clotting properties Small Ruminant Research DOI: 10.1016/j.smallrumres.2017.09.015 **I.F. 0.97**
6. Kotsampasi V., Christodoulou C., Tsiplakou E., **Mavrommatis A.**, Karaiskou C., Mpampidis V., Ntotas, V., Zervas G., Mitsiopoulou C., Christodoulou V. 2017 The effect of pulp pomegranate silage in dairy cows' milk yield, fatty acid profile and blood plasma antioxidant enzymes. Animal Feed Science and Technology DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.08.017 **I.F. 2.14**
7. Tsiplakou E., Mitsiopoulou C., **Mavrommatis A.**, Karaiskou C., Chronopoulou E. G., Mavridis G., Sotirakoglou K., Labrou N. E. and Zervas G. 2017 Effect of under- and over-feeding on sheep and goat milk and plasma enzymes activities related with oxidation Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition DOI: 10.1111/jpn.12741 **I.F. 1.61**
8. Tsiplakou E., **Mavrommatis A.**, Skliros D., Sotirakoglou K., Flemetakis E., Zervas G. 2018 The effects of dietary supplementation with rumen-protected amino acids on the expression of several genes involved in the immune system

of dairy sheep. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition DOI: 10.1111/jpn.12968 **I.F. 1.61**

**9. Mavrommatis A.**, Chronopoulou E. G., Sotirakoglou K., Labrou N. E. and Zervas G., Tsiplakou E. 2018 The impact of the dietary supplementation level with *Schizochytrium* sp, on the oxidative capacity of both goats' organism and milk. DOI: 10.1016/j.livsci.2018.10.014 **I.F. 1.20**

**10. B. Kotsampasi, E. Tsiplakou, C. Christodoulou, A. Mavrommatis, C. Mitsiopoulou, C. Karaiskou, E. Sossidou, N. Fragioudakis, V.A. Bampidis, V. Christodoulou, G. Zervas.** Effects of dietary orange peel essential oil supplementation on milk yield, composition and fatty acid profile, and blood and milk antioxidant status of lactating dairy ewes. Animal Feed Science and Technology DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2018.08.007 **I.F. 2.14**

#### H. ANAKOINΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Tsiplakou, E., **Mavrommatis, A.**, Labrou N., Zervas G. 2018 The effect of dietary supplementation with rumen protected methionine alone or in combination with rumen protected choline and betaine on sheep milk and antioxidant capacity EAAP 2018 Symposium Dubrovnik, Croatia.
2. Christodoulou, C., Kotsambasi, B., Tsiplakou, E., **Mavrommatis, A.**, Mitsiopoulou, C., Karaiskou, C., Dotas, D., Bampidis, V., Christodoulou, V., Zervas, G. Pomegranate pulp silage inclusion on lactating dairy cows' diets and its effects on milk yield, antioxidant status and milk fatty acid profile. XII Kabrt's Dietetic Days International Conference. Abstracts p. 181-187. Brno, Czech Republic, 20 April 2017.
3. G. P. Danezis, A. C. Pappas, E. Tsiplakou, E. C. Pappa, **A. Mavrommatis, M. Zacharioudaki, A. S. Tsagkaris, C.A. Papachristidis, K. Sotirakoglou, G. Zervas, C.A. Georgiou** Fusion of elemental and fatty acid profile for authentication of Greek PDO and traditional cheeses 11th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD2018) Book of abstracts P2-3

4. G. P. Danezis, A. C. Pappas, E. Tsiplakou, E. C. Pappa, **A. Mavrommatis**, M. Zacharioudaki, A. S. Tsagkaris, C.A. Papachristidis, K. Sotirakoglou, G. Zervas, C.A. Georgiou Authentication of Greek PDO cheeses through data fusion of elemental, fatty acid profile and physicochemical properties (ACAC 2018) Poster. Book of abstracts p.208

#### Θ. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΘΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **A. Μαυρομμάτης**, Θ. Καλογερόπουλος, Ε. Τσιπλάκου, Π. Κουτσούλη, Ι. Μπιζέλης, Γ. Ζέρβας 2014 «Η επίδραση της προσθήκης μεθειονίνης και βεταΐνης στη διατροφή προβατινών, στην ποσότητα και τη χημική σύσταση του γάλακτος.» Περιοδικό περιλήψεων συνεδρίου Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας Νο. 40, σελ. 79 (29<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Κυπαρισσία, 2014)
2. **A. Μαυρομμάτης**, Ε. Τσιπλάκου, Γ. Ζέρβας 2016 «Η επίδραση της ενσωμάτωσης του μικροφύκου Schizochytrium sp. στη χημική σύσταση και το προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος και του αίματος αγών.» Περιοδικό περιλήψεων συνεδρίου Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας Νο. 44, σελ. 97-98 (31<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Σέρρες, 2016)
3. **A. Μαυρομμάτης**, Ε. Τσιπλάκου, Ν. Λάμπρου, Γ. Ζέρβας 2016 «Η επίδραση της ενσωμάτωσης του μικροφύκου Schizochytrium sp. στο σιτηρέσιο αγών στη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων στο γάλα και το πλάσμα του αίματος.» Περιοδικό περιλήψεων συνεδρίου Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας Νο. 44, σελ. 89-90 (31<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Σέρρες, 2016)
4. Χ. Χριστοδούλου, Β. Κοτσάμπαση, Ε. Τσιπλάκου, Β. Μπαμπίδης, **A. Μαυρομμάτης**, Χ. Μητσιοπούλου, Χ. Καραΐσκου, Β. Χριστοδούλου, Γ. Ζέρβας, Δ. Ντότας 2016 «Η επίδραση της ενσιρωμένης πούλπας ροδιού στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής.» Περιοδικό περιλήψεων συνεδρίου Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας Νο. 44, σελ. 107-108 (31<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Σέρρες, 2016)

5. **A. Μαυρομμάτης**, Χ. Μητσιοπούλου, Δ. Μπουρίτη, Ι. Δήμου, Γ. Ζέρβας, Ε. Τσιπλάκου 2017 Η επίδραση της συμπλήρωσης του σιτηρεσίου προβατινών με προστατευμένα αμινοξέα στη γαλακτοπαραγωγή. Περιοδικό περιλήψεων συνεδρίου Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (32<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Λάρισα, 2017)
6. **A. Μαυρομμάτης**, Ι. Βουγά, Κ. Καραπουρνιώτη, Ζ. Κόμη, Γ. Ζέρβας, Ε. Τσιπλάκου 2017 Η αλληλεπίδραση της ενσωμάτωσης του μικροφύκους *Schizochytrium* sp. και του λόγου ΧΖ/ΣΖ στη χημική σύσταση και το προφίλ των λιπαρών οξέων του αγείου γάλακτος. Περιοδικό περιλήψεων συνεδρίου Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (32<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Λάρισα, 2017)
7. **A. Μαυρομμάτης**, Ν. Λάμπρου, Γ. Ζέρβας, Ε. Τσιπλάκου 2018 Η αλληλεπίδραση της ενσωμάτωσης του μικροφύκους *Schizochytrium* sp. και του λόγου ΧΖ/ΣΖ στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων στο γάλα και το πλάσμα του αίματος αγών. Περιοδικό περιλήψεων συνεδρίου Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (33<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Πρέβεζα, 2018)
8. **A. Μαυρομμάτης**, Δ. Σκληρός, Εμ. Φλεμετάκης, Γ. Ζέρβας, Ε. Τσιπλάκου 2018 Η επίδραση της συμπλήρωσης του σιτηρεσίου προβατινών με προστατευμένα αμινοξέα στο ανοσοποιητικό σύστημα. Περιοδικό περιλήψεων συνεδρίου Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (33<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Πρέβεζα, 2018)
9. Γ. Ζέρβας, **A. Μαυρομμάτης**, Χ. Μητσιοπούλου, Ε. Τσιπλάκου 2018 Στοιχεία διαχείρισης και διατροφής αγελαδοτροφικών μονάδων γαλακτοπαραγωγής. Περιοδικό περιλήψεων συνεδρίου Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (33<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Πρέβεζα, 2018)

*Συνολικό impact factor σε περιοδικά με κρίση: 15,7*

*h-index: 3*

*Ετεροαναφορές: 12*