



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

**Διδακτορική Διατριβή**

Η επίδραση της *Camelina sativa* και της *Spirulina* στο ανοσοποιητικό σύστημα, στο μικροβίωμα της μεγάλης κοιλίας και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των προβατινών

**Χρήστος Β. Χριστοδούλου**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Ελένη Τσιπλάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ελένη Τσιπλάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Καθηγητής ΓΠΑ

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2022**



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

**Διδακτορική Διατριβή**

Η επίδραση της *Camelina sativa* και της *Spirulina* στο ανοσοποιητικό σύστημα, στο μικροβίωμα της μεγάλης κοιλίας και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των προβατινών

“Effect of *Camelina sativa* and *Spirulina* supplementation in ewes’ immune system, rumen microbiota, and quality characteristics”

**Χρήστος Β. Χριστοδούλου**

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ελένη Τσιπλάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Καθηγητής ΓΠΑ

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητής ΓΠΑ

Αθανάσιος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Στυλιανή Χαδιώ Μάντζαρη, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Κυριακή Σωτηράκογλου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Παναγιώτης Σμιτζής, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

## Η επίδραση της *Camelina sativa* και της *Spirulina* στο ανοσοποιητικό σύστημα, στο μικροβίωμα της μεγάλης κοιλίας και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των προβατινών

Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής

### Περίληψη

Η αυξημένη ζήτηση και παραγωγή κτηνοτροφικών προϊόντων υψηλής διατροφικής αξίας λόγω αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού και των προτιμήσεων των καταναλωτών, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες που χαρακτηρίζονται από ευημερία, οδηγεί στη μελέτη καινοτόμων ζωοτροφών. Οι ζωοτροφές αυτές είναι πλούσιες σε βιολειτουργικά συστατικά, όπως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFA) και τα αντιοξειδωτικά τα οποία συμβάλουν στην ενίσχυση της ποιότητας των κτηνοτροφικών προϊόντων, όπως το γάλα, ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ζώων γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στον περιορισμό της χρήσης των αντιβιοτικών και κατ' επέκταση της αντίστασης στα αντιβιοτικά πέραν της μείωσης του κόστους παραγωγής. Επίσης, δύνανται να τροποποιούν το μικροβίωμα της μεγάλης κοιλίας (M.K.) των μηρυκαστικών. Η σπουδαιότητα στην τροποποίηση του μικροβιώματος της M.K. έγκειται στο γεγονός ότι αυτό είναι αρχικά υπεύθυνο για την αποδόμηση των PUFA σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (saturated fatty acids, SFA) τα οποία μεταφέρονται στο αίμα και στη συνέχεια στο παραγόμενο γάλα, αλλά και στο ότι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί (μεθανοβακτήρια) είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή ενός από τα σημαντικότερα αέρια του θερμοκηπίου, το μεθάνιο (CH<sub>4</sub>).

Επομένως, σκοπός των δύο πειραματισμών της διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης τριών διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης και η αξιολόγηση του βέλτιστου επιπέδου ενσωμάτωσης δύο διαφορετικών διατροφικών καινοτόμων ζωοτροφών και συγκεκριμένα των σπερμάτων καμελίνας (*Camelina sativa* seeds, CS) και της σπιρουλίνας (*Spirulina*, SP) α) στη γαλακτοπαραγωγή και στη χημική σύσταση του γάλακτος, β) στο προφίλ των λιπαρών οξέων του υγρού της M.K. (Y.M.K.), του πλάσματος του αίματος και του γάλακτος, γ) στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και δ) στη σχετική αφθονία μικροοργανισμών στο υγρό και στερεό περιεχόμενο της M.K.

Για τον πρώτο πειραματισμό, σαράντα οκτώ (48) προβατίνες φυλής Χίου επιλέχθηκαν και χωρίστηκαν σε τέσσερις ισοδύναμες ομάδες (n = 12) από πλευράς διορθωμένης ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγής (6 %) (1,85 ± 0,3 kg/ημέρα), ηλικίας (2 - 4), ημέρες γαλακτικής περιόδου (67 ± 8) και σωματικού βάρους (55.0 ± 6,5 kg). Τα ζώα σταβλίζονταν ομαδικά ανά ομάδα και για τη διατροφή τους μεταφέρονταν σε ειδικά διαμορφωμένα ατομικά κελιά προκειμένου να επιτευχθεί ατομική διατροφή. Οι προβατίνες τρέφονταν ατομικά με σανό μηδικής, άχυρο σίτου και μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΣΖ). Το μείγμα ΣΖ της ομάδας του μάρτυρα (CON) δεν περιείχε σπέρματα καμελίνας, ενώ στις υπόλοιπες τρεις διατροφικές επεμβάσεις, σπέρματα καμελίνας ενσωματώθηκαν στα μείγματα ΣΖ σε ποσοστά 6 % (CS6), 11 % (CS11) και 16 % (CS16), προς μερική αντικατάσταση του σογιάλευρου και του αραβοσίτου. Η χορήγηση του σιτηρεσίου γινόταν δύο φορές ημερησίως σε ισάριθμες ποσότητες, μετά το πέρας της μηχανικής άμελξης.

Η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στα μείγματα ΣΖ δεν επηρέασε τη γαλακτοπαραγωγή, ενώ όσον αφορά τη χημική σύσταση του γάλακτος, στην ομάδα CS16 η λιποπεριεκτικότητα του μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με την CON (P = 0,046). Η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στα μείγματα ΣΖ, βελτίωσε την ποιότητα του γάλακτος τροποποιώντας τη συγκέντρωση σε SFA (P < 0,001), α-λινολενικό (C18:3 n-3) (P < 0,001), *cis*-9, *trans*-11 C18:2

(CLA) ( $P < 0,001$ ) και τον λόγο  $\omega 6/\omega 3$  ( $P < 0,001$ ) προς την επιθυμητή κατεύθυνση για τον καταναλωτή. Επιπλέον, στο πλάσμα του αίματος, η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT) αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,006$ ) στις ομάδες CS11 και CS16 και η δραστηριότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,014$ ) στη CS16. Επίσης, η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση αυξήθηκε στις ομάδες CS σύμφωνα τις μεθόδους ABTS ( $P < 0,001$ ) και FRAP ( $P = 0,008$ ). Ωστόσο, τα επίπεδα της μηλονικής διαλδεϋδης (MDA), βιοδείκτη οξειδωτικού στρες, αυξήθηκαν σημαντικά ( $P < 0,001$ ) για την ομάδα CS11 σε σύγκριση με τις CON και CS6 και για την ομάδα CS16 σε σύγκριση με την CS6. Στην ομάδα CS16, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC) αυξήθηκαν σημαντικά ( $P < 0,001$ ). Τέλος, στις ομάδες CS, η οξειδωτική σταθερότητα του γάλακτος ενισχύθηκε, όπως υποδηλώθηκε από τις τροποποιήσεις ( $P < 0,050$ ) στις δραστηριότητες των SOD, CAT και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSH-Px), στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και στους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες.

Για τον προσδιορισμό των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία των προβατινών, χρησιμοποιήθηκε πλατφόρμα PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της ιντερφερόνης- $\beta$  (*TRIF*) ( $P = 0,005$ ), του σχετιζόμενου με τον υποδοχέα TNF παράγοντα 3 (*TRAF3*) ( $P = 0,010$ ), του ρυθμιστικού παράγοντα 5 ιντερφερόνης (*IRF5*) ( $P = 0,002$ ) και της ενεργοποιημένης από μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (*MAPK*) ( $P = 0,005$ ) που επάγει τον προσαρμογέα TIR, αυξήθηκαν στα μονοκύτταρα των προβατινών της ομάδας CS11. Επιπλέον, στα μονοκύτταρα των προβατινών της CS6, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ιντερλευκίνης-1 βήτα (*IL1B*) αυξήθηκαν ( $P = 0,015$ ) σε σύγκριση με την CON, ενώ στα ουδετερόφιλα της ίδιας ομάδας τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *IL1B* ( $P < 0,001$ ), Ιντερλευκίνης-8 (*IL8*) ( $P = 0,017$ ) και Ιντερλευκίνης-10 (*IL10*) ( $P = 0,007$ ) αυξήθηκαν σε σύγκριση με τις CON και CS16. Η απόκριση των μονοκυττάρων σχετίζεται με τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στο προφίλ των αμινοξέων (κυρίως θρεονίνη, τυροσίνη, σερίνη και λυσίνη) των τεσσάρων μειγμάτων ΣΖ και είναι διαφορετική από αυτή των ουδετερόφιλων.

Η σχετική αφθονία των μικροοργανισμών της Μ.Κ. προσδιορίστηκε μέσω πλατφόρμας RT-qPCR. Η σχετική αφθονία των αρχαίων ( $P < 0,001$ ) και των μεθανοβακτηρίων ( $P = 0,025$ ) μειώθηκε σημαντικά στο στερεό περιεχόμενο των CS11 και CS16. Επιπλέον, η σχετική αφθονία των πρωτοζώων αυξήθηκε σημαντικά τόσο στο υγρό ( $P < 0,001$ ) όσο και στο στερεό περιεχόμενο ( $P = 0,010$ ) της Μ.Κ. της CS6, ενώ αυτή των μυκήτων μειώθηκε σημαντικά ( $P = 0,043$ ) στο στερεό περιεχόμενο της CS16. Στο Υ.Μ.Κ., η σχετική αφθονία των *Fibrobacter succinogens* ( $P < 0,001$ ) και *Ruminobacter amylophilus* ( $P = 0,002$ ) αυξήθηκε σημαντικά στις CS6 και CS11, αντίστοιχα. Στο στερεό περιεχόμενο της CS11, η σχετική αφθονία του είδους *Ruminococcus flavefaciens* μειώθηκε σημαντικά ( $P = 0,022$ ), ενώ των *Ruminobacter amylophilus* ( $P < 0,001$ ) και *Butyrivibrio proteoclasticus* ( $P = 0,001$ ) αυξήθηκε σημαντικά. Επίσης, η σχετική αφθονία του είδους *Selenomonas ruminantium* αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,001$ ) στο στερεό περιεχόμενο των CS11 και CS16.

Συμπερασματικά, η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στα μείγματα ΣΖ των προβατινών βελτίωσε το προφίλ των λιπαρών οξέων και την οξειδωτική σταθερότητα του γάλακτος προς την επιθυμητή για τον καταναλωτή κατεύθυνση. Επίσης, το υψηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας στα μείγματα των ΣΖ (CS16) δεν είχε αρνητικό αντίκτυπο στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία των προβατινών. Τέλος, η μείωση των μεθανοβακτηρίων και οι τροποποιήσεις στον βακτηριακό πληθυσμό των προβατινών της ομάδας CS16, αναδεικνύουν σημαντικά ευρήματα σχετικά τόσο με τη μείωση των εκπομπών CH<sub>4</sub> και κατ' επέκταση τη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος μίας κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης, όσο και για τις ζυμωτικές διεργασίες εντός της Μ.Κ., καθώς οι τροποποιήσεις αυτές δεν επηρέασαν αρνητικά την παραγωγικότητα.

Για τον δεύτερο πειραματισμό της διδακτορικής διατριβής, 48 προβατίνες φυλής Χίου επιλέχθηκαν και κατανεμήθηκαν σε 4 ισοδύναμες ομάδες ( $n = 12$ ) από πλευράς διορθωμένης ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγής (6 %) ( $1,85 \pm 0,3$  kg/ημέρα), ηλικίας (2 - 4), ημέρες γαλακτικής περιόδου ( $67 \pm 8$ ) και σωματικού βάρους ( $54 \pm 6$  kg). Οι προβατίνες σταβλίζονταν ομαδικά ανά ομάδα και για τη διατροφή τους μεταφέρονταν σε ειδικά διαμορφωμένα ατομικά κελιά προκειμένου να επιτευχθεί ατομική διατροφή. Οι προβατίνες κατανάλωναν ημερησίως σανό μηδικής, άχυρο σίτου και μείγμα ΣΖ. Η ομάδα του μάρτυρα (CON) κατανάλωνε βασικό σιτηρέσιο χωρίς την ενσωμάτωση σπιρουλίνας στα μείγματα ΣΖ, ενώ ανά ζώο σε ημερήσια βάση στις υπόλοιπες τρεις διατροφικές επεμβάσεις, 5 g (SP5), 10 g (SP10) και 15 g (SP15) σπιρουλίνας ενσωματώθηκαν ως πρόσθετο στα μείγματα ΣΖ. Η διάθεση του σιτηρεσίου γινόταν δύο φορές ημερησίως σε ισάριθμες ποσότητες, μετά τη μηχανική άμελξη.

Η γαλακτοπαραγωγή και η χημική σύσταση του γάλακτος δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη σπιρουλίνας στα μείγματα ΣΖ. Η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων μικρής αλύσου αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,001$ ) στο γάλα των προβατινών των ομάδων SP5 και SP10 ενώ των μεσαίας αλύσου μειώθηκε σημαντικά ( $P = 0,024$ ) στο γάλα της SP10 σε σύγκριση με την CON. Η προσθήκη σπιρουλίνας στο υψηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης (SP15) στα μείγματα ΣΖ ενίσχυσε τη συγκέντρωση των PUFA ( $P = 0,027$ ) και μείωσε τον δείκτη θρομβογένεσης ( $P = 0,046$ ) στο γάλα. Σχετικά με την οξειδωτική κατάσταση των προβατινών, η δραστηριότητα της SOD αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,014$ ) στις ομάδες SP. Το ίδιο παρατηρήθηκε για τις δραστηριότητες της CAT ( $P = 0,031$ ), της GSH-Px ( $P < 0,001$ ) και της μεταφοράσης της γλουταθειόνης (GST) ( $P = 0,026$ ) στο πλάσμα του αίματος των προβατινών των ομάδων SP10, SP15 και SP5, αντίστοιχα. Αντίθετα, τα επίπεδα των PC μειώθηκαν ( $P < 0,001$ ) στο πλάσμα του αίματος των προβατινών των ομάδων SP. Η οξειδωτική σταθερότητα του πρόβειου γάλακτος βελτιώθηκε για τις ομάδες SP, όπως αποδείχθηκε από την αύξηση της δραστηριότητας των SOD ( $P = 0,007$ ), CAT ( $P = 0,011$ ) και GSH-Px ( $P < 0,001$ ) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας [προσδιορισμένη με της μεθόδους ABTS και FRAP ( $P < 0,001$ )]. Τέλος, το υψηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα μείγματα ΣΖ (SP15) προκάλεσε τη μεγαλύτερη μείωση ( $P = 0,034$ ) στο επίπεδο των PC στο γάλα.

Επιπλέον, στα μονοκύτταρα των προβατινών της SP5 αυξήθηκαν σημαντικά τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *TRIF* ( $P = 0,012$ ), *MAPK* ( $P = 0,010$ ) και *JUND* ( $P = 0,008$ ) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες και τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *IRF5* αυξήθηκαν σημαντικά ( $P = 0,016$ ) σε σύγκριση με την CON. Στα ουδετερόφιλα, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *MYD88* μειώθηκαν σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις ομάδες SP10 και SP15 σε σύγκριση με την CON, ενώ του *NFKB* μειώθηκαν σημαντικά ( $P = 0,010$ ) στην ομάδα SP10 σε σύγκριση με την CON. Επίσης, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *STAT3* μειώθηκαν σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις ομάδες SP. Αντίθετα, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *TRIF* αυξήθηκαν σημαντικά ( $P = 0,011$ ) στην SP5 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες.

Στο Υ.Μ.Κ. η σχετική αφθονία του είδους *Prevotella brevis* αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,001$ ) στις SP5 και SP10 σε σύγκριση με τις CON και SP15. Επίσης, η σχετική αφθονία του *Ruminobacter amylophilus* μειώθηκε σημαντικά ( $P = 0,012$ ) στην ομάδα SP10, ενώ στην SP15 η σχετική αφθονία των *Fibrobacter succinogenes* και *Eubacterium ruminantium* αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,008$  και  $P = 0,005$ , αντίστοιχα). Στο στερεό περιεχόμενο, η σχετική αφθονία των *Fibrobacter succinogenes* στις SP5 και SP10 και *Selenomonas ruminantium* στις SP5 και SP15 μειώθηκε σημαντικά ( $P = 0,017$  και  $P = 0,001$ , αντίστοιχα) σε σύγκριση με την CON. Επιπλέον, η σχετική αφθονία των *Ruminobacter amylophilus* ( $P < 0,001$ ) και *Streptococcus bovis* ( $P < 0,001$ ) μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες SP, ενώ του είδους *Ruminococcus albus* αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,046$ ) στην SP15 σε σύγκριση με την CON.

Εν κατακλείδι, το μεγαλύτερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα μείγματα ΣΖ των προβατινών (15 g/προβατίνα/ημέρα, SP15), βελτίωσε την ποιότητα του παραγόμενου γάλακτος διασφαλίζοντας και την υγεία των προβατινών, όπως διαπιστώθηκε από τη μελέτη του προφίλ των λιπαρών οξέων και της οξειδωτικής σταθερότητας του γάλακτος, της οξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού, της σχετικής έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία και του μικροβιώματος της μεγάλης κοιλίας.

**Επιστημονική περιοχή:** Διατροφή Μηρυκαστικών

**Λέξεις κλειδιά:** Γαλακτοπαραγωγές προβατίνες, Ελαιούχα σπέρματα, Μικροφύκη, Καμελίνα, Σπιρουλίνα, Μεγάλη Κοιλία, Πρόβειο γάλα, Οξειδωτική κατάσταση, Έμφυτη ανοσία

## **Effect of *Camelina sativa* and *Spirulina* supplementation in ewes' immune system, rumen microbiota, and quality characteristics**

*Department of Animal Science*  
*Laboratory of Nutritional Physiology and Feeding*

### **Abstract**

The need for increased animal productivity because of the global population rise, as well as the rapid increase in demand for high nutritional animal products due to consumer preferences and emerging markets existing mainly in developing countries characterized by prosperity, drive the scientific community in studying innovative, unconventional, and high nutritional feedstuffs. The supplementation with feedstuffs rich in bioactive compounds such as polyunsaturated fatty acids (PUFA) and antioxidants in animal diets, could contribute to the development of high-nutritional dairy products. These bioactive compounds, ensure the fortification of the immune system and animal health, thus, reducing the use of antibiotics and consequently antibiotic resistance, ensuring profitability for dairy farms. Such feeding strategies are also associated with important alterations in the rumen microorganisms. The importance of modifying the rumen microorganisms lies not only in their ability to the breakdown of PUFA into saturated fatty acids (SFA) which are transferred in blood and then in milk, but also in the fact that specific microorganisms (methanogens) are linked with methane (CH<sub>4</sub>) production, and therefore, livestock's environmental impact.

Considering the abovementioned, the purpose of this Ph.D. thesis is the investigation of the effect of three different supplementation levels and the evaluation of the optimum level of two innovative feedstuffs, specifically *Camelina sativa* seeds, (CS), and *Spirulina* (SP): (a) on milk yield and its chemical composition, b) on rumen fluid, blood plasma, and milk fatty acids profile, c) on the expression of selected genes related to the regulation of the immune system and d) on rumen microorganisms.

For the first experiment, 48 Chios breed ewes were allocated into four equal and homogenous groups, in terms of fat-corrected milk yield (6 %) ( $1.85 \pm 0.3$  kg/day), age (2 - 4), days in milk ( $67 \pm 8$ ) and body weight ( $55.0 \pm 6.5$  kg). Animals were housed in groups and during feeding time, they were transferred to specially designed individual pens to achieve individual feeding. The rations consisted of concentrate, alfalfa hay, and wheat straw, and were offered in equal proportions, twice per day, after milking. Each group was assigned to one of the following four dietary treatments: CON: control diet without the CS supplementation; CS6: concentrate with 6 % of CS; CS11: concentrate with 11 % of CS, and CS16: concentrate with 16 % of CS. In the three CS dietary treatments, CS partially substituted both soybean meal and maize grain.

Supplementing CS at 6 % and 11 %, had no impact on milk yield and chemical composition, while in the CS16, milk fat was significantly decreased compared to the CON. In the CS groups, milk quality was improved from a human health perspective considering the proportions of SFA ( $P < 0.001$ ),  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3 n-3) ( $P < 0.001$ ), *cis*-9, *trans*-11 C18:2 (CLA) ( $P < 0.001$ ), and the  $\omega 6/\omega 3$  ratio ( $P < 0.001$ ). Furthermore, in blood plasma, the activity of catalase (CAT) was significantly increased ( $P = 0.006$ ) in the CS11 and CS16, and the activity of superoxide dismutase (SOD) was significantly increased ( $P = 0.014$ ) in the CS16. In addition, the total antioxidant capacity was increased in the CS-fed ewes considering both ABTS ( $P < 0.001$ ) and FRAP ( $P = 0.008$ ) methods. The levels of malondialdehyde (MDA) were significantly increased ( $P < 0.001$ ) in the CS11 compared to the CON and CS6, and in the CS16 compared to the CS6. In the CS16, protein carbonyls (PC) were significantly increased ( $P < 0.001$ ). Finally, in the CS-fed ewes, milk oxidative stability was fortified, as suggested by the activities of SOD, CAT, and

glutathione peroxidase (GSH-Px), by the total antioxidant capacity, and the levels of the oxidative stress biomarkers.

The relative transcript levels of the immune-related genes were determined using a real-time PCR platform (RT-PCR). The relative transcript levels of TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (*TRIF*) ( $P = 0.005$ ), TNF receptor-associated factor 3 (*TRAF3*) ( $P = 0.010$ ), Interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) ( $P = 0.002$ ), and Mitogen-activated protein kinase (*MAPK*) ( $P = 0.005$ ) were significantly increased in monocytes of the CS11 fed ewes. Furthermore, in monocytes of the CS6-fed ewes, the relative transcript levels of Interleukin-1 beta (*IL1B*) were significantly increased ( $P = 0.015$ ) compared to the CON, while in neutrophils, those of *IL1B* ( $P < 0.001$ ), Interleukin-8 (*IL8*) ( $P = 0.017$ ), and Interleukin-10 (*IL10*) ( $P = 0.007$ ) were significantly increased compared to the CON and CS16 fed ewes. The response of monocytes to dietary amino acids (mainly threonine, tyrosine, serine, and lysine) changes related to CS inclusion were different from that of neutrophils. However, the observed responses need to be further investigated.

Rumen microorganisms' relative abundance was determined using a RT-qPCR platform. The relative abundance of the archaea ( $P < 0.001$ ) and methanogens ( $P = 0.025$ ) was significantly reduced in rumen solid particles of the CS11 and CS16. In addition, the relative abundance of the protozoa of the CS6 was significantly increased in both the rumen fluid ( $P < 0.001$ ) and solid particles ( $P = 0.010$ ), while that of fungi was significantly reduced ( $P = 0.043$ ) in the CS16. Furthermore, in rumen fluid, the relative abundance of the *Fibrobacter succinogens* ( $P < 0.001$ ) and *Ruminobacter amylophilus* ( $P = 0.002$ ) was significantly increased in the CS6 and CS11, respectively. In rumen solid particles of the CS11, the relative abundance of the *Ruminococcus flavefaciens* was significantly reduced ( $P = 0.022$ ), while that of *Ruminobacter amylophilus* ( $P < 0.001$ ) and *Butyrivibrio proteoclasticus* ( $P = 0.001$ ) was significantly increased. Lastly, the relative abundance of *Selenomonas ruminantium* was significantly increased ( $P = 0.001$ ) in the rumen particles of the CS11 and CS16.

In conclusion, supplementing CS in ewes' diets, improved milk fatty acid profile, milk oxidative stability as well as total antioxidant capacity. The highest level of CS supplementation (CS16) did not have a negative impact on ewes' innate immunity. Finally, the highest CS supplementation reduced the relative abundance of methanogens without inducing radical changes in rumen microorganisms that could impair ruminal fermentation and ewes' performance, thus, highlighting important findings regarding both the reduction of CH<sub>4</sub> emissions and consequently, the reduction of the environmental footprint, as well as rumen fermentation processes.

For the second trial of this doctoral dissertation, 48 Chios breed ewes were selected and allocated in 4 homogenous groups ( $n = 12$ ) in terms of fat-corrected (6 %) milk yield ( $1.85 \pm 0.3$  kg/day), age (2 - 4), days in milk ( $67 \pm 8$ ) and body weight ( $54 \pm 6$  kg). Animals were kept in a common stall, divided into different blocks for each group, and at feeding time they were transferred to individual pens to achieve individual feeding. Each ewe was fed individually based on its maintenance and lactating requirements and the rations consisted of concentrates, alfalfa hay, and wheat straw, and were administered twice per day, after milking, independently of the groups. The concentrate of the control group (CON) had no SP, while in the concentrates of the treated groups, SP was added to obtain a daily supply of 5 g (SP5), 10 g (SP10), and 15 g (SP15) per animal.

The milk yield and chemical composition were not affected by the SP administration. The proportion of short-chain fatty acids was increased ( $P = 0.001$ ) in the milk of SP5 and SP10 ewes while those of medium-chain fatty acids were reduced ( $P = 0.024$ ) in the milk of SP10 compared with the CON animals. The highest SP supplementation level (SP15) increased the proportion of PUFA ( $P = 0.027$ ) in milk and reduced the thrombogenicity index ( $P = 0.046$ ). Furthermore, ewes' milk oxidative stability was improved by the dietary supplementation of SP as indicated by



the increase in the activities of SOD ( $P = 0.007$ ), CAT ( $P = 0.011$ ) και GSH-Px ( $P < 0.001$ ), and the total antioxidant capacity [measured by FRAP and ABTS assays ( $P < 0,001$ )] as well. Finally, the highest inclusion level of SP caused the sharpest drop ( $P = 0.034$ ) in the PC content of milk. In conclusion, the highest inclusion level of SP (SP15) improved ewes' oxidative status as well as their milk quality and oxidative stability. Moreover, the activity of SOD was significantly increased ( $P = 0.014$ ) in the blood plasma of SP-fed ewes. The same was observed for the activities of CAT ( $P = 0.031$ ), GSH-Px ( $P < 0.001$ ), and glutathione transferase ( $P = 0.026$ ) in the blood plasma of SP10, SP15, and SP5-fed ewes, respectively. On the contrary, PC were significantly decreased ( $P < 0.001$ ) in ewes' blood plasma, by the dietary supplementation of SP. In the monocytes of the SP5 ewes, the relative transcript levels of the *TRIF* ( $P = 0.012$ ), *MAPK* ( $P = 0.010$ ), and *JUND* ( $P = 0.008$ ) genes were significantly increased compared to all the groups and the relative transcript levels of the *IRF5* gene were also significantly increased ( $P = 0.016$ ) compared to the CON. In neutrophils, the relative transcript levels of the *MYD88* were significantly decreased ( $P < 0.001$ ) in the SP10 and SP15 compared to the CON, while that of the *NFkB* were significantly decreased ( $P = 0.010$ ) in the SP10 compared to the CON. Furthermore, the relative transcript levels of the *STAT3* were also significantly decreased ( $P < 0.001$ ) in the SP-fed ewes compared to the CON. In contrast, the relative transcript levels of the *TRIF* were significantly increased ( $P = 0.011$ ) in the SP5. In the rumen fluid, the relative abundance of *Prevotella brevis* was significantly increased ( $P = 0.001$ ) in the SP5 and SP10, and the relative abundance of *Ruminobacter amylophilus* was significantly decreased ( $P = 0.012$ ) in the SP10, while in the SP15 the relative abundance of *Fibrobacter succinogenes* and *Eubacterium ruminantium* was significantly increased ( $P = 0.008$  and  $P = 0.005$ , respectively). In rumen particles, the relative abundance of *Fibrobacter succinogenes* in the SP5 and SP10 and of *Selenomonas ruminantium* in the SP5 and SP15 was significantly reduced ( $P = 0.017$  and  $P = 0.001$ , respectively) compared to the CON. In the SP groups, the relative abundance of *Ruminobacter amylophilus* and *Streptococcus bovis* was significantly decreased ( $P < 0.001$ ), while that of *Ruminococcus albus* was significantly increased ( $P = 0.046$ ) in the SP15 compared to the CON. Consequently, the highest supplementation level of SP (15 g/ewe/day, SP15), improved milk quality and ensured ewes' health, as determined by the results of the milk fatty acid profile and milk oxidative stability, the ewes' organism oxidative status, the relative expression of genes related to innate immunity and the relative abundance of the rumen microorganisms.

**Scientific area:** Ruminant Nutrition

**Keywords:** Ewes, Oilseeds, Microalgae, *Camelina sativa*, *Spirulina*, Rumen microbiota, Ewes milk, Oxidative status, Innate immune system

Δήλωση έργου

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος, Χριστοδούλου Χρήστος δηλώνω ότι το κείμενο της μελέτης αποτελεί δικό μου, μη υποβοηθούμενο πόνημα. Υποβάλλεται σε μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του Διδακτορικού Διπλώματος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Δεν έχει υποβληθεί ποτέ πριν για οιοδήποτε λόγο ή για εξέταση σε οποιοδήποτε άλλο πανεπιστήμιο ή εκπαιδευτικό ίδρυμα της χώρας ή του εξωτερικού. Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Χριστοδούλου Χρήστος

1/9/2022

## Ευχαριστίες

Κατά τη διάρκεια αυτού του όμορφου και συνάμα απαιτητικού «ταξιδιού» της ζωής μου, θεωρώ υποχρέωση και ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους βοήθησαν στο να το φέρω σε πέρας με επιτυχία.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσά μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Ελένη Τσιπλάκου. Ήταν ο άνθρωπος που μου έδωσε την ευκαιρία να μελετήσω σε βάθος τον χώρο της έρευνας, να τον αγαπήσω και να αποκομίσω σπουδαίες γνώσεις και εμπειρίες. Η στήριξή της από τη πρώτη στιγμή της παρουσίας μου στο τμήμα σε κάθε δυσκολία και προβληματισμό ακόμα και σε προσωπικό επίπεδο, αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα για τη διαμόρφωσή μου όχι μόνο σαν Ερευνητή αλλά και σαν Άνθρωπο και της οφείλω τα μέγιστα.

Θεωρώ συναισθηματική υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά τον ομότιμο Καθηγητή κ. Γεώργιο Ζέρβα. Δίπλα του απέκτησα πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες. Επίσης, βοήθησε τα μέγιστα με ουσιαστικές συμβουλές και επισημάνσεις στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Με ενέπνευσε στο να εντρυφήσω και να υπηρετήσω την έρευνα σε βάθος και ουσιαστικά. Θα αποτελεί πάντα πηγή έμπνευσης, Επιστήμονα μα κυρίως Ανθρώπου.

Ευχαριστίες εκφράζονται στον Καθηγητή, κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή, για τις πολύτιμες διορθώσεις και επισημάνσεις του αλλά και τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας για τους ερευνητικούς προβληματισμούς που μοιραστήκαμε και πιο συγκεκριμένα για τις μοριακές τεχνικές που εφαρμόστηκαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Λάμπρου για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή αλλά κυρίως για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και πολύτιμες παρατηρήσεις κατά τη διόρθωση της διατριβής που βοήθησαν στο να βελτιωθεί η ποιότητά της.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή, κ. Αθανάσιο Παππά για την άριστη συνεργασία και τις εύστοχες συμβουλές και παρατηρήσεις του οι οποίες βοήθησαν στη σημαντική βελτίωση της παρούσης διατριβής.

Οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την Καθηγήτρια κα Στυλιανή Χαδιώ-Μάντζαρη για τις πολύτιμες επισημάνσεις, υποδείξεις και συμβουλές της, οι οποίες αναβάθμισαν ποιοτικά και ουσιαστικά τη διατριβή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια, κα Κυριακή Σωτηράκογλου, για τη σημαντική συνεισφορά και καθοδήγησή της σχετικά με την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν στην εν λόγω διατριβή.

Βαθιές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στον Επίκουρο Καθηγητή, κ. Παναγιώτη Σιμιτζή για τις σημαντικές και εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις του που βοήθησαν στη βελτίωση της διατριβής.

Οφείλω να ευχαριστήσω τους ερευνητές και φίλους μου, μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής, Δρ. Αλέξανδρο Μαυρομάτη, Δρ. Χριστίνα Μητσιοπούλου, την υποψήφια Διδάκτορα Παναγιώτα Κυριακάκη και τη Δρ. Ελισάβετ Γιαμούρη, για την υποστήριξη, τη βοήθειά τους, τους ερευνητικούς προβληματισμούς που μοιραστήκαμε αλλά και το ευχάριστο και φιλικό κλίμα που δημιουργήσαμε. Επιθυμώ να ευχαριστήσω και το μέλος ΕΤΕΠ του εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής, την κα Μαρία Γεωργιάδου για την υποστήριξη, τη βοήθειά της και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε ακόμα και σε προσωπικό επίπεδο.

Θερμές ευχαριστίες απονέμονται και στο ερευνητικό προσωπικό του Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, του ΕΛΓΟ Δήμητρα, Γιαννιτσών, για τη βοήθειά τους στη διεξαγωγή των πειραματισμών και ιδιαίτερα στην Κύρια Ερευνήτρια κα Βασιλική Κοτσάμπαση και στον Επίκουρο Καθηγητή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Βασίλειο Ντότα.

Ευχαριστώ και τη σύντροφό μου, Ευαγγελία, που στάθηκε δίπλα μου με υπομονή και συμβουλές και με βοήθησε να προοδεύσω και να πετύχω τους στόχους μου. Επίσης, ευχαριστώ και τους συγγενείς και φίλους μου που με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια.

Πάνω από όλα, τις ολόψυχες ευχαριστίες μου οφείλω να αποδώσω στην οικογένειά μου, για την αμέριστη στήριξη και αγάπη τους. Ο πατέρας μου, Βλαδίμηρος, ήταν ο άνθρωπος που μου δίδαξε να υπηρετώ την έρευνα με ήθος και αξιοπρέπεια. Η μητέρα μου, Παναγιώτα και ο αδερφός μου, Φαίδων, με τις συμβουλές, τη στήριξη και την αγάπη τους, μου πρόσφεραν πολύτιμα εφόδια στο να φέρω σε πέρας τους στόχους μου και να εξελιχθώ σαν Άνθρωπος.

*Στην οικογένειά μου  
Βλαδίμηρο, Παναγιώτα, Φαίδων*

## Πίνακας Περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΠΛΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΑ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΑ.....	3
2.1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΗ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	3
2.1.1. Η επίδραση των ελαιούχων σπερμάτων στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση του γάλακτος και στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος.....	4
2.1.2. Η επίδραση των μικροφυκών στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση του γάλακτος και στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος .....	12
2.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΠΛΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ .....	17
2.2.1. Ελεύθερες ρίζες, οξειδωτικό στρες και αντιοξειδωτικά.....	17
2.2.2. Η λιπιδική υπεροξείδωση.....	21
2.2.3. Η επίδραση της των ελαιούχων σπερμάτων στην οξειδωτική κατάσταση των μηρυκαστικών .....	22
2.2.4. Η επίδραση των μικροφυκών στην οξειδωτική κατάσταση των μηρυκαστικών .....	26
2.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΠΛΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ .....	29
2.3.1. Η επίδραση των ελαιούχων σπερμάτων στο ανοσοποιητικό σύστημα.....	31
2.3.2. Η επίδραση των μικροφυκών στο ανοσοποιητικό σύστημα.....	33
2.3.3. Η επίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο ανοσοποιητικό σύστημα.....	34
2.4. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΧΕΙΡΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΚΑΙ ΟΙ ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ .....	39
2.4.1. Οι μικροοργανισμοί της μεγάλης κοιλίας .....	40

2.4.1.1. Τα βακτήρια της μεγάλης κοιλίας.....	41
2.4.1.2. Τα μεθανοβακτήρια της μεγάλης κοιλίας.....	42
2.4.1.3. Τα πρωτόζωα της μεγάλης κοιλίας.....	43
2.4.1.4. Οι βακτηριοφάγοι της μεγάλης κοιλίας.....	44
2.4.1.5. Οι μύκητες της μεγάλης κοιλίας.....	45
2.4.2. Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις στη μεγάλη κοιλία.....	46
2.4.3. Ζυμωτικές διεργασίες στη μεγάλη κοιλία.....	48
2.4.3.1. Ζύμωση των υδατανθράκων.....	48
2.4.3.2. Ζύμωση των πρωτεϊνών και μη-πρωτεϊνικού αζώτου.....	50
2.4.3.3. Ζύμωση των λιπών.....	51
2.4.4. Η επίδραση της ενσωμάτωσης των ελαιούχων σπερμάτων και των μικροφυκών στην παραγωγή μεθανίου.....	53
2.4.5. Η επίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), των ελαιούχων σπερμάτων και των μικροφυκών στον μικροβιακό πληθυσμό της μεγάλης κοιλίας.....	55
<b>3. Η ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΩΣ ΖΩΟΤΡΟΦΗ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ.....</b>	<b>62</b>
3.1. ΤΟ ΕΛΑΙΟ ΤΗΣ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ.....	63
3.2. ΑΝΤΙΔΙΑΙΤΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ.....	65
3.2.1. Οι γλυκοσινολάτες ως ο κύριος αντιδιαιτητικός παράγοντας της καμελίνας.....	65
3.2.2. Λοιποί αντιδιαιτητικοί παράγοντες της καμελίνας.....	66
3.3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ.....	67
<b>4. Η ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΩΣ ΚΑΙΝΟΤΟΜΟΣ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ.....</b>	<b>70</b>
4.1. ΤΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ.....	70
4.2. ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ.....	71

4.3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ.....	74
5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....	77
5.1. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ .....	78
5.1.1. Πειραματικό σχέδιο πρώτου πειραματισμού .....	78
5.2. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ .....	81
5.2.1. Πειραματικό σχέδιο δεύτερου πειραματισμού.....	82
6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	86
6.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΩΝ .....	86
6.1.1. Συλλογή δειγμάτων ζωοτροφών σιτηρεσίων .....	86
6.1.2. Συλλογή ατομικών δειγμάτων γάλακτος.....	86
6.1.3. Συλλογή ατομικών δειγμάτων αίματος.....	86
6.1.4. Συλλογή ατομικών δειγμάτων υγρού και στερεού περιεχομένου της μεγάλης κοιλίας.....	87
6.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	87
6.2.1. Αναλύσεις ζωοτροφών .....	87
6.2.2. Αναλύσεις χημικής σύστασης του γάλακτος .....	88
6.2.3. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων .....	88
6.2.3.1. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας .....	88
6.2.3.2. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο πλάσμα του αίματος.....	88
6.2.3.3. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο γάλα .....	88
6.2.3.4. Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων με τη χρήση αέριου χρωματογράφου .....	89
6.2.4. Φωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και των δεικτών οξειδωτικού στρες .....	90
6.2.4.1. Φωτομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων.....	90
6.2.4.2. Φωτομετρικό προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	92
6.2.4.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	94
6.2.5. Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία .....	95



6.2.6. Μεταγονιδωματική ανάλυση του βακτηριώματος της μεγάλης κοιλίας με τη χρήση αλληλούχισης νέας γενιάς.....	101
6.2.7. Γονιδιωματική ανάλυση του μικροβιώματος της μεγάλης κοιλίας .....	102
6.2.8. Γονιδιωματική ανάλυση του μικροβιώματος της Μ.Κ. μέσω της Real-Time PCR...	103
6.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	107
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ .....	110
7.1. ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ, ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ.....	110
7.2. ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	112
7.3. ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ .....	114
7.3.1. Προφίλ των λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας .....	114
7.3.2. Προφίλ των λιπαρών οξέων στο πλάσμα του αίματος.....	116
7.3.3. Προφίλ των λιπαρών οξέων στο γάλα των προβατινών .....	119
7.4. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ .....	127
7.5. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	127
7.6. ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΕΚΦΡΑΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ .....	130
7.6.1. Συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων .....	133
7.6.2. Αποτελέσματα διαχωριστικής ανάλυσης στα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα και στο προφίλ των αμινοξέων των μειγμάτων συμπυκνωμένων ζωοτροφών .....	136
7.7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΝΕΑΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ.....	138
7.8. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΥΓΡΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ .....	141
7.9. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΣΤΕΡΕΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ	143
8. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 1 <sup>ΟΥ</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ .....	146

8.1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΗ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	146
8.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΥΓΡΟ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ .....	147
8.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ .....	148
8.4. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	151
8.5. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ ΣΤΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ.....	154
8.6. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ.....	159
9. ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	169
10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	171
11. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	172
12. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ.....	173
12.1. ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ, ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ.....	173
12.2. ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ .....	175
12.3. ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ .....	178
12.3.1. Προφίλ των λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας .....	178
12.3.2. Προφίλ των λιπαρών οξέων στο πλάσμα του αίματος.....	179
12.3.3. Προφίλ των λιπαρών οξέων στο γάλα .....	182
12.4. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ .....	186

12.5. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ .....	186
12.6. ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΕΚΦΡΑΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ .....	189
12.6.1. Συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων .....	192
12.6.2. Αποτελέσματα διαχωριστικής ανάλυσης στα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα..	194
12.7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΝΕΑΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ.....	195
12.8. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΥΓΡΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ .....	199
12.9. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΣΤΕΡΕΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ .....	200
13. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 2 <sup>ΟΥ</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ .....	203
13.1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΗ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	203
13.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΥΓΡΟ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ .....	203
13.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ.....	204
13.4. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ .....	205
13.5. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ ΣΤΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ.....	207
13.6. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ.....	210
14. ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	216
15. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	218

16. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	220
17. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	221
18. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	251

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας	Τίτλος πίνακα	Σελίδα
Πίνακας 2.1.	Συνοπτική περιγραφή ενδεικτικών πειραματισμών επίδρασης των ελαιούχων σπερμάτων και των υποπροϊόντων τους στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση και στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος	10-11
Πίνακας 2.2.	Συνοπτική περιγραφή ενδεικτικών πειραματισμών επίδρασης των μικροφυκών στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση και στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος	15-16
Πίνακας 2.3.	Συνοπτική περιγραφή της επίδρασης της ενσωμάτωσης ελαιούχων σπερμάτων και των υποπροϊόντων τους στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών και στην οξειδωτική κατάστασή τους	25
Πίνακας 2.4.	Συνοπτική περιγραφή της επίδρασης της ενσωμάτωσης μικροφυκών στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών και στην οξειδωτική κατάστασή τους	28
Πίνακας 2.5.	Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης των ελαιούχων σπερμάτων, των μικροφυκών και των PUFA στο ανοσοποιητικό σύστημα	37-38
Πίνακας 2.6.	Οι μικροοργανισμοί της μεγάλης κοιλίας	41
Πίνακας 2.7.	Μικροοργανισμοί που εμπλέκονται σε διεργασίες της μεγάλης κοιλίας	52-53
Πίνακας 2.8.	Συνοπτική περιγραφή ενδεικτικών πειραματισμών επίδρασης των ελαιούχων σπερμάτων και των μικροφυκών στους μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών	60-61
Πίνακας 4.1.	Συνοπτική παρουσίαση των θρεπτικών συστατικών, αμινοξέων και λιπαρών οξέων της σπιρουλίνας	73-74
Πίνακας 5.1.	Σύσταση (g/kg) των μειγμάτων των συμπυκνωμένων ζωοτροφών (CON, CS6, CS11, CS16)	79
Πίνακας 5.2.	Χημική σύσταση (% ΞΟ) και προφίλ των λιπαρών οξέων (%) των μειγμάτων συμπυκνωμένων ζωοτροφών και των χονδροειδών ζωοτροφών	80
Πίνακας 5.3.	Προφίλ αμινοξέων (% του μείγματος ΣΖ όπως χορηγήθηκε)	81
Πίνακας 5.4.	Σύσταση (g/kg) των μειγμάτων των συμπυκνωμένων ζωοτροφών (CON, SP5, SP10, SP15)	83
Πίνακας 5.5.	Χημική σύσταση των ζωοτροφών (% ΞΟ)	83
Πίνακας 5.6.	Το προφίλ των λιπαρών οξέων (%) και των αμινοξέων (% w/w) του μείγματος συμπυκνωμένων ζωοτροφών και της σπιρουλίνας	84-85
Πίνακας 6.1.	Αλληλουχίες, μέγεθος αμπλικονίου και θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών που χρησιμοποιούνται σε qPCR σε πραγματικό χρόνο	99-100
Πίνακας 6.2.	Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιούνται για qPCR, γονιδιοωματικές περιοχές ενίσχυσης PCR, μέγεθος αμπλικονίων, αποδοτικότητα εκκινητών και θερμοκρασία υβριδισμού	105-106
Πίνακας 7.1.	Ημερήσια κατανάλωση των ζωοτροφών (g/προβατίνα/ημέρα) και πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και κύριων λιπαρών οξέων (g/προβατίνα/ημέρα) των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης	110-111

	σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)	
Πίνακας 7.2.	Μέσο σωματικό βάρος (ΣΒ, kg) των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη την πειραματική περίοδο (0, 30 <sup>η</sup> και 60 <sup>η</sup> πειραματική ημέρα)	111
Πίνακας 7.3.	Η γαλακτοπαραγωγή, η χημική σύσταση του γάλακτος των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη την πειραματική περίοδο (0, 15 <sup>η</sup> , 30 <sup>η</sup> , 45 <sup>η</sup> και 60 <sup>η</sup> πειραματική ημέρα)	113-114
Πίνακας 7.4.	Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ) στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)	115
Πίνακας 7.5.	Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ) στο πλάσμα αίματος των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15η, 30η, 45η και 60η πειραματική ημέρα)	117-118
Πίνακας 7.6.	Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ), των ομαδοποιήσεών τους, των δεικτών υγείας των ΛΟ και των δεικτών αφυδρογονάσης στο γάλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15 <sup>η</sup> , 30 <sup>η</sup> , 45 <sup>η</sup> και 60 <sup>η</sup> πειραματική ημέρα)	122-124
Πίνακας 7.7.	Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και οι δείκτες οξειδωτικής κατάστασης στο πλάσμα του αίματος και στο γάλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15 <sup>η</sup> , 30 <sup>η</sup> , 45 <sup>η</sup> και 60 <sup>η</sup> πειραματική ημέρα)	129-130
Πίνακας 7.8.	Η σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)	131-132
Πίνακας 7.9.	Η σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων σε ουδετερόφιλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)	132-133
Πίνακας 7.10.	Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα	140

	ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)	
Πίνακας 7.11.	Σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)	142-143
Πίνακας 7.12.	Σχετική ποσότητα επιλεγμένων μικροοργανισμών στο στερεό περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)	144-145
Πίνακας 12.1.	Ημερήσια κατανάλωση των ζωοτροφών (g/προβατίνα/ημέρα) και ημερήσια πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, αμινοξέων και κύριων λιπαρών οξέων (g/προβατίνα/ημέρα) των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)	173-174
Πίνακας 12.2.	Μέσο σωματικό βάρος των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη την πειραματική περίοδο (0, 30 <sup>η</sup> και 60 <sup>η</sup> πειραματική ημέρα)	175
Πίνακας 12.3.	Η γαλακτοπαραγωγή, η χημική σύσταση του γάλακτος των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη την πειραματική περίοδο (0, 15 <sup>η</sup> , 30 <sup>η</sup> , 45 <sup>η</sup> και 60 <sup>η</sup> πειραματική ημέρα)	177-178
Πίνακας 12.4.	Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ) στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)	178-179
Πίνακας 12.5.	Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ) στο πλάσμα αίματος των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15 <sup>η</sup> , 30 <sup>η</sup> , 45 <sup>η</sup> και 60 <sup>η</sup> πειραματική ημέρα)	180-181
Πίνακας 12.6.	Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ), των ομαδοποιήσεών τους, των δεικτών υγείας των ΛΟ και των δεικτών αφυδρογονάσης στο γάλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15 <sup>η</sup> , 30 <sup>η</sup> , 45 <sup>η</sup> και 60 <sup>η</sup> πειραματική ημέρα)	183-185
Πίνακας 12.7.	Οι δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και οι δείκτες οξειδωτικής κατάστασης στο πλάσμα του αίματος και στο γάλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και	187-188

	SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15 <sup>η</sup> , 30 <sup>η</sup> , 45 <sup>η</sup> και 60 <sup>η</sup> πειραματική ημέρα)	
Πίνακας 12.8.	Η σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)	190
Πίνακας 12.9.	Η σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)	191
Πίνακας 12.10.	Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) σε επίπεδο φύλου	197
Πίνακας 12.11.	Σχετική ποσότητα επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)	199-200
Πίνακας 12.12.	Σχετική ποσότητα επιλεγμένων μικροοργανισμών στο στερεό περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)	201-202
Πίνακας 18.1.	Συσχετίσεις μεταξύ της σχετικής έκφρασης γονιδίων στα μονοκύτταρα και των αμινοξέων των τεσσάρων μειγμάτων συμπυκνωμένων ζωοτροφών (CON, CS6, CS11, CS16)	251-252
Πίνακας 18.2.	Συσχετίσεις μεταξύ της σχετικής έκφρασης γονιδίων στα ουδετερόφιλα και των αμινοξέων των τεσσάρων μειγμάτων συμπυκνωμένων ζωοτροφών (CON, CS6, CS11, CS16)	253-254



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα	Τίτλος διαγράμματος	Σελίδα
Διάγραμμα 7.1.	Συσχέτιση κατά Pearson του α-λινολενικού οξέος (ALA) με συγκεκριμένα λιπαρά οξέα και ομαδοποιήσεις λιπαρών οξέων	125
Διάγραμμα 7.2.	Γραφική απεικόνιση της διαχωριστικής ανάλυσης (discriminant analysis) των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON: μπλε □, CS6: πράσινο ○, CS11: κόκκινο ◇ και CS16: μαύρο Δ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου με βάση τις συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων του γάλακτος, τα ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα, τους δείκτες υγείας των λιπαρών οξέων και τους δείκτες αφυδρογονάσης Δ <sup>-9</sup>	126
Διάγραμμα 7.3.	Γραφική απεικόνιση heatmap της συσχέτισης Pearson μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων στα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα	135
Διάγραμμα 7.4.	Γραφική απεικόνιση της διαχωριστικής ανάλυσης που διαχωρίζει τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON, CS6, CS11 και CS16) σύμφωνα με τη σχετική έκφραση γονιδίων των: a) μονοκυττάρων, b) ουδετεροφίλων, c) μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων και d) μονοκυττάρων έναντι ουδετεροφίλων	137
Διάγραμμα 7.5.	Γραφική απεικόνιση της ανάλυσης που διαχωρίζει τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON, CS6, CS11 και CS16) σύμφωνα με το προφίλ αμινοξέων	138
Διάγραμμα 7.6.	Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11, CS16) σε επίπεδο φύλου	140
Διάγραμμα 7.7.	Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11, CS16) σε επίπεδο οικογένειας	141
Διάγραμμα 7.8.	Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11, CS16) σε επίπεδο γένους	141
Διάγραμμα 12.1.	Γραφική απεικόνιση heatmap της συσχέτισης Pearson μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων στα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα	193
Διάγραμμα 12.2.	Γραφική απεικόνιση της ανάλυσης που διαχωρίζει τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON, SP5, SP10 και SP15) σύμφωνα με τη σχετική έκφραση γονιδίων των: a) μονοκυττάρων, b) ουδετεροφίλων, c) μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων και d) μονοκυττάρων έναντι ουδετεροφίλων	195
Διάγραμμα 12.3.	Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10, SP15) σε επίπεδο φύλου	197
Διάγραμμα 12.4.	Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10, SP15) σε επίπεδο οικογένειας	198
Διάγραμμα 12.5.	Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10, SP15) σε επίπεδο γένους	198

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα	Τίτλος Σχήματος	Σελίδα
Σχήμα 2.1.	Σχηματική απεικόνιση αντιοξειδοτικών ενζύμων (Πηγή: Weydert & Cullen, 2010)	20
Σχήμα 2.2.	Διαφορετικές δραστικές μορφές οξυγόνου, σχηματισμός και κύριοι στόχοι τους (Πηγή: Harris & DeNicola, 2020)	21
Σχήμα 2.3.	Μονοπάτι σηματοδότησης του TLR4 (Πηγή: Firmal <i>et al.</i> , 2020)	30
Σχήμα 2.4.	Μεταβολισμός του λινελαϊκού λιπαρού οξέος και του λινολενικού λιπαρού οξέος	35
Σχήμα 2.5.	Μικροβιακή ταξινόμηση και στάδια των ζυμωτικών διεργασιών της Μ.Κ (Προσαρμοσμένο από: Nagaraja, 2016)	48
Σχήμα 6.1.	Απεικόνιση της αντίδρασης της μεθόδου FRAP	93
Σχήμα 6.2.	Απεικόνιση της αντίδρασης της μεθόδου ABTS	93
Σχήμα 6.3.	Αντίδραση της μηλονικής διαλδεϋδης με το θειοβαρβιτουρικό οξύ	94
Σχήμα 6.4.	Αντίδραση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με τη 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη	94

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα	Τίτλος Εικόνας	Σελίδα
Εικόνα 6.1.	α) Διήθηση υγρού μεγάλης κοιλίας με υλικό τύπου γάζας, β) Διαχωρισμός και απομόνωση στερεού μεγάλης κοιλίας, γ) Άμεση μεταφορά δειγμάτων σε υγρό άζωτο	87
Εικόνα 6.2.	Διαχωρισμός των κυττάρων μετά τη φυγοκέντρηση	95
Εικόνα 6.3.	Διαχωρισμός νουκλεϊκών οξέων και κατακρήμνιση του RNA	96
Εικόνα 6.4.	Προσδιορισμός της ποσότητας και ποιότητας των RNA φωτομετρικά με τη χρήση του NanoDrop (Quawell) και των λόγων A260/A280 και A260/A230	96
Εικόνα 6.5.	Ενδεικτική απεικόνιση του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης για τον ποιοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων μετά την απομόνωση	97
Εικόνα 6.6.	Ομογενοποίηση υγρού και στερεού περιεχομένου της μεγάλης κοιλίας με τη χρήση ιγδίου και υγρού αζώτου	102
Εικόνα 6.7.	Στάδια απομόνωσης DNA	103
Εικόνα 6.8.	Διαδικασία απομόνωσης DNA με τη χρήση στηλών επιτάχυνσης NucleoSpin® Tissue	103
Εικόνα 13.1.	Οι δραστηριότητες της σπιρουλίνας προς τροποποίηση του μικροβιακού πληθυσμού, δύναται να αποτρέψουν τη δυσβίωση. Η αντιβακτηριακή δράση της σπιρουλίνας μπορεί να προστατεύσει τον ξενιστή από μολύνσεις (Πηγή: Finamore <i>et al.</i> , 2017)	214

## Συντομογραφίες

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

ADFom = Acid Detergent Fiber (NDF - ημικυτταρίνες)

AI = Atherogenicity index, Αθηρωματικός δείκτης

ALA =  $\alpha$ -Linolenic Acid,  $\alpha$ -λινολενικό οξύ

aNDFom = Neutral Detergent Fiber (ημικυτταρίνες + κυτταρίνη + λιγνίνη + κουτίνη + πυριτικά άλατα + πρωτεΐνες κυτταρικών τοιχωμάτων)

CAT = Catalase, καταλάση

CDNB = 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο

CDS = Κωδικοποιητική αλληλουχία

CHUK = Κινάσες-αναστολείς του μεταγραφικού παράγοντα NFkB, η υπομονάδα- $\alpha$  (IKK- $\alpha$ ) γνωστοί και ως συντηρημένη ουβικινόνη κινάση έλικα-βρόχου-έλικα

CLA = Συζευγμένο λινελαϊκό οξύ

COXs = Cyclooxygenases, κυκλοξυγενάσες

CXCL-5 = C-X-C χυμειοκίνη 5

CXCL-16 = C-X-C χυμειοκίνη 16

DHA = Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ

DNA = Deoxyribonucleic Acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

DNPH = 2,4-dinitrophenylhydrazine, 2,4-δινιτροφαινυλο-υδραζίνη

DPA = Εικοσιδιπεντανοϊκό οξύ

DPPH = Diphenylpicrylhydrazyl

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic Acid, Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EPA = Εικοσιπεντανοϊκό οξύ

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

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

FID = Flame Ionization Detector, Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας

FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Power

GAPDH = Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης

GR = Glutathione Reductase, αναγωγή της γλουταθειόνης

GSH-Px = Glutathione Peroxidase, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης,

GSH = Glutathione, γλουταθειόνη (ανηγμένη μορφή)

GSSG = Glutathione oxidized, γλουταθειόνη (οξειδωμένη μορφή)

GST = Glutathione transferase, μεταφοράση της γλουταθειόνης  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Υπεροξειδίο του υδρογόνου  
HMOX1 = Οξυγενάση της αίμης-1  
HPI = Health Promoting Index, Δείκτης προαγωγής υγείας  
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  
JUND = Μεταγραφικός παράγοντας JunD  
LCFA = Long Chain Fatty Acid, μακράς αλύσου λιπαρά οξέα  
LCPUFA = Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid, μακράς αλύσου πολυακόρεστα λιπαρά οξέα  
LPS = Λιποπολυσακχαριτών  
LOXs = Λιποξυγενάσες  
MAPK = MAP κινάσες  
MCFA = Medium Chain Fatty Acid, μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα  
MDA = Μηλονική διαλδεΰδη  
MFD = Milk fat depression, σύνδρομο μείωσης της λιποπερικτικότητας  
MUFA = Monounsaturated Fatty Acid, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα  
MYD88 = Διαφοροποιητής της πρώτης απάντησης των μυελοειδών 88  
NADPH = Φωσφορική δινουκλεοτιδική νικοτιναμυδική αδερίνη (ανηγμένη μορφή),  
NADP<sup>+</sup> = Φωσφορική δινουκλεοτιδική νικοτιναμυδική αδερίνη (οξειδωμένη μορφή),  
NGS = Next Generation Sequencing, Αλληλούχιση νέας γενιάς  
NFκB = Μεταγραφικός πυρηνικός παράγοντας κάππα-B  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> = Ανιόν του υπεροξειδίου  
OH<sup>•</sup> = Ρίζες υδροξυλίου  
PAMPs = pathogen-associated molecular patterns, μοριακά πρότυπα των παθογόνων  
PBS = Phosphate Buffered Saline, Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών  
PC = Protein Carbonyls, Πρωτεϊνικά καρβονύλια

PCR = Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης  
PGE-2 = Prostaglandins E2, προσταγλανδίνες προσταγλαδίνες σειράς-2  
PRRs = pattern recognition receptors, υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων  
PUFA = Polyunsaturated Fatty Acid, πολυάκορεστα λιπαρά οξέα  
ROS = Δραστικές ρίζες οξυγόνου  
SCFA = Short Chain Fatty Acid, μικρής αλυσού λιπαρά οξέα  
SFA = Saturated Fatty Acid, κορεσμένα λιπαρά οξέα  
SEM = Standard Error of Mean, Τυπικό σφάλμα των μέσων  
SOD = Superoxide Dismutase, δισμουτάση του υπεροξειδίου  
STAT3 = Ο μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3  
TBA = Thiobarbituric Acid, Θειοβαρβιτουρικό οξύ  
TI = Thrombotic Index, Δείκτης θρόμβωσης  
TLRs = Ανάλογοι των Toll υποδοχείς  
TLR4 = Υποδοχείς τύπου Toll 4  
TNFA = Παράγοντας νέκρωσης όγκων-α  
TRAF3 = TNF υποδοχείς 3  
TRIF = Τομέας TIR επαγωγής της ιντερφερόνης β  
UFA = Unsaturated Fatty Acids, ακόρεστα λιπαρά οξέα  
VA = Vaccenic Acid, βασσενικό οξύ  
VFAs = Volatile Fatty Acids, πτητικά λιπαρά οξέα  
YWHAZ = η πρωτεΐνη ενεργοποίησης της μονοξυγενάσης 3 της τυροσίνης/μονοξυγενάση 5 της τρυπτοφάνης, το ζήτα πολυπεπτίδιο  
M.K. = Μεγάλη κοιλία  
ΛΟ = Λιπαρά οξέα  
ΞΟ = Ξηρά ουσία  
ΟΑΟ = Ολικές αζωτούχες ουσίες  
ΣΖ = Συμπυκνωμένες ζωοτροφές  
Υ.Μ.Κ. = Υγρό μεγάλης κοιλίας  
ΧΖ = Χονδροειδείς ζωοτροφές

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ζωική παραγωγή αποτελεί βασικό πυλώνα της εθνικής μας οικονομίας και οφείλει να διασφαλίζει την παραγωγή ζωοκομικών προϊόντων υψηλής διατροφικής και βιολογικής αξίας.

Μέχρι το 2050 ο παγκόσμιος πληθυσμός αναμένεται να αυξηθεί στα 9,7 δις και μέχρι το 2100 στα 10,4 δις (UN, 2022). Ταυτόχρονα αναμένεται ραγδαία αύξηση στη ζήτηση και κατ' επέκταση στην παραγωγή των ζωοκομικών προϊόντων. Τις τελευταίες δεκαετίες, η ζήτηση για ζωοκομικά προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας επίσης αυξάνεται λόγω των παγκόσμιων αλλαγών στις προτιμήσεις των καταναλωτών και των αναπτυσσόμενων αγορών, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες που χαρακτηρίζονται από ευημερία. Ωστόσο, δύο βασικά εμπόδια πρέπει να ξεπεραστούν πριν να επιτευχθεί αυτή η παραγωγή που θα καλύψει την προβλεπόμενη ζήτηση: (α) ο αυξημένος ανταγωνισμός για τη γη, με την αστική επέκταση, την παραγωγή βιοκαυσίμων και άλλες γεωργικές εφαρμογές που καταλαμβάνουν γη που διαφορετικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εκτροφή ζώων, και (β) η κλιματική αλλαγή που επηρεάζει αρνητικά τη διαθεσιμότητα νερού και ζωοτροφών σε παγκόσμιο επίπεδο. Επομένως, ο προσδιορισμός νέων πόρων τροφοδοσίας κρίνεται ζωτικής σημασίας για να χαρακτηρίζονται μελλοντικά βιώσιμες οι κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις. Σε ένα ιδανικό σενάριο, τέτοιου είδους ζωοτροφές πρέπει να έχουν υψηλή διατροφική αξία και μετατρεψιμότητα, να βελτιστοποιούν την ποιότητα των ζωοκομικών προϊόντων και να χρησιμοποιούν αποτελεσματικά και βιώσιμα τη γη και το νερό.

Είναι σημαντικό όσοι συνεισφέρουν στον κλάδο της ζωικής παραγωγής να επισημαίνουν τη σπουδαιότητα της ύπαρξης κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων ικανών να προάγουν την ευζωία του ζωικού κεφαλαίου και εν συνεχεία να καλύπτουν ποιοτικά τις ανάγκες του καταναλωτή μέσω της παραγωγής ζωοκομικών προϊόντων υψηλής διατροφικής αξίας που θα προάγουν την υγεία τους. Η βέλτιστη ποιότητα των ζωοκομικών προϊόντων επηρεάζει την τιμή και τη ζήτηση αυτών και αυξάνει την ανταγωνιστικότητα των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων.

Τα τελευταία χρόνια, η ενσωμάτωση ζωοτροφών πλούσιων σε βιολειτουργικά συστατικά στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών ζώων, αποτελεί τη σύγχρονη τάση της Διατροφής. Είναι γνωστό ότι το πρόβειο γάλα είναι πλούσιο σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (saturated fatty acids, SFA), τα οποία έχουν συνδεθεί με δυσμενείς καταστάσεις για τον άνθρωπο όπως καρδιαγγειακές παθήσεις και μείωση της ευαισθησίας της ινσουλίνης (WHO, 2003). Ο πιο άμεσος τρόπος για τη δημιουργία ζωοκομικών προϊόντων υψηλής διατροφικής αξίας που συμβαδίζουν με τις

σύγχρονες ανάγκες της αγοράς, είναι μέσω ορθολογικών διατροφικών χειρισμών και συγκεκριμένα με τη συμμετοχή «καινοτόμων» ζωοτροφών, πλούσιων σε βιολειτουργικά συστατικά, όπως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFA), αντιοξειδωτικά, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες. Συγκεκριμένα, τα PUFA χαρακτηρίζονται ως τα «επιθυμητά» λιπαρά οξέα (ΛΟ) και η κατανάλωσή τους συνδέεται με την προαγωγή της υγείας του ανθρώπου (Simopoulos 1998, Simopoulos 2002, Lee & Hiramatsu, 2011). Επίσης, τα βιολειτουργικά συστατικά που απαντώνται σε καινοτόμες ζωοτροφές, έχει αποδειχθεί ότι διασφαλίζουν την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και γενικότερα της υγείας του ζώου κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό διότι δύναται να μειωθεί η χρήση των αντιβιοτικών και κατ' επέκταση η αντίσταση στα αντιβιοτικά πέραν της μείωσης του κόστους παραγωγής. Εξίσου σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι εν λόγω διατροφικοί χειρισμοί τροποποιούν τον μικροβιακό πληθυσμό της μεγάλης κοιλίας (M.K.) των μηρυκαστικών. Ο ρόλος της M.K. είναι κρίσιμος, καθότι αυτή εμπλέκεται, μέσω του μικροβιώματός της, στην αποδόμηση των PUFA σε SFA τα οποία μεταφέρονται στο αίμα και στη συνέχεια στο παραγόμενο γάλα. Η σπουδαιότητα στην τροποποίηση του μικροβιώματος της M.K. έγκειται και στο γεγονός ότι συγκεκριμένα βακτήρια (μεθανοβακτήρια) είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενός από τα σημαντικότερα αέρια του θερμοκηπίου, το μεθάνιο (CH<sub>4</sub>). Επομένως, οι προαναφερθέντες στόχοι/πυλώνες παραγωγικότητας και υγείας των ζώων, κρίνεται αναγκαίο να επιτυγχάνονται πάντα σεβόμενοι το περιβαλλοντικό (ανθρακικό) αποτύπωμα της εκάστοτε κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης και των παραγόμενων προϊόντων της.

## **2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΠΛΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΑ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΑ**

Τις τελευταίες δεκαετίες η επιστημονική κοινότητα έχει μελετήσει και συνεχίζει να διερευνά την επίδραση της ενσωμάτωσης ζωοτροφών πλούσιων σε βιολειτουργικά συστατικά όπως τα ω-3 PUFA, αντιοξειδωτικά κ.α. στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων και τα ποικίλα οφέλη των εν λόγω διατροφικών στρατηγικών. Ο εμπλουτισμός των ζωοκομικών προϊόντων όπως το γάλα και το κρέας με PUFA, είναι μία μικρογραφία τόσο της βιοσύνθεσης των ΛΟ των ιστών όσο και των ΛΟ που προσλαμβάνονται. Επίσης, η ικανότητα των ακόρεστων ΛΟ (ειδικότερα εκείνων με περισσότερους των δύο δεσμών) προς ταχεία οξείδωση είναι σημαντική για τη ρύθμιση της διάρκειας ζωής των παραπάνω προϊόντων.

Τα ελαιούχα σπέρματα θεωρούνται σπουδαίας οικονομικής σημασίας και έχουν συγκεντρώσει την προσοχή των ερευνητών εξαιτίας του γεγονότος ότι περιέχουν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά όπως PUFA, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, αντιοξειδωτικά κ.α. (Tanwar & Goyal, 2021). Τα εν λόγω θρεπτικά συστατικά, έχει αποδειχθεί ότι έχουν ευεργετικές επιδράσεις σε καρδιαγγειακές παθήσεις, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, στην παχυσαρκία, στον διαβήτη, στον καρκίνο, στην υπέρταση κ.α. πιθανόν λόγω των αντιοξειδωτικών αλλά και των αντιφλεγμονωδών μηχανισμών που τα χαρακτηρίζουν (Tanwar & Goyal, 2021).

Μία ακόμη αξιοσημείωτη διατροφική επέμβαση που έχει αποκτήσει ιδιαίτερη προσοχή είναι τα μικροφύκη. Τα μικροφύκη περιέχουν και αυτά συστατικά υψηλής διατροφικής αξίας. Είναι πλούσια σε PUFA, καθώς και σε πρωτεΐνες, αμινοξέα, βιταμίνες, αντιοξειδωτικές ενώσεις κ.α. Παρόλα αυτά η κύρια χρήση τους είναι για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Madeira *et al.*, 2017).

### **2.1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΗ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**

Ο πιο άμεσος και λειτουργικός τρόπος για την παραγωγή ζωοκομικών προϊόντων υψηλής διατροφικής αξίας και πλούσιων σε θρεπτικά συστατικά όπως τα επιθυμητά PUFA, είναι μέσω της τροποποίησης του σιτηρεσίου και της χορήγησης ειδικών ζωοτροφών. Η σύσταση του



γάλακτος σε ΛΟ, επιδρά ποικιλοτρόπως στην ποιότητα του γάλακτος, συμπεριλαμβανομένων των φυσικών ιδιοτήτων του όπως το σημείο τήξης, την κρυστάλλωση και την κλασμάτωσή του (Chilliard *et al.*, 2000) καθώς και στις θρεπτικές του ιδιότητες.

Το πρόβειο γάλα χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και είναι πλουσιότερο του αγελαδινού και του αίγειου σε λίπος. Παρόλα αυτά, όπως είναι ευρέως γνωστό, το πρόβειο γάλα είναι πλούσιο σε SFA (65 % του συνόλου των ΛΟ) κυρίως σε C12:0, C14:0 και C16:0, και *trans*- ΛΟ τα οποία έχουν αρνητικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (Williams, 2000). Τα SFA συνδέονται με αυξημένο ρίσκο καρδιαγγειακών παθήσεων (Siri-Tarino *et al.*, 2010; WHO, 2003), μειωμένη ευαισθησία ινσουλίνης (WHO, 2003) κ.α. Συνεπώς, η διατροφή με σκοπό την ενίσχυση των γαλακτοκομικών προϊόντων σε PUFA, τα οποία θεωρούνται επιθυμητά, κρίνεται αναγκαία. Τα PUFA ανευρίσκονται σε χαμηλό ποσοστό στο λίπος του γάλακτος. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρουν στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων (Simopoulos, 2008; Lee & Hiramatsu, 2011), υποστηρίζουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη (Summers *et al.*, 2002), ενώ μελέτες απέδειξαν τη θετική επίδραση σε φλεγμονές και αυτοάνοσα νοσήματα (Simopoulos, 2002) και στη μείωση του ρίσκου για ανάπτυξη της νόσου Alzheimer (Nguyen *et al.*, 2019). Επίσης, αποδείχθηκε ότι ρυθμίζουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών που εμπλέκονται στο ανοσοποιητικό σύστημα (Calder, 2001).

Για τον λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί έμφαση στην προσθήκη κυρίως των ελαιούχων σπερμάτων, των μικροφυκών, καθώς και στην τροποποίηση του λόγου χονδροειδών προς συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΣΖ). Συγκεκριμένα, συνιστάται έπειτα από πολλές μελέτες η χορήγηση ζωοτροφών πλούσιων σε ΛΟ, όπως τα α-λινολενικό (C18:3 n-3, ALA), συζευγμένο λινολεϊκό (CLA), δοκοσαεξανοϊκό (C22:6 n-3, DHA) και εικοσιπενταενοϊκό (C20:5 n-3, EPA), τα οποία αποδεδειγμένα μπορούν να πετύχουν τους προαναφερθέντες στόχους.

### **2.1.1. Η επίδραση των ελαιούχων σπερμάτων στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση του γάλακτος και στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος**

Η χορήγηση ελαιούχων σπερμάτων και φυτικών ελαίων στη διατροφή των μικρών μηρυκαστικών θα μπορούσε να θεωρηθεί αποτελεσματική στρατηγική για την αύξηση της ενέργειας στη διατροφή και τη βελτίωση του προφίλ των ΛΟ του γάλακτος, ειδικά όταν η περιεκτικότητα των UFA στο σιτηρέσιο είναι χαμηλό, το οποίο μπορεί να συμβεί όταν ο σανός ή το ενσίρωμα είναι η κύρια πηγή χονδροειδών ζωοτροφών. Έχει αποδειχθεί ότι τα ελαιούχα

σπέρματα είναι αποτελεσματικά στο να τροποποιούν το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος των μηρυκαστικών (Chilliard *et al.*, 2007, Shingfield *et al.*, 2008). Οι Tsiplakou και Zervas (2008) αναφέρουν χαρακτηριστικά ότι η ενσωμάτωση ελαιούχων σπερμάτων και φυτικών ελαίων είναι μία αποτελεσματική στρατηγική για την αντικατάσταση των SFA με μονοακόρεστα ΛΟ (monounsaturated fatty acids, MUFA) και σε μικρότερο βαθμό με PUFA. Γίνεται αντιληπτό ότι ένας από τους πιο άμεσους και αποτελεσματικούς τρόπους για να εμπλουτιστεί η περιεκτικότητα του γάλακτος σε επιθυμητά ΛΟ, όπως το CLA, είναι η χορήγηση ελαιούχων σπερμάτων πλούσιων σε ALA (Zhang *et al.*, 2006, Shingfield *et al.*, 2013). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η ενσωμάτωση ελαιούχων σπερμάτων μειώνει τη συνολική περιεκτικότητα των SFA στο λίπος του αγελαδινού γάλακτος (Chilliard *et al.*, 2007, Elgersma *et al.*, 2015). Παραδείγματα πειραματισμών χορήγησης ελαιούχων σπερμάτων με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασής τους στο προφίλ των ΛΟ καταγράφονται περιληπτικά στον Πίνακα 2.1. Σπουδαίο ρόλο στην σε βάθος αξιολόγηση της επίδρασης της ενσωμάτωσης ελαιούχων σπερμάτων στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών διαδραματίζουν και τα διαφορετικά ποσοστά ενσωμάτωσής τους. Λόγου χάριν τα ελαιούχα σπέρματα είναι υπεύθυνα για δοσοεξαρτώμενες μειώσεις στις περιεκτικότητες κορεσμένων ΛΟ των C10:0 έως C16:0.

Πέραν των προαναφερθέντων, κάτι που χρήζει ιδιαίτερης προσοχής είναι το γεγονός ότι η χορήγηση ελαιούχων σπερμάτων κυρίως σε υψηλά επίπεδα συμμετοχής, δύναται να προκαλέσει μείωση της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος (Milk Fat Depression, MFD). Είναι γεγονός ότι η χορήγηση ελαιούχων σπερμάτων σε σιτηρέσια αγελάδων γαλακτοπαραγωγής προκάλεσε τάση μείωσης στη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος. Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζει το γεγονός ότι αρκετοί πειραματισμοί έδειξαν ότι αυτή η τάση δεν παρατηρείται όταν ελαιούχα σπέρματα ενσωματώνονται στα σιτηρέσια των αιγών και των προβατινών. Ένας ακόμα παράγοντας που ίσως προκαλεί MFD είναι και το γεγονός ότι το CLA δρα ως αναστολέας της σύνθεσης λίπους (Shingfield & Griinari, 2007). Επίσης, αυξημένα επίπεδα των *trans*- ΛΟ στο γάλα μπορεί να αποτελέσουν ένδειξη του εν λόγω συνδρόμου.

Πιο συγκεκριμένα, ο ηλίανθος (*Helianthus annuus*), ο λιναρόσπορος (*Linum usitatissimum*), η ατρακτυλίδα (*Carthamus tinctorius*), η σόγια (*Glycine max*) και τα σπέρματα και το έλαιο ελαιοκράμβης (*Brassica napus*), είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα συμπληρώματα λιπιδίων με σκοπό την αύξηση του γάλακτος σε UFA και ειδικότερα σε βασσενικό (*trans*-11 C18:1, VA) και CLA στα μικρά μηρυκαστικά (Sampelayo *et al.*, 2007; Nudda *et al.*, 2014). Ανάμεσα σε

αυτές τις πηγές UFA, ο λιναρόσπορος, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως πλούσια πηγή ALA, είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη (Nudda *et al.*, 2020).

Σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες, η χορήγηση λιναρόσπορου προκάλεσε αύξηση της γαλακτοπαραγωγής σε σύγκριση με προβατίνες στις οποίες δεν χορηγήθηκε και σε σύγκριση με προβατίνες στις οποίες χορηγήθηκαν σπέρματα ηλίανθου (Zhang *et al.*, 2006). Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος μειώθηκε σημαντικά στη διατροφική επέμβαση που ενσωματώθηκαν σπέρματα ηλίανθου σε σύγκριση με την ομάδα που δεν χορηγήθηκαν. Αντίθετα, η πρωτεΐνη του γάλακτος αυξήθηκε για την ομάδα στην οποία χορηγήθηκαν σπέρματα ηλίανθου σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα. Στην ίδια ομάδα η περιεκτικότητα του γάλακτος σε ολικά στερεά μειώθηκε σημαντικά. Επίσης, η προσθήκη και σπερμάτων λιναριού και ηλίανθου, μείωσε τις συγκεντρώσεις των SFA και συγκεκριμένα των C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C15:0, και C16:0. Αντίθετα, αύξησε τη συγκέντρωση των VA, CLA, ALA και γενικότερα των PUFA (Zhang *et al.*, 2006). Όμοια, η χορήγηση λιναρόσπορου στα σιτηρέσια των αιγών βελτίωσε το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος, μέσω αύξησης των VA, CLA και ALA (Nudda *et al.*, 2006).

Οι Mierlita *et al.* (2011) δεν διαπίστωσαν σημαντική διαφορά στη γαλακτοπαραγωγή των προβατινών όταν στα σιτηρέσιά τους ενσωματώθηκαν σπέρματα καμελίνας (80 g/ημέρα), ενώ από τους ίδιους διαπιστώθηκε αυξημένη γαλακτοπαραγωγή όταν οι προβατίνες διατρέφονταν σε βοσκοτόπους σε συνδυασμό με μείγμα ΣΖ που περιελάμβανε σπέρματα καμελίνας (100 g/kg) (Mierlita *et al.*, 2015). Και στους δύο αυτούς πειραματισμούς η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος βρέθηκε αυξημένη (Mierlita *et al.*, 2011, Mierlita *et al.*, 2015). Επίσης οι Szumacher-Strabel *et al.* (2011), ανέφεραν σημαντικά χαμηλότερη λιποπεριεκτικότητα μετά από χορήγηση πλακούντα καμελίνας στα σιτηρέσια προβατινών. Όσον αφορά το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος των προβατινών, τα SFA μειώθηκαν σημαντικά, ενώ τα *trans-11* C18:1, ALA και CLA αυξήθηκαν (Mierlita *et al.*, 2011, Mierlita *et al.*, 2015).

Οι Mitsiouroulou *et al.* (2020) μελέτησαν την επίδραση της χορήγησης του σησαμάλευρου, της βιταμίνης Ε και του σεληνίου. Στη μελέτη αυτή, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στη γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος. Ωστόσο, στο προφίλ των ΛΟ του γάλακτος, παρατηρήθηκε μείωση των C14:0 και C16:0 και αύξηση των C18:0 και C20:0. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση στο CLA η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συνοπτικά, η προσθήκη μόνο σησαμάλευρου, δίχως την προσθήκη βιταμίνης Ε και σεληνίου, μείωσε

σημαντικά τα συνολικά SFA, τα συνολικά MCFA και τον δείκτη AI, ενώ αύξησε τα LCFA, τα MUFA και τα UFA με την τελευταία αύξηση να είναι στατιστικά σημαντική μόνο στην ομάδα που χορηγήθηκε άλευρο σησάμου με βιταμίνη E.

Η μερική αντικατάσταση του σογιάλεου και του αραβοσίτου με σπέρματα σησάμου (*Sesamum indicum*) στα σιτηρέσια αιγών σε ποσοστό 10 % αύξησε σημαντικά τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος και τα ολικά στερεά σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα (Mitsioroulou *et al.*, 2021a). Επίσης, η ενσωμάτωση σπερμάτων σησάμου σε ποσοστά 5 και 10 % του ολικού σιτηρεσίου βελτίωσε το προφίλ των ΛΟ προς την επιθυμητή για τον καταναλωτή κατεύθυνση. Πιο συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση σε ποσοστό 10 % αύξησε τη συνολική συγκέντρωση των μακράς αλύσου (long chain) ακόρεστων ΛΟ (LCFA), των MUFA και UFA, ενώ η συγκέντρωση των μεσαίας αλύσου (medium chain fatty acids, MCFA) και των SFA μειώθηκε στατιστικά σημαντικά. Τέλος, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη συγκέντρωση της αναλογίας κορεσμένων/ακόρεστα (SFA/UFA) και στον αθηρωματικό δείκτη (AI) στις αίγες που χορηγήθηκαν σπέρματα σησάμου σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα.

Η ενσωμάτωση πλακούντα ελαιοκράμβης και ηλιοπλακούντα στα σιτηρέσια προβατινών (Amores *et al.*, 2014), πλακούντα λιναρόσπορου στα σιτηρέσια αιγών (Józwick *et al.*, 2010) και ηλιοπλακούντα ψυχρής έκθλιψης στα σιτηρέσια αγελάδων (Goiri *et al.*, 2019), αύξησε το ποσοστό των PUFA και συγκεκριμένα του CLA. Ωστόσο, η γαλακτοπαραγωγή αυξήθηκε μόνο στον πειραματισμό που χορηγήθηκε πλακούντας λιναρόσπορου (Józwick *et al.*, 2010), ενώ η προσθήκη ηλιοπλακούντα ψυχρής έκθλιψης μείωσε τη διορθωμένη ως προς το λίπος γαλακτοπαραγωγή (Goiri *et al.*, 2019). Όσον αφορά τη λιποπεριεκτικότητα, η ενσωμάτωση υποπροϊόντων του ηλιάνθου, προκάλεσε σημαντική μείωση (Amores *et al.*, 2014, Goiri *et al.*, 2019).

Όσον αφορά μελέτες που με αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, η ενσωμάτωση ωμών αλεσμένων σπερμάτων σόγιας στα σιτηρέσιά τους (18 % του ολικού σιτηρεσίου), θερμικώς κατεργασμένων αλεσμένων σπερμάτων σόγιας, σογιελαίου (3,6 %) και λινελαίου (2,2 και 4.4 %), προκάλεσε αύξηση στη συγκέντρωση του CLA στο προφίλ των ΛΟ του γάλακτος κυρίως στις επεμβάσεις που το λινελαϊκό και το λινολενικό ήταν αυξημένα (Dhiman *et al.*, 2000).

Σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, η ενσωμάτωση εξωθιμένου λιναρόσπορου ή ελαίου λιναρόσπορου, προκάλεσε αύξηση στη γαλακτοπαραγωγή ενώ τροποποίησε και το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος (Kliem *et al.*, 2019).

Επίσης, μελετήθηκε και η χορήγηση θερμικά κατεργασμένων σπερμάτων ηλίανθου σε επίπεδα 7,5 και 15 % (Mansoori *et al.*, 2011). Στο μικρότερο ποσοστό ενσωμάτωσης παρατηρήθηκε τάση μείωσης στη γαλακτοπαραγωγή των αγελάδων, ενώ και οι δύο δόσεις δεν προκάλεσαν κάποια διαφορά στη χημική σύσταση του γάλακτος. Πρόσθετα, και τα δύο ποσοστά ενσωμάτωσης αύξησαν σημαντικά τη συνολική συγκέντρωση των UFA στο γάλα.

Οι Chen *et al.* (2008), μελέτησαν την επίδραση της χορήγησης τριών διαφορετικών τύπων/επεξεργασμένων ελαιούχων σπερμάτων και πιο συγκεκριμένα θερμικά κατεργασμένη σόγια, αλεσμένα σπέρματα ελαιοκράμβης και βαμβακόσπορο (*Gossypium* spp.) στα σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγών αγελάδων. Η γαλακτοπαραγωγή παρέμεινε ανεπηρέαστη, ωστόσο στο προφίλ των ΛΟ του γάλακτος παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των κορεσμένων C14:0 και C16:0. Επίσης, η περιεκτικότητα σε C18:0 και C18:1 αυξήθηκε, ενώ η προσθήκη θερμικά κατεργασμένης σόγιας προκάλεσε αύξηση στο C18:2 και στο CLA.

Στην ίδια λογική, οι Chichlowski *et al.* (2005) προσδιόρισαν την επίδραση της ενσωμάτωσης ελαιοκράμβης στα σιτηρέσια αγελάδων γαλακτοπαραγωγής (14 % ΞΟ) στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση και στο προφίλ των ΛΟ του γάλακτος. Η γαλακτοπαραγωγή και η διορθωμένη ως προς το λίπος γαλακτοπαραγωγή δεν επηρεάστηκαν σημαντικά, ωστόσο η λιποπεριεκτικότητα και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη μειώθηκαν. Όσον αφορά το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος, αυξήθηκαν σημαντικά τα LCFA, μειώθηκαν σημαντικά τα μικράς αλυσού (short chain fatty acids, SCFA) και MCFA. Πιο συγκεκριμένα, αυξήθηκε σημαντικά η συγκέντρωση του VA και του CLA.

Η ενσωμάτωση σπερμάτων (630 g/ημέρα) ή αλεύρου καμελίνας (2 kg/ημέρα) στα σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγών αγελάδων, δεν επηρέασε τη γαλακτοπαραγωγή (Hurtaud & Peyraud, 2007), ενώ η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος μειώθηκε. Οι Bayat *et al.* (2015) ανέφεραν ότι η χορήγηση ελαίου καμελίνας στα σιτηρέσια των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, μείωσε τη γαλακτοπαραγωγή, τη λιποπεριεκτικότητα, την πρωτεΐνοπεριεκτικότητα και τη λακτόζη του γάλακτος. Και στους δύο πειραματισμούς η συγκέντρωση των SFA του γάλακτος μειώθηκε

σημαντικά, ενώ οι συγκεντρώσεις των MUFA, *trans* C18:1, ALA και CLA αυξήθηκαν σημαντικά.

Γίνεται αντιληπτό ότι οι μελέτες διερεύνησαν την επίδραση πολλών από αυτά τα ελαιούχα σπέρματα και των υποπροϊόντων τους, όπως τα σπέρματα καμελίνας μόνο σε ένα επίπεδο ενσωμάτωσης έναντι ομάδας μάρτυρα, δίχως να διερευνηθεί σε βάθος ο βαθμός επίδρασης του διαφορετικού επιπέδου ενσωμάτωσης στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση του γάλακτος και στο προφίλ των ΛΟ αυτού.

Στον Πίνακα 2.1. παρουσιάζονται συνοπτικά αποτελέσματα από μελέτες που διερεύνησαν την επίδραση των ελαιούχων σπερμάτων και των υποπροϊόντων τους στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση του γάλακτος και στο προφίλ των ΛΟ αυτού.

**Πίνακας 2.1.** Συνοπτική περιγραφή ενδεικτικών πειραματισμών επίδρασης των ελαιούχων σπερμάτων και των υποπροϊόντων τους στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση και στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος

<b>Επέμβαση</b>	<b>Ζώα</b>	<b>Στόχος</b>	<b>Αποτέλεσμα</b>	<b>Μελέτη</b>
Σησαμάλευρο + Βιταμίνη E +Se	Αίγες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	NS Γαλ/γή ↓SFA, ↓AI, ↑PUFA	Mitsiopolou <i>et al.</i> , 2020
Σπέρματα σησάμου	Αίγες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↓AI, ↓SFA/UFA, ↑UFA, ↑LCUFA	Mitsiopolou <i>et al.</i> , 2021a
Λιναρόσπορος	Αίγες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↑VA, ↑CLA, ↑ALA	Nudda <i>et al.</i> , 2006
Λιναρόσπορος	Προβατίνες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↑Γαλ/γή, ↓SFA, ↑VA, ↑CLA, ↑ALA, ↑PUFA	Zhang <i>et al.</i> , 2006
Σπέρματα ηλίανθου	Προβατίνες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↓Λιπο/τας, ↑πρωτεΐνη γάλακτο, ↓ολικά στερεά, ↓SFA, ↑VA, ↑CLA, ↑ALA, ↑PUFA	Zhang <i>et al.</i> , 2006
Σπέρματα ηλίανθου	Αγελάδες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↑UFA	Mansoori <i>et al.</i> , 2011
Σπέρματα ελαιοκράμβης, Βαμβακόσπορος	Αγελάδες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↓SFA, ↑C18:0, ↑C18:1	Chen <i>et al.</i> , 2008
Θερμικά κατεργασμένη σόγια	Αγελάδες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↓SFA, ↑C18:0, ↑C18:1, ↑C18:2, ↑CLA	Chen <i>et al.</i> , 2008
Ελαιοκράμβη	Αγελάδες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↓Λιπο/τα, ↓πρωτεΐνη γάλακτος ↓SCFA, ↓MCFA, ↑LCFA	Chichlowski <i>et al.</i> , 2005

Ωμά αλεσμένα σπέρματα σόγιας Θερμικώς κατεργασμένα αλεσμένα σπέρματα σόγιας Σογιέλαιο Λινέλαιο	Αγελάδες	ΛΟ (CLA)	↑CLA	Dhiman <i>et al.</i> , 2000
Σπέρματα καμελίνας	Προβατίνες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↑Γαλ/γή, ↑λιπ/τα γάλακτος ↓SFA, ↑VA, ↑CLA, ↑ALA	Mierlita <i>et al.</i> , 2011
Σπέρματα καμελίνας και βοσκοτόπια	Προβατίνες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↑Γαλ/γή ↓SFA, ↑VA, ↑CLA, ↑ALA	Mierlita <i>et al.</i> , 2015
Σπέρματα καμελίνας ή άλευρο καμελίνας	Αγελάδες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	NS Γαλ/γή, ↓λιπ/τα γάλακτος ↑MUFA, ↑ <i>trans</i> C18:1, ↑ALA, ↑CLA	Hurtaud & Peyraud, 2007
Έλαιο καμελίνας	Αγελάδες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↑MUFA, ↑ <i>trans</i> C18:1, ↑ALA, ↑CLA	Bayat <i>et al.</i> , 2015



### 2.1.2. Η επίδραση των μικροφυκών στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση του γάλακτος και στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος

Τα μικροφύκη είναι πλούσια σε ω-3 PUFA και κυρίως σε EPA και DHA. Το γεγονός ότι η διατροφή του ανθρώπου χαρακτηρίζεται από έλλειψη σε τρόφιμα προερχόμενα από τη θάλασσα, η δημιουργία προϊόντων τα οποία παράγονται μαζικά για ανθρώπινη κατανάλωση, και τα οποία είναι εμπλουτισμένα με ω-3 PUFA από συμπληρώματα θαλάσσιας προέλευσης, δύναται να αυξήσει την κατανάλωση αυτών των λιπαρών οξέων, όπως ανέφεραν οι Nguyen *et al.* (2019). Σημαντικό επίσης είναι το γεγονός ότι τα διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης μικροφυκών στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών επηρεάζουν σε διαφορετικό βαθμό το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος. Παραδείγματα και αποτελέσματα πειραματισμών που διερεύνησαν την επίδραση των μικροφυκών στο προφίλ των ΛΟ του γάλακτος δίνονται περιληπτικά στον Πίνακα 2.2.

Η προσθήκη 10 g/kg ΣΖ *Chlorella vulgaris* ή *Chlorella pyrenoidosa* σε σιτηρέσια αιγών δεν επηρέασε τη χημική σύσταση του γάλακτος, ενώ στο προφίλ των ΛΟ του γάλακτος, η προσθήκη της *Chlorella vulgaris*, μείωσε την περιεκτικότητα στο σύνολο των *trans* C18:1 και CLA (Tsiplakou *et al.*, 2017a; Tsiplakou *et al.*, 2017b).

Αντίθετα, η προσθήκη 5 και 10 g *Chlorella vulgaris*/αίγα/ημέρα στα σιτηρέσια αιγών, προκάλεσε σημαντική μείωση στη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος, αλλά και σημαντική αύξηση ημερήσιας παραγωγής λίπους και πρωτεΐνης λόγω αύξησης της γαλακτοπαραγωγής (Kholif *et al.*, 2017). Όσον αφορά το προφίλ των ΛΟ, αυξήθηκε σημαντικά το ελαϊκό, το CLA και γενικότερα το προφίλ των UFA και PUFA, ενώ παράλληλα μειώθηκε το στεατικό οξύ και τα SFA. Επίσης, η χορήγηση *Chlorella kessleri* (10 g/kg ΞΟ), επηρέασε θετικά την περιεκτικότητα του λίπους σε στεατικό και VA στο γάλα αιγών (Poti *et al.*, 2015).

Η προσθήκη φυκών (8, 16 και 24 g/kg ΞΟ) σε σιτηρέσιο προβατινών, μαζί με την προσθήκη 25 g/kg ΞΟ έλαιο ηλίανθου, δύναται να προκάλεσε MFD το οποίο συσχετίστηκε με τις τροποποιήσεις στο προφίλ των ΛΟ (Toral *et al.*, 2010). Σε αυτή τη μελέτη, σημαντικά ΛΟ όπως τα VA, CLA και DHA αυξήθηκαν σημαντικά, όπως και το *trans-10* C18:1, για τη συσχέτιση του οποίου με την ανθρώπινη υγεία γνωρίζουμε ελάχιστα αλλά έχει συνδεθεί με την πρόκληση MFD (Shingfield & Griinari, 2007). Είναι γεγονός ότι η προσθήκη θαλάσσιων φυκών στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών μείωσε τη λιποπεριεκτικότητα, τόσο σε προβατίνες (Toral *et al.*, 2018) όσο και σε αίγες (Bernard *et al.*, 2017). Η μείωση της λιποπεριεκτικότητας οφείλεται στη μείωση του

πληθυσμού των κυτταρινολυτικών μικροοργανισμών με αποτέλεσμα τη μείωση του οξικού οξέος. Έχει αποδειχθεί ότι η προσθήκη ελαίου ηλιάνθου με θαλάσσια φύκη δύναται να επιδράσει θετικά στη μεταβολή του προφίλ του γάλακτος σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες, καθώς αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση ορισμένων SFA μειώθηκε σημαντικά, ενώ η συγκέντρωση επιθυμητών ΛΟ, όπως το VA, αλλά και σημαντικών PUFA, όπως τα CLA και DHA, αυξήθηκε σημαντικά (Bichi *et al.*, 2013).

Σε αίγες, η ενσωμάτωση του μικροφύκου *Schizochytrium* sp. (20, 40 και 60 g/αίγα/ημέρα) στα σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγών αιγών και με αναλογία 50/50 χονδροειδών προς συμπυκνωμένες ζωοτροφές (XZ/ΣΖ = 50/50), δεν επηρέασε τη γαλακτοπαραγωγή, αλλά μείωσε τη λιποπεριεκτικότητα στις ομάδες που χορηγήθηκε σε ποσότητα 20 και 40 g/αίγα/ημέρα. Όπως ήταν αναμενόμενο, το προφίλ των ΛΟ στο γάλα βελτιώθηκε προς την επιθυμητή για τον καταναλωτή κατεύθυνση, καθώς τα VA, CLA, DHA και εικοσιπενταενοϊκό (DPA) αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά (Mavrommatis *et al.*, 2020a).

Επιπλέον, οι Mavrommatis *et al.* (2021a) διερεύνησαν την επίδραση της ενσωμάτωσης *Schizochytrium* spp. και του λόγου XZ/ΣΖ (60/40 έναντι 40/60) στην γαλακτοπαραγωγή, τη χημική σύσταση και το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος. Ούτε το επίπεδο ενσωμάτωσης *Schizochytrium* spp. ούτε τα διαφορετικά επίπεδα XZ/ΣΖ επηρέασαν τη γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος. Το υψηλό επίπεδο ενσωμάτωσης *Schizochytrium* spp. (40 g) σε συνδυασμό με τον λόγο XZ/ΣΖ = 40/60 τροποποίησε την περιεκτικότητα των CLA, DHA, DPA και τον λόγο ω-3/ω-6 προς την επιθυμητή για την ανθρώπινη υγεία κατεύθυνση.

Η προσθήκη 15 g/αίγα/ημέρα *Schizocjytrium limanicum*, αύξησε την περιεκτικότητα σε DHA και βελτίωσε τον λόγο ω-6/ω-3 στο γάλα αιγών που ήταν σταβλισμένες αλλά και σε αίγες που βρισκόνταν στη βοσκή σε σύγκριση με αίγες στις οποίες δεν χορηγήθηκε (Pajor *et al.*, 2019).

Η ενσωμάτωση *Spirulina* στα σιτηρέσια των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής παρουσίασε διαφορετικά αποτελέσματα σε διαφορετικές μελέτες. Η ενσωμάτωση 40 g/ημέρα σπιρουλίνας στο μείγμα ΣΖ δεν επηρέασε τη γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος αγελάδων (Christaki *et al.*, 2012). Όμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν όταν η σόγια αντικαταστάθηκε μερικώς (5 %) από σπιρουλίνα σε σιτηρέσιο αγελάδων (Manzocchi *et al.*, 2020). Αντίθετα, διαπιστώθηκε αύξηση στην γαλακτοπαραγωγή και στην περιεκτικότητα σε λίπος, όταν αγελάδες κατανάλωναν 200 g σπιρουλίνας ημερησίως (Kulpys *et al.*, 2009). Η

ενσωμάτωση 2 g σπιρουλίνας σε σιτηρέσιο στηριζόμενο στη βοσκή, αύξησε τη γαλακτοπαραγωγή και την περιεκτικότητα σε λίπος, πρωτεΐνες και λακτόζη (Simkus *et al.*, 2007). Επιπλέον, η ενσωμάτωση 7,4 g αποξηραμένης σπιρουλίνας/kg ΞΟ μείωσε τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος αγελάδων (Póti *et al.*, 2015). Όσον αφορά το προφίλ των ΛΟ στο γάλα, οι Christaki *et al.* (2012) ανέφεραν αύξηση των PUFA, ενώ οι Manzocchi *et al.* (2020) ανέφεραν μικρή αύξηση στο C18:3 n-6 και οι Poti *et al.* (2015) αύξηση των MUFA.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η επίδραση της ενσωμάτωση μικροφυκών όπως η σπιρουλίνα στα σιτηρέσια των προβατινών επί της γαλακτοπαραγωγής, της χημικής σύστασης του γάλακτος και του προφίλ των ΛΟ αυτού, δεν έχει μελετηθεί σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες.

Στον Πίνακα 2.2. παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα από μελέτες στις οποίες ενσωματώθηκαν μικροφύκη στα σιτηρέσια μηρυκαστικών.

**Πίνακας 2.2.** Συνοπτική περιγραφή ενδεικτικών πειραματισμών επίδρασης των μικροφυκών στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση και στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος

Επέμβαση	Ζώα	Στόχος	Αποτέλεσμα	Μελέτη
<i>Chlorella vulgaris</i>	Αίγες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↓ <i>trans</i> C18:1, ↓CLA	Tsiplakou <i>et al.</i> , 2017a
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Αίγες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	NS	Tsiplakou <i>et al.</i> , 2017b
<i>Chlorella vulgaris</i>	Αίγες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↓Λιπ/τα ↑Ημερήσια παραγωγή λίπους και πρωτεΐνης ↑Ελαϊκό, ↑CLA, ↑UFA, ↑PUFA	Kholif <i>et al.</i> , 2017
<i>Spirulina</i>	Αγελάδες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	NS Γαλ/γή ↑PUFA	Christaki <i>et al.</i> , 2012
<i>Spirulina</i>	Αγελάδες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↑Γαλ/γής, ↑λιπ/τα, ↑πρωτεΐνη, ↑λακτόζη ↑C18:3 n-6	Manzocchi <i>et al.</i> , 2020
<i>Spirulina</i>	Αγελάδες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↓Λιπ/τας ↑MUFA	Póti <i>et al.</i> , 2015
<i>Schizochytrium</i> sp. (50/50 XZ/ΣZ)	Αίγες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↓Λιπ/τας ↑VA, ↑CLA, ↑DHA, ↑DPA	Mavrommatis <i>et al.</i> , 2020a
<i>Schizochytrium</i> spp. (40/60 XZ/ΣZ)	Αίγες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↑CLA, ↑DHA, ↑DPA Βελτίωσε την αναλογία ω-3/ω-6	Mavrommatis <i>et al.</i> , 2021a
<i>Schizocjytrium limanicum</i>	Αίγες	Γαλ/γή, Χημική	Βελτίωσε την αναλογία ω-6/ω-3	Pajor <i>et al.</i> , 2019

		σύσταση, ΛΟ		
<i>Chlorella kessleri</i>	Αίγες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↑στεαρικό, ↑VA	Poti <i>et al.</i> , 2015
Θαλάσσια φύκη + έλαιο ηλίανθου	Προβατίνες	Γαλ/γή, Χημική σύσταση, ΛΟ	↓Λιπ/τας, ↑VA, ↑CLA, ↑DHA	Toral <i>et al.</i> , 2010
Θαλάσσια φύκη + έλαιο ηλίανθου	Προβατίνες	ΛΟ	↑VA, ↑CLA, ↑DHA	Bichi <i>et al.</i> , 2013

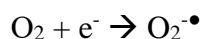
## 2.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΠΛΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Η εντατικοποίηση των εκτροφών και η εκτροφή ζωικού κεφαλαίου υψηλής γενετικής αξίας με σκοπό τη μεγιστοποίηση της παραγωγής δύναται να οδηγήσει σε στρεσογόνες συνθήκες και κατ' επέκταση σε οξειδωτικό στρες και σε ανασοκαταστολή (Celi, 2011, Wullepit *et al.*, 2009). Ωστόσο, η ενσωμάτωση ζωοτροφών πλουσίων σε φυσικά αντιοξειδωτικά δύνανται να ενισχύσουν την οξειδωτική κατάσταση των παραγωγικών ζώων αλλά και των παραγόμενων προϊόντων.

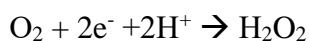
### 2.2.1. Ελεύθερες ρίζες, οξειδωτικό στρες και αντιοξειδωτικά

Ως ελεύθερη ρίζα μπορεί να χαρακτηριστεί οποιοδήποτε άτομο ή μόριο ικανό να υπάρξει ανεξάρτητο και το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα σε ατομική τροχιά. Η πλειοψηφία των πιο επιβλαβών επιδράσεων του οξυγόνου έγκειται στον σχηματισμό και στη δράση συγκεκριμένων χημικών ενώσεων, γνωστών ως «ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου» ή αλλιώς ROS (reactive oxygen species) (Lobo *et al.*, 2010). Οι σημαντικότερες ROS είναι οι ρίζες υδροξυλίου (OH), ανιόντων υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ), το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το απλό οξυγόνο ( $O_2$ ), το υποχλωριώδες ανιόν ( $OCL^-$ ), μονοξείδιο του αζώτου ( $NO^*$ ) και ο περοξυνιτρίτης ( $ONOO^-$ ). Η δραστικότερη ελεύθερη ρίζα οξυγόνου είναι το ανιόν του υπεροξειδίου. Πιο συγκεκριμένα:

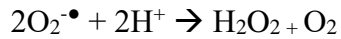
Μείωση οξυγόνου μέσω της μεταφοράς σε αυτό ενός ηλεκτρονίου, παράγει το ανιόν ελεύθερων ριζών υπεροξειδίου:



Μείωση δύο-ηλεκτρονίων του οξυγόνου αποδίδει το υπεροξείδιο του υδρογόνου:



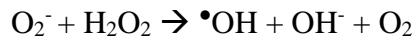
Επίσης, το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται συχνά σε βιολογικά συστήματα μέσω της παραγωγής υπεροξειδίου: δύο μόρια υπεροξειδίου μπορούν να αντιδράσουν μαζί για να σχηματίσουν υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο.



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι μια σημαντική ένωση στη βιοχημεία των ελευθέρων ριζών επειδή μπορεί εύκολα να διασπαστεί, ιδιαίτερα παρουσία μεταλλικών ιόντων μετάβασης, για να παράγει την πιο αντιδραστική και καταστροφική από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, τη ρίζα υδροξυλίου (OH).



Η παραπάνω αντίδραση, αναφέρεται συχνά ως αντίδραση Fenton. Η μη καταλυμένη αντίδραση Haber-Weiss είναι η αντίδραση του υπεροξειδίου απευθείας με υπεροξειδίο του υδρογόνου:



Οι εν λόγω ρίζες επιτίθενται σε σημαντικά μακρομόρια με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται κυτταρική βλάβη και ομοιοστατική διαταραχή. Στόχος των ελεύθερων ριζών είναι όλα τα είδη μορίων στο σώμα με τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα και τις πρωτεΐνες να αποτελούν προτεραιότητα. Αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού είναι το οξειδωτικό στρες. Επίσης, πλεονάζον οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει στην οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, η οποία σχετίζεται με αλλαγές στη δομή και τις λειτουργίες τους (Lobo *et al.*, 2010).

Ως αντιοξειδωτικά αναφέρονται μόρια αρκετά σταθερά στο να δωρίσουν ένα ηλεκτρόνιο σε μία ελεύθερη ρίζα εξουδετερώνοντάς την και κατά συνέπεια μειώνοντας τη δραστηριότητά της. Τόσο τα ενζυμικά όσο και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά υπάρχουν στο ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό περιβάλλον για την εξουδετέρωση των ROS. Για τα αντιοξειδωτικά έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί δράσης. Ο πρώτος αφορά την ικανότητα του κύριου αντιοξειδωτικού να δωρίζει ένα ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες. Ο δεύτερος περιλαμβάνει την απομάκρυνση των ROS με τα δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά. Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να επηρεάσουν τα βιολογικά συστήματα με διαφορετικούς μηχανισμούς, δρώντας ως καταλύτες των ελευθέρων ριζών, δότες υδρογόνου, δότες ηλεκτρονίων, αποσυνθέτες υπεροξειδίου, αναστολείς ενζύμων, προκαλώντας χηλίωση ιόντων μετάλλων, ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση κ.α. (Lobo *et al.*, 2010). Ορισμένα αντιοξειδωτικά μειώνουν εκ των προτέρων τα υδροϋπεροξειδία και το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε αλκοόλες και νερό, αντίστοιχα, δίχως τη δημιουργία ελευθέρων ριζών και ορισμένων πρωτεϊνών που δεσμεύουν ιόντα μετάλλων (Σχήμα 2.1.). Η υπεροξειδάση

της γλουταθειόνης (GSH-Px), η μεταφοράση της γλουταθειόνης-s (GST), το φωσφολιπιδικό υδροϋπεροξειδίο της γλουταθειόνης της υπεροξειδάσης και η υπεροξειδάση είναι γνωστό ότι αποσυνθέτουν λιπιδικά υδροϋπεροξειδία σε αντίστοιχες αλκοόλες. Το φωσφολιπιδικό υδροϋπεροξειδίο της γλουταθειόνης της υπεροξειδάσης μπορεί να μειώσει τα υδροϋπεροξειδία των φωσφολιπιδίων που είναι ενσωματωμένα σε βιομεμβράνες. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση μειώνουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου στο νερό (Lobo *et al.*, 2010).

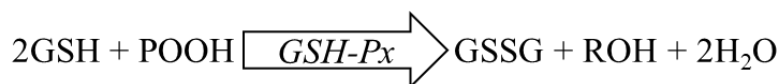
➤ Η πρώτη γραμμή αντιμετώπισης του οργανισμού έναντι στο οξειδωτικό στρες δρα μέσω της εξουδετέρωσης της δραστηκής ρίζας του υπεροξειδικού ανιόντος  $O_2^{\bullet}$  είναι η δράση του ενζύμου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD):



➤ Για την εξουδετέρωση του  $H_2O_2$  υπεύθυνη είναι η καταλάση (CAT):



➤ Επίσης σημαντικό είναι να γίνει αναφορά και στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px) η οποία δρα σε συνδυασμό με το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης (GSH). Απαραίτητο υπόστρωμα για να δράσει η GSH-Px είναι ορισμένα ROOH ή το  $H_2O_2$ :



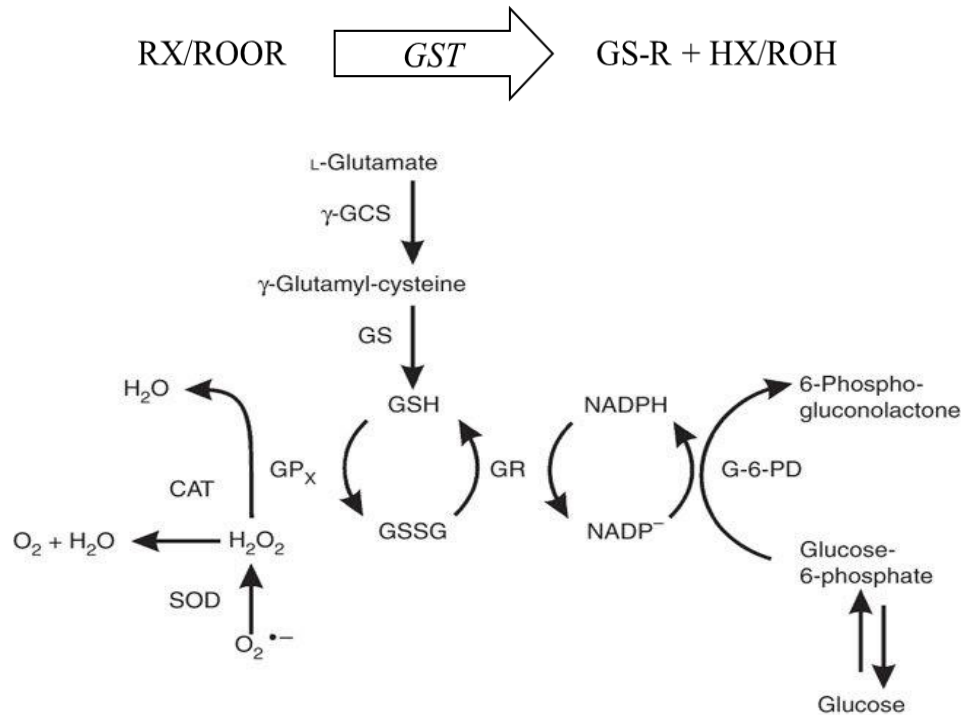
(Yu, 1994).

Ένα ακόμα αντιοξειδωτικό ένζυμο είναι η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR), υπεύθυνη για την ανακύκλωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε ανηγμένη μορφή με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή της (Tsiplakou *et al.*, 2017b).



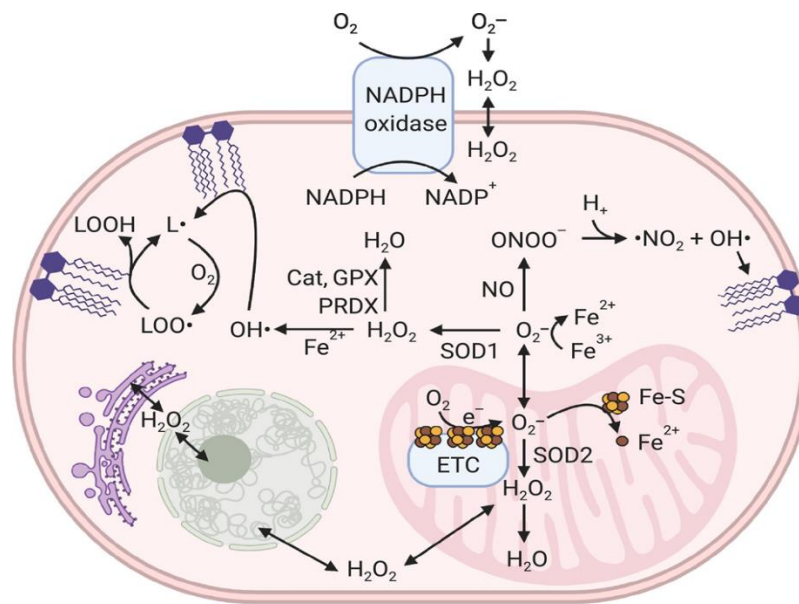


Επίσης, οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs), είναι μια οικογένεια ενζύμων που καταλύουν τη σύζευξη της γλουταθειόνης (GSH) σε μια ευρεία ποικιλία ενδογενών και εξωγενών ηλεκτρόφιλων ενώσεων. Τα GSTs χωρίζονται σε δύο ξεχωριστά μέλη της υπέρ-οικογένειας: τα μικροσωματικά και κυτταροπλασματικά. Είναι υπεύθυνα για την απενεργοποίηση και τη μεταφορά των ηλεκτρόφιλων ενώσεων εκτός κυττάρου, και αποκτούν ιδιαίτερη σημαντικότητα για τη μελέτη των λιπιδικών υπεροξειδασών που σχηματίζονται από τη δράση των παραχθέντων ριζών υδροξυλίου στα PUFA (Labrou *et al.*, 2015).



**Σχήμα 2.1.** Σχηματική απεικόνιση αντιοξειδοτικών ενζύμων (Πηγή: Weydert & Cullen, 2010)

Στο Σχήμα 2.2. γίνεται μία σύνοψη των διαφορετικών μορφών ROS, των πηγών προέλευσής τους και των κύριων στόχων τους.



**Σχήμα 2.2.** Διαφορετικές δραστικές μορφές οξυγόνου, σχηματισμός και κύριοι στόχοι τους (Πηγή: Harris & DeNicola, 2020)

### 2.2.2. Η λιπιδική υπεροξειδωση

Αν και η αυξημένη διατροφική πρόσληψη των ω-3 PUFA θεωρείται αποτελεσματική διατροφική στρατηγική τόσο για τη διασφάλιση της παραγωγής όσο και της υγείας των ζώων, μια θεωρητική ανησυχία που σχετίζεται με την πιθανή αύξηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων που προκαλείται από μια πλούσια σε PUFA διατροφή εξακολουθεί να αποτελεί πρόβλημα. Είναι γεγονός ότι όλες οι κατηγορίες βιομορίων είναι ευαίσθητες σε επιθέσεις από τις ελεύθερες ρίζες. Ωστόσο τα λιπίδια είναι τα πιο επιρρεπή (Lobo et al., 2010). Η υπεροξειδωση των λιπιδίων προκαλείται στα PUFA που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες και επεκτείνεται με αλυσιδωτή αντίδραση των ριζών. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων καταστρέφει τα φωσφολιπίδια άμεσα και μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως σήμα κυτταρικής βλάβης. Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια μπορούν επίσης να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο σε πολλές φλεγμονώδεις ασθένειες και συχνά να μεσολαβούν σε προφλεγμονώδεις μεταβολές. Η ταχεία υπεροξειδωση που υφίστανται τα PUFA, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τις λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης και απενεργοποιεί τις πρωτεΐνες και τα ένζυμα οδηγώντας τελικά σε διαταραχές και ασθένειες (Csala et al., 2015). Αντιοξειδωτικές ενώσεις που μπορούν να προσληφθούν μέσω της διατροφής όπως οι τοκοφερόλες, τα καροτινοειδή ή τα φλαβονοειδή, αναστέλλουν την οξειδωση των λιπιδίων και έτσι συμβάλλουν στην προστασία από παθήσεις (π.χ. καρδιαγγειακές παθήσεις). Μελέτες *in vitro* απέδειξαν ότι τα διατροφικά και ενδογενή αντιοξειδωτικά

αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους. Οι ανωτέρω ενώσεις μπορεί να παρέχουν επιπλέον προστασία έναντι της οξειδωσης των λιπιδίων (Lobo et al., 2010).

Πέραν του γεγονότος ότι τα PUFA είναι επιρρεπή σε οξείδωση, δύνανται να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι σηματοδότησης του στρες που ελέγχει το γενετικό μηχανισμό που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα για τη σύνθεση πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την αποτοξίνωση και την εξουδετέρωση του οξειδωτικού στρες (Ma, 2013). Για να εξηγηθεί το εν λόγω οξύμωρο, εικάζεται ότι η υπεροξείδωση των λιπιδίων που εμφανίζεται σε κύτταρα λόγω των PUFA, προκαλεί ένα μικρού επιπέδου υποτοξικό στρες το οποίο μπορεί να προκαλέσει προστατευτική προσαρμογή εν καιρώ (hormesis), συμβάλλοντας έτσι στις επιπτώσεις των PUFA στην υγεία. Συγκεκριμένα, τα PUFA έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανά να βοηθήσουν τη ρύθμιση των αντιοξειδωτικών συστημάτων σε ποικίλα κύτταρα (Giordano & Visioli, 2014) και ως εκ τούτου να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες (Zanatta et al., 2014). Συμπερασματικά, η ενσωμάτωση ζωοτροφών πλούσιων σε PUFA, έχει συνδεθεί με την πρόκληση οξειδωτικού στρες αλλά και την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων. Επομένως, τα διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης ζωοτροφών πλούσιων σε PUFA στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών είναι σημαντικό να διερευνώνται προκειμένου να αξιολογηθεί το βέλτιστο επίπεδο στο οποίο να μην προκαλείται οξειδωτική καταπόνηση. Επομένως, ο βαθμός οξειδωτικής καταπόνησης του οργανισμού εξαρτάται τόσο από το επίπεδο ενσωμάτωσης των PUFA όσο και των αντιοξειδωτικών ενώσεων.

### **2.2.3. Η επίδραση της των ελαιούχων σπερμάτων στην οξειδωτική κατάσταση των μηρυκαστικών**

Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Ως εκ τούτου, δεδομένου ότι τα PUFA είναι επιρρεπή σε οξείδωση και το ποσοστό συμμετοχής τους στα ελαιούχα σπέρματα είναι υψηλό, τα υψηλά επίπεδα ενσωμάτωσής τους στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών δύναται να προκαλέσουν οξειδωτικές ανισορροπίες (Giordano & Visioli, 2014). Τα ελαιούχα σπέρματα περιέχουν φυσικά αντιοξειδωτικά, που είναι συνήθως μίγματα διαφόρων ενώσεων σε διαφορετικές αναλογίες (Schmidt et al., 2003). Ορισμένα ελαιούχα σπέρματα καταναλώνονται άμεσα και τα άλευρα που προκύπτουν από την εξαγωγή του ελαίου σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ήδη ή θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφές. Τα άλευρα μετά την επεξεργασία περιέχουν

κυρίως φαινολικά οξέα και τα παράγωγά τους, προϊόντα αποσύνθεσης λιγνανών, φλαβονοειδή και παρόμοιες ενώσεις. Τόσο τα έλαια όσο και τα άλευρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αντιοξειδωτικών για τη σταθεροποίηση των λιπών και των ελαίων και άλλων λιπιδικών τροφών κατά της οξειδωτικής βλάβης (Schmidt *et al.*, 2003). Επίσης, περιέχουν μια ποικιλία φαινολικών ενώσεων με ποικίλη αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, ο τύπος αντιοξειδωτικού που υπάρχει σε κάθε ελαιούχο σπέρμα και τα υποπροϊόντα του είναι διαφορετικός. Ο προστατευτικός ρόλος των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα ελαιούχα σπέρματα μπορεί να υποστηρίξει τη χορήγηση αυτών και των άνευ λίπους υποπροϊόντων τους σαν πηγή πρωτεΐνης στη διατροφή των παραγωγικών ζώων κάτι που δικαιολογείται σε μεγάλο βαθμό και από τη γενικευμένη χρήση της σόγιας (Shahidi, 2000). Ο λιναρόσπορος, ο ηλίανθος, η σόγια, ο βαμβακόσπορος και η ελαιοκράμβη είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα ελαιούχων σπερμάτων με διαφορετικό αντιοξειδωτικό προφίλ. Μια σημαντική ομάδα αντιοξειδωτικών σε αυτά περιλαμβάνει τις στερόλες (Hall, 2014). Αυτές οι ενώσεις έχουν αποδειχθεί ότι αποτρέπουν τη θερμική οξειδωτική αποδόμηση των ελαίων. Άλλα αντιοξειδωτικά, παρόντα στα ελαιούχα σπέρματα, είναι οι τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες (Tanwar & Goyal, 2021).

Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της χορήγησης σογιέλαιου μαζί με ιχθυέλαιο σε επιλεγμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα, στην αντιοξειδωτική ικανότητα και σε αντιοξειδωτικούς δείκτες σε γάλα και πλάσμα προβάτων και αιγών (Tsiplakou *et al.*, 2017c). Αποδείχθηκε ότι βελτιώθηκε η οξειδωτική κατάσταση των ζώων καθώς και του γάλακτος. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT και GR στο πλάσμα των προβατινών, ενώ η δραστηριότητα της GST και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της μεθόδου FRAP αυξήθηκαν σημαντικά στις αίγες. Στις προβατίνες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα πρωτεϊνικά καρβονύλια, πιθανώς λόγω της αυξημένης συμμετοχής των ω-3 ΛΟ στο σιτηρέσιο. Επίσης, στο γάλα των προβατινών και των αιγών η δραστηριότητα της CAT αυξήθηκε σημαντικά.

Η ενσωμάτωση σησαμάλευρου μαζί με βιταμίνη E και σελήνιο στα σιτηρέσια αιγών, βελτιώνει την οξειδωτική κατάσταση των ζώων και ταυτόχρονα διασφαλίζει την οξειδωτική σταθερότητα του γάλακτος (Tsiplakou *et al.*, 2021).

Οι Mitsiropoulou *et al.* (2021a), παρατήρησαν ότι η μερική αντικατάσταση του σογιάλλευρου και αραβοσίτου με σπέρματα σησάμου στα σιτηρέσια αιγών σε ποσοστό 10 % του ολικού σιτηρεσίου, μείωσε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων που είναι δείκτης

οξειδωτικού στρες, σε δείγματα πλάσματος και γάλακτος των αιγών καθώς επίσης και της μηλονικής διαλδεΐδης (MDA) στο γάλα. Επίσης, σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στην FRAP στο πλάσμα των αιγών που διατράφηκαν με σιτηρέσιο που περιείχε 10 % σπέρματα σισάμου, ενώ σε δείγματα γάλακτος αυξήθηκε μόνο στην ομάδα που σπέρματα σισάμου ενσωματώθηκαν σε ποσοστό 5 % του ολικού σιτηρεσίου.

Επίσης, η ενσωμάτωση λινάλευρου στα σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγών αγελάδων βελτίωσε την οξειδωτική τους κατάσταση (Schogor *et al.*, 2013), ενώ η χορήγηση αποφλοιωμένου λιναρόσπορου, αύξησε την πληθώρα μελετημένων αντιοξειδωτικών γονιδίων που συμμετέχουν στην προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες στον μαστικό αδένα και σε άλλους ιστούς (Cortes *et al.*, 2012).

Γίνεται αντιληπτό, ότι ενώ η επίδραση της ενσωμάτωσης ελαιούχων σπερμάτων (πλούσια σε PUFA) όπως τα σπέρματα καμελίνας, στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών επί της γαλακτοπαραγωγής, της χημικής σύστασης του γάλακτος και του προφίλ των ΛΟ αυτού έχει μελετηθεί εκτενώς, δεν συμβαίνει το ίδιο με την οξειδωτική κατάσταση των μηρυκαστικών και των παραγόμενων προϊόντων, κάτι που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης δεδομένου του γεγονότος ότι όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα PUFA είναι επιρρεπή σε οξείδωση. Η μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης ελαιούχων σπερμάτων βοηθά στο να αντληθούν σημαντικά συμπεράσματα και να αξιολογηθεί το βέλτιστο επίπεδο ενσωμάτωσης στο οποίο να μην δημιουργείται ανισορροπία στην οξειδωτική κατάσταση.

Ενδεικτικά παραδείγματα μελέτης της ενσωμάτωσης ελαιούχων σπερμάτων και των παραπροϊόντων τους, και η επίδραση της χορήγησης αυτών στα μηρυκαστικά παρέχεται στον Πίνακα 2.3.

**Πίνακας 2.3.** Συνοπτική περιγραφή της επίδρασης της ενσωμάτωσης ελαιούχων σπερμάτων και των υποπροϊόντων τους στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών και στην οξειδωτική κατάσταση τους

Επέμβαση	Ζώα	Στόχος	Αποτέλεσμα	Μελέτη
Σόγια + Ιχθυέλαιο	Προβατίνες	Οξειδωτική κατάσταση ζώου και γάλακτος	<u>Πλάσμα:</u> ↑CAT, ↑GR, ↑PC <u>Γάλα:</u> ↑CAT	Tsiplakou <i>et al.</i> , 2017c
Σόγια + Ιχθυέλαιο	Αίγες	Οξειδωτική κατάσταση ζώου και γάλακτος	<u>Πλάσμα:</u> ↑GST, ↑FRAP <u>Γάλα:</u> ↑CAT	Tsiplakou <i>et al.</i> , 2017c
Σησαμάλευρο + Βιταμίνη E + Se	Αίγες	Οξειδωτική κατάσταση ζώου και γάλακτος	✓ Βελτίωση οξειδωτικής κατάστασης των ζώων ✓ Διασφάλιση οξειδωτικής σταθερότητας του γάλακτος	Tsiplakou <i>et al.</i> , 2021
Σπέρματα σησάμου	Αίγες	Οξειδωτική κατάσταση ζώου και γάλακτος	<u>Πλάσμα:</u> ↓PC, ↑FRAP <u>Γάλα:</u> ↓MDA, ↑FRAP	Mitsiopolou <i>et al.</i> , 2021a
Λινάλευρο	Αγελάδες	Οξειδωτική κατάσταση	✓ Βελτίωση οξειδωτικής κατάστασης των ζώων	Schogor <i>et al.</i> , 2013
Αποφλοιωμένο λινάρι	Αγελάδες	Οξειδωτική κατάσταση	↑ Αντι/κών γονιδίων σε ιστούς	Cortes <i>et al.</i> , 2012

#### 2.2.4. Η επίδραση των μικροφυκών στην οξειδωτική κατάσταση των μηρυκαστικών

Η βιταμίνη C βρίσκεται σε αφθονία στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς και δύναται να μειώσει σημαντικά την παραγωγή των ROS (Goiris *et al.*, 2015). Υψηλά επίπεδα βιταμίνης C έχουν αναφερθεί στη *Chlorella* sp. (Running *et al.*, 2002), στη *Dunaliella* sp. (Barbosa *et al.*, 2005), κ.α. Επίσης η πιο ενεργή μορφή των τοκοφερολών, η α- τοκοφερόλη, δρα ως αντιοξειδωτικό μέσω της ικανότητάς της να καταστέλλει τη δραστική μορφή οξυγόνου  $^1\text{O}_2$  και υπεροξειδία (Lesser, 2006). Τα ζώα μπορούν να προσλάβουν τοκοφερόλη μέσω της διατροφής τους (Lesser, 2006). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της τοκοφερόλης είναι το αποτέλεσμα της ικανότητάς της να σβήνει τόσο το  $\text{O}_2$  όσο και τα υπεροξειδία. Όμοια, α-τοκοφερόλη έχει παρατηρηθεί σε μεγάλη συγκέντρωση στη *Dunaliella teriolecta* και *Tetraselmis suecica*. Άξιο αναφοράς είναι επίσης το γεγονός ότι τα καροτινοειδή είναι τα πιο ευρέως διαδεδομένα και εμπορικά προϊόντα που προέρχονται από μικροφύκη (Goiris *et al.*, 2015). Συγκεκριμένα τα φλαβονοειδή, τα οποία απαντώνται σε μικροφύκη όπως η *Chlorella*, δύνανται να μειώσουν την παραγωγή των ROS (Goiris *et al.*, 2015).

Η χορήγηση 5.15 g/kg ΞΟ *Chlorella vulgaris* στα σιτηρέσια αιγών, βελτίωσε την οξειδωτική κατάσταση των αιγών (Tsiplakou *et al.*, 2017a). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και CAT στο πλάσμα του αίματος των αιγών. Όσον αφορά το γάλα, η αυξημένη δράση της SOD και η μείωση στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βελτίωσε την οξειδωτική του σταθερότητα. Επίσης, σε πλάσμα και γάλα αιγών, η χορήγηση *Chlorella pyrenoidosa* (10 g/kg ΣΖ), δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες, αντιοξειδωτικών ενζύμων και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Tsiplakou *et al.*, 2017b).

Σε παχυνόμενα αρνιά, η ενσωμάτωση 1 g *Spirulina*/10 kg ΣΒ/ημέρα αύξησε τη δραστηριότητα της GSH στο αίμα και μείωσε τη περιεκτικότητας του ορού του αίματος σε MDA (El-Sabagh *et al.*, 2014). Σε υψηλής ενέργειας σιτηρέσιο που ενσωματώθηκε με 3 και όχι με 1 % *Spirulina*, βρέθηκε αύξηση της δραστηριότητας της SOD και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού και του μήκιστου θωρακικού και οσφυϊκού μυ (*Longissimus thoracis et lumborum*) των προβάτων (Liang *et al.*, 2020). Σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής που διατηρούνταν σε βοσκή, η ενσωμάτωση 15 ή 30 g *Spirulina* δεν είχε επίδραση στο οξειδωτικό στρες κατά τη μεταβατική περίοδο (Garcés *et al.*, 2019).

Η ενσωμάτωση 60 g/αίγα/ημέρα *Schizochytrium* sp. αύξησε τη δραστικότητα της GST και της SOD στο πλάσμα των αιγών σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα. Επίσης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP αυξήθηκε σημαντικά με την ενσωμάτωση 40 και 60 g/αίγα/ημέρα σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Επίσης, η ενσωμάτωση 60 g/αίγα/ημέρα προκάλεσε αύξηση της MDA στο πλάσμα των αιγών. Όσον αφορά την οξειδωτική κατάσταση του γάλακτος, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε σύμφωνα με τις μεθόδους ABTS και FRAP, ενώ η ενσωμάτωση 60 g/αίγα/ημέρα αύξησε τα επίπεδα τόσο της MDA όσο και των PC. Επομένως, η ενσωμάτωση 20 g/αίγα/ημέρα *Schizochytrium* sp., αποδείχθηκε ιδανική προσθήκη στα σιτηρέσια των αιγών όσον αφορά τους δείκτες οξειδωτικού στρες, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε πλάσμα και γάλα (Mavrommatis *et al.*, 2018).

Η ενσωμάτωση 40 g *Schizochytrium* spp./αίγα/ημέρα σε συνδυασμό με τον λόγο XZ/ΣZ = 40/60, προκάλεσε οξειδωτική απόκριση όπως παρατηρήθηκε από τα αυξημένα επίπεδα των PC και της MDA στο γάλα και στο πλάσμα του αίματος. Συμπερασματικά, η ενσωμάτωση 20 g *Schizochytrium* spp. και με λόγο XZ/ΣZ = 60/40 φαίνεται να είναι ιδανική χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις στην οξειδωτική σταθερότητα του γάλακτος (Mavrommatis *et al.*, 2021a).

Ωστόσο σε αγελάδες όπου χορηγήθηκε DHA μικροφυκών, δεν μειώθηκε η ευαισθησία σε οξειδωτικό στρες στη μεταβατική περίοδο. Αντίθετα, αυξήθηκε πιθανώς λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε PUFA η λιπιδική υπεροξείδωση (Wullepit *et al.*, 2012).

Είναι γεγονός ότι για συγκεκριμένα μικροφύκη όπως η σπιρουλίνα, δεν έχουν διεξαχθεί μελέτες που να διερευνάν ολιστικά την οξειδωτική κατάσταση τόσο του οργανισμού των προβατινών όσο και του παραγόμενου γάλακτος.

Αποτελέσματα από μελέτες που διερεύνησαν την επίδραση των μικροφυκών στην οξειδωτική κατάσταση των μηρυκστικών παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 2.4.



**Πίνακας 2.4.** Συνοπτική περιγραφή της επίδρασης της ενσωμάτωσης μικροφυκών στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών και στην οξειδωτική κατάστασή τους

Επέμβαση	Ζώα	Στόχος	Αποτέλεσμα	Μελέτη
<i>Chlorella vulgaris</i>	Αίγες	Οξειδωτική κατάσταση ζώου και γάλακτος	✓ Βελτίωση οξειδωτικής κατάστασης των ζώων ✓ Διασφάλιση οξειδωτικής σταθερότητας του γάλακτος	Tsiplakou <i>et al.</i> , 2016
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Αίγες	Οξειδωτική κατάσταση ζώου και γάλακτος	NS	Tsiplakou <i>et al.</i> , 2017
<i>Spirulina</i>	Αρνιά	Οξειδωτική κατάσταση ζώου	↑GSH στο αίμα ↓του ορού του αίματος σε MDA	El-Sabagh <i>et al.</i> , 2014
<i>Spirulina</i>	Πρόβατα	Οξειδωτική κατάσταση ζώου	↑SOD, ↑ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού και του μήκιστου θωρακικού και οσφυϊκού μυ	Liang <i>et al.</i> , 2020
<i>Spirulina</i>	Αγελάδες	Οξειδωτικό κατάσταση κατά τη μεταβατική περίοδο	NS	Garcés <i>et al.</i> , 2019
<i>Schizochytrium</i> sp. 50/50 XZ/ΣZ	Αίγες	Οξειδωτική κατάσταση ζώου και γάλακτος	✓ Βελτίωση οξειδωτικής κατάστασης των ζώων ✓ Διασφάλιση οξειδωτικής σταθερότητας του γάλακτος	Mavrommatis <i>et al.</i> , 2018
<i>Schizochytrium</i> spp. 60/40 XZ/ΣZ	Αίγες	Οξειδωτική κατάσταση ζώου και γάλακτος	✓ Διασφάλιση οξειδωτικής σταθερότητας του γάλακτος	Mavrommatis <i>et al.</i> , 2021a
DHA μικροφύκους	Αγελάδες	Ευαισθησία σε οξειδωτικό στρες στη μεταβατική περίοδο	↑Λιπιδικής υπεροξειδωσης	Wullepit <i>et al.</i> , 2012

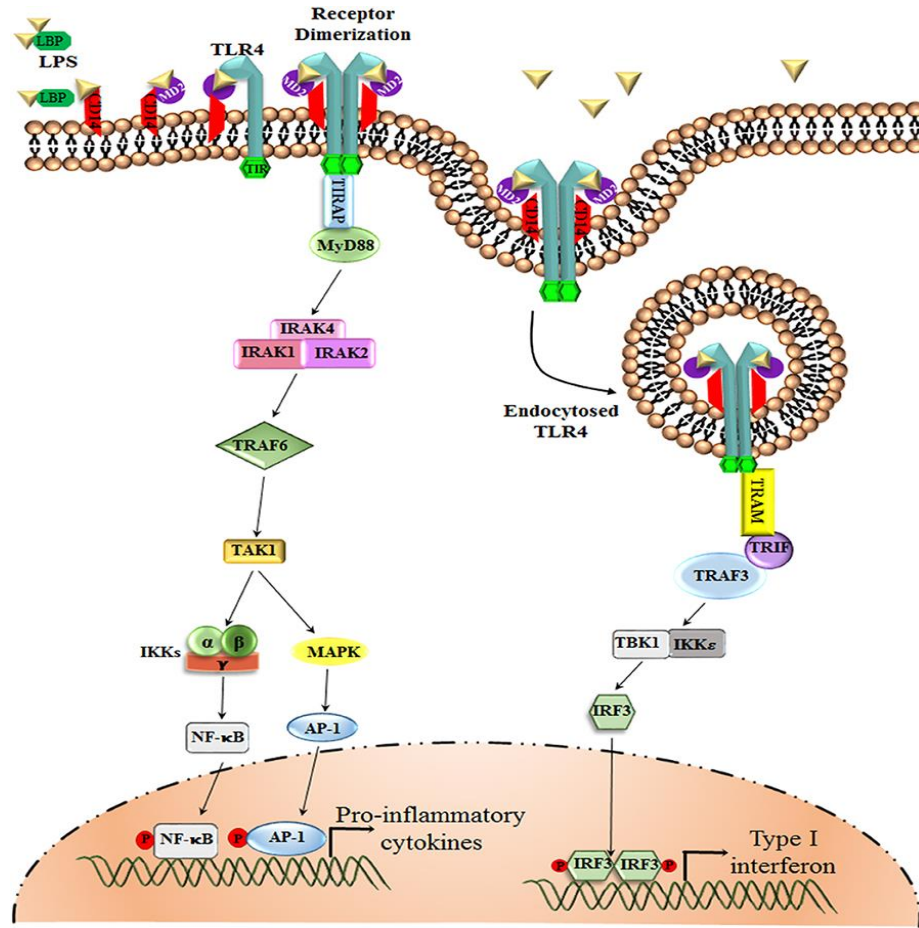
### 2.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΠΛΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η εντατικοποίηση των συστημάτων εκτροφής και η χρησιμοποίηση ζωικού κεφαλαίου υψηλής γενετικής αξίας για αύξηση της παραγωγικότητας, πιθανώς να οδηγεί σε στρεσογόνες συνθήκες για τα παραγωγικά ζώα. Η διατροφή αποτελεί θεμελιώδη παράγοντα που διασφαλίζει το ανοσοποιητικό σύστημα και την πρόσληψη φλεγμονωδών καταστάσεων (Sordillo *et al.*, 2016). Επομένως, η ενσωμάτωση καινοτόμων ζωοτροφών, πλούσιων σε βιολειτουργικά συστατικά και πιο συγκεκριμένα σε PUFA, φαινολικές ενώσεις και πολυφαινόλες, φλαβονοειδή κ.α., δύνανται να διασφαλίσουν ανοσοποιητικό σύστημα των μηρυκαστικών. Επίσης, η ενσωμάτωση καινοτόμων ζωοτροφών πλούσιων σε βιολειτουργικά συστατικά, δύνανται να αποτελεί σύμμαχο στη μείωση της αντίστασης στα αντιβιοτικά.

Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να χαρακτηριστεί ως η γραμμή άμυνας οποιουδήποτε ζωντανού οργανισμού, καθώς είναι αυτό που δρα σε πιθανή προσβολή του οργανισμού από μολυσματικούς παράγοντες όπως τα βακτήρια, οι ιοί, τα παράσιτα και σε πιθανές φλεγμονές. Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να διακριθεί σε δύο κύρια μέρη αμυντικής ζώνης, την έμφυτη ή αλλιώς και φυσική ανοσία και την επίκτητη (Calder, 2001). Η έμφυτη ανοσία η οποία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή, αρχικά, δρα προστατευτικά με σκοπό να αποφευχθεί η προσβολή του ξενιστή από κάποιον παθογόνο και στη συνέχεια δρα επιθετικά με σκοπό την εξουδετέρωση του παθογόνου (Calder, 2001).

Τα κυτταρικά στοιχεία όπως τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα NK (natural killer) λεμφοκύτταρα, αναγνωρίζουν μοριακά πρότυπα παθογόνων, γνωστών και ως PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) καθώς και μόρια που παράγονται από τα κύτταρα του ξενιστή σαν απάντηση σε μία λοίμωξη με τη μεσολάβηση υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων ή αλλιώς PRRs (pattern recognition receptors, PRRs) (Kawai & Akira, 2009). Οι πιο γνωστοί PRRs είναι οι ανάλογοι των Toll υποδοχείς, ευρέως γνωστοί ως TLRs (Toll-like receptors) (Mogensen *et al.*, 2009). Οι TLRs αποτελούν μια σημαντική κατηγορία του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος των θηλαστικών (Selvarajoo, 2013). Οι εν λόγω υποδοχείς, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας. Έχει αποδειχθεί ότι συμβάλουν στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού και εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως οι φλεγμονές. Ο TLR4 είναι ο πιο μελετημένος των PRRs. Ο TLR4 μεσολαβεί πρωταρχικά σε

φλεγμονώδη απόκριση των λιποπολυσακχαριτών (LPS) που παράγεται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια και δευτερευόντως διαμεσολαβεί σε ικά στοιχεία και πρωτεΐνες θερμικού σοκ ενώ όταν ενεργοποιηθεί οδηγεί στην παραγωγή κυτταροκινών και χυμειοκινών (Vaure & Liu, 2014) (Σχήμα 2.3.).



**Σχήμα 2.3.** Μονοπάτι σηματοδότησης του TLR4 (Πηγή: Firmal *et al.*, 2020)

Επικοινωνία μεταξύ των δύο ζωνών άμυνας (έμφυτη και επίκτητη ανοσία) επιτυγχάνεται μέσω άμεσης κύτταρο προς κύτταρο επαφής, συμπεριλαμβάνοντας μόρια και μέσω της παραγωγής χημικών αγγελιαφόρων. Ανάμεσα σε αυτούς τους χημικούς αγγελιαφόρους, κυρίαρχο ρόλο κατέχουν οι πρωτεΐνες που ονομάζονται κυτταροκίνες οι οποίες δρουν για να ρυθμίσουν τη δραστηριότητα του κυττάρου που παρήγαγε την κυτταροκίνη και/ή άλλα κύτταρα (Calder, 2001). Οι κυτταροκίνες δρουν μέσω προσκόλλησης σε συγκεκριμένους υποδοχείς, στην επιφάνεια των κυττάρων, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο αλλαγές στην ανάπτυξη ή στη δράση των κυττάρων στόχων. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκου, ή αλλιώς TNF-α και οι ιντερλευκίνες-1 (IL-1) και -6

(IL-6), είναι ορισμένες από τις σημαντικότερες κυτταροκίνες που παράγονται από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων των μονοκυττάρων και των μακροφάγων με σκοπό τη θανάτωση των βακτηρίων και των κακοήθων κυττάρων καθώς και την ενεργοποίηση των T και B λεμφοκυττάρων (Calder, 2001).

Με την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, ιντερφερόνης τύπου I (IFN) και άλλων μεσολαβητών, οι PRR ενεργοποιούν τις οδούς σηματοδότησης που οδηγούν σε αυτές τις συγκεκριμένες ανοσοαποκρίσεις (Kawasaki & Kawai, 2014). Σαν αποτέλεσμα της διέγερσης των TLR, ενεργοποιούνται και άλλα μονοπάτια σηματοδότησης, όπως ο πυρηνικός παράγοντας kappa B (NF-kB). Οι κύριοι προσαρμογείς που συνδέονται με την ενδοκυτταρική περιοχή του TLR, με σκοπό την ενεργοποίηση της προφλεγμονώδους απόκρισης, είναι η μυελώδης διαφοροποιημένη πρωτογενής απόκριση (MyD-88) και η περιοχή του υποδοχέα ομολογίας που ενεργοποιεί την ιντερφερόνη-β (TRIF). Παράλληλα, MyD-88 και TRIF ενεργοποιούν τον NF-kB, την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη-1 (AP-1), τον ρυθμιστικό παράγοντα ιντερφερόνης-3 (IRF-3) ή τις MAP κινάσες (MAPK) που οδηγούν σε μετέπειτα ρύθμιση της έκφρασης κυτταροκινών όπως των TNF-α, IL-1β, IL-6, IP-10, IFN-γ κ.α. (Kawasaki & Kawai, 2014). Η πρόκληση προφλεγμονωδών κυτταροκινών μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω του NF-kB με την ενεργοποίηση της συντηρημένης Helix-Loop-Helix-Ubiquitous Kinase (CHUK) ή της IκB κινάσης-α (IKKα) (Tsiplakou *et al.*, 2020). Επιπλέον, δύναται να επιτευχθεί αύξηση της έκφρασης της IL10 μέσω της ενεργοποίησης του μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής-3 (STAT-3) (Tsiplakou *et al.*, 2020). Επίσης, η οξυγενάση της αίμης-1 (HMOX1) έχει ανοσορυθμιστικές ιδιότητες (Paine *et al.*, 2010). Τέλος, οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως το μοτίβο συμπλόκου χυμειοκίνης 5 (CCL-5) και η χυμειοκίνη (C-X-C μοτίβο) συμπλόκου-16 (CXCL-16) ενεργοποιούνται, επίσης, από τους μηχανισμούς της έμφυτης ανοσίας.

### **2.3.1. Η επίδραση των ελαιούχων σπερμάτων στο ανοσοποιητικό σύστημα**

Τα ελαιούχα σπέρματα είναι πλούσια σε βιολειτουργικά συστατικά που δύνανται να επιδράσουν στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Η ενσωμάτωση λιναρόσπορου (2 g/ημέρα) στη διατροφή υγιών ατόμων ηλικίας 55 - 75 ετών δεν επηρέασε σημαντικά τη δραστηριότητα των κυττάρων NK (Thies *et al.*, 2001a), τον πολλαπλασιασμό της απόκρισης των λεμφοκυττάρων σε μιτογόνα (Thies *et al.*, 2001b) ή την παραγωγή TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-2, ή IFN-γ σε μονοπύρηνια κύτταρα (Thies *et al.*, 2001b).

Στα σιτηρέσια των προβατινών, η ενσωμάτωση εξωθημένων σπερμάτων λιναριού (10 g/100g ΣΖ) δεν επηρέασε σημαντικά στην έμφυτη ανοσία, ωστόσο, η παραγωγή αντισωμάτων κατά των *Salmonella enterica* subsp. και *Abortusovis* αυξήθηκε (Acuti *et al.*, 2012).

Η ενσωμάτωση σπερμάτων σησάμου (5 και 10 % στα μείγματα ΣΖ) προς μερική αντικατάσταση του σογιαλεύρου και του καρπού αραβοσίτου σε γαλακτοπαραγωγές αίγες, μπορεί να χαρακτηριστεί ως αποτελεσματική στρατηγική για βελτίωση της έμφυτης ανοσίας (Mitsioroulou *et al.*, 2021b). Συγκεκριμένα η έκφραση των *MAPK1*, *IL6*, *TRIF*, *IFNG*, *TRAF3* και *JUND* γονιδίων μειώθηκε σημαντικά με χορήγηση σπερμάτων σησάμου σε ποσοστό 10 %, ενώ σε ποσοστό 5 % μειώθηκε σημαντικά η έκφραση των *IFNG* και *TRAF3* γονιδίων σε ουδετερόφιλα κύτταρα.

Σε σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγών αγελάδων, η ενσωμάτωση σπερμάτων ηλίανθου (8 % ΞΟ) προ τοκετού, επηρέασε θετικά τη λειτουργία των ωοθηκών μετά τον τοκετό χωρίς να επηρεάσει τη φλεγμονώδη κατάσταση της μήτρας ή την έκφραση των προ- και αντιφλεγμονωδών γονιδίων κυτταροκινών στα κύτταρα του ενδομητρίου (Salehi *et al.*, 2016).

Η έκφραση των *LGP2*, *STAT1*, *IRF1*, *ISG15* και *viperin*, γονίδια με γνωστή λειτουργία στην αντι-ική έμφυτη ανοσολογική απόκριση, αυξήθηκε ελαφρώς μέσω της μερικής αντικατάστασης ιχθυελαίου με 40 % έλαιο καμελίνας στο σιτηρέσιο μπακαλιάρου του Ατλαντικού (Booman *et al.*, 2014). Η αντικατάσταση έως και 80 % του ιχθυελαίου με έλαιο καμελίνας δεν είχε ισχυρή επίδραση στην βασική γονιδιακή έκφραση στη σπλήνα. Οι ίδιοι συγγραφείς συμπέραναν ότι η ενσωμάτωση ελαίου καμελίνας στη διατροφή του μπακαλιάρου του Ατλαντικού είναι ικανή να δημιουργήσει μια ισχυρή αντι-ική ανοσολογική απόκριση, συγκρίσιμη με αυτή του μπακαλιάρου που τρέφεται με ιχθυέλαιο (Booman *et al.*, 2014).

Πειραματικά μοντέλα με τρωκτικά έδειξαν ότι ο λιναρόσπορος αύξησε την παραγωγή TNF στα μακροφάγα, αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην παραγωγή TNF από φλεγμονώδη μακροφάγα (Watanabe *et al.*, 1991). Τα υψηλά επίπεδα λιναρόσπορου στη διατροφή τρωκτικών οδήγησαν σε μειωμένο πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων, δραστηριότητα κυττάρων NK και απόκριση μοσχεύματος έναντι ξενιστή (Jeferry *et al.*, 1997). Η ακριβής επίδραση του ALA οξέος στις λειτουργίες των λεμφοκυττάρων φαίνεται να εξαρτάται από τα επίπεδα χορήγησης του λινελαϊκού οξέος και τη συνολική περιεκτικότητα σε PUFA της διατροφής (Jeferry *et al.*, 1997).

### 2.3.2. Η επίδραση των μικροφύκων στο ανοσοποιητικό σύστημα

Τα μικροφύκη έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την επίδρασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα λόγω των ποικίλων βιολειτουργικών συστατικών τους.

Η *in vitro* επώαση ανθρώπινων μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος με σπιρουλίνα αύξησε την έκκριση των IFNG, IL1B και IL4 κατά 2,0, 3,3, και 13,6 φορές, αντίστοιχα (Mao *et al.*, 2000).

Οι Mavrommatis *et al.* (2021b) ανέφεραν αξιοσημείωτα αποτελέσματα όσον αφορά την επίδραση της χορήγησης του μικροφύκου *Schizochytrium* sp, πλούσιου σε DHA στην έμφυτη ανοσία των αιγών. Πιο συγκεκριμένα, οι εκφράσεις των μελετημένων γονιδίων *TLR4*, *MYD88*, *MAPK*, *IRF3*, *IFNG*, των προφλεγμονωδών κυτταροκινών *IL1B*, *IL2*, *IL8* και *TNF* και των χυμιοκινών *CCL5* και *CXCL16*, μειώθηκαν σημαντικά στις αίγες που χορηγήθηκε το συγκεκριμένο μικροφύκος σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα.

Σε μελέτη με τιλάπια Νείλου, η έκφραση γονιδίων κυτταροκινών (IL-1β, TNF-α και TGF-β1) αυξήθηκε σημαντικά μετά την έκθεση σε αρσενίτη. Ωστόσο, σε ιχθύες που στα σιτηρέσιά τους ενσωματώθηκε *Chlorella* 10 % η ανοδική έκφραση μειώθηκε (Zahran *et al.*, 2019). Όμοια, η ενσωμάτωση 5 % *Chlorella* σε σιτηρέσιο τιλάπιας Νείλου αύξησε την έκφραση των IL-1β, TNF-α (Mahmoud *et al.*, 2020).

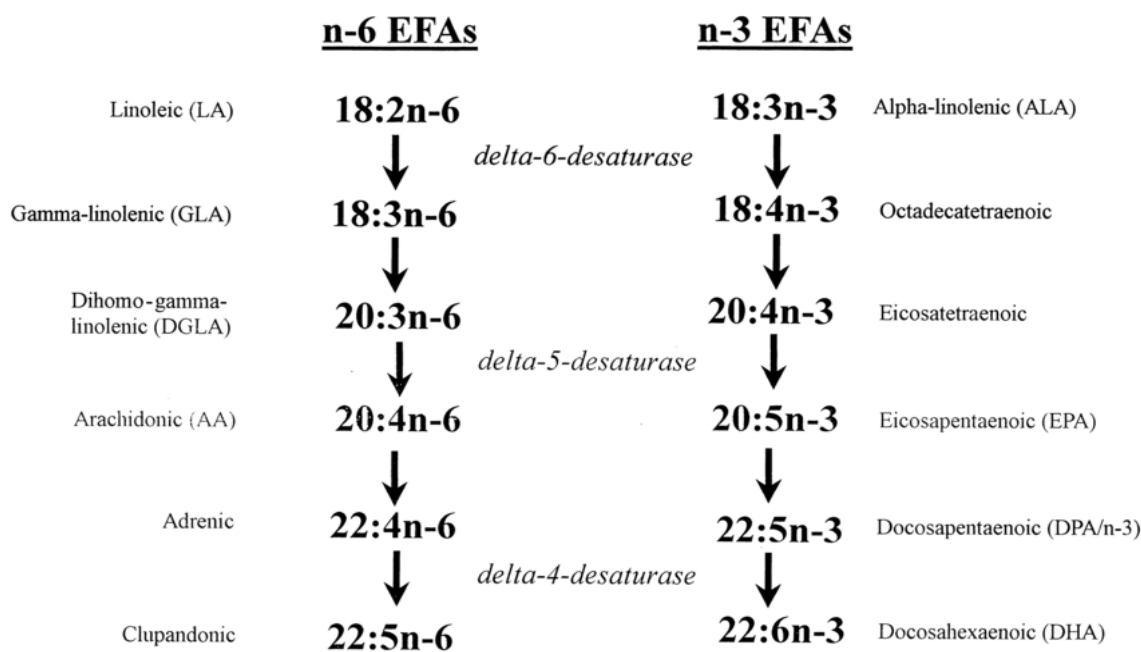
Η έκφραση των *INFG* και *IL1B* αυξήθηκε μέσω της ενσωμάτωσης σπιρουλίνας και της δράσης του β-καροτενίου και της φυκοκυανίνης σε πειραματισμό με τιλάπια Νείλου και *Oreochromis niloticus* (Hassan *et al.*, 2021), ενώ η έκφραση του γονιδίου *TNFA* αυξήθηκε σε πέστροφες (*Oncorhynchus mykiss*) (Sheikhzadeh *et al.*, 2019), κυπρίνους (*Cyprinus carpio*) (Watanuki *et al.*, 2006) και τιλάπια Νείλου (Mahmoud *et al.*, 2018) ως αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης *Spirulina platensis* στα σιτηρέσιά τους.

Επιπλέον, η αντικατάσταση σόγιας με σπιρουλίνα στα σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγών αγελάδων και ταύρων, δεν επέφερε σημαντικές τροποποιήσεις στην αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη γονιδιακή έκφραση σε μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος (Keller *et al.*, 2021).

### 2.3.3. Η επίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο ανοσοποιητικό σύστημα

Τόσο τα ελαιούχα σπέρματα όσο και τα μικροφύκη είναι πλούσια σε PUFA, η επίδραση των οποίων έχει μελετηθεί εκτενώς στο ανοσοποιητικό σύστημα σε ανθρώπους και τρωκτικά (Calder, 2001). Συγκεκριμένα, τα SFA έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν προ-φλεγμονώδη απόκριση, ενώ τα ω-3 μακράς αλύσου PUFA (long chain polyunsaturated fatty acids, LCPUFA) δρουν ανταγωνιστικά προς μια αντιφλεγμονώδη κατεύθυνση (Oh *et al.*, 2010). Ωστόσο, ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί σε σχέση με τα εικοσανοειδή. Τα εικοσανοειδή συντίθενται από το γ-λινολενικό, το αραχιδονικό και το εικοσαπεντανοϊκό (EPA) (Calder, 2001), μέσω του μεταβολισμού της κυκλοξυγενάσης που αναπτύσσει τις προσταγλαδίνες σειράς-2 (PGE<sub>2</sub>). Παρόλα αυτά, τα ω-3 LCPUFA ανταγωνίζονται του αραχιδονικού οξέος για την παραγωγή των εικοσανοειδών (Calder, 2007). Επίσης, τα LCFA είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση του συζευγμένου με πρωτεΐνη G υποδοχέα 120 (GRP120) (Hirasawa *et al.*, 2005) και μέσω της σηματοδότησής του, ενεργούν ως μεσολαβητές ενός ισχυρού αντιφλεγμονώδους αποτελέσματος αναστέλλοντας τα μονοπάτια των TLR και TNF-α (Oh *et al.*, 2010).

Η σχετική αφθονία ή αναλογία μεταξύ των μακράς αλύσου ω-6 (αραχιδονικό οξύ) και ω-3 (EPA και DHA) στις κυτταρικές μεμβράνες, εξαρτάται από τη διατροφική διαθεσιμότητα σε αυτά και την μετατροπή τους (επιμήκυνση ανθρακικής αλύσου και αφυδρογόνωση) μέσω του λινελαϊκού και ALA οξέος. Στα θηλαστικά η μετατροπή του λινελαϊκού σε αραχιδονικό είναι αρκετά πιο αποτελεσματική από τη μετατροπή του ALA σε EPA και DHA. Τα δύο αυτά ΛΟ είναι απαραίτητα καθώς το σώμα δεν μπορεί να τα συνθέσει και επομένως πρέπει να προσληφθούν μόνο μέσω των διατροφικών επεμβάσεων (Σχήμα 2.4.).



**Σχήμα 2.4.** Μεταβολισμός του λινελαϊκού λιπαρού οξέος και του λινολενικού λιπαρού οξέος

Στο παρελθόν, *in vitro* και *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι τα ω-3 PUFA δύνανται να μειώσουν την παραγωγή TNFα (Babcock *et al.*, 2002, Novak *et al.*, 2003). Μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι υψηλή δόση ALA (15 g/ημέρα για 4 εβδομάδες) μείωσε την παραγωγή IL-1 και TNF σε διεγερμένα με λιποπολυσακχαρίτες ανθρώπινα μονοκύτταρα (Caughey *et al.*, 1996). Μια μέτρια αύξηση της πρόσληψης ALA από υγιείς ενήλικες δεν επηρεάζει την ανοσία, αλλά μια σημαντική αύξηση της πρόσληψης ALA (π.χ. 7 έως 15 φορές) μπορεί να προκαλέσει αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα (Calder, 2001). Ωστόσο πρέπει να δοθεί προσοχή σε τυχόν συμπεράσματα καθώς δεν καθίσταται σαφές εάν αυτά οφείλονται στο ίδιο το ALA ή στο EPA, προϊόν μεταβολισμού ALA. Σε μελέτη στην οποία τα άτομα κατανάλωναν διατροφή με χαμηλά λιπαρά, συμπεριλαμβανομένων λιπαρών ψαριών σε καθημερινή βάση (παρέχοντας 1,2 g EPA και DHA/ημέρα) βρέθηκε μειωμένη παραγωγή TNF, IL-1 και IL-6 (Meydani *et al.*, 1991). Επιπλέον, παρεντερική χορήγηση ιχθυελαίου μείωσε τις συγκεντρώσεις TNF-α και IL-6 στον ορό σε ασθενείς μετά από μείζονα κοιλιακή χειρουργική επέμβαση σε σύγκριση με την παρεντερική διατροφή πλούσια σε ω-6 PUFA (Wachtler *et al.*, 1997). Σε αντίθεση με αυτές τις παρατηρήσεις, ορισμένες μελέτες που παρείχαν από 0,55 έως 3,4 g EPA και DHA/ημέρα απέτυχαν να αναδείξουν μια επίδραση του ιχθυελαίου στην παραγωγή TNF, IL-1 και IL-6 (Schmidt *et al.*, 1996, Blok *et al.*, 1997, Yaqoob *et al.*, 2000).



Μελέτες σε τρωκτικά αποκαλύπτουν σημαντικές αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις του χορηγούμενου μέσω της διατροφής ιχθυελαίου. Η χορήγηση ιχθυελαίου μείωσε την *ex vivo* παραγωγή TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IL-6 σε μακροφάγα τρωκτικών και σε μονοκύτταρα (Yaqoob & Calder, 1995, Renier *et al.*, 1993). Σε σύγκριση με την χορήγηση ελαίου ατρακτυλίδας, αυτή του ιχθυελαίου είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερες συγκεντρώσεις TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IL-6 στο πλάσμα μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση ενδοτοξίνης σε ποντίκια (Sadeghi *et al.*, 1999). Επιπλέον, η παρεντερική χορήγηση ιχθυελαίου μείωσε τις συγκεντρώσεις στον ορό αρουραίων σε TNF- $\alpha$ , IL-6 και IL-8 σε σύγκριση με την παρεντερική διατροφή πλούσια σε n-6 PUFA (Tashiro *et al.*, 1998, Hayashi *et al.*, 1998). Επίσης, μελέτες απέδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα ιχθυελαίου μείωσαν την έκφραση του υποδοχέα IL-2 σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή IL-2 και IFN- $\gamma$  (Sanderson *et al.*, 1995, Jolly *et al.*, 1998).

Συμπερασματικά, η επίδραση διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης ελαιούχων σπερμάτων (όπως τα σπέρματα καμελίνας) και μικροφυκών (όπως η σπιρουλίνα) και πιο συγκεκριμένα των βιολειτουργικών συστατικών στα σιτηρέσια των γαλακτοπαραγωγών προβατινών και επί της έμφυτης ανοσίας τους δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς.

Αποτελέσματα πειραματισμών της επίδρασης των ελαιούχων σπερμάτων, των μικροφυκών και των PUFA στο ανοσοποιητικό σύστημα συνοψίζονται στον Πίνακα 2.5.

**Πίνακας 2.5.** Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης των ελαιούχων σπερμάτων, των μικροφυκών και των PUFA στο ανοσοποιητικό σύστημα

Επέμβαση	Ζώα	Στόχος	Αποτέλεσμα	Μελέτη
Εξωθημένα σπέρματα λιναριού	Προβατίνες	Αξιολόγηση έμφυτης ανοσίας και παραγωγή αντισωμάτων	↑Παραγωγή αντισωμάτων κατά της <i>Salmonella enterica</i> subsp. και <i>Abortusovis</i>	Acuti <i>et al.</i> , 2012
Έλαιο καμελίνας	Μπακαλιάρος Ατλαντικού	Αξιολόγηση της αντι-ικτής έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης	Μικρή αύξηση στη έκφραση των <i>LGP2</i> , <i>STAT1</i> , <i>IRF1</i> , <i>ISG15</i> και <i>viperin</i>	Booman <i>et al.</i> , 2014
Σπέρματα ηλιανθου	Αγελάδες	Έκφραση προ- και αντιφλεγμονωδών γονιδίων κυτταροκινών στα κύτταρα του ενδομητρίου	NS	Salehi <i>et al.</i> , 2016
Σπέρματα σησάμου	Αίγες	Αξιολόγηση έμφυτης ανοσίας	↓ <i>MAPK1</i> , ↓ <i>IL6</i> , ↓ <i>TRIF</i> , ↓ <i>IFNG</i> , ↓ <i>TRAF3</i> , ↓ <i>JUND</i> , ↓ <i>IFNG</i> , ↓ <i>TRAF3</i>	Mitsiopoulou <i>et al.</i> , 2021b
<i>Chlorella</i>	Ιχθύες	Γονιδιακή έκφραση ανοσοποιητικού	Θετική επίδραση στην έκφραση των IL-1β, TNF-α και TGF-β1	Zahran <i>et al.</i> , 2019, Mahmoud <i>et al.</i> , 2020
Σπιρουλίνα	Άνθρωποι	<i>In vitro</i> αξιολόγηση έκκρισης κυτταροκινών	↑IFNG, ↑IL1B, ↑IL4	Mao <i>et al.</i> , 2000
Σπιρουλίνα	Ιχθύες	Αξιολόγηση έκφρασης γονιδίων ανοσοποιητικού συστήματος	↑TNFA	Mahmoud <i>et al.</i> , 2018, Sheikhzadeh <i>et al.</i> , 2019, Hassan <i>et al.</i> , 2021

Σπιρουλίνα	Αγελάδες	Αντιφλεγμονώδη γονιδιακή έκφραση	NS	Keller <i>et al.</i> , 2021
<i>Schizochytrium sp</i>	Αίγες	Αξιολόγηση έμφυτης ανοσίας	↓ <i>TLR4</i> , ↓ <i>MYD88</i> , ↓ <i>MAPK</i> , ↓ <i>IRF3</i> , ↓ <i>IFNG</i> , ↓ <i>IL1B</i> , ↓ <i>IL2</i> , ↓ <i>IL8</i> , ↓ <i>TNF</i> , ↓ <i>CCL5</i> , ↓ <i>CXCL16</i>  ↑ <i>MAPK</i> , ↑ <i>IL1B</i> ,	Mavrommatis <i>et al.</i> , 2021b
ALA	Άνθρωποι	Αξιολόγηση ανοσοποιητικού συστήματος	↓ <i>IL1B</i> , ↓ <i>TNFA</i>	Caughey <i>et al.</i> , 1996
Ιχθυέλαιο	Άνθρωποι	Αξιολόγηση ανοσοποιητικού συστήματος	↓ <i>TNF-α</i> , ↓ <i>IL-1β</i> , ↓ <i>IL-6</i>	Yaqoob & Calder, 1995, Renier <i>et al.</i> , 1993
Ιχθυέλαιο EPA, DHA	Άνθρωποι	Αξιολόγηση ανοσοποιητικού συστήματος	↓ <i>TNF</i> , ↓ <i>IL-1</i> , ↓ <i>IL-6</i>	Caughey <i>et al.</i> , 1996, Meydani <i>et al.</i> , 1991, Gallai <i>et al.</i> , 1993
Ιχθυέλαιο	Άνθρωποι	Αξιολόγηση ανοσοποιητικού συστήματος	↓ <i>TNF-α</i> , ↓ <i>IL-6</i>	Wachtler <i>et al.</i> , 1997
EPA, DHA	Άνθρωποι	Αξιολόγηση ανοσοποιητικού συστήματος	NS	Schmidt <i>et al.</i> , 1996, Blok <i>et al.</i> , 1997, Yaqoob <i>et al.</i> , 2000

## 2.4. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΧΕΙΡΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΚΑΙ ΟΙ ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η Μ.Κ. παρέχει το απαραίτητο περιβάλλον και «φιλοξενεί» ένα πολύπλοκο οικοσύστημα με μεγάλη ποικιλία προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών μικροοργανισμών που επιτρέπουν στα μηρυκαστικά μέσω συμβιωτικών σχέσεων και της στενής αλληλεπίδρασης αναερόβιων βακτηρίων, πρωτόζωων, μυκήτων, μεθανοβακτηρίων, αρχαίων και βακτηριοφάγων, τη διάσπαση των ζωοτροφών και την αφομοίωση των καταναλωθέντων συστατικών, παρέχοντας παράλληλα μεταβολική ενέργεια στον ξενιστή (Huws *et al.*, 2018). Οι μικροοργανισμοί αυτοί διασπούν όλα τα συστατικά της τροφής, με χαρακτηριστικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην αποδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων, των μη δομικών υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπαρών ουσιών. Οι ζυμωτικές διεργασίες που πραγματοποιούνται στη Μ.Κ. θεωρούνται επωφελείς από πολλές απόψεις, ωστόσο, δεν πρέπει να παραβλέπουμε τις επιπτώσεις στο περιβάλλον. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στα μεθανοβακτήρια καθώς είναι αυτά που χρησιμοποιούν τα αναγωγικά ισοδύναμα που προέρχονται από τις ζυμωτικές διεργασίες της Μ.Κ. για να μειώσουν το διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ), το μυρμηκικό οξύ ή τις μεθυλαμίνες σε  $\text{CH}_4$  (Patra *et al.*, 2017). Η έρευνα για τα μεθανοβακτήρια της Μ.Κ. έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον επειδή η εκπομπή  $\text{CH}_4$  από τα μηρυκαστικά συμβάλλει σε μία από τις παγκόσμιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις της κτηνοτροφίας που είναι η απελευθέρωση αερίων του θερμοκηπίου (Greenhouse Gas Emissions, GHG) στην ατμόσφαιρα, ιδίως του  $\text{CH}_4$ , ενός αερίου υπεύθυνου για το 20 % της υπερθέρμανσης του πλανήτη που παράγεται από όλα τα GHG (Patra, 2016, Tullo *et al.*, 2019). Εκτιμάται ότι η εκτροφή των παραγωγικών ζώων αντιπροσωπεύει περίπου το 16 % των εκπομπών ανθρωπογενών GHG, με τα δύο τρίτα των συνολικών εκπομπών αυτών των αερίων του θερμοκηπίου να παράγονται από τα μηρυκαστικά. Δυστυχώς, η συμβολή των εκτροφών αυτών αναμένεται τα επόμενα χρόνια να αυξηθεί δραματικά λόγω της πληθυσμιακής αύξησης και της αύξησης των απαιτήσεων των καταναλωτών για κτηνοτροφικά προϊόντα και ζωική πρωτεΐνη (Patra, 2016). Ενώ έχουν προταθεί διάφορες στρατηγικές για τη βελτιστοποίηση της χρήσης ενέργειας και αζώτου από τα μηρυκαστικά, μια καλύτερη κατανόηση των βασικών μικροοργανισμών που εμπλέκονται και των δραστηριοτήτων τους είναι απαραίτητη για τον επιτυχημένο χειρισμό των διεργασιών που πραγματοποιούνται στη Μ.Κ. Η διατροφή είναι ο πιο προφανής παράγοντας που επηρεάζει τον μικροβιακό πληθυσμό της Μ.Κ. και τις ζυμώσεις που πραγματοποιούνται σε αυτή.

#### 2.4.1. Οι μικροοργανισμοί της μεγάλης κοιλίας

Στα μηρυκαστικά ζώα, συμβιωτικοί μικροοργανισμοί υδρολύουν τους υδατάνθρακες των ζωοτροφών με αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας τόσο για αυτούς, όσο και για το ζώο ξενιστή (Henderson *et al.*, 2015). Η Μ.Κ. φιλοξενεί ένα πολύπλοκο βιολογικό δίκτυο. Μερικοί από αυτούς τους μικροοργανισμούς αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους συνεργατικά με σκοπό την παραγωγή ενέργειας, παράγοντας ταυτόχρονα ενεργά κυτταρινολυτικά ένζυμα ικανά να υποστηρίξουν την πέψη του ξενιστή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των πτητικών λιπαρών οξέων (volatile fatty acids, VFAs), μυρμηκικού οξέος, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> και CH<sub>4</sub> (Krause *et al.* 2003). Τα τρία κύρια VFAs είναι το προπιονικό, το βουτυρικό και το οξικό και απαντώνται σε μέσα ποσοστά 65, 21 και 14 % αντίστοιχα. Η σπουδαιότητα των VFAs έγκειται στο γεγονός ότι επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της χρησιμοποίησης της ενέργειας, τη σύνθεση των κτηνοτροφικών προϊόντων καθώς επίσης και την παραγωγή αερίων όπως CO<sub>2</sub> και CH<sub>4</sub> τα οποία απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Για πολλά χρόνια, οι διατροφολόγοι, μικροβιολόγοι και φυσιολόγοι μελετούν τη Μ.Κ. με σκοπό τη μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας και τη βελτίωση της συνολικής υγείας των ξενιστών μέσω της αξιοποίησης αυτής και του μικροβιακού της οικοσυστήματος. Δίχως την παρουσία των μικροοργανισμών της Μ.Κ. ή μέσω διαταραχών του οικοσυστήματος της Μ.Κ. δύναται να προκληθούν επιβλαβείς επιπτώσεις στην παραγωγικότητα και την υγεία των μηρυκαστικών. Επομένως, μία επιστημονική προσέγγιση με στόχο την αλλαγή του οικοσυστήματος της Μ.Κ. λόγω χάριν με σκοπό τη μείωση των εκπομπών του μεθανίου είναι σημαντική πρόκληση και πρέπει πάντα να λαμβάνει υπόψιν τη διασφάλιση της υγείας και της παραγωγικότητας των ζώων. Αρκετοί από τους μικροοργανισμούς αποικίζουν, αναπτύσσονται και θεωρούνται αυτόχθονες. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί συνυπάρχουν σε αρμονία με τον ξενιστή. Επίσης, η μικροβιακή χλωρίδα της Μ.Κ. περιλαμβάνει μικροοργανισμούς οι οποίοι είναι αλλόχθονες. Αυτοί από τη μεριά τους, δεν αποικούν και αναπτύσσονται, είναι αδρανείς και σε κίνηση. Προέρχονται σε μεγάλο βαθμό από την κατάποση της τροφής και του νερού και σε μικρότερο βαθμό από κάποιον άλλο βιότοπο ξενιστή (π.χ., δέρμα, αναπνευστική ή αναπαραγωγική οδό). Τα μη ενδογενή είδη, περιλαμβάνουν και ορισμένα βακτήρια του γαστρεντερικού συστήματος που δύνανται να επηρεάζουν τις πεπτικές διεργασίες, ακόμα και να προκαλούν λοιμώξεις.

Οι μικροοργανισμοί της Μ.Κ. μπορούν να κατανεμηθούν σε διαφορετικές λειτουργικές ομάδες, όπως τους: α) κυτταρινολυτικούς, β) αμυλολυτικούς και γ) πρωτεολυτικούς (Henderson *et al.*, 2015). Ο πληθυσμός των βακτηρίων κυμαίνεται από 16,2 μέχρι 40,6 δισεκατομμύρια για κάθε κυβικό εκατοστό (mL) του υγρού περιεχομένου της Μ.Κ. Η ταξινόμηση κατά Woese περιλαμβάνει ολόκληρο τον μικροβιακό πληθυσμό της Μ.Κ., μέλη τα οποία κατανέμονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: α) Ευβακτήρια (βακτήρια), β) Αρχαία (μεθανοβακτήρια) και γ) Ευκαρυωτικά (πρωτόζωα και μύκητες). Πιο συγκεκριμένα, στη Μ.Κ. βρίσκονται βακτήρια, βακτηριοφάγοι, πρωτόζωα και μύκητες (Nagaraja, 2006) (Πίνακας 2.6).

**Πίνακας 2.6.** Οι μικροοργανισμοί της μεγάλης κοιλίας

Μικροοργανισμοί	Τάξη	Συγκέντρωση ανά mL υγρού Μ.Κ.	Ποσοστό (%) του ολικού μικροβιακού πληθυσμού
Βακτήρια	Ευβακτήρια	$10^{10} - 10^{11}$	40 - 90
Μεθανοβακτήρια	Αρχαία	$10^5 - 10^8$	2 - 4
Βακτηριοφάγοι	-	$10^8 - 10^9$	< 0,1
Μύκητες	Ευκαρυώτες	$10^3 - 10^5$	3 - 4
Μαστιγωτά		$10^2 - 10^3$	
Βλεφαριδωτά		$10^4 - 10^6$	
Πρωτόζωα	Ευκαρυώτες	$10^5 - 10^6$	40 - 50

#### 2.4.1.1. Τα βακτήρια της μεγάλης κοιλίας

Η Μ.Κ. περιλαμβάνει διαφορετικά είδη βακτηρίων τα οποία συμμετέχουν ενεργά στην αποδόμηση των φυτικών ινών (κυτταρικών τοιχωμάτων) όπως αποδεικνύεται από τη συσχέτιση των βακτηρίων με μέρη τροφών. Τα βακτήρια κατέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού (40 - 90 %) (Πίνακας 2.6.) (Nagaraja, 2016). Ο πληθυσμός των βακτηρίων εξαρτάται από το είδος των ζώων, το είδος και τη χημική σύσταση των χορηγούμενων ζωοτροφών, τη συχνότητα της χορήγησης της τροφής και ποικίλους άλλους παράγοντες (Agarwal *et al.*, 2015). Η πλειονότητα των βακτηρίων είναι αυστηρά αναερόβια και είναι κυρίως αρνητικά κατά Gram. Ορισμένα είδη, όπως το *Butyrivibrio fibrisolvens*, έχουν δομημένο κυτταρικό τοίχωμα όπως αυτό των θετικά κατά Gram, αλλά το κυρίως στέλεχος είναι κυρίως αρνητικό. Το ποσοστό των θετικών κατά Gram εμφανίζεται αυξημένο σε ζώα που στα σιτηρέσιά τους ενσωματώνονται δημητριακοί καρποί (20 - 30 %) (Nagaraja, 2016).

Μόνο 15 - 20 γένη απαντώνται σε αξιοσημείωτα μεγάλη κλίμακα ( $> 10^6$  κύτταρα/mL Υ.Μ.Κ.), προκειμένου να πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε διεργασία στη Μ.Κ. Ωστόσο, μόλις ενσωματωθεί μία νέα ζωοτροφή στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών, ο πληθυσμός των βακτηρίων δύναται να αυξηθεί σημαντικά και να τροποποιήσει τη διαδικασία των ζυμώσεων που πραγματοποιείται προκειμένου η νέα αυτή ζωοτροφή να αποδομηθεί και να αξιοποιηθεί.

Σύμφωνα με μελέτες που αφορούσαν την εις βάθος κατανόηση και τον χειρισμό της Μ.Κ., η βακτηριακή ποικιλομορφία δεν σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το είδος του ζώου, αλλά πολύ περισσότερο με το είδος της διατροφής και τη γεωγραφική διαφοροποίηση. Για παράδειγμα, συγκεκριμένες ομάδες βακτηρίων όπως των υπεύθυνων για την αποδόμηση των ταννινών ή της μιμοζίνης, βρίσκονται σε πολύ χαμηλό ποσοστό, αλλά μόλις ενσωματωθούν σχετικές ζωοτροφές στα σιτηρέσια, ο εν λόγω πληθυσμός δύναται να αυξηθεί σε αξιοσημείωτο βαθμό, και ολόκληρο το οικοσύστημα στη Μ.Κ. αρχίζει να λειτουργεί αποτελεσματικά για την αξιοποίηση της νέας προσληφθείσας ζωοτροφής (Agarwal *et al.*, 2015).

Επίσης, τα βακτήρια ταξινομούνται σε επιμέρους τρεις κατηγορίες: η πρώτη κατηγορία αφορά στα βακτήρια που είναι προσκολλημένα στις ζωοτροφές και αποτελούν την πλειονότητα με ποσοστό που ανέρχεται στο 70 %, η δεύτερη κατηγορία είναι τα βακτήρια που βρίσκονται στο υγρό της Μ.Κ. και απαντώνται σε ποσοστό 30 % και τέλος, τα βακτήρια που είναι προσκολλημένα στο επιθήλιο τα οποία εμπλέκονται στη διατήρηση των ευνοϊκών συνθηκών της Μ.Κ., αλλά όχι και στη διαδικασία της πέψης (Nagaraja, 2016).

#### **2.4.1.2. Τα μεθανοβακτήρια της μεγάλης κοιλίας**

Τα μεθανοβακτήρια είναι μέλη της τάξης των Αρχαίων και διαφέρουν φυλογενετικά από τα βακτήρια, τα πρωτόζωα και τους μύκητες. Ο πληθυσμός των μεθανοβακτηρίων κυμαίνεται από  $10^5$  -  $10^8$ /mL υγρού της Μ.Κ. ή αλλιώς αποτελούν το 2 - 4 % του ολικού μικροβιακού πληθυσμού της Μ.Κ. Αρχικά τα μεθανοβακτήρια είχαν ομαδοποιηθεί με την τάξη των βακτηρίων αλλά στη συνέχεια, λόγω της πολύπλοκης δομής του κυτταρικού τους τοιχώματος καθώς και λόγω της αλληλούχισης του 16S RNA που πραγματοποιήθηκε, ταξινομήθηκαν στην τάξη των Αρχαίων (Woese & Fox, 1977). Τα μεθανοβακτήρια, όπως εύκολα μπορεί να γίνει συσχέτιση λόγω της ονομασίας τους, είναι μία μοναδική ομάδα μικροοργανισμών που παράγουν  $\text{CH}_4$  ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού τους (Agarwal *et al.*, 2015).

Τα μεθανοβακτήρια, είναι ιδιαίτερης σπουδαιότητας όσον αφορά τη Μ.Κ. καθώς είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση των ζυμωτικών διεργασιών σε αυτή. Κατά τη ζύμωση των μονοσακχαριτών στη Μ.Κ., παράγεται  $H_2$  το οποίο μετέπειτα χρησιμοποιείται για την παραγωγή  $CH_4$  στη Μ.Κ. (Agarwal *et al.*, 2015). Επίσης, πέραν του  $H_2$ , για την παραγωγή  $CH_4$ , η πλειοψηφία των μεθανοβακτηρίων χρησιμοποιεί ως πηγή ενέργειας και το μυρμηκικό οξύ (Patra *et al.*, 2017).

Λόγω αλλαγών που οφείλονται στη μεθανογένεση που πραγματοποιείται στη Μ.Κ. και εξαιτίας της επίδρασής τους στην επιβάρυνση του περιβάλλοντος, τα μεθανοβακτήρια έχουν αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία ως προς τη μελέτη τους από την επιστημονική κοινότητα (Agarwal *et al.*, 2015). Τα μεθανοβακτήρια ανήκουν σε πέντε κύρια γένη: α) Methanobacteriales, β) Methanococcaeales, γ) Methanomicrobiales, δ) Methanosacrinales και ε) Methanopyrales. Επίσης ανήκουν σε επτά είδη: *Methanobacterium formicium*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanoculleus olentangyi* και *Methanosarcina barkeri* (Agarwal *et al.*, 2015).

Στη Μ.Κ., ορισμένα από τα μεθανοβακτήρια, συνυπάρχουν με συμβιωτικές σχέσεις με τα πρωτόζωα (Tymensen *et al.*, 2012). Επίσης, πρόσφατα αναφέρθηκε ότι συσχετίζονται και με αναερόβιους μύκητες (Jin *et al.*, 2014).

Η παραλλακτικότητα του πληθυσμού των μεθανοβακτηρίων οφείλεται κυρίως στις επιμέρους διαφορές στη διατροφή και στη γεωγραφική ποικιλομορφία και απαντάται μόνο με τη μορφή αλλαγών μεταξύ των διαφορετικών ειδών των μεθανοβακτηρίων (Agarwal *et al.*, 2015). Η κατανομή των μεθανοβακτηρίων μεταξύ των διαφορετικών ειδών μηρυκαστικών ζώων είναι σχεδόν πανομοιότυπη, με τη μόνη διαφοροποίηση να εμφανίζεται στην πυκνότητα των διαφορετικών ειδών μεθανοβακτηρίων. Οποιαδήποτε παραλλακτικότητα μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών μεθανοβακτηρίων οφείλεται, κυρίως, στη διατροφή των ζώων, σε μικρότερο βαθμό στη γεωγραφική περιοχή καθώς και σε συγκεκριμένο βαθμό στη ροή των τροφών στην εκάστοτε διαφορετική περιοχή (Agarwal *et al.*, 2015).

#### **2.4.1.3. Τα πρωτόζωα της μεγάλης κοιλίας**

Τα πρωτόζωα αποτελούν το 50 % του μικροβιακού πληθυσμού της Μ.Κ. και είναι οι πρώτοι μικροοργανισμοί που έγιναν γνωστοί από τους Gruby και Delafond (1843). Όπως ακριβώς και με τα βακτήρια, τα πρωτόζωα είναι αναερόβιοι μικροοργανισμοί και διακρίνονται σε δύο



κατηγορίες: τα βλεφαριδωτά και τα μαστιγωτά. Η πλειοψηφία των πρωτόζωων είναι βλεφαριδωτά. Τα βλεφαριδωτά διαχωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες με βάση τα μορφολογικά και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Η πρώτη είναι τα ολότριχα τα οποία ανήκουν στην τάξη των *Trichostomatida*. Στην υποκατηγορία αυτή διακρίνονται δύο κύρια γένη: τα *Isotricha* και τα *Dasytricha*. Τα βλεφαριδωτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πέψη των κυτταρικών τοιχωμάτων. Τα πρωτόζωα παράγουν τελικά προϊόντα ζύμωσης παρόμοια με αυτά των βακτηρίων και συγκεκριμένα το οξικό, το βουτυρικό και  $H_2$ . Συγκεκριμένα, τα βακτήρια της Μ.Κ. προσκολλώνται και συμβιώνουν στην επιφάνεια των πρωτόζωων με σκοπό την άμεση πρόσβαση σε  $H_2$ . Επίσης, χρησιμοποιούν μεγάλες ποσότητες αμύλου το οποίο μπορούν να αποθηκεύσουν, κάτι το οποίο δύναται να επιβραδύνει την παραγωγή οξέων ικανών να μειώσουν το pH της Μ.Κ., ωφελώντας με αυτό τον τρόπο την ίδια τη Μ.Κ. Τα πρωτόζωα, σε αντίθεση με τα βακτήρια, πολλαπλασιάζονται πολύ πιο αργά, κάτι που αιτιολογείται από το γεγονός ότι τα πρώτα παραμένουν στα χαμηλότερα στρώματα της Μ.Κ., προκειμένου να μπορούν να πολλαπλασιαστούν. Ένα σιτηρέσιο με χαμηλή περιεκτικότητα σε χονδροειδείς ζωοτροφές (XZ), μειώνει την κατακράτηση των κυτταρικών τοιχωμάτων στη Μ.Κ., επομένως και τον αριθμό των πρωτόζωων.

Το ενζυμικό προφίλ των ολότριχων, αποδεικνύει την ύπαρξη αμυλάσης, ιμπερτάσης, πηκτινестεράσης και πολυγαλακτουρονάσης σε επαρκείς μεγάλες ποσότητες, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το άμυλο, οι πηκτίνες, και τα διαλυτά σάκχαρα ως πηγή ενέργειας (Williams 1979). Επίσης, στα ολότριχα απαντώνται και τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη ζύμωση των κυτταρινών και των ημικυτταρινών, βέβαια σε πολύ μικρότερη ποσότητα από ότι στα ενδοδημορφίδια πρωτόζωα. Τα ενδοδημορφίδια συγκεκριμένα, έχουν και υψηλή δραστηριότητα αμυλολυτικών ενζύμων. Παρόλα αυτά, δεν συμβάλουν στον ίδιο βαθμό με τα βακτήρια στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών (Nagaraja, 2016). Τα ολότριχα, είναι πρωτεολυτικά και παράγουν αμμωνία και ΛΟ ως τελικά προϊόντα.

#### **2.4.1.4. Οι βακτηριοφάγοι της μεγάλης κοιλίας**

Οι βακτηριοφάγοι, συχνά αναφερόμενοι και ως φάγοι, είναι από τα πιο σημαντικά στοιχεία του μικροβιακού πληθυσμού της Μ.Κ. και βρίσκονται σε συγκέντρωση  $10^{11} - 10^{12}/mL$  του υγρού της Μ.Κ. Θεωρούνται παθογόνοι για τα βακτήρια, καθώς είναι ιοί οι οποίοι έχουν την ιδιότητα να τα μολύνουν και να τα διασπούν. Επίσης, βοηθούν στον κύκλο εργασιών της Μ.Κ., κάτι το οποίο

μπορεί να μη βοηθά τα ζώα σε διαφορετικές διατροφικές συνθήκες (Klieve & Swain, 1993), αλλά μέσω διάσπασης των βακτηριακών κυττάρων, η βακτηριακή πρωτεΐνη εύκολα μετατρέπεται σε πηγή αμινοξέων. Η εξειδίκευση των βακτηριοφάγων μπορεί να αποδειχθεί από το γεγονός ότι για συγκεκριμένα βακτήρια της Μ.Κ., μπορεί να αξιοποιηθούν για απόσυρση ή εξόντωση μέσω διάσπασης, συγκεκριμένων ανεπιθύμητων για το οικοσύστημα της Μ.Κ. βακτηρίων, όπως τα μεθανοβακτήρια και *Streptococcus bovis* (Klieve *et al.*, 1999; Bach *et al.*, 2002). Τεχνικές *in vitro* χρησιμοποιούνται για να δώσουν περαιτέρω πληροφορίες αναφορικά με το γενετικό σχεδιασμό και τη γονιδιακή λειτουργικότητα των αρχαίων, συγκεκριμένα των μεθανοβακτηρίων, και των φαγών. Παρά την έλλειψη γνώσης, οι φάγοι στα μηρυκαστικά και τα ένζυμα τους που εμπλέκονται στη διάσπαση του κυττάρου ξενιστή είναι ιδιαίτερης σπουδαιότητας σε σχέση με τον έλεγχο τόσο του πληθυσμού των μεθανοβακτηρίων αλλά και άλλων μελών του μικροβιακού πληθυσμού της Μ.Κ. Επιπλέον, είναι δυνατό να αναγνωρίσουν βασικά ένζυμα στόχους του ξενιστή τα οποία είναι ευαίσθητα στην αναστολή από πρωτεϊνικούς φάγους.

#### **2.4.1.5. Οι μύκητες της μεγάλης κοιλίας**

Η Μ.Κ. είναι μια «αποθήκη» αναερόβιων μυκήτων που δεν βρίσκονται αλλού και παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην αποδόμηση των λιγνοκυτταρινικών συστατικών των ζωοτροφών (Choudhury *et al.*, 2015). Αποτελούν το μικρότερο σε αριθμό ποσοστό αντιπροσωπεύοντας περίπου το 20 % (Rezaeian *et al.* 2004) της μικροβιακής βιομάζας της Μ.Κ. αλλά θεωρούνται οι περισσότερο αποτελεσματικοί για την αποδόμηση κυτταρινών (Akin *et al.* 1988). Σύμφωνα με το πρόσφατο σύστημα ταξινόμησης (Hibbett *et al.* 2007), οι αναερόβιοι μύκητες έχουν περιγραφεί στην τάξη *Neocallimastigales*, κλάσης *Neocallimastigomycetes* και φύλο *Neocallimastigomycota* (Dagar *et al.* 2011, Sirohi *et al.* 2013, Gruninger *et al.* 2014). Ο θαλλός μπορεί να είναι μονοκεντρικός (μονό αναπαραγωγικό σώμα, δηλ. σποράγγιο από απλό ζωοσπόριο) ή πολυκεντρικό (πολλά σποραγγεία από μεμονωμένα ζωοσπόρια) (Ho, 1995). Αυτές οι μορφές καθορίζονται στα πρώτα στάδια ανάπτυξης, αμέσως μετά τη ζωοσπορογένεση.

Με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά οι μύκητες ταξινομούνται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες: τους ζυμομύκητες (μονοκύτταροι) και τους μυκηλιακούς μύκητες (πολυκύτταροι) (Nagaraja, 2016). Οι ζυμομύκητες είναι προαιρετικά αερόβιοι ή αναερόβιοι, ενώ δεν εμπλέκονται στη διαδικασία της πέψης. Αντίθετα, οι μυκηλιακοί μύκητες είναι αναερόβιοι,

αυτόχθονες και συνεισφέρουν στη διαδικασία της πέψης στη Μ.Κ. Η συνεισφορά των μυκήτων στην πέψη των τροφών είναι δύσκολο να αξιολογηθεί λόγω του βιολογικού τους κύκλου (Nagaraja, 2016). Η επίδρασή τους έγκειται στη συνεισφορά τους στην πέψη και τη ζύμωση των υδατανθράκων μέσω της παραγωγής υδρολυτικών ενζύμων τα οποία ανήκουν στις κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, αμυλάσες και πρωτεάσες και κρίνονται απαραίτητα για την αποδόμηση των φυτικών βιομαζών (Nagaraja, 2016). Οι μύκητες της Μ.Κ. συμμετέχουν στην παραγωγή μυρμηκικού οξέος και  $H_2$ , κύριων πρόδρομων ενώσεων των μεθανοβακτηρίων, μεταβολίζοντας εξόζες και πεντόζες. Σιτηρέσια βασισμένα σε ΧΖ κυρίως χαμηλής ποιότητας, αυξάνουν τον πληθυσμό των μυκήτων της Μ.Κ., οι οποίοι συνεισφέρουν στην πέψη των ινωδών ουσιών (Nagaraja, 2016).

Τα ζωοσπόρια μπορεί να είναι οπίσθια μη μαστιγωτά ή πολυμαστιγωτά και στις δύο μορφές. Ο κύκλος ζωής των αναερόβιων μυκήτων είναι δίχως φύλο και έχουν παρατηρηθεί μόνο μιτωτικές πυρηνικές διαιρέσεις (Heath *et al.* 1986). Μεταβάλλεται μεταξύ ενός κινητικού ζωοσπορίου, του εγκυστωμένου ζωοσπορίου και του βλαστικού ζωοσποραγγίου σταδίου. Μόλις απελευθερωθούν από το ζωοσποράγγιο, τα κινητά ζωοσπόρια κινούνται με χημειοταξία για να αποικίσουν το κυτταρινικό περιεχόμενο και να αποβάλλουν το φλοιό τους για να μετατραπεί σε κύστη (εγκύστωση). Η κύστη βλασταίνει παράγοντας έναν βλαστικό σωλήνα, ο οποίος τελικά δημιουργεί ένα ριζοειδές σύστημα. Σε μονοκεντρικές μορφές, η ανάπτυξη μπορεί περαιτέρω να ταξινομηθεί ως ενδογενής ή εξωγενής (Sirohi *et al.* 2012).

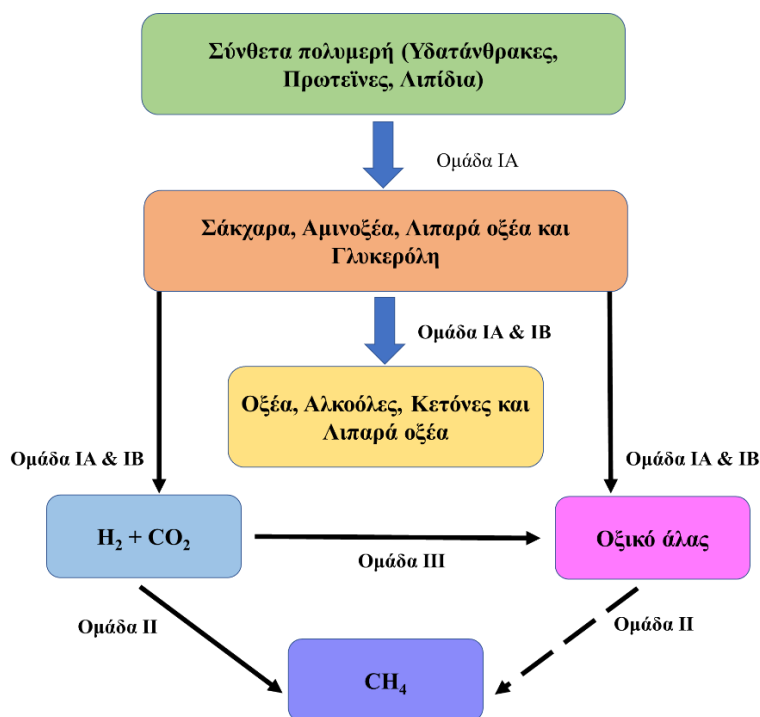
#### **2.4.2. Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις στη μεγάλη κοιλία**

Η αποδόμηση των ζωοτροφών στη Μ.Κ. είναι το αποτέλεσμα συντονισμένων δραστηριοτήτων του υπάρχοντος μικροβιακού πληθυσμού. Στη Μ.Κ. επικρατούν ανταγωνιστικές σχέσεις μεταξύ των μικροοργανισμών, για τα θρεπτικά συστατικά και για χωροταξικούς λόγους. Επομένως, δεν προκαλεί ιδιαίτερη έκπληξη το γεγονός ότι υπάρχουν διαφορετικοί τύποι αλληλεπιδράσεων μεταξύ του πληθυσμού. Μία αξιοσημείωτη αλληλεπίδραση που υφίσταται είναι η διασταυρωμένη τροφοδοσία (cross-feeding) μεταξύ μικροβίων που οδηγεί σε μία σχετικά πιο πλήρη αξιοποίηση των ζωοτροφών ως προς την παραγωγή των τελικών προϊόντων ζύμωσης, αυτών των VFAs οξέων καθώς και την παραγωγή  $CH_4$ . Τα κύρια συστατικά των ζωοτροφών για τα μηρυκαστικά είναι οι κυτταρίνες, οι ημικυτταρίνες, οι πηκτίνες, το άμυλο, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια (Nagaraja, 2016).

Με βάση τον τύπο των μεταβολιστέων υποστρωμάτων, ο μικροβιακός πληθυσμός της Μ.Κ., μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις μεταβολικές ομάδες (Σχήμα 2.5.) (Nagaraja, 2016). Η πρώτη περιλαμβάνει τα ζυμωτικά ή τα υδρολυτικά βακτήρια, πρωτόζωα, και μύκητες, τα οποία από τη μεριά τους διασπούν σύνθετα πολυμερή (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λιπίδια) αρχικά σε ολιγομερή και μονομερή και στη συνέχεια σε οξέα, κυρίως σε οξικό, προπιονικό και βουτυρικό, σε αλκοόλες (αιθανόλη και μεθανόλη) και σε αέρια (κυρίως  $H_2$  και  $CO_2$ ) (Nagaraja, 2016).

Μεταξύ των ζυμωτικών μικροοργανισμών, ορισμένα είναι ζυμωτικά πολυμερή (ΙΑ, Σχήμα 2.5.) τα οποία μπορούν να μετατρέψουν τα πολυμερή σε τελικά προϊόντα ζύμωσης και σε μονομερή (ΙΒ, Σχήμα 2.5.) τα οποία όμως δεν μπορούν να διασπάσουν τα πολυμερή αλλά μπορούν να χρησιμοποιήσουν μονομερή για την παραγωγή οξέων, αλκοολών και αερίων. Τα ζυμωτικά βακτήρια περιλαμβάνουν βακτήρια που αποδομούν τους υδατάνθρακες, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Η δεύτερη (ΙΙ) περιλαμβάνει τα αρχαία και τα μεθανοβακτήρια τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή του  $H_2$ , του  $CO_2$  ή του οξικού σε  $CH_4$ . Η Μ.Κ. περιέχει επίσης και μία ακόμη μεταβολική ομάδα βακτηρίων, τα ομοακετογόνα (ΙΙΙ), η οποία μπορεί να μετατρέψει τα  $H_2$  και  $CO_2$  σε οξικό (Σχήμα 2.5.). Τα ακετογόνα δεν είναι λειτουργικά στη Μ.Κ. καθώς δεν δύνανται να ξεπεράσουν ανταγωνιστικά τα μεθανοβακτήρια για  $H_2$  (Nagaraja, 2016).

Μία ακόμα σημαντική αλληλεπίδραση είναι ο «αρπακτικός» ρόλος που έχουν τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα, τα οποία τρέφονται με βακτήρια και μυκητιακά σπόρια. Εν απουσία βακτηρίων, τα βακτήρια και μυκητιακά σπόρια αυξάνονται κατά 10 έως και 100 φορές. Τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα εγκολπώνουν βακτήρια κάτι που εξυπηρετεί σαν κύρια πηγή αζώτου (Nagaraja, 2016).



**Σχήμα 2.5.** Μικροβιακή ταξινόμηση και στάδια των ζυμωτικών διεργασιών της Μ.Κ. (Προσαρμοσμένο από: Nagaraja, 2016)

### 2.4.3. Ζυμωτικές διεργασίες στη μεγάλη κοιλία

Οι ζυμωτικές διεργασίες στη Μ.Κ. μετατρέπουν την προσλαμβανόμενη τροφή σε πηγές ενέργειας για τον ξενιστή. Οι κυτταρίνες «ξύνουν» το τοίχωμα της Μ.Κ. για να ξεκινήσει μια σειρά συσπάσεων. Αυτές οι συσπάσεις οδηγούν σε μηρυκασμό, η οποία είναι η διαδικασία που διασπά με φυσικό τρόπο την πηγή των κυτταρινών. Στη συνέχεια, η τροφή αναρροφάται, αναμασάτε και καταπίνεται συνήθως 50 - 70 φορές κατά τη διάρκεια του μηρυκασμού πριν περάσει στο επόμενο διαμέρισμα του στομάχου. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί ζυμώνουν την τροφή και το νερό σε VFAs και αέρια ( $\text{CH}_4$  και  $\text{CO}_2$ ).

#### 2.4.3.1. Ζύμωση των υδατανθράκων

Οι υδατάνθρακες των ζωοτροφών περιλαμβάνουν τους πολυσακχαρίτες και τα απλά σάκχαρα. Οι πολυσακχαρίτες μπορεί να είναι δομικοί (κυτταρίνες, ημικυτταρίνες και πηκτίνη) ή μη δομικοί (άμυλο). Τα βακτήρια, τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα και οι μύκητες, παράγουν μια ποικιλία υδρολασών γλυκοζυλίου που διασπούν τους γλυκοσιδικούς δεσμούς για να παράγουν πρώτα ολιγοσακχαρίτες και μετά τους δι- και μονοσακχαρίτες. Το πρώτο βήμα στην αποδόμηση των

κυτταρινών είναι η προσκόλληση μικροοργανισμών στα σωματίδια της τροφής και η προσκόλληση γίνεται σε ορισμένες περιπτώσεις με τη μεσολάβηση και συμμετοχή ειδικής πρωτεΐνης δέσμευσης. Αρκετά είδη βακτηρίων και βλεφαριδωτών και όλα τα είδη μυκήτων της Μ.Κ. έχουν κυτταρινολυτική δράση. Τα τρία βακτηριακά είδη που θεωρούνται πιο άφθονα στη Μ.Κ. είναι τα *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* και *Ruminococcus flavefaciens*. Είναι ενδιαφέρον ότι και τα τρία δεν είναι πρωτεολυτικά (Πίνακας 2.7) (Nagaraja, 2016). Μερικά από τα μη κυτταρινολυτικά βακτήρια είναι ικανά να χρησιμοποιούν κυτταροδεξτρίνες που παράγονται από κυτταρινολυτικά βακτήρια. Τα κύρια κυτταρινολυτικά βακτήρια μπορούν επίσης να αφομοιώσουν τις ημικυτταρίνες και την πηκτίνη. Μη κυτταρινολυτικά βακτήρια που δύναται να πέσουν τις ημικυτταρίνες είναι τα *Prevotella* sp. (*P. albensis*, *P. brevis*, *P. bryanti* και *P. ruminicola*), *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* (Nagaraja, 2016). Τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται στην αποδόμηση των ημικυτταρινών είναι οι ενδοοξυλανάσες και αρκετά ένζυμα αποκλάδωσης με την αραβινοφουρανοσιδάση να είναι το πιο σημαντικό. Αν και η πηκτίνη είναι ένας δομικός πολυσακχαρίτης, αφομοιώνεται πλήρως στην Μ.Κ. Τα κύρια πηκτινολυτικά είδη βακτηρίων είναι: *Prevotella* sp., *Lachnospira multiparus*, *Streptococcus bovis* και *Trepnema* sp. (*T. bryantii* και *T. saccharophilum*). Αν και το είδος *Streptococcus bovis* είναι πηκτινολυτικό, δεν χρησιμοποιεί τα προϊόντα αποδόμησης της πηκτίνης (D-γαλακτουρονικό οξύ) (Πίνακας 2.7.) (Nagaraja, 2016). Παρομοίως, τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα μπορούν να διασπάσουν την πηκτίνη αλλά δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα προϊόντα. Το κυρίαρχο πηκτινολυτικό ένζυμο είναι η λυάση της πηκτίνης. Το άμυλο πέπτεται γρήγορα στη Μ.Κ. και ο βαθμός πέψης εξαρτάται από τον τύπο των δημητριακών καρπών και τον βαθμό επεξεργασίας αυτών. Τα κύρια αμυλολυτικά βακτηριακά είδη της Μ.Κ. είναι: *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis* και τα είδη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Πίνακας 2.7.). Τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται είναι η α-αμυλάση και το ένζυμο αποκλάδωσης, πουλουλανάση. Τα *Endodiniomorphid* πρωτόζωα καταβροχθίζουν τους κόκκους του αμύλου και τους ζυμώνουν αργά, γεγονός που κατά κάποιο τρόπο συμβάλλει στην επιβράδυνση του ρυθμού ζύμωσης του αμύλου στη Μ.Κ. Οι μύκητες έχουν τη δραστηριότητα της αμυλάσης αλλά πιστεύεται ότι συνεισφέρουν ελάχιστα επειδή ο πληθυσμός των μυκήτων μειώνεται στα ζώα που καταναλώνουν σιτηρά (Nagaraja, 2016).

Επίσης, πολλά από τα βακτήρια που ζυμώνουν πολυμερή, τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα και τους μύκητες, μπορούν να ζυμώσουν δισακχαρίτες και μονοσακχαρίτες που παράγονται από την αρχική υδρόλυση. Επιπλέον, η Μ.Κ. έχει ενεργά βακτήρια ζύμωσης σακχάρων που ανήκουν στα

γένη *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* και *Treponema*. Από αυτά, τα *Streptococcus bovis* και *Lactobacillus* sp. είναι σημαντικά λόγω της τάσης τους για εκρηκτική ανάπτυξη και παραγωγή γαλακτικού οξέος σε καταστάσεις όπου στη Μ.Κ. παρουσιάζονται αρκετοί ζυμωτικοί υδατάνθρακες. Ποσοτικά, η γλυκόζη και η ξυλόζη είναι τα κυρίαρχα σάκχαρα που παρουσιάζονται στα μικρόβια και οι οδοί Embden-Meyerhof ή μονοφωσφορικής εξόζης ή φωσφορικής πεντόζης τα μεταβολίζουν, με το πυροσταφυλικό ως το κύριο ενδιάμεσο προϊόν. Οι τύποι προϊόντων ζύμωσης που παράγονται από το πυροσταφυλικό εξαρτώνται από τους μικροοργανισμούς και τις συνθήκες που επικρατούν στη Μ.Κ., όπως το pH και οι ρυθμοί αραίωσης. Τα προϊόντα ζύμωσης που παράγονται στη Μ.Κ. περιλαμβάνουν ακετοΐνη, βουτανодиόλη, οξικό, μυρμηκικό, αιθανόλη, γαλακτικό, ηλεκτρικό, προπιονικό, βουτυρικό και βαλερικό. Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, το μυρμηκικό οξύ χρησιμοποιείται από τα μεθανοβακτήρια για την παραγωγή CH<sub>4</sub>. Το γαλακτικό και το ηλεκτρικό είναι ενδιάμεσα προϊόντα επειδή τα βακτήρια που χρησιμοποιούν γαλακτικό και ηλεκτρικό τα μεταβολίζουν περαιτέρω. Το ηλεκτρικό αποκαρβοξυλιώνεται σε προπιονικό και οι κύριοι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται είναι οι *Selenomonas*, γι' αυτό και το ηλεκτρικό δεν συσσωρεύεται στη Μ.Κ. Το γαλακτικό μεταβολίζεται σε οξικό, προπιονικό και βουτυρικό από δύο κύρια βακτήρια που χρησιμοποιούν γαλακτικό, τα *Megasphaera elsdenii* και *Selenomonas ruminantium*. Εάν ο ρυθμός παραγωγής γαλακτικού οξέος υπερβαίνει το ρυθμό ζύμωσης, τότε το γαλακτικό συσσωρεύεται στη Μ.Κ., μια κατάσταση που ονομάζεται γαλακτική οξέωση (Nagaraja, 2016).

#### **2.4.3.2. Ζύμωση των πρωτεϊνών και μη-πρωτεϊνικού αζώτου**

Πολλά από τα βακτήρια που ζυμώνουν υδατάνθρακες είναι επίσης πρωτεολυτικά. Τα πιο ενεργά πρωτεϊνολυτικά βακτηριακά είδη είναι: *Prevotella* sp., *Ruminobacter amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium* και *Megasphaera elsdenii* (Πίνακας 2.7.) (Nagaraja, 2016). Οι πρωτεΐνες διασπώνται σε πολυπεπίδια και στη συνέχεια σε βραχεία πεπίδια και αμινοξέα, ενώ ο ρυθμός διάσπασης των πεπτιδίων εξαρτάται από τη σύνθεση των αμινοξέων. Η πεπτιδική ζύμωση στη Μ.Κ. είναι μια διαδικασία δύο σταδίων. Στο πρώτο στάδιο, οι διπεπτιδυλικές πεπτιδάσες διασπώνται τα διπεπίδια και ακολουθείται διάσπαση των διπεπτιδίων σε αμινοξέα από τη διπεπτιδάση. Ένα κοινό βακτηριακό είδος που έχει αποδειχθεί ότι περιέχει υψηλή δραστηριότητα διπετιδυλοπεπτιδάσης είναι το *Prevotella ruminicola*. Η δραστηριότητα της διπεπτιδάσης έχει ανιχνευθεί σε πολλά βακτηριακά είδη και βλεφαριδωτά πρωτόζωα. Οι μύκητες της Μ.Κ. διαθέτουν επίσης αμινοπεπτιδασική δράση, αλλά η έκταση της συμβολής των

μυκήτων στη ζύμωση των πεπτιδίων δεν είναι γνωστή. Η Μ.Κ. έχει πολύ λίγα ελεύθερα αμινοξέα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αμινοξέα ζυμώνονται γρήγορα σε αυτή. Η απαμίνωση είναι πιθανώς ο πιο κοινός τρόπος ζύμωσης αμινοξέων και σχεδόν όλα τα πρωτεολυτικά βακτήρια εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία. Η Μ.Κ. έχει επίσης μια εξειδικευμένη ομάδα βακτηρίων που ονομάζονται «παραγωγοί υπεραμμωνίας» που δεν ζυμώνουν υδατάνθρακες, αλλά μπορούν να υδρολύσουν μικρά πεπτίδια και να απαμινώσουν τα αμινοξέα. Μέχρι στιγμής τέσσερα είδη έχουν αναγνωριστεί ως παραγωγοί υπεραμμωνίας: *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, *Clostridium aminophilum* και *Fusobacterium necrophorum*. Επομένως, η απαμίνωση των αμινοξέων στη Μ.Κ. μπορεί να πραγματοποιηθεί από βακτήρια που έχουν χαμηλή δραστηριότητα αλλά είναι άφθονα σε αριθμό ή από βακτήρια που δεν απαντώνται σε αφθονία αλλά έχουν υψηλή δραστηριότητα (Nagaraja, 2016). Τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην απαμίνωση. Η ουρία ζυμώνεται ταχέως στη Μ.Κ. και η πηγή της δραστηριότητας της ουρεάσης πιστεύεται ότι είναι τα επιδερμικά βακτήρια. Τα μικροβιακά είδη που εμπλέκονται στη ζύμωση των νουκλεϊκών οξέων ή των νιτρικών δεν είναι πλήρως γνωστά. Ούτε τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα ούτε οι μύκητες έχουν ουρεολυτική δραστηριότητα. Τα περισσότερα από τα βακτήρια της Μ.Κ. είναι ικανά να χρησιμοποιούν αμμωνία ως πηγή αζώτου. Επομένως, η υδρόλυση του μη πρωτεϊνικού αζώτου όπως η ουρία, τα νιτρικά ή τα νουκλεϊκά οξέα είναι ευεργετική για τις ζυμωτικές διεργασίες της Μ.Κ. Η γλουταμική αφυδρογονάση και η συνθετάση της γλουταμίνης είναι τα βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στην αφομοίωση της αμμωνίας από τα βακτήρια του μηρυκαστικού (Nagaraja, 2016).

#### **2.4.3.3. Ζύμωση των λιπών**

Τα κυρίαρχα λιπίδια στις τροφές μηρυκαστικών είναι τα γαλακτολιπίδια, τριγλυκερίδια και φωσφολιπίδια. Τα λιπίδια υδρολύονται ταχέως από τις λιπάσες ή εστεράσες που παράγονται από βακτήρια και τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα. Η συμβολή των μυκήτων στη ζύμωση των λιπιδίων δεν είναι γνωστή. Τα κύρια λιπολυτικά βακτήρια στη Μ.Κ. είναι τα *Anaerovibrio lipolytica* και *Butyrivibrio fibrisolvens* (Πίνακας 2.7) (Nagaraja, 2016). Ορισμένα στελέχη *Treponema* έχουν επίσης λιπολυτική δράση. Τα προϊόντα της λιπιδικής υδρόλυσης είναι η γλυκερίνη και τα ΛΟ και η γαλακτόζη στην περίπτωση των γαλακτολιπιδίων. Η γλυκερόλη ζυμώνεται ταχέως (*Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens* και *Selenomonas ruminantium*) σε οξικό, προπιονικό και βουτυρικό. Τα LCFA δεν αποδομούνται στη Μ.Κ. αλλά μπορεί να



ενσωματωθούν στα κυτταρικά λιπίδια από τα μικρόβια. Σε αναερόβια οικοσυστήματα εκτός του εντέρου, η οξείδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων πραγματοποιείται από βακτήρια που μειώνουν τα θειικά ή από μια εξειδικευμένη ομάδα βακτηρίων που ονομάζονται υποχρεωτικά ακετογόνα βακτήρια που παράγουν H<sub>2</sub> (αναγωγικά πρωτόνια). Στη Μ.Κ., η βιοϋδρογόνωση είναι η διαδικασία που υδρογονώνει τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (UFA). Τα δύο UFA στη διατροφή των μηρυκαστικών είναι το λινελαϊκό (*cis-9, cis-12 C18:2*) και το λινολενικό οξύ (*cis-9, cis-12, cis-15 C18:3*). Η προϋπόθεση για τη βιοϋδρογόνωση είναι το λιπαρό οξύ να έχει ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα. Τα UFA ισομερίζονται πριν από τη διαδοχική προσθήκη υδρογόνου για κορεσμό κάθε διπλού δεσμού για παραγωγή στεατικού οξέος (C18:0). Η βιοϋδρογόνωση οδηγεί σε ορισμένα παροδικά ενδιάμεσα προϊόντα και τα δύο από αυτά που έχουν λάβει μεγάλη προσοχή είναι το συζευγμένο λινολεικό οξύ (CLA) και τα *trans-10* και *-11* ΛΟ. Μια σειρά από θετικά οφέλη για την υγεία έχουν αποδοθεί στο CLA και τόσο το CLA όσο και τα *trans-* ΛΟ, ιδιαίτερα το *trans-10* αναστέλλουν τη λιπογένεση στους μαστικούς αδένες και είναι παράγοντες που συμβάλλουν σε κάτι το οποίο είναι ευρέως γνωστό και ως σύνδρομο μειωμένης λιποπεριεκτικότητας (milk fat depression - MFD) του γάλακτος (Nagaraja, 2016). Τόσο τα βακτήρια όσο και τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα εμπλέκονται στη βιοϋδρογόνωση. Ωστόσο, τα πρωτόζωα μπορεί να μην συμβάλλουν σημαντικά, επειδή η απομάκρυνσή τους (defaunation) μειώνει ελαφρώς τη βιοϋδρογόνωση. Τα βακτηριακά είδη που έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στη βιοϋδρογόνωση είναι τα *Butyrivibrio hungatei*, *Butyrivibrio proteoclasticus* (πρώην *Clostridium proteoclasticum*) και *Propionibacterium acnes*. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα ακόρεστα είναι πιο τοξικά από τα κορεσμένα ΛΟ για τους μικροοργανισμούς, η βιοϋδρογόνωση δρα ως αμυντικός μηχανισμός (Nagaraja, 2016).

**Πίνακας 2.7.** Μικροοργανισμοί που εμπλέκονται σε διεργασίες της μεγάλης κοιλίας

Τύποι μικροοργανισμών	Σημαντικά γένη και είδη
<b>Βακτήρια</b>	
Ακετογόνα	<i>Acetitomaculum ruminis</i> , <i>Eubacterium limosum</i>
Αξιοποιητές οξέων	<i>Megasphaera elsdeni</i> , <i>Wolinella succinogenes</i> , <i>Veillonella gazogene</i> , <i>Micrococcus lactolytica</i> , <i>Oxalobacter formigenes</i> , <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , <i>Desulfotomaculum ruminis</i> , <i>Succiniclasticum ruminis</i>
Κυτταρινολυτικά	<i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Clostridium cellobioparum</i> ,

	<i>Clostridium longisporum, Clostridium lochheadii, Eubacterium cellulosolvens</i>
Ημικυτταρινολυτικά	<i>Prevotella ruminicola, Eubacterium xylanophilum, Eubacterium uniformis</i>
Λιπολυτικά	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
Πηκτινολυτικά	<i>Treponema saccharophilum, Lachnospira multiparus</i>
Πρωτεϊνολυτικά	<i>Prevotella ruminicola, Ruminobacter amylophilus, Clostridium bifermentans</i>
Αμυλολυτικά	<i>Streptococcus bovis, Ruminobacter amylophilus, Prevotella ruminicola</i>
Σακχαρολυτικά	<i>Succinivibrio dextrinosolvens, Succinivibrio amylolytica, Selenomonas ruminantium, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus helveticus, Bifidobacterium globosum, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium thermophilum, Bifidobacterium ruminale, Bifidobacterium ruminantium</i>
Ταννινολυτικά	<i>Streptococcus caprinus, Eubacterium oxidoreducens</i>
Ουρεολυτικά	<i>Megasphaera elsdenii</i>

Τροποποίηση από Choudhury *et al.* (2015).

#### 2.4.4. Η επίδραση της ενσωμάτωσης των ελαιούχων σπερμάτων και των μικροφυκών στην παραγωγή μεθανίου

Η κύρια πηγή πρωτεΐνης στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων είναι το σογιάλευρο (69 %), το άλευρο ελαιοκράμβης (13 %), το βαμβακάλευρο (6 %), το ηλιάλευρο (5 %), το ιχθυάλευρο (2 %) και το άλευρο φιστικιών (Cromwell, 2012). Η σόγια είναι η κυρίαρχη καλλιέργεια ελαιούχων σπερμάτων και η πιο σημαντική πηγή πρωτεΐνης για τη διατροφή των ζώων, με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες να κυμαίνεται μεταξύ 30 - 40 % (Charron *et al.*, 2005, Natarajan *et al.*, 2013), ενώ το σογιάλευρο αποτελείται από εξαιρετικά εύπεπτη πρωτεΐνη και από ένα αξιοσημείωτο προφίλ αμινοξέων (Cromwell, 2012). Η παγκόσμια παραγωγή σόγιας συνεχίζει να αυξάνεται. Κατά συνέπεια, η διευρυμένη χρήση της και η αυξανόμενη ζήτηση για παραγωγή σόγιας καταδεικνύει επιβλαβή περιβαλλοντικά ζητήματα σε παγκόσμια κλίμακα (αποψίλωση

των δασών). Για να αντιμετωπιστεί αυτό το ζήτημα, και ταυτόχρονα να προωθηθεί η βιοποικιλότητα, εναλλακτικές καλλιέργειες ελαιούχων σπερμάτων με χαμηλότερες εισροές και σε λιγότερο παραγωγικές περιοχές, που να έχουν συγκρίσιμο πρωτεϊνικό και θρεπτικό προφίλ, θα πρέπει να αξιολογηθούν ως εναλλακτικές πρωτεϊνικές πηγές που μπορούν μερικώς να αντικαταστήσουν τη σόγια στη διατροφή των ζώων.

Από την άλλη, εφόσον έχει αποδειχθεί ότι η ενσωμάτωση ολικών λιπαρών ουσιών στα σιτηρέσια δύναται να μειώσει τις εκπομπές CH<sub>4</sub>, η χρήση των ελαιούχων σπερμάτων στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών ζώων αποκτά ιδιαίτερη σημασία. Η ενσωμάτωση ελαιούχων σπερμάτων αποδείχθηκε ότι δύναται να μειώσει τις ημερήσιες εκπομπές CH<sub>4</sub>, παρόλο που μέρος του ελαίου σε θρυμματισμένα σπέρματα είναι προστατευμένο στη Μ.Κ. Πιο συγκεκριμένα οι Beauchemin *et al.* (2009) χαρακτηριστικά αναφέρουν ότι τα επεξεργασμένα ελαιούχα σπέρματα, λόγω της περιεκτικότητάς τους σε LCFA μπορούν να χαρακτηριστούν ως αποτελεσματική διατροφική στρατηγική για την μείωση των εκπομπών CH<sub>4</sub>. Στην πράξη, τα ελαιούχα σπέρματα δύναται να μειώσουν την ημερήσια εκπομπή CH<sub>4</sub> (15 - 24 %), την ημερήσια παραγωγή του ανά μονάδα προσληφθείσας τροφής (8 - 20 %), και την ημερήσια παραγωγή ανά μονάδα παραγόμενου προϊόντος (γάλα ή κρέας) (4 - 19 %) μειώνοντας ταυτόχρονα την ημερήσια κατανάλωση ζωοτροφών (1 - 7 %) και την πέψη των κυτταρικών τοιχωμάτων (6 - 11 %). Σημαντικό, επίσης, είναι το γεγονός ότι η γαλακτοπαραγωγή δεν επηρεάζεται ενώ η αύξηση σωματικού βάρους μειώνεται (6 - 20 %). Επομένως, η ενσωμάτωση ελαιούχων σπερμάτων μπορεί να συνιστάται μόνο για γαλακτοπαραγωγά παραγωγικά ζώα και όχι για ζώα πάχυνσης. Παρομοίως, η ενσωμάτωση ελαιούχων σπερμάτων πρέπει να περιορίζεται ώστε να μην επηρεάζονται αρνητικά οι ζυμώσεις στη Μ.Κ., η υγεία των ζώων και η παραγωγή. Επιπλέον, λόγω της μειωμένης πέψης των κυτταρικών τοιχωμάτων, πρέπει να γίνεται αξιολόγηση όσον αφορά τις πιθανές επιπτώσεις στην παραγωγή CH<sub>4</sub>. Παραδείγματα ελαιούχων σπερμάτων που έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τις ημερήσιες εκπομπές CH<sub>4</sub> είναι τα σπέρματα ηλιάνθου (15 - 57 %, Chuntrakort *et al.*, 2014; Beauchemin *et al.*, 2009), ο βαμβακόσπορος (13 - 23 %, Chuntrakort *et al.*, 2014), ο λιναρόσπορος (2 - 29 %, Abuelfatah *et al.*, 2016) και τα σπέρματα ελαιοκράμβης (10 - 16 %, Beauchemin *et al.*, 2009). Όμοια, η χρήση ελαίου ηλιάνθου και ελαίου λιναρόσπορου σε πρόβατα με τη μέθοδο προσομοίωσης της Μ.Κ. Rusitec, μείωσε σημαντικά την παραγωγή CH<sub>4</sub> σε σύγκριση με τον μάρτυρα, χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά η ημερήσια παραγωγή αερίων (Vargas *et al.*, 2017).

Μία επιπλέον καινοτόμα και αιεφόρος διατροφική στρατηγική θεωρείται και η ενσωμάτωση μικροφυκών με σκοπό τη μείωση των μεθανοβακτηρίων της Μ.Κ. Οι Machado *et al.* (2014) μελέτησαν αρκετά θαλάσσια μικροφύκη *in vitro* και διαπίστωσαν ότι το *Asparagopsis* δύναται όχι μόνο να μειώσει την παραγωγή CH<sub>4</sub> κατά το εντυπωσιακό 99 % σε χορηγούμενη δόση 2 % της ολικής οργανικής ουσίας, αλλά μείωσε και την παραγωγή των VFAs. Στην ίδια μελέτη, το *Oedogonium* δεν είχε παρόμοια αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, μείωσε σημαντικά την παραγωγή CH<sub>4</sub> όταν χορηγήθηκε σε ποσοστό  $\geq 50$  % της οργανικής ουσίας. Επίσης, ο συνδυασμός *Asparagopsis* (2 % οργανικής ουσίας) και *Oedogonium* (25 και 50 % οργανικής ουσίας) συνέχισε να καταστέλλει την παραγωγή CH<sub>4</sub>, ανεξαρτήτως του ποσοστού ενσωμάτωσης του *Oedogonium*. Τα καφέ φύκια (*Cystoseira trinodis* και *Dictyota bartayresii*) έχουν, επίσης, αναγνωριστεί ως ισχυρός παράγοντας αναστολής του CH<sub>4</sub> *in vitro* (Doubois *et al.*, 2013). Επίσης, όταν άλευρο φυκών που περιείχε 20 % DHA χορηγήθηκε σε αγελάδες, έως 375 g/αγελάδα/ημέρα που αντιστοιχεί σε 75 g DHA/αγελάδα/ημέρα, δεν επηρέασε την παραγωγή CH<sub>4</sub> *in vivo*, το οποίο πιθανώς οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση αυτού του λιπαρού οξέος για την αναστολή της παραγωγής CH<sub>4</sub> (Moate *et al.*, 2013). Σε πρόσφατη *in vitro* μελέτη, μέσω της επώασης του ALA και του λινελαϊκού καθώς και του συνδυασμού τους, αποδείχθηκε ότι το λινελαϊκό προκαλεί μεγαλύτερη εκπομπή αμμωνίας και ολικά αέρια και μικρότερο pH με περισσότερα ολικά VFAs σε σύγκριση με τον συνδυασμό των δύο μαζί (Amanullah *et al.*, 2021). Ο συνδυασμός των δύο παρήγαγε περισσότερο CO<sub>2</sub> και λιγότερο CH<sub>4</sub>.

#### **2.4.5. Η επίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), των ελαιούχων σπερμάτων και των μικροφυκών στον μικροβιακό πληθυσμό της μεγάλης κοιλίας**

Οι μικροοργανισμοί της Μ.Κ. που είναι υπεύθυνοι για την κυτταρινόλυση έχει αποδειχθεί ότι είναι ευάλωτοι σε μία πιθανή αναστολή της ανάπτυξής τους λόγω των PUFA (Maia *et al.*, 2007). Πληθυσμοί βακτηρίων που σχετίζονται με την πέψη των κυτταρινών και τη βιοϋδρογόνωση έχουν βρεθεί ότι είναι ευαίσθητοι στα PUFA. Ως εκ τούτου, ο αντίκτυπος της ενσωμάτωσης των PUFA στα βακτήρια της Μ.Κ. θα πρέπει να πραγματοποιείται με την εξέταση συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών και όχι του συνολικού αριθμού βακτηρίων (Liu *et al.*, 2010). Τα διαφορετικά ευρήματα από διαφορετικές μελέτες μπορούν να αποδοθούν στα επίπεδα συγκέντρωσης των PUFA στη Μ.Κ (Abuelfatah *et al.*, 2016).

Η προσθήκη λιναρόσπορου στα σιτηρέσια αιγών σε δύο διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης (10 και 20 %), μείωσε τους πληθυσμούς των συνολικών βακτηρίων, μεθανοβακτηρίων και των πρωτόζωων σε σύγκριση με αίγες στις οποίες δεν χορηγήθηκε λιναρόσπορος (Abuelfatah *et al.*, 2016). Επίσης, μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των *Fibrobacter succinogenes* και *Ruminococcus flavefaciens*, ενώ δεν επηρέασε αρνητικά το είδος *Ruminococcus albus*, το οποίο είναι το πιο σημαντικό κυτταρινολυτικό είδος (Abuelfatah *et al.*, 2016). Η μείωση του είδους *Ruminococcus flavefaciens* επιτυγχάνεται όταν η συγκέντρωση των PUFA απαντάται σε υψηλά επίπεδα (Zhang *et al.*, 2008).

Η ενσωμάτωση ελαιούχων σπερμάτων υψηλής περιεκτικότητας σε λινολεϊκό και λινολενικό στα σιτηρέσια αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, μείωσε τον συνολικό πληθυσμό των πρωτόζωων. Επίσης, αύξησε τον συνολικό πληθυσμό των κυτταρινολυτικών βακτηρίων στο Y.M.K. κυρίως μέσω της ενσωμάτωσης λινολενικού οξέος (Ivan *et al.*, 2013). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε αύξηση στον πληθυσμό του είδους *Ruminococcus albus* (Ivan *et al.*, 2013).

Όμοια, η ενσωμάτωση αλεσμένων σπερμάτων ηλίανθου και ελαιοκράμβης στα σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγών αγελάδων, προκάλεσε σημαντική μείωση στον πληθυσμό των πρωτόζωων (Beauchemin *et al.*, 2009).

Επιπλέον, τα βακτήρια στο σύνολό τους στη M.K. αιγών, δεν επηρεάστηκαν από την κατανάλωση λινελαίου όταν η περιεκτικότητα σε ολικές λιπαρές ουσίες στο σιτηρέσιο ήταν παρόμοια ή μικρότερη από την ομάδα του μάρτυρα. Ο πληθυσμός του είδους *Ruminococcus flavefaciens* μειώθηκε, ενώ του είδους *Ruminococcus albus* αυξήθηκε (Ebrahimi, 2012).

Σε *in vitro* μελέτη, οι Amanullah *et al.* (2021) βρήκαν ότι το λινελαϊκό, συνδέεται με αύξηση των *Fibrobacter succinogenes* και *Ruminococcus flavefaciens*, ενώ με χορήγηση ALA, ο πληθυσμός του είδους *Ruminococcus albus* βρέθηκε αυξημένος. Επίσης, πέρα των 8 ωρών επώασης, το ALA δύναται να μειώσει τα μεθανοβακτήρια σε σύγκριση με το λινελαϊκό και τον συνδυασμό τους αλλά παρουσίασε περισσότερα βλεφαριδωτά σε σύγκριση με το λινελαϊκό. Επομένως, το λινελαϊκό βελτιώνει τον πληθυσμό των βακτηρίων που σχετίζονται με την αποδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων αλλά ο συνδυασμός των δύο ενδείκνυται καθώς δύναται εκτός από το να μειώσει τις εκπομπές CH<sub>4</sub> να αντιστέκεται στη βιοϋδρογόνωση στη M.K. με μειωμένες επιπτώσεις στον μικροβιακό πληθυσμό της M.K. (Amanullah *et al.*, 2021).

Όσον αφορά τα μικροφύκη, η χορήγηση του μικροφύκου *Chlorella vulgaris* σε αίγες (10 g/kg ΣΖ ΞΟ), αύξησε τον συνολικό πληθυσμό των πρωτόζωων. Παρατηρήθηκε αύξηση στα μεθανοβακτήρια και στα *Methanosphaera stadmanae*, *M. Ruminantium*, *Butyrivibrio fibrosolvans* και *Clostridium sticklandii*, ενώ αντιθέτως μείωση του είδους *Ruminococcus albus* (Tsiplakou *et al.*, 2017d).

Η χορήγηση του *Schizochytrium* sp. στα σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγών αγελάδων (2 % του συνολικού σιτηρεσίου), τροποποίησε τον πληθυσμό των βακτηρίων και των βλεφαριδωτών. Πιο συγκεκριμένα, ο σχετικός πληθυσμός των *Isotricha prostoma* και *I. intestinalis* και ορισμένων ειδών όπως τα *Epidinium caudatum*, *Eudiplodinium maggii* και *Diplodinium dentatum* μειώθηκαν (Boeckeaert *et al.*, 2007).

Συμπληρωματικά, οι Castro-Carrera *et al.* (2014), αναφέρουν ότι σε πρόβατα που ενσωματώθηκε *Schizochytrium* sp. (*DHA gold*), βακτήρια όπως τα *Bacterpodes* και *Paludibacter* μειώθηκαν, ενώ τα *Clostridium* και *Succinovibrionaceae* αυξήθηκαν. Γενικότερα, η εν λόγω διατροφική επέμβαση επηρέασε σημαντικά το προφίλ των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το υγρό της Μ.Κ. και αυτών που ήταν προσκολλημένα σε στερεό.

Η χορήγηση PUFA μέσω του μικροφύκου *Schizochytrium* sp. (*DHA gold*) σε σιτηρέσια αιγών (0,28 g/kg ΣΒ), τροποποίησε τον μικροβιακό πληθυσμό της Μ.Κ., σε απογαλακτισμένα ερίφια. Συγκεκριμένα βακτήρια όπως τα *Succinovibrionaceae*, *Paraprevotellaceae*, *Selenomonas*, *Succiniclasticum* και *Butyrivibrio* αυξήθηκαν, ενώ τα *Ruminococcaceae*, *Acidainococcus* και *Pirellulaceae* μειώθηκαν (Dewanckele *et al.*, 2018).

Σε μελέτη των Manrommatis *et al.* (2021c), βρέθηκε ότι σε δείγματα στερεού περιεχομένου της Μ.Κ. αιγών, η ενσωμάτωση του μικροφύκου *Scizochytrium* spp., μείωσε το σχετικό πληθυσμό των συνολικών αρχαίων και συγκεκριμένων μεθανοβακτηρίων (*Methanomassiliicoccales*, *Methanobrevibacter* spp. *Methanosphaera stadmanae* και *Methanobacterium formicicum*) σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των *Firmicutes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens* και των *Neocallimastigales*.

Από την ίδια ερευνητική ομάδα παρατηρήθηκε στον ίδιο πειραματισμό (Manrommatis *et al.*, 2021d), σε δείγματα Υ.Μ.Κ. των αιγών ότι η ενσωμάτωση του μικροφύκου *Scizochytrium* spp., σε 40 και 60 g/αίγα/ημέρα, μείωσε τον σχετικό πληθυσμό των Αρχαίων σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα. Τα μεθανοβακτήρια και τα *Methanomassiliicoccales* εμφάνισαν τάση

μείωσης μετά από χορήγηση 20 και 40 g σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα, δίχως όμως να είναι στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, ο σχετικός πληθυσμός των *Methanomicrobium mobile* αυξήθηκε σημαντικά στις αίγες που χορηγούνταν 60 g/αίγα/ημέρα.

Χρησιμοποιώντας τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), η ενσωμάτωση 40 g/αίγα/ημέρα *Schizochytrium* spp. σε σιτηρέσιο με υψηλή περιεκτικότητα σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές, αύξησε τα μη χαρτογραφημένα βακτήρια εντός της Μ.Κ. Η ίδια διατροφική επέμβαση προκάλεσε αύξηση στη σχετική αφθονία των *Bacteroidetes* και *Prevotella brevis*. Επιπλέον, τα μεθανοβακτήρια και *Methanomassiliicoccales* αυξήθηκαν σε αίγες που διατρέφονταν με σιτηρέσιο που περιείχε 40 g/αίγα/ημέρα *Schizochytrium* spp., ενώ τα *Methanobrevibacter* και *Methanobacteriales* μειώθηκαν. Τα κυτταρινολυτικά βακτήρια μειώθηκαν σε αίγες που διατρέφονταν με σιτηρέσιο που περιείχε 40 g *Schizochytrium* spp., ενώ η κυτταρινολυτική δραστηριότητα βρέθηκε αυξημένη. Η αμμωνία μειώθηκε σε αίγες των οποίων τα σιτηρέσια είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές, ενώ το EPA και το DHA παρουσίασαν χαμηλότερο ρυθμό αποδόμησης στην Μ.Κ. των αιγών που διατρέφονταν με σιτηρέσιο υψηλής περιεκτικότητας ΧΖ. Η μεταβολή της αναλογίας ΧΖ/ΣΖ σε αίγες που τους χορηγήθηκε *Schizochytrium* spp. τροποποίησε τόσο τον μικροβιακό πληθυσμό της Μ.Κ. των αιγών όσο και την ενζυμική δραστηριότητα. Ωστόσο, δεν υπήρχε σημαντική συνέπεια στις μεταξύ τους σχέσεις (Mavrommatis *et al.*, 2021e).

Επίσης, αξιολογήθηκε η επίδραση τριών διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης του μικροφύκου *Schizochytrium* spp. (20, 40 και 60 g/αίγα/ημέρα) επί του μικροβιακού πληθυσμού της Μ.Κ. σε αίγες με σύγχρονη αναλυτική τεχνική (Mavrommatis *et al.*, 2021f). Η ανάλυση μικροβιώματος χρησιμοποιώντας μια πλατφόρμα αλληλουχίας 16S rRNA αποκάλυψε ότι τα *Firmicutes* μειώθηκαν σε αίγες που διατρέφονταν με μικροφύκη, ενώ τα *Bacteroidetes* έδειξαν τάση αύξησης στην ομάδα με το μεσαίο επίπεδο ενσωμάτωσης (40 g) λόγω της ενίσχυσης των *Prevotellaceae*. Στην ίδια ομάδα τα κυτταρινολυτικά βακτήρια, *Treponema bryantii*, *Ruminococcus gauvreauii*, *Ruminococcus albus* και *Ruminococcus flavefaciens*, μειώθηκαν, με αποτέλεσμα τη συνολική μείωση της δραστηριότητας της κυτταρινάσης. Αντίθετα, η αμυλολυτική δράση πιθανώς να ενισχύθηκε σημαντικά λόγω της αύξησης του πληθυσμού των *Ruminobacter amylophilus*, *Succinivibrio dextrinosolvens* και *Fretibacterium fastidiosum*. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι η ενσωμάτωση 20 g *Schizochytrium* spp. στα σιτηρέσια των αιγών θα μπορούσε να θεωρηθεί μια βιώσιμη και αποτελεσματική διατροφική στρατηγική για τη

ρύθμιση του μικροβιώματος της Μ.Κ. προς την ανάπτυξη γαλακτοκομικών προϊόντων εμπλουτισμένων με βιοδραστικές ενώσεις, ενώ υψηλότερα επίπεδα προκάλεσαν σημαντικές αλλαγές σε καθοριστικούς πληθυσμούς μικροοργανισμών (Manrommatis *et al.*, 2021f).

Στον Πίνακα 2.8. παρουσιάζονται συνοπτικά οι πειραματισμοί που μελέτησαν την επίδραση της ενσωμάτωσης των ελαιούχων σπερμάτων και των μικροφυκών στους μικροοργανισμούς της Μ.Κ. των μηρυκαστικών.



**Πίνακας 2.8.** Συνοπτική περιγραφή ενδεικτικών πειραματισμών επίδρασης των ελαιούχων σπερμάτων και των μικροφυκών στους μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών

Επέμβαση	Ζώα	Στόχος	Αποτέλεσμα	Μελέτη
<b>Ελαιούχα σπέρματα</b>				
Λιναρόσπορος	Αίγες	Μικροοργανισμοί της Μ.Κ.	↓Μεθανοβακτήρια, ↓Πρωτόζωα, ↓ <i>Fibrobacter succinogenes</i> , ↓ <i>Rumunococcus flavefaciens</i>	Abuelfatah <i>et al.</i> , 2017
Ελαιούχα σπέρματα πλούσια σε 1) λινελαϊκό και 2) λινολενικό	Αγελάδες	Μικροοργανισμοί της Μ.Κ.	↓Πρωτόζωα ↑Κυτταρινολυτικά λόγω λινελαϊκού	Ivan <i>et al.</i> , 2013
Σπέρματα ηλιάνθου, ελαιοκράμβης και λιναριού	Αγελάδες	Πρωτόζωα της Μ.Κ.	↓Πρωτόζωα (σπέρματα ηλιάνθου και ελαιοκράμβης)	Beauchemin <i>et al.</i> , 2009
Λινέλαιο	Αίγες	Πληθυσμός σε βακτήρια της Μ.Κ.	↓ <i>Rumunococcus flavefaciens</i> ↑ <i>Ruminococcus albus</i>	Ebrahimi <i>et al.</i> , 2012
<b>Μικροφύκη</b>				
<i>Chlorella vulgaris</i>	Αίγες	Μικροοργανισμοί της Μ.Κ.	↑Μεθανοβακτήρια, ↑ <i>Methanosphaera stadmanae</i> , ↑ <i>M. Ruminantium</i> , ↑ <i>Butyrivibrio fibrosolvens</i> , ↑ <i>Clostridium sticklandii</i> ↓ <i>Ruminococcus albus</i>	Tsiplakou <i>et al.</i> , 2017d
<i>Schizochytrium</i> sp.	Αγελάδες	Μικροοργανισμοί της Μ.Κ.	↓ <i>Isotricha prostoma</i> , ↓ <i>I. Intestinalis</i> , ↓ <i>Epidinium caudatum</i> , ↓ <i>Eudiplodinium maggii</i> , ↓ <i>Diplodinium dentatum</i>	Boeckert <i>et al.</i> , 2007
<i>Schizochytrium</i> sp.	Αίγες	Μικροοργανισμοί της Μ.Κ.	↑ <i>Clostridium</i> , ↑ <i>Succinovibrionaceae</i>	Castro-Carrera <i>et al.</i> ,

(DHA gold)			↓ <i>Bacterpodes</i> , ↓ <i>Paludibacter</i>	2014
<i>Schizochytrium</i> sp. (DHA gold)	Ερίφια	Μικροοργανισμοί της Μ.Κ.	↑ <i>Succinovibrionaceae</i> , ↑ <i>Paraprevotellaceae</i> , ↑ <i>Selenomonas</i> , ↑ <i>Succiniclasticum</i> , ↓ <i>Ruminococcaceae</i> , ↓ <i>Acidainococcus</i> , ↓ <i>Pirellulaceae</i> ↑ <i>Butyrivibrio</i>	Dewanckele <i>et al.</i> , 2018
<i>Scizochytrium</i> spp.	Αίγες	Μικροοργανισμοί στο στερεό περιεχόμενο της Μ.Κ	↓Αρχαία, ↓ <i>Methanomassiliicoccalles</i> , ↓ <i>Methanobrevibacter</i> spp. ↓ <i>Methanosphaera stadmanae</i> , ↓ <i>Methanobacterium formicicum</i> , ↓ <i>Firmicutes</i> , ↓ <i>Ruminococcus</i> <i>flavefaciens</i> , ↓ <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , ↓ <i>Neocallimastigales</i>	Mavrommatis <i>et al.</i> , 2021c
<i>Scizochytrium</i> spp.	Αίγες	Μικροοργανισμοί στο Υ.Μ.Κ New generation sequencing	↑ <i>Bacteroidetes</i> , ↑ <i>Prevotella brevis</i> , ↑μεθανοβακτήρια, ↑ <i>Methanomassiliicoccales</i> ↓ <i>Methanobrevibacter</i> , ↓ <i>Methanobacteriales</i> , Κυτταρινολυτικά	Mavrommatis <i>et al.</i> , 2021e
<i>Scizochytrium</i> spp.	Αίγες	Μικροοργανισμοί στο Υ.Μ.Κ New generation sequencing	↑ <i>Ruminobacter amylophilus</i> , ↑ <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> , ↑ <i>Fretibacterium fastidiosum</i> ↓ <i>Firmicutes</i> , ↓ <i>Treponema bryantii</i> , ↓ <i>Ruminococcus gaurvreauii</i> , ↓ <i>Ruminococcus albus</i> , ↓ <i>Ruminococcus</i> <i>flavefaciens</i>	Mavrommatis <i>et al.</i> , 2021f

### 3. Η ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΩΣ ΖΩΟΤΡΟΦΗ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ

Η *Camelina sativa* (L.) (καμελίνα), μέλος της οικογένειας *Brassicaceae*, έχει αποκτήσει ιδιαίτερη προσοχή ως καλλιέργεια ελαιούχων σπερμάτων. Είναι ευρέως γνωστή ως ψευδολινάρι ή «Χρυσή απόλαυση» (“*Golden pleasure*”). Θεωρείται ως αρχαία καλλιέργεια και η χρήση της χρονολογείται από την εποχή του Χαλκού. Η καμελίνα καλλιεργείται και παράγεται κυρίως στη Β. Αμερική και τα τελευταία χρόνια έχει αποκτήσει ιδιαίτερη προσοχή κυρίως ως καλλιέργεια για την παραγωγή βιοκαυσίμων, καυσίμων αεριοθούμενων (jet), ως ζωοτροφή, στην ανθρώπινη διατροφή και στον τομέα της κοσμετολογίας (Berti *et al.*, 2016).

Η καλλιέργεια της καμελίνας έχει πολλά θετικά χαρακτηριστικά καθιστώντας τη μοναδική ανάμεσα στις καλλιέργειες ελαιούχων σπερμάτων. Ένα από τα βασικά ζητήματα είναι ότι η καλλιέργεια της καμελίνας είναι προσαρμόσιμη σε πολλές διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και ο μόνος πραγματικός περιορισμός είναι τα βαριά αργιλώδη και τα οργανικά εδάφη (Zubr, 1997, Gugel & Falk, 2006). Αν και οι αποδόσεις των σπερμάτων και η περιεκτικότητά τους σε έλαιο είναι πολύ μεταβλητές με βάση το περιβάλλον (Vollman *et al.*, 1996, Zubr, 2003, Gugel & Falk, 2006), έχει ξεπεράσει την ελαιοκράμβη σε δοκιμές υπό πανομοιότυπες συνθήκες ξηρασίας (Zubr, 1997, Gugel & Falk, 2006). Αυτό σε συνδυασμό με τις σχετικά χαμηλές εισροές που απαιτούνται (Urbaniak *et al.*, 2008, Zubr, 1997) καθιστά την καμελίνα μια ιδανική καλλιέργεια για χρήση σε λιγότερο παραγωγικές εκτάσεις και σε περιοχές χωρίς επαρκή βροχόπτωση για την υποστήριξη άλλων καλλιεργειών όπως είναι και η χώρα μας. Η καμελίνα δύναται να συμμετάσχει θετικά στη συζήτηση για τα τρόφιμα και την παραγωγή καυσίμων, που συχνά αμαυρώνει τη χρήση ελαιούχων καλλιεργειών. Επίσης, οι καλλιεργητικές απαιτήσεις και οι ανάγκες λίπανσης της καμελίνας έχουν εκτιμηθεί ως οι ελάχιστες σε σύγκριση με οποιοδήποτε άλλο ελαιούχο σπέρμα συμπεριλαμβανομένης της σόγιας (Eynck & Falk, 2013).

Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι η καμελίνα έχει πρωτεϊνικό προφίλ παρόμοιο με αυτό του σογιαλεύρου (Zubr, 1997). Συνεπώς, δύναται να αντικαταστήσει μέρος του σογιαλεύρου χάρις όχι μόνο στην υψηλή περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνη (περίπου 25 %) αλλά και στο υψηλής

βιοδιαθεσιμότητας προφίλ αμινοξέων της. Αυτό καθιστά το άλευρο από καμελίνα ιδανικό προς ενσωμάτωση στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων (Zubr, 1997, Frame *et al.*, 2007).

### 3.1. ΤΟ ΕΛΑΙΟ ΤΗΣ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ

Τα επίπεδα ελαίου της καμελίνας κυμαίνονται από 30 - 50 %. Το έλαιό της είναι πλούσιο σε ω-3 ΛΟ (25 - 50 %), ενώ είναι και πλουσιότερο σε PUFA (73 %) σε σύγκριση με άλλα ελαιούχα σπέρματα όπως ο λιναρόσπορος, ο ηλίανθος, η σόγια και η ελαιοκράμβη (69, 66, 60 και 31 %, αντίστοιχα) (Hurtaud & Peyraud, 2007). Πιο συγκεκριμένα, είναι πλούσια κυρίως σε ALA (31 - 40 %) σε λινελαϊκό (15 - 23 %) και σε εικοσενοϊκό (12 - 15 %) (Berti *et al.*, 2016). Το έλαιο της καμελίνας είναι μια πλούσια πηγή ALA (Budín *et al.*, 1995, Zubr, 1997, Zubr & Matthäus, 2002, Eidhin *et al.*, 2003, Song & Thornally, 2007, Murphy, 2011, Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2013). Εκτός αυτού, σε αντίθεση με πολλά κοινώς χρησιμοποιημένα έλαια για κατανάλωση από τον άνθρωπο και τα ζώα, το έλαιο της καμελίνας είναι πολύ πιο πλούσιο περιεκτικότητα σε ω-3 και ω-6 ΛΟ, χαρακτηρίζοντάς το για το λόγο αυτό ως μια αξιόλογη διατροφική πηγή (Budín *et al.*, 1995, Zubr, 1997, Zubr & Matthäus, 2002, Murphy, 2011, Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2013). Η αναλογία ω-3/ω-6 για το έλαιο της καμελίνας ποικίλλει από περίπου 1,3 έως 2 (Budín *et al.*, 1995, Zubr, 1997, Zubr & Matthäus, 2002, Murphy, 2011, Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2013), ενώ η αναλογία ω-3/ω-6 είναι σημαντικά χαμηλότερη στο έλαιο της ελαιοκράμβης (Canola) (~ 0,52), του σογιέλαιου (~ 0,15), του ελαίου ατρακτυλίδας (~ 0,013), του ηλιέλαιου (~ 0,014) και του αραβοσιτελαίου (~ 0,018) και σημαντικά υψηλότερη στο λινέλαιο (~ 4.2) (υπολογίζεται από τα στοιχεία σύνθεσης ελαίου που παρέχονται από την Καναδική επιτροπή ελαιοκράμβης). Επίσης, σε αντίθεση με πολλά ελαιούχα σπέρματα, βρέθηκε ότι στο έλαιο της καμελίνας το C20:1n-9 βρίσκεται σε σχετική αφθονία (~ 12 %) και προέρχεται από την επιμήκυνση του C18:1n-9, ενώ το C22:1n-9 (ερουκικό οξύ) (το προϊόν επιμήκυνσης του C20:1n-9) είναι λιγότερο άφθονο (Budín *et al.*, 1995, Zubr, 1997, Zubr & Matthäus, 2002, Urbaniak *et al.*, 2008, Murphy, 2011, Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2013.). Συμπερασματικά, το έλαιο της καμελίνας είναι πλούσια πηγή ALA, ολεϊκού, λινελαϊκού, αλλά και MUFA.

Ωστόσο, το γεγονός ότι τα PUFA αποτελούν περίπου το 50 % των συνολικών ΛΟ του ελαίου (Budín *et al.*, 1995, Zubr, 1997, Zubr & Matthäus, 2002, Eidhin *et al.*, 2003, Murphy, 2011, Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2013, Song & Thornally, 2007), υποδηλώνει ότι το εν λόγω έλαιο παρουσιάζει πιθανώς χαμηλή οξειδωτική σταθερότητα (Eidhin *et al.*, 2003). Όπως πολλά άλλα

ελαιούχα σπέρματα που είναι υψηλής περιεκτικότητας σε PUFA, το έλαιο της καμελίνας μπορεί να θεωρηθεί πιθανός παράγοντας οξείδωσης. Παρόλα αυτά στα ελαιούχα σπέρματα απαντώνται διαφορετικά μόρια με αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα το έλαιο της καμελίνας είναι πλούσιο σε τοκοφερόλες, με τη συνολική περιεκτικότητα σε τοκοφερόλη να αναφέρεται μεταξύ 700 και 800 mg/kg σπέρματος (Zubr, 1997, Zubr & Matthäus, 2002, Abramovic *et al.*, 2007), με τη γ-τοκοφερόλη να αντιπροσωπεύει πάνω από το 90 % του συνόλου (Zubr & Matthäus, 2002, Abramovic *et al.*, 2007). Επίσης, η καμελίνα έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, με υψηλή ποσότητα φλαβονοειδών (143 mg/kg σπέρματος) (Matthäus, 2002) και πολικές φαινολικές ενώσεις (439 mg/kg σπέρματος) (Abramovic *et al.*, 2007). Λόγω αυτών των αντιοξειδωτικών, το έλαιο της καμελίνας χαρακτηρίζεται από υψηλή οξειδωτική σταθερότητα. Άλλα αντιοξειδωτικά που παρουσιάζονται στα σπέρματα καμελίνας είναι και η σιναπίνη, η κερσετίνη, η ρουτίνη η κατεχίνη κ.α. (Eidhin *et al.*, 2003). Το έλαιο της καμελίνας είναι πιο σταθερό από το λινέλαιο και το ιχθυέλαιο αλλά λιγότερο σταθερό από το έλαιο σησάμου, αραβοσίτου, το ελαιόλαδο και το ηλιέλαιο (Eidhin *et al.*, 2003). Από αυτά τα έλαια, μόνο το ελαιόλαδο και το κραμβέλαιο έχουν χαμηλότερες τιμές υπεροξειδίων μετά από 16 ημέρες στους 65 °C, ενώ υπό αυτές τις συνθήκες, ο σχηματισμός συζευγμένου τριενίου στο έλαιο της καμελίνας είναι πολύ μεγαλύτερος από ότι σε άλλα έλαια. Ωστόσο, μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι η καμελίνα σχηματίζει ποσότητα υπεροξειδίων παρόμοια με αυτή που βρέθηκε στο έλαιο λιναριού, αν και η μελέτη της οξειδωτικής σταθερότητας που πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου rancimat δείχνει μεγαλύτερη σταθερότητα από αυτό (Szterk *et al.*, 2010). Συμπερασματικά, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρά την υψηλή περιεκτικότητα σε PUFA, το έλαιο της καμελίνας δείχνει οξειδωτική σταθερότητα παρόμοια με άλλα ελαιούχα σπέρματα πλούσια σε ω-3 λόγω του επιπέδου των αντιοξειδωτικών ενώσεων που απαντώνται σε αυτό.

Τέλος, κρίνεται σκόπιμο να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με λοιπά ελαιούχα σπέρματα, το έλαιο της καμελίνας περιέχει χοληστερόλη (Shukla *et al.*, 2002, Szterk *et al.*, 2010). Οι κυριότερες στερόλες στο έλαιο της καμελίνας είναι σιτοστερόλη (1884 μg/g ελαίου), καμπεστερόλη (893 μg/g ελαίου), χοληστερόλη (188 μg/g ελαίου), βρασασκαστερόλη (133 μg/g ελαίου) και στιγμαστερόλη (103 μg/g ελαίου) (Shukla *et al.*, 2002).

## 3.2. ΑΝΤΙΔΙΑΙΤΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ

### 3.2.1. Οι γλυκοσινολάτες ως ο κύριος αντιδιαιτητικός παράγοντας της καμελίνας

Όσον αφορά τους αντιδιαιτητικούς παράγοντες, τα σπέρματα της καμελίνας περιέχουν γλυκοσινολάτες, ταννίνες, μη-αμυλούχους πολυσακχαρίτες και ερουκικό οξύ (Zubr 1997, Matthäus & Zubr, 2000, Abramovic *et al.*, 2007). Είναι γεγονός ότι οι γλυκοσινολάτες απαντώνται σε ελαιούχα σπέρματα της οικογένειας *Brassicaceae*, λόγου χάριν στο σινάπι (*Sinapis*), στην κράμβη (*Brassica nigra*) και στην ελαιοκράμβη. Τα σπέρματα της καμελίνας συγκεντρώνουν σημαντικά επίπεδα τριών κυρίως γλυκοσινολατών: (α) γλυκοαραβίνη (9-methylsulfinyl) nonglucosinolate - GS9), (β) γλυκοκαμελινίνη (10-(methylsulfinyl) decylglucosinolate - GS10) και (γ) 11-(methylsulfinyl)undecylglucosinolate (GS11) (Vaughn & Berhow, 2005). Πιο συγκεκριμένα, περιέχουν γλυκοσινολάτες (14 - 23  $\mu\text{mol/g}$ ), σε επίπεδα παρόμοια με την ελαιοκράμβη αλλά σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από ότι σε άλλες καλλιέργειες όπως την κράμβη και το σινάπι (> 120  $\mu\text{mol/g}$ ) (Zubr, 1997, Matthäus & Zubr, 2000). Το επίπεδο γλυκοσινολατών στην καμελίνα φθάνει τα 35  $\mu\text{mol/g}$  (Schuster & Friedt, 1998). Είναι ενδιαφέρον ότι, οι χειμερινές ποικιλίες καμελίνας έχουν λιγότερη περιεκτικότητα σε γλυκοσινολάτες από ότι στις συνήθεις φυτεμένες ποικιλίες της άνοιξης (κατά περίπου 10  $\mu\text{mol/g}$ ) (Schuster & Friedt, 1998). Περαιτέρω, η περιεκτικότητα σε γλυκοσινολάτες της καμελίνας ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του εδάφους και την περιεκτικότητά του σε θείο (Schuster & Friedt, 1998). Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε όρνιθες που χορηγήθηκε άλευρο καμελίνας (10 % του σιτηρεσίου), δεν υπήρξαν μετρήσιμα επίπεδα για τις γλυκοσινολάτες ή τα προϊόντα διάσπασής τους στα αυγά (Kakani *et al.*, 2012), υποδεικνύοντας χαμηλή πιθανότητα αυτές οι ενώσεις να έχουν αρνητικό αντίκτυπο στα πτηνά.

Η κύρια ανησυχία, όσον αφορά τις γλυκοσινολάτες, έγκειται στο γεγονός ότι μετά την κατάποση της τροφής, πραγματοποιείται υδρόλυση μέσω του ενζύμου της μυροσινάσης (myrosinase), κάτι το οποίο οδηγεί στον σχηματισμό ενεργών, πιθανώς τοξικών, ενώσεων όπως τα ισοθειοκυανικά, νιτρίλια, 5-vinyl oxazolidine-2-thione και θειοκυανικά ιόντα, ενώ οι δύο κύριες ενώσεις είναι τα ισοθειοκυανικά και τα νιτρίλια.

Τα νιτρίλια έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να έχουν τοξικές επιδράσεις στα πρόβατα και μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση της ημερήσιας πρόσληψης της τροφής. Μετά την πρόσληψη, οι γλυκοσινολάτες διασπώνται στη Μ.Κ. Τα προαναφερόμενα παράγωγα αυτής της διάσπασης

απορροφώνται, περνούν στο αίμα και προκαλούν την έκκριση της ελεύθερης τριωδοθυρονίνης (FT3) η οποία μπορεί να αλλάξει τη φυσιολογία της Μ.Κ. και να μειώσει τον μέσο χρόνο πέψης κάτι που έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκαλέσει μείωση παραγωγής CH<sub>4</sub> (Sun, 2020). Αυτές οι ενώσεις σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις είναι γνωστό ότι αναστέλλουν την πρόσληψη ιωδίου στον θυρεοειδή, με αποτέλεσμα τη βρογχοκήλη και τη μείωση της ανάπτυξης. Επίσης, η εμπλοκή τους με τη πρόσληψη ιωδίου (ιόν θειοοκυανίου) και της σύνθεσης τριωδοθυρονίνης (T3) και της θυροξίνης (T4) του πλάσματος μπορεί να οδηγήσει σε υποθυρεοειδισμό και διόγκωση του θυρεοειδούς αδένα (goitre) (EFSA, 2008).

### **3.2.2. Λοιποί αντιδιατητικοί παράγοντες της καμελίνας**

Εκτός από τις γλυκοσινολάτες, υπάρχουν και άλλες αντιδιατητικές ενώσεις που απαντώνται στην καμελίνα. Η σιναπίνη βρίσκεται στην καμελίνα σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 4 mg/g σπέρματος (Matthäus & Zubr, 2000, Matthäus & Angelini, 2005), που είναι περίπου 30 % λιγότερο από ό,τι βρέθηκε στην ελαιοκράμβη. Αυτά τα επίπεδα της σιναπίνης είναι αρκετά για να οδηγήσουν σε μια κλασική οσμή σε προϊόντα, όπως τα αυγά, εάν τα άλευρα της καμελίνας ενσωματώνονται σε υψηλό ποσοστό στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων.

Επίσης, η εξαφωσφορική ινοσιτόλη ή το φυτικό οξύ είναι ένας ακόμα αντιδιατητικός παράγοντας που υπάρχει στην καμελίνα και οφείλει να αναφερθεί λόγω των ισχυρών χηλικών ιδιοτήτων του. Η συνολική ποσότητα φωσφορικών ινοσιτόλης, που περιέχει τόσο πενταφωσφορική ινοσιτόλη όσο και εξαφωσφορική ινοσιτόλη (> 95 % εξαφωσφορική ινοσιτόλη) κυμαίνεται μεταξύ 22 και 30 mg/g, κάτι που είναι παρόμοιο με το επίπεδο που βρίσκεται στον ηλίανθο, αλλά υψηλότερο από αυτό που βρέθηκε στο σινάπι, τη σόγια, την κράμβη και την ελαιοκράμβη, με τα υψηλότερα επίπεδα να απαντώνται στις χειμερινές ποικιλίες και να εξαρτώνται από την τοποθεσία της καλλιέργειας (Matthäus & Zubr, 2000). Ωστόσο, η ποσότητα φυτικού οξέος που βρέθηκε στην καμελίνα είναι μόνο περίπου 1,5 φορές παραπάνω από αυτήν της ελαιοκράμβης (17,4 mg/g) (Matthäus & Angelini, 2005).

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες βρίσκονται σε όλα τα σπέρματα αλλά αντιπροσωπεύουν μια πιθανή αντιδιατητική ένωση που μπορεί να μειώσει την πεπτικότητα των σιτηρεσίων στα μηρυκαστικά και τα μη μηρυκαστικά (Matthäus & Angelini, 2005). Στην καμελίνα, τα επίπεδα ταννινών είναι 1,1 mg/g, τα οποία είναι σημαντικά μικρότερα από αυτά της ελαιοκράμβης (4 mg/g) (Matthäus &

Angelini, 2005). Άλλοι αναφέρουν ένα εύρος από 1 έως 2 mg/g, μικρότερο δηλαδή από της ελαιοκράμβης και παρόμοιο με το σινάπι και της κράμβης (Matthäus & Zubr, 2000).

Συνεπώς, ένας αριθμός αντιδιαιτητικών ενώσεων, όπως η σιναπίνη, το φυτικό οξύ, οι ταννίνες και οι γλυκοσινολάτες, βρίσκονται στα σπέρματα της καμελίνας και ως εκ τούτου στο άλευρό της. Ωστόσο, στην καμελίνα, οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις βρίσκονται σε επίπεδα ισοδύναμα ή χαμηλότερα απ' ό,τι στην ελαιοκράμβη, η οποία θεωρείται ως μία αρκετά αποδοτική καλλιέργεια ελαιούχων σπερμάτων και χρησιμοποιείται συχνά στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων. Ως εκ τούτου, η έλλειψη αρνητικών επιπτώσεων σε δοκιμές με τη χρήση αλεύρου καμελίνας σε διάφορα είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένων και των μηρυκαστικών, δείχνει ότι στα κατάλληλα επίπεδα ενσωμάτωσης το άλευρο της καμελίνας αποτελεί μια ασφαλή εναλλακτική διατροφική επέμβαση στη διατροφή των παραγωγικών ζώων (Murphy, 2016).

Παρόλα αυτά, γίνεται αντιληπτό ότι περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση της επίδρασης των διαφορετικών επιπέδων της ενσωμάτωσης των σπερμάτων της στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών.

### **3.3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ**

Η ενσωμάτωση των σπερμάτων καμελίνας, του αλεύρου της, του ελαίου της και των λοιπών υποπροϊόντων της στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών, έχει μελετηθεί κυρίως με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασής τους στη γαλακτοπαραγωγή, στη χημική σύσταση και στο προφίλ των ΛΟ του γάλακτος. Πιο συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια των γαλακτοπαραγωγών προβατινών αύξησε τη γαλακτοπαραγωγή (Mierlita *et al.*, 2011, Mierlita *et al.*, 2015). Η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγών αγελάδων, μείωσε σημαντικά την προσληφθείσα ΞΟ δίχως να επηρεάσει τη γαλακτοπαραγωγή, ενώ η χορήγηση αλεύρου καμελίνας μείωσε τη λιποπεριεκτικότητα και εμφάνισε αλλαγές στην ικανότητα επάλειψης του βουτύρου (Hurtaud & Peyraud, 2007). Επίσης, προϊόν Κεφίρ που παρασκευάστηκε από γάλα αιγών που διατράφηκαν με σιτηρέσιο που περιείχε καμελίνα (χαρακτηρίστηκε ως αποδεκτό όσον αφορά την υφή, τη γεύση, το άρωμα, το χρώμα και τη πυκνότητά του (Pikul *et al.*, 2014). Αναφορικά με μελέτες που προσδιόρισαν το προφίλ των ΛΟ στο γάλα, ένα γενικότερο συμπέρασμα είναι ότι τα σπέρματα της καμελίνας και τα υποπροϊόντα της (έλαιο και άλευρο) τροποποίησαν το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος προς την επιθυμητή για



τον καταναλωτή κατεύθυνση σε πειραματισμούς μηρυκαστικών (Hurtaud & Peyraud, 2007, Mierlita *et al.*, 2011, Halmenies-Beauchet-Fileau *et al.*, 2011, Pikul *et al.*, 2014, Mierlita & Vicas, 2015, Bayat *et al.*, 2015, Mierlita *et al.*, 2018). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μείωση στα SFA και σημαντική αύξηση στα επιθυμητά PUFA όπως το ALA και το CLA. Ειδικότερα, οι Halmenies-Beauchet-Fileau *et al.* (2011) συμπέραναν ότι η βιοϋδρογόνωση των C<sub>18</sub> UFA σε C<sub>18:0</sub> στη Μ.Κ. δεν πραγματοποιήθηκε στον ίδιο βαθμό όταν χορηγήθηκαν εξωθημένα σπέρματα καμελίνας σε σύγκριση με τη χορήγηση του ελαίου της.

Επιπλέον, μετά από χορήγηση ελαίου καμελίνας σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες, παρατηρήθηκε μείωση στην παραγωγή CH<sub>4</sub> και CO<sub>2</sub> αλλά δεν επηρεάστηκε σημαντικά ο πληθυσμός των βακτηρίων, των μεθανοβακτηρίων, των πρωτόζωων και των μυκήτων της Μ.Κ. (Bayat *et al.*, 2015). Αντίθετα, σε βούβαλους, μελετήθηκε η επίδραση της ενσωμάτωσης ελαίου της καμελίνας σε σιτηρέσια με διαφορετικά επίπεδα χονδροειδών ζωοτροφών (70/30, 50/50 και 30/70 ΧΖ/ΣΖ). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το έλαιο της καμελίνας μείωσε την παραγωγή CH<sub>4</sub> *in vitro*, στο μεσαίο και χαμηλό ποσοστό συμμετοχής των ΧΖ στα σιτηρέσια. Επίσης, και στους τρεις διαφορετικούς λόγους ΧΖ/ΣΖ επηρεάστηκε σημαντικά η αμμωνία και η μικροβιακή πρωτεΐνη. Για όλα τα σιτηρέσια, η χορήγηση ελαίου καμελίνας μείωσε σημαντικά τα ολικά βακτήρια, τα πρωτόζωα και τα μεθανοβακτήρια. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση στην αναλογία των Firmicutes προς Bacteroidetes. Η προσθήκη ελαίου καμελίνας επίσης επηρέασε τη σχετική αφθονία της *Prevotella* στη χαμηλή και μέτρια αναλογία χονδροειδών ζωοτροφών στα σιτηρέσια, ενώ αύξησε τη σχετική αφθονία των *Ruminobacter* και *Pseudobutyribrio* (Ebeid *et al.*, 2020).

Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι η ΕΕ εισάγει περίπου 14 εκατομμύρια τόνους σόγιας ετησίως ως κύρια πρωτεϊνική πηγή για τη διατροφή των παραγωγικών ζώων (ΕΥ, 2022). Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή (Κεφ. 1) επιβάλλεται να προωθηθούν και στηριχθούν αποτελεσματικές και βιώσιμες στρατηγικές που υποστηρίζουν και επεκτείνουν την καλλιέργεια ευρωπαϊκών καλλιεργειών, κατάλληλων για την αντικατάσταση της σόγιας με απώτερο σκοπό τη μείωση του κόστους αλλά και της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος. Συνεπώς, στηριζόμενοι στα προαναφερθέντα δεδομένα ότι η καμελίνα καλλιεργείται και στην ΕΕ, έχει ελάχιστες ανάγκες, έχει αυξημένη ανθεκτικότητα ως καλλιέργεια και λόγω της ύπαρξης σπουδαιών βιολειτουργικών συστατικών, μπορεί επάξια να θεωρηθεί ως αξιόλογη πρωτεϊνική πηγή και αποτελεσματικός ανταγωνιστής της σόγιας.

Συνοψίζοντας, οι ήδη δημοσιευμένες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν εστίασαν κυρίως στην επίδραση της ενσωμάτωσης των σπερμάτων καμελίνας στη γαλακτοπαραγωγή και στο προφίλ των ΛΟ του γάλακτος. Οι μελέτες που διερεύνησαν την επίδραση της ενσωμάτωσης καμελίνας σε προβατίνες είχαν δύο περιορισμούς: α) χρησιμοποιούσαν σιτηρέσια βασιζόμενα στις ΧΖ πλούσιες σε ω-3 PUFA (α-λινολενικό οξύ) (φρέσκες ΧΖ, βοσκοτόπια ή ενσίρωμα) και αξιολογούσαν ένα επίπεδο ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (που κυμαίνονται από 70 - 200 g/προβατίνα/ημέρα) (Mierlita *et al.*, 2011; Mierlita *et al.*, 2015; Mierlita *et al.*, 2018). Επομένως, ήταν δύσκολο να γίνει διάκριση μεταξύ της επίδρασης των ΧΖ και της καμελίνας στη φυσιολογία των ζώων. Επιπλέον, η ενός επιπέδου ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας αποτρέπει την αποσαφήνιση μιας δοσοεξαρτώμενης επίδρασης των σπερμάτων καμελίνας επί του ανοσοποιητικού συστήματος από ένα σιτηρέσιο πλούσιο σε PUFA η οποία δυνητικά μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες (Tsiplakou *et al.*, 2017c). Επίσης, έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως *in vitro* μελέτες που διερεύνησαν την επίδραση της καμελίνας και των υποπροϊόντων της στους μικροοργανισμούς της Μ.Κ. Εφόσον δεν έχουν πραγματοποιηθεί σχετικές μελέτες σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες, εξίσου σπουδαία είναι η *in vivo* μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας στους μικροοργανισμούς της Μ.Κ. και κατ' επέκταση τόσο στις ζυμωτικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε αυτή, όσο και στο περιβαλλοντικό αποτύπωμα.

## 4. Η ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΩΣ ΚΑΙΝΟΤΟΜΟΣ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ

Τα τελευταία χρόνια, έχει μελετηθεί εκτενώς η ενσωμάτωση μικροφυκών στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων. Προηγουμένως έγινε αναφορά στα αποτελέσματα μίας τέτοιας ενσωμάτωσης στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών και της πιθανής επιδράσής τους. Η σπιρουλίνα (*Arthrospira* sp.) είναι ένα βρώσιμο, νηματοειδές, κυανοβακτήριο σπειροειδούς σχήματος, που ταξινομείται επισήμως στα γαλαζοπράσινα μικροφύκη (Becker, 2007, Gouveia *et al.*, 2008, Gupta *et al.*, 2008). Είναι μια από τις παλαιότερες μορφές ζωής που αναπτύσσονται σε αλκαλικές ηφαιστειακές λίμνες ζεστού νερού στη γη τα τελευταία 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια περίπου. Βρίσκεται φυσικά στις αλκαλικές λίμνες του Μεξικό και της Αφρικής (Shimamatsu, 2004), όπου έχει μακρά ιστορία ως πηγή τροφής για τους αρχαίους πληθυσμούς των περιοχών αυτών. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα είδη σπιρουλίνας για συμπληρώματα διατροφής είναι η *Spirulina platensis* και η *Spirulina maxima*. Έχει μακρά ιστορία ως αξιοποιήσιμη τροφή και μπορεί να αναπτυχθεί σε πολλά μέρη σε όλο τον κόσμο.

Η σπιρουλίνα «ανακαλύφθηκε» σχετικά πρόσφατα από τους Leonard και Compere τη δεκαετία του 1960 (Shimamatsu, 2004) και έκτοτε έγινε προϊόν μαζικής παραγωγής (Shimamatsu, 2004, Spolaore *et al.*, 2006). Επί του παρόντος, παράγεται εμπορικά παγκοσμίως και χρησιμοποιείται ως θρεπτικό συμπλήρωμα τόσο στη διατροφή των ανθρώπων όσο και των ζώων (Muhling *et al.*, 2005), με περίπου το ήμισυ της συνολικής παραγωγής της να χρησιμοποιείται στη ζωική παραγωγή και σε ιχθυοτροφές.

### 4.1. ΤΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ

Η σπιρουλίνα είναι ένα βρώσιμο μικροφύκος και μία θρεπτική πηγή για πολλά παραγωγικά ζώα. Τα ευρήματα των ερευνών έχουν συσχετίσει τη σπιρουλίνα με βελτιώσεις στην ανάπτυξη, τη γονιμότητα, την ποιότητα των προϊόντων και γενικότερα την υγεία και ευζωία των ζώων. Η επίδραση στην ανάπτυξη των ζώων πηγάζει από την περιεκτικότητά της σε θρεπτικά συστατικά και πρωτεΐνη, οδηγώντας έτσι σε αυξημένη εμπορική παραγωγή για την κάλυψη της ζήτησης των καταναλωτών. Η περιεκτικότητά της σπιρουλίνας σε πρωτεΐνη είναι αρκετά υψηλή και χαρακτηρίζεται από ένα ολοκληρωμένο προφίλ αμινοξέων, με κυρίαρχα τη λευκίνη, τη βαλίνη

και την ισολευκίνη (Vaz *et al.*, 2016). Η σπιρουλίνα περιέχει τόσο απαραίτητα όσο και μη απαραίτητα αμινοξέα σε μέτρια υψηλές ποσότητες. Τα βασικά αμινοξέα της σπιρουλίνας είναι η λευκίνη (55 mg/g), η τρυπτοφάνη (10 mg/g), η μεθειονίνη (14 mg/g), η φενυλαλανίνη (28 mg/g), η λυσίνη (30 mg/g), η θειονίνη (33 mg/g), η ισολευκίνη (36 mg/g) και η βαλίνη (45 mg/g). Με βάση την απαραίτητη περιεκτικότητα σε αμινοξέα, η χρήση της σπιρουλίνας ως συμπλήρωμα τροφής μπορεί να καλύπτει τις καθημερινές ανάγκες σε απαραίτητα αμινοξέα. Η σπιρουλίνα περιέχει και μη απαραίτητα αμινοξέα όπως κυστεΐνη (7 mg/g), ιστιδίνη (10 mg/g), προλίνη (27 mg/g), τυροσίνη (30 mg/g), γλυκίνη (32 mg/g), σερίνη (33 mg/g), αργινίνη (44 mg/g), αλανίνη (47 mg/g), ασπαρτικό (60 mg/g), γλουταμινικό οξύ (92 mg/g).

## 4.2. ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ

Η σπιρουλίνα έχει υψηλή θρεπτική αξία λόγω της περιεκτικότητάς της σε πρωτεΐνες, απαραίτητα αμινοξέα, ανόργανα στοιχεία, απαραίτητα ΛΟ, βιταμίνες και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E και καροτινοειδή) (Vaz *et al.*, 2016). Επιπλέον, είναι πλούσια σε κάλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, ψευδάργυρο, φώσφορο και σίδηρο. Η αναλογία Ca:P είναι συμβατή με την υγεία των οστών για τη μείωση της απασβέστωσης. Η περιεκτικότητα σε σίδηρο, ασβέστιο και φώσφορο της σπιρουλίνας είναι 1,7, 15 και 10 mg/g δείγματος, αντίστοιχα (Liestianty *et al.*, 2019). Η αποξηραμένη σκόνη σπιρουλίνας περιέχει και βιταμίνες όπως θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νιασίνη, πυριδοξίνη, κυανοκοβαλαμίνη και τοκοφερόλη. Μία από τις σημαντικές και σύνθετες βιταμίνες είναι η κοβαλαμίνη (βιταμίνη B12) η οποία περιέχεται μόνο σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Η περιεκτικότητα της σπιρουλίνας σε κυανοκοβαλαμίνη (B12) είναι περίπου 3,6 μg/g δείγματος. Η σπιρουλίνα περιέχει ποικίλα βιολετουργικά συστατικά με αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, όπως φαινολικές φυτοχημικές ουσίες, β-καροτίνη και τη C-φυκοκυανίνη. Πιο συγκεκριμένα είναι γνωστή καλή πηγή β-καροτενίου (5,8 mg g<sup>-1</sup>) (Liestianty *et al.*, 2019). Το β-καροτένιο απορροφάται για το βιομετασχηματισμό σε βιταμίνη A. Η φυκοκυανίνη, η χλωροφύλλη και τα καροτινοειδή αποτελούν μια σημαντική ομάδα χρωστικών που απαντώνται στη σπιρουλίνα. Τα καροτινοειδή χαρακτηρίζονται ως λιπόφιλα αντιοξειδωτικά και ως αντικαρκινικός παράγοντας. Η περιεκτικότητα σε φυκοκυανίνη, χλωροφύλλη και καροτινοειδή είναι 180, 11 και 6 mg/g δείγματος, αντίστοιχα (Liestianty *et al.*, 2019).

Η σπιρουλίνα είναι γνωστό ότι περιέχει υψηλό ποσοστό γλυκολιπιδίων και σουλφολιπιδίων. Περιέχει 5 - 8 % λιπίδια, από τα οποία το 40 % είναι γλυκολιπίδια και 2 - 5 % είναι

σουλφολιπίδια τα οποία έχουν θεραπευτική αξία. Οι χρωστικές, που ονομάζονται φυκοχολίνες, περιλαμβάνουν τη φυκοκυανίνη και την αλλοφυκοκυανίνη. Οι φυκοχολίνες έχουν παρόμοια δομή με χολικές χρωστικές όπως η χολερυθρίνη. Στα κύτταρα της σπιρουλίνας, οι φυκοχολίνες συνδέονται με πρωτεΐνες, γνωστό ως σύμπλοκο φυκοχολίνης-πρωτεΐνης που ονομάζεται φυκοχολοπρωτεΐνη. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα θρεπτικά συστατικά της σπιρουλίνας μπορούν να αξιοποιηθούν εύκολα από τον οργανισμό και συμβάλλουν στην αύξηση της κατάστασης των θρεπτικών συστατικών στο φυσιολογικό επίπεδο.

Όσον αφορά το προφίλ των ΛΟ της σπιρουλίνας, απαντώνται ΛΟ όπως το μυριστικό, το επταδεκανοϊκό, το στεατικό, το ελαϊκό, το παλμιτολεϊκό, το λινελαϊκό οξύ, το γ- λινελαϊκό οξύ (GLA) και το παλμιτικό. Το μυριστικό και το παλμιτικό είναι τα ΛΟ με τη χαμηλότερη και υψηλότερη περιεκτικότητα, αντίστοιχα. Ωστόσο, οι αναφορές ποικίλουν για τη συνολική περιεκτικότητα σε ΛΟ. Οι Liestianty *et al.* (2019) αναφέρουν ότι ανέρχεται στα 81,2 mg/g ξηρού βάρους, ενώ αντίθετα οι Kent *et al.* (2015) αναφέρουν μόνο περίπου 48,73 mg/g ξηρού βάρους. Η περιεκτικότητα σε GLA είναι 16 mg (Liestianty *et al.*, 2019). Έχει χαρακτηριστεί ως μια πλούσια πηγή ειδικά του GLA το οποίο έχει συνδεθεί άμεσα με οφέλη για την υγεία (Howe *et al.*, 2006) (Πίνακας 7.1.).

Συνοψίζοντας, η υψηλή περιεκτικότητα της σπιρουλίνας σε πρωτεΐνες τη διακρίνει ως μια αξιόλογη νέα ζωοτροφή (Doreau *et al.*, 2010). Η θρεπτική αξία της σπιρουλίνας υπήρξε το θέμα πολλών εργασιών (Belay *et al.*, 1993, Diraman *et al.*, 2009). Ωστόσο, η θρεπτική της αξία είναι γνωστό ότι διαφέρει ελαφρώς ανάλογα με το παραγωγικό σύστημα. Αυτές οι διαφορές υπήρξαν, επίσης, το θέμα αρκετών μελετών (Tokusoglu & Unal, 2003, Babadzhanov *et al.*, 2004, Muhling *et al.*, 2005, Mata *et al.*, 2010).

**Πίνακας 4.1.** Συνοπτική παρουσίαση των θρεπτικών συστατικών, αμινοξέων και λιπαρών οξέων της σπιρουλίνας

<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>Ποσότητα</b>	<b>Μονάδες</b>
<b>Μέταλλα</b>		
Ασβέστιο	1200	mg/kg
Μαγνήσιο	3300	mg/kg
Φωσφορικό	13000	mg/kg
Κάλιο	26000	mg/kg
Νάτριο	22000	mg/kg
<b>Βιταμίνες/Καροτινοειδή</b>		
β-καροτένιο	1400000	μg/100g
Ολικά καροτινοειδή	1700	Mg/kg
Προβιταμίνη Α	23300000	IU kg <sup>-1</sup>
Θειαμίνη (B1)	34 – 50	mg/kg
B2	30 – 46	mg/kg
Νιασίνη (B3)	130 – 150	mg/kg
B6	5 – 8	mg/kg
B12	1,5 – 2,0	mg/kg
B9	0,50	mg/kg
<b>Αμινοξέα</b>		
Λυσίνη	2,60 – 4,63	% ΞΟ
Φενυλαλανίνη	2,60 – 4,10	% ΞΟ
Τυροσίνη	2,60 – 3,42	% ΞΟ
Λευκίνη	5,90 – 8,37	% ΞΟ
Μεθειονίνη	1,30 – 2,75	% ΞΟ
Γλουταμινικό οξύ	7,04 – 7,30	% ΞΟ
Ασπαρκτικό οξύ	5,20 – 6,00	% ΞΟ
<b>ΛΟ</b>		
C16:0	25,8 - 44,9	% των ολικών ΛΟ
C16:1	2,3 – 3,8	% των ολικών ΛΟ
C18:0	1,7 – 2,2	% των ολικών ΛΟ
C18:1	10,1 – 16,6	% των ολικών ΛΟ

C18:2	11,1 – 12,0	% των ολικών ΛΟ
C18:3 n-6	17,1 – 40,1	% των ολικών ΛΟ

(Προσαρμοσμένο από Holman & Malau-Aduli, 2012a)

#### 4.3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ

Όσον αφορά την ενσωμάτωση της σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών ζώων, οι μελέτες έχουν κυρίως εστιάσει στην επίδρασή της στην ανάπτυξη των ζώων, την παραγωγικότητα και την ποιότητα των ζωοκομικών προϊόντων. Η ικανότητα των μηρυκαστικών να πέπτουν τα μη επεξεργασμένα μικροφύκη (Gouveia *et al.*, 2008) καθιστά τη σπιρουλίνα ιδιαίτερα κατάλληλη για διατροφική χρήση. Αυτό μπορεί να υποστηριχθεί περαιτέρω από την αποτελεσματική πέψη των κλασμάτων των υδατανθράκων της σπιρουλίνας από μηρυκαστικά όταν χρησιμοποιείται σε επίπεδα έως και 20 % της συνολικής ποσότητας τροφής, σε σύγκριση με άλλους τύπους τροφών φυκών όπως η *Chlorella* ή *Scenedesmus obliquus* (Gouveia *et al.*, 2008). Η σπιρουλίνα έχει δειχθεί ότι αυξάνει την παραγωγή μικροβιακής πρωτεΐνης και μειώνει το χρόνο κατακράτησής της εντός της Μ.Κ. (Quigley & Poppi, 2009). Επιπλέον, περίπου το 20 % της πρωτεΐνης της σπιρουλίνας προσπερνά την αποδόμηση στη Μ.Κ. και είναι επομένως διαθέσιμη για άμεση απορρόφηση εντός του ηνύστρου (Quigley & Poppi, 2009, Panjaitan *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2010).

Στις ήδη δημοσιευμένες μελέτες, τα επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών κυμαίνονταν ευρέως και μεταξύ 2 - 880 g/ζώο/ημέρα στις αγελάδες (Šimkus *et al.*, 2007, Kulpys *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2010, Christaki *et al.*, 2012, Póti *et al.*, 2015, Manzocchi *et al.*, 2020) και 2 - 60 g/ζώο/ημέρα σε αρνιά (Bezzera *et al.*, 2010, Shimkiene *et al.*, 2010, Holman *et al.*, 2012b, Liang *et al.*, 2020). Σε αυτές τις μελέτες, μελετήθηκε η επίδραση της χορήγησης σπιρουλίνας στις αποδόσεις των ζώων (Holman *et al.*, 2012b, Kulpys *et al.*, 2009, Bezzera *et al.*, 2010, Shimkiene *et al.*, 2010), στην παραγωγικότητα (Šimkus *et al.*, 2007, Kulpys *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2010) και στην ποιότητα του προϊόντος (Šimkus *et al.*, 2007, Kulpys *et al.*, 2009, Christaki *et al.*, 2012, Póti *et al.*, 2015, Liang *et al.*, 2020, Manzocchi *et al.*, 2020).

Μελέτες που διερεύνησαν την επίδραση της χορήγησης σπιρουλίνας σε σιτηρέσια γαλακτοπαραγωγικών αγελάδων συμπέραναν θετικά αποτελέσματα με άμεσο αντίκτυπο στην παραγωγικότητα των ζώων. Πιο συγκεκριμένα, οι Kulpys *et al.* (2009) διαπίστωσαν ότι οι

αγελάδες που τους χορηγήθηκε σπιρουλίνα (200 g/ημέρα) είχαν αύξηση 21 % στην παραγωγή γάλακτος και βελτιωμένη σωματική κατάσταση (8,5 - 11 %) σε σύγκριση με αυτές της ομάδας του μάρτυρα. Επιπλέον, η χορήγηση 2 g/ημέρα σπιρουλίνας σε αγελάδες, αύξησε τη λιποπεριεκτικότητα (μεταξύ 17,6 % και 25,0 %), την πρωτεΐνη (κατά 9,7 %) και τη λακτόζη (κατά 11,7 %) στο γάλα και μείωσε τον αριθμό των σωματικών κυττάρων, βελτιώνοντας επομένως την ασφάλεια του γάλακτος σαν προϊόν (Šimkus *et al.*, 2007). Επιπλέον, η συγκέντρωση των SFA μειώθηκε, ενώ των MUFA και PUFA αυξήθηκαν στο γάλα αγελάδων που κατανάλωναν 40 g σπιρουλίνας καθημερινά (Christaki *et al.*, 2012). Αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να αποδοθούν στην επίδραση της σπιρουλίνας στη σύνθεση μικροβιακής πρωτεΐνης, στην αποφυγή της υποβάθμισης στη Μ.Κ. και στα θρεπτικά συστατικά της.

Όσον αφορά τα μικρά μηρυκαστικά, οι Bezerra *et al.* (2010) αναφέρουν χαρακτηριστικά ότι αρνιά που τους χορηγήθηκε σπιρουλίνα εμφάνισαν υψηλότερα σωματικά βάρη και μέση ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους, σε σύγκριση με αρνιά της ομάδας του μάρτυρα. Οι Holman και Malau-Aduli, (2012b) δείχνουν επίσης αύξηση του σωματικού βάρους των αρνιών μέσω της χορήγησης σπιρουλίνας μαζί με βελτίωση του δείκτη θρεπτικής κατάστασης και άλλων χαρακτηριστικών διαμόρφωσης των σφάγιων. Ωστόσο, η διακύμανση στην ημερήσια αύξηση του σωματικού βάρους δεν χαρακτηρίστηκε ως στατιστικά σημαντική. Αυτή η απόκλιση μεταξύ των δύο μελετών ήταν κυρίως λόγω ηλικιακής διαφοράς των αρνιών και του βαθμού διάλυσης της σπιρουλίνας σε νερό. Οι Shimkiene *et al.* (2010) αναφέρουν ότι εγκυμονούσες γαλακτοπαραγωγές προβατίνες που έλαβαν σπιρουλίνα έδωσαν βαρύτερα αρνιά (πάνω από 4,07 %) με μεγαλύτερο μέσο ημερήσιο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τις προβατίνες που δεν λάμβαναν.

Επίσης, σε αρνιά, η δραστηριότητα της GSH-Px, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα και η δραστηριότητα της CAT στο ήπαρ, βρέθηκαν αυξημένες όταν ενσωματώθηκε σπιρουλίνα σε σιτηρέσιο συμβατικό αλλά και σε σιτηρέσιο υψηλής ενεργειακής αξίας, σε σύγκριση με σιτηρέσιο στο οποίο δεν χορηγήθηκε. Όμοια στο ήπαρ των ζώων που χορηγήθηκε συμβατικό σιτηρέσιο με προσθήκη 3 % σπιρουλίνα, παρουσιάστηκε αυξημένη δραστηριότητα για τη GSH-Px καθώς επίσης και στο πλάσμα για τη CAT. Στην ίδια λογική, σε ζώα που τους χορηγήθηκε υψηλής ενεργειακής αξίας σιτηρέσιο με ενσωμάτωση σπιρουλίνας σε ποσοστό 1 και 3 % σε σύγκριση με ζώα που τους χορηγήθηκε σιτηρέσιο υψηλής ενεργειακής αξίας χωρίς όμως την προσθήκη σπιρουλίνας, αναφέρθηκε σημαντική αύξηση στη δραστηριότητα της SOD και της



GSH-Px σε δείγματα από τον μήκιστο θωρακικό και οσφυϊκό μυ (*Longissimus thoracis et lumborum*), ενώ η χορήγηση με 3 % σπιρουλίνα προκάλεσε αύξηση στη δραστικότητα της SOD στο ήπαρ (Liang *et al.*, 2020).

Κατά συνέπεια, η σπιρουλίνα αναγνωρίζεται ως οικονομικά αποδοτικό μέσο για τη βελτίωση της παραγωγικότητας των ζώων και για ένα βιώσιμο μέλλον στην ασφάλεια των τροφίμων (Holman & Malau-Aduli, 2012a). Επίσης, από τα διαφορετικά συστήματα παραγωγής, μπορεί να προκύψει ένα προϊόν δεύτερης διαλογής, το οποίο δύναται να προορίζεται για χρήση στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων. Ωστόσο, η σημερινή μας γνώση σχετικά με την ανταπόκριση των ζώων και ειδικότερα των μικρών μηρυκαστικών στη χορήγηση διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα σιτηρέσιά τους, είναι σχετικά περιορισμένη και σε μεγάλο βαθμό άγνωστη, καθώς πολλές μελέτες παρουσιάζουν αντικρουόμενα συμπεράσματα. Επομένως, μελέτες σχετικά με τα δραστικά συστατικά της σπιρουλίνας και τις σχετικές βιολογικές οδούς θα βοηθήσουν στη διεύρυνση των γνώσεων, του πεδίου εφαρμογής και των εφαρμοστέων επιπτώσεων στη βιώσιμη εκτροφή παραγωγικών ζώων στο άμεσο μέλλον.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι δεν έχουν διεξαχθεί πειραματισμοί που να αξιολογούν την επίδραση των διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης της σπιρουλίνας στη γαλακτοπαραγωγή και στην ποιότητα του παραγόμενου γάλακτος των προβατινών. Λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης της σπιρουλίνας και του χαρακτηρισμού της ως συμπλήρωμα υψηλής διατροφικής αξίας που δύναται να επιδρά θετικά στο ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, κρίνεται σπουδαίο να μελετηθεί η επίδραση των διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης της σπιρουλίνας και κατ' επέκταση των βιολειτουργικών συστατικών της τόσο στην οξειδωτική κατάσταση του οργανισμού και του παραγόμενου γάλακτος όσο και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Τέλος, η επίδραση των διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στους μικροοργανισμούς της Μ.Κ. των προβατινών παραμένει αδιερεύνητη κάτι που χρήζει περαιτέρω μελέτη για μια πιο ολιστική προσέγγιση της αξιολόγησης μίας τέτοιας διατροφικής επέμβασης.

## 5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι μέχρι τώρα μελέτες που διερεύνησαν τα αποτελέσματα της ενσωμάτωσης της καμελίνας στα σιτηρέσια των γαλακτοπαραγωγών προβατινών είχαν δύο περιορισμούς: το είδος των ΧΖ (φρέσκια χορτονομή, βοσκοτόπια ή ενσίρωμα) ήδη πλούσιων σε ω-3 PUFA [α-λινολενικό οξύ, C18:3 n-3 (ALA)] και τη χρήση μόνο ενός επιπέδου ενσωμάτωσης (που κυμαίνεται από 70 έως 200 g/προβατίνα/ημέρα). Στην πράξη, το είδος των ΧΖ επιδρούσε πιθανώς με τα σπέρματα καμελίνας στην τροποποίηση του προφίλ ΛΟ των σιτηρεσίων, ενώ το μοναδικό επίπεδο ενσωμάτωσης που αξιολόγησε η εκάστοτε μελέτη, δεν επέτρεψε τη μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης και την αξιολόγηση ενός βέλτιστου επιπέδου. Επίσης, υπάρχουν περιοριστικοί παράγοντες χορήγησης λιπαρών ουσιών στα σιτηρέσια των προβατινών. Καθώς τα σπέρματα καμελίνας είναι υψηλής περιεκτικότητας σε ολικές λιπαρές ουσίες (ΟΛΟ), κρίνεται σκόπιμο να πραγματοποιηθεί σε βάθος αξιολόγηση του βέλτιστου ποσοστού ενσωμάτωσής τους, αποκλιμακώνοντας ολόκληρο το εύρος με τη μελέτη διαφορετικών ποσοστών ενσωμάτωσης. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, απαιτείται περισσότερη έρευνα για τον καθορισμό του βέλτιστου επιπέδου ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια των προβατινών. Επιπλέον, η επίδραση των σπερμάτων καμελίνας στην οξειδωτική κατάσταση του οργανισμού και του γάλακτος, στο ανοσοποιητικό σύστημα και στους μικροοργανισμούς της Μ.Κ., δεν έχει μελετηθεί σε γαλακτοπαραγωγές προβατίνες.

Τα μικροφύκη δύναται να επηρεάσουν τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος των μηρυκαστικών καθώς επίσης και να τροποποιήσουν το προφίλ των ΛΟ αυτού προς την επιθυμητή για τον καταναλωτή κατεύθυνση. Η σπιρουλίνα έχει πλούσια αντιοξειδωτική δράση μέσω των βιολειτουργικών συστατικών της. Παρόλα αυτά δεν έχουν διεξαχθεί πειραματισμοί που να αξιολογούν την επίδραση της σπιρουλίνας στην οξειδωτική κατάσταση των προβατινών και της οξειδωτικής σταθερότητας του γάλακτος. Η σπιρουλίνα έχει αποδειχθεί ότι έχει έντονη δράση μέσω των βιολειτουργικών συστατικών της και στο ανοσοποιητικό σύστημα και έχει συνδεθεί με αξιοσημείωτη δράση στο ανοσοποιητικό σύστημα τόσο του ανθρώπου όσο και ζώων. Παρόλα αυτά, χρήζει ιδιαίτερης προσοχής το επίπεδο ενσωμάτωσής της καθώς είναι πλούσια σε βαρέα μέταλλα. Ωστόσο, επίσης δεν έχει διερευνηθεί η επίδρασή της στο ανοσοποιητικό σύστημα και πιο συγκεκριμένα στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία των προβατινών. Εν κατακλείδι, η επιστημονική κοινότητα στοχεύει τα τελευταία χρόνια στη σε βάθος μελέτη του μικροβιώματος της Μ.Κ. και των ζυμωτικών διεργασιών που

γίνονται σε αυτή με στόχο τον χειρισμό της με τρόπο τον οποίο να στοχεύει στη βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας και στη μείωση της μεθανογένεσης και του περιβαλλοντικού αποτυπώματος των μηρυκαστικών. Όμοια, η επίδραση της σπιρουλίνας στην τροποποίηση του μικροβιώματος της Μ.Κ. των προβατινών δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν.

## **5.1. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ**

Ο σκοπός του πρώτου πειράματος ήταν η αξιολόγηση των τριών διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης των σπερμάτων της καμελίνας στα σιτηρέσια των γαλακτοπαραγωγών προβατινών προς μερική αντικατάσταση του σογιάλευρου και του αραβοσίτου, με στόχο την διερεύνηση της επίδρασης των ποικίλων βιολειτουργικών συστατικών της που αναλύθηκαν εκτενώς στο Κεφάλαιο 3 στους εξής πυλώνες/ερευνητικούς στόχους:

A) στα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος,

B) στο προφίλ των ΛΟ στο Υ.Μ.Κ., στο πλάσμα του αίματος και στο γάλα,

Γ) στην αξιολόγηση της οξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού των προβατινών και της οξειδωτικής σταθερότητας του παραγόμενου γάλακτος,

Δ) στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων κυτταροκινών που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία, σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα του αίματος και

E) στους μικροοργανισμούς της Μ.Κ.

### **5.1.1. Πειραματικό σχέδιο πρώτου πειραματισμού**

Για τον σκοπό του πρώτου πειράματος επιλέχθηκαν 48 υγιείς προβατίνες φυλής Χίου και κατανεμήθηκαν σε 4 ισοδύναμες ομάδες ( $n = 12$ ) από πλευράς διορθωμένης ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγής (6 %) ( $1,85 \pm 0,3$  kg/ημέρα), ηλικίας (2 - 4), ημέρες στη γαλακτοπαραγωγή ( $67 \pm 8$ ) και σωματικού βάρους ( $55.0 \pm 6,5$  kg). Η ομάδα του μάρτυρα κατανάλωνε βασικό σιτηρέσιο χωρίς την ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στο μείγμα ΣΖ, ενώ σπέρματα καμελίνας ενσωματώθηκαν σε ποσοστά 6 (CS6), 11 (CS11) και 16 % (CS16) στα μείγματα ΣΖ των υπολοίπων διατροφικών επεμβάσεων ανά προβατίνα, ημερησίως. Τα ζώα ενσταβλίζονταν ομαδικά ανά ομάδα και για τη διατροφή τους μεταφέρονταν σε ειδικά διαμορφωμένα ατομικά κελιά προκειμένου να επιτευχθεί ατομική διατροφή. Τα σιτηρέσια των

ζώων αποτελούνταν από μείγμα ΣΖ, σανό μηδικής και άχυρο σίτου. Τα σπέρματα καμελίνας στις ομάδες CS6, CS11 και CS16, ενσωματώθηκαν στα μείγματα ΣΖ προς μερική αντικατάσταση του σογιάλευρου και του αραβοσίτου. Η διάθεση του σιτηρεσίου γινόταν δύο φορές ημερησίως σε ισάριθμες ποσότητες, μετά το πέρας της μηχανικής άμελξης και συγκεκριμένα μετά τις 07:00 π.μ. και τις 5:00 μ.μ. Τα ζώα είχαν 24ωρη πρόσβαση σε καθαρό και πόσιμο νερό. Πριν την επίσημη έναρξη του κυρίως πειραματισμού προηγήθηκαν 7 (επτά) ημέρες προπειραματικής περιόδου προκειμένου τα ζώα να εγκλιματιστούν στις καινούριες συνθήκες σταβλισμού. Στη συνέχεια ξεκίνησε και επίσημα η κύρια πειραματική περίοδος με διάρκεια 60 (εξήντα) ημέρες (Μάρτιος - Μάιος). Στον Πίνακα 5.1. παρουσιάζονται η σύσταση των μειγμάτων ΣΖ (%), στον Πίνακα 5.2. η χημική σύσταση των ζωοτροφών (%) και το προφίλ των λιπαρών οξέων (%) σε αυτές και στον Πίνακα 5.3. το προφίλ των αμινοξέων (% του μείγματος ΣΖ όπως χορηγήθηκε). Όσον αφορά την καταναλωθείσα ξηρά ουσία, δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των ομάδων. Ο πειραματισμός πραγματοποιήθηκε στις πειραματικές εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Παραλίμνης, Νομού Πέλλας, του Ε.Λ.Γ.Ο. Δήμητρα (Γιαννιτσία, Ελλάδα, 40°44' N, 22°27' E). Η στέγαση και οι συνθήκες υγιεινής και ευζωίας των ζώων ήταν σε συμφωνία με τις οδηγίες της Επιτροπής Δεοντολογίας της Σχολής Επιστημών των Ζώων (ΕΕ 63/2010, Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2010).

**Πίνακας 5.1.** Σύσταση (g/kg) των μειγμάτων των συμπυκνωμένων ζωοτροφών (CON, CS6, CS11, CS16)

Συστατικά (g/kg)	Μείγματα ΣΖ			
	CON	CS6	CS11	CS16
Σπέρματα καμελίνας	0	60	110	160
Αραβόσιτος	344	344	344	344
Κριθή	200	200	200	200
Σιτάρι	100	100	100	100
Ηλιάλευρο	160	160	160	160
Σογιάλευρο	155	155	155	155
Πρόμιγμα ανόργανων στοιχείων και βιταμινών	41	41	41	41

**Πίνακας 5.2.** Χημική σύσταση (% ΞΟ) και προφίλ των λιπαρών οξέων (%) των μειγμάτων συμπυκνωμένων ζωοτροφών και των χονδροειδών ζωοτροφών

<b>Χημική σύσταση (% ΞΟ)</b>						
	<b>CON</b>	<b>CS6</b>	<b>CS11</b>	<b>CS16</b>	<b>Μηδική</b>	<b>Άχυρο σίτου</b>
Ξηρά ουσία	90,24	89,85	90,38	90,74	89,40	92,80
Τέφρα	8,67	8,10	7,32	6,65	9,30	7,60
Ολικές αζωτούχες ουσίες	20,03	19,96	20,09	21,30	20,00	4,80
Ολικές λιπαρές ουσίες	2,36	5,00	6,80	8,55	0,28	0,16
aNDFom	15,29	15,34	15,52	16,42	36,60	72,80
ADFom	5,29	8,35	8,36	8,85	32,50	49,30
<b>Περιεκτικότητα ΛΟ (%)</b>						
	<b>CON</b>	<b>CS6</b>	<b>CS11</b>	<b>CS16</b>	<b>Μηδική</b>	<b>Άχυρο σίτου</b>
C14:0	0,18	0,16	0,15	0,10	2,35	6,16
C15:0	0,00	0,04	0,04	0,03	0,68	0,83
C16:0	15,71	10,18	8,63	7,68	43,53	33,38
C16:1 n-7	0,22	0,14	0,12	0,11	2,99	0,00
C17:0	0,21	0,10	0,09	0,08	0,83	0,00
C17:1 n-7	0,41	0,10	0,08	0,04	0,00	0,00
C18:0	2,94	2,46	2,28	2,17	6,79	4,28
<i>trans</i> C18:1	0,20	0,10	0,11	0,05	0,00	0,00
<i>cis</i> -9 C18:1	20,65	17,89	17,84	17,35	3,01	9,00
<i>cis</i> C18:2 n-6	54,14	37,75	30,36	28,77	16,34	26,74
C18:3 n-6	0,00	0,12	0,13	0,14	0,00	0,00
C20:0	0,23	0,40	0,47	0,50	0,70	1,12
C18:3 n-3	3,41	18,11	21,76	23,44	18,59	11,22
C20:1 n-9	0,59	8,95	11,19	12,19	0,00	0,00
C20:2 n-6	0,46	1,13	1,35	1,40	0,00	0,00
C22:0	0,00	0,08	0,10	0,07	1,48	3,99
C20:3 n-3	0,40	0,32	0,33	0,32	0,00	0,00
C22:1 n-9	0,00	0,65	0,82	0,90	0,00	0,00
C24:0	0,27	0,18	0,19	0,19	2,71	1,94
C24:1 n-9	0,00	0,32	0,40	0,46	0,00	0,00

**Πίνακας 5.3.** Προφίλ αμινοξέων (% του μείγματος ΣΖ όπως χορηγήθηκε)

<b>Προφίλ αμινοξέων (% του μείγματος ΣΖ όπως χορηγήθηκε)</b>				
	<b>CON</b>	<b>CS6</b>	<b>CS11</b>	<b>CS16</b>
Γλυκίνη	1,21	1,19	1,17	1,29
Αλανίνη	0,85	0,97	0,96	0,83
Αργινίνη	1,60	1,42	1,39	1,75
Ασπαρτικό οξύ	1,71	2,08	2,04	1,67
Κυστεΐνη	0,33	0,39	0,39	0,44
Γλουταμινικό οξύ	3,77	4,39	4,34	3,87
Ιστιδίνη	0,36	0,30	0,25	0,33
Ισολευκίνη	0,64	0,68	0,64	0,62
Λευκίνη	1,42	1,46	1,34	1,29
Λυσίνη	0,37	0,66	0,61	0,46
Μεθειονίνη	0,27	0,34	0,33	0,35
Φαινυλαλανίνη	1,10	0,84	0,72	0,83
Προλίνη	1,15	1,19	1,14	1,15
Σερίνη	1,06	1,00	0,95	1,01
Θρεονίνη	0,78	0,76	0,72	0,77
Τυροσίνη	0,49	0,37	0,32	0,39
Βαλίνη	0,75	0,85	0,80	0,81
Λυσίνη/Μεθειονίνη	1,39	1,93	1,86	1,31

## **5.2. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ**

Σκοπός του δεύτερου πειράματος ήταν να αξιολογηθούν τρία διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης της σπιρουλίνας και η αξιολόγηση του βέλτιστου, στα σιτηρέσια των γαλακτοπαραγωγών προβατινών με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης των ποικίλων βιολειτουργικών συστατικών της που αναλύθηκαν εκτενώς στο Κεφάλαιο 4.2. στους ακόλουθους πυλώνες/στόχους που τέθηκαν προς διερεύνηση:

A) στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος,

B) στο προφίλ των ΛΟ στο Υ.Μ.Κ., στο πλάσμα του αίματος και στο παραγόμενο γάλα,

Γ) στην αξιολόγηση της οξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού των προβατινών και της οξειδωτικής σταθερότητας του παραγόμενου γάλακτος,

Δ) στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων κυτταροκινών που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία, σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα του αίματος και

Ε) στους μικροοργανισμούς της Μ.Κ.

### **5.2.1. Πειραματικό σχέδιο δεύτερου πειραματισμού**

Για τον σκοπό του δεύτερου πειράματος επιλέχθηκαν 48 υγιείς προβατίνες φυλής Χίου, και κατανεμήθηκαν σε 4 ισοδύναμες ομάδες ( $n = 12$ ) από πλευράς από πλευράς διορθωμένης ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγής (6 %) ( $1,85 \pm 0,3$  kg/ημέρα), ηλικίας (2 - 4), των ημέρων στη γαλακτοπαραγωγή ( $67 \pm 8$ ) και του σωματικού βάρους ( $54 \pm 6$  kg). Οι ομάδες αποτελούνταν από: την ομάδα του μάρτυρα στην οποία δεν χορηγήθηκε σπιρουλίνα (CON: 0 g σπιρουλίνας στο μείγμα ΣΖ/ζώο/ημέρα), και τις ομάδες SP5, SP10 και SP15 στις οποίες χορηγήθηκαν 5, 10 και 15 g σπιρουλίνας στο μείγμα ΣΖ, αντίστοιχα. Τα ζώα ενσταβλίζονταν ομαδικά ανά ομάδα και για τη διατροφή τους μεταφέρονταν σε ειδικά διαμορφωμένα ατομικά κελιά προκειμένου να επιτευχθεί ατομική διατροφή. Τα σιτηρέσια των ζώων αποτελούνταν από μείγμα ΣΖ, σανό μηδικής και άχυρο σίτου. Η διάθεση του σιτηρεσίου γινόταν δύο φορές ημερησίως σε ισάριθμες ποσότητες, μετά τη μηχανική άμελξή τους και συγκεκριμένα μετά τις 07:00 π.μ. και μετά τις 5:00 μ.μ. Τα ζώα είχαν 24ωρη πρόσβαση σε καθαρό και πόσιμο νερό. Πριν την έναρξη του κυρίως πειραματισμού προηγήθηκαν 7 (επτά) ημέρες προπειραματικής περιόδου προκειμένου τα ζώα να εγκλιματιστούν στις καινούριες συνθήκες σταβλισμού. Στη συνέχεια ξεκίνησε η κύρια πειραματική περίοδος με διάρκεια 60 (εξήντα) ημέρες (Μάρτιος - Μάιος). Στον Πίνακα 5.4. παρουσιάζεται η σύσταση των μειγμάτων ΣΖ (g/kg), στον Πίνακα 5.5. η χημική σύσταση των ζωοτροφών (% ΞΟ) και στον Πίνακα 5.6. το προφίλ των λιπαρών οξέων (%) και των αμινοξέων (% w/w) του μείγματος ΣΖ και της σπιρουλίνας. Ο εν λόγω πειραματισμός πραγματοποιήθηκε στις πειραματικές εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Παραλίμνης, Νομού Πέλλας, του Ε.Λ.Γ.Ο. Δήμητρα (Γιαννιτσά, Ελλάδα,  $40^{\circ}44' N$ ,  $22^{\circ}27' E$ ) ενώ η στέγαση και οι συνθήκες υγιεινής και ευζωίας των ζώων ήταν σε συμφωνία με τις οδηγίες της Επιτροπής Δεοντολογίας της Σχολής Επιστημών των Ζώων (ΕΕ 63/2010, Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2010).

**Πίνακας 5.4.** Σύσταση (g/kg) των μειγμάτων των συμπυκνωμένων ζωοτροφών (CON, SP5, SP10, SP15)

Συστατικά (g/kg)	Μείγματα ΣΖ			
	CON	SP5	SP10	SP15
Σπιρουλίνα, g/d	0	5	10	15
Αραβόσιτος	344	344	344	344
Κριθή	200	200	200	200
Σιτάρι	100	100	100	100
Ηλιάλευρο	160	160	160	160
Σογιάλευρο	155	155	155	155
Πρόμιγμα ανόργανων στοιχείων και βιταμινών	41	41	41	41

**Πίνακας 5.5.** Χημική σύσταση των ζωοτροφών (% ΞΟ)

Χημική σύσταση (% ΞΟ)				
	Μείγμα ΣΖ	Σπιρουλίνα	Μηδική	Άχυρο σίτου
Ξηρά ουσία	90,24	93,15	89,40	92,80
Τέφρα	8,67	16,43	9,30	7,60
Αζωτούχες ουσίες	20,03	57,10	20,00	4,8
Λιπαρές ουσίες	2,36	0,42	0,28	0,16
aNDFom	15,29	22,40	36,60	72,8
ADFom	5,29	4,00	32,50	49,30



**Πίνακας 5.6.** Το προφίλ των λιπαρών οξέων (%) και των αμινοξέων (% w/w) του μείγματος συμπυκνωμένων ζωοτροφών και της σπιρουλίνας

<b>Λιπαρά οξέα (%)</b>		
<b>Λιπαρά οξέα</b>	<b>Μείγμα ΣΖ</b>	<b>Σπιρουλίνα</b>
C10:0	0,00	3,68
C11:0	0,00	0,45
C14:0	0,18	0,49
C16:0	15,71	36,00
C16:1	0,22	10,06
C17:0	0,21	0,00
C17:1	0,41	0,00
C18:0	2,94	8,76
C18:1 cis-9	20,65	0,57
C18:2 n-6 cis	54,14	18,34
C18:3 n-6	0,00	20,97
C20:0	0,23	0,00
C18:3 n-3	3,41	0,00
C20:1 n-9	0,59	0,00
C20:2 n-6	0,46	0,00
C20:3 n-3	0,40	0,00
C20:3 n-6	0,00	0,68
C24:0	0,27	0,00
<b>Αμινοξέα (% w/w)</b>		
<b>Αμινοξέα</b>	<b>Μείγμα ΣΖ</b>	<b>Σπιρουλίνα</b>
Αλανίνη	0,85	3,79
Αργινίνη	1,60	3,63
Ασπαρτικό οξύ	1,71	4,43
Κυστεΐνη	0,33	0,68
Γλουταμινικό οξύ	3,77	6,55

Γλυκίνη	1,21	2,92
Ιστιδίνη	0,36	1,06
Ισολευκίνη	0,64	2,65
Λευκίνη	1,42	4,16
Λυσίνη	0,37	1,85
Μεθειονίνη	0,27	1,30
Φαινυλαλανίνη	1,10	2,62
Προλίνη	1,15	2,00
Σερίνη	1,06	2,88
Θρεονίνη	0,78	2,72
Τρυπτοφάνη	-	0,37
Τυροσίνη	0,49	2,07
Βαλίνη	0,75	2,93
Λυσίνη/Μεθειονίνη	1,39	1,43

---

## **6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **6.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΩΝ**

#### **6.1.1. Συλλογή δειγμάτων ζωοτροφών σιτηρεσίων**

Πριν την έναρξη κάθε πειραματισμού δείγματα ζωοτροφών συλλέχθηκαν προς χημική ανάλυση και πιο συγκεκριμένα προς προσδιορισμό της οργανικής ουσίας, της ξηράς ουσίας, της τέφρας, των ολικών αζωτούχων, των λιπαρών ουσιών, των ινωδών ουσιών και των κλασμάτων: aNDFom και ADFom. Επίσης, στα συλλεχθέντα δείγματα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των ΛΟ.

#### **6.1.2. Συλλογή ατομικών δειγμάτων γάλακτος**

Τόσο στο πρώτο όσο και στο δεύτερο πείραμα οι προβατίνες αρμέγονταν δύο φορές ημερησίως στις 07:00 π.μ. και στις 5:00 μ.μ. μέσω αμελκτικής μηχανής. Ατομικά δείγματα γάλακτος συλλέχθηκαν πριν την έναρξη ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των ομάδων. Στη συνέχεια και κάθε 15 ημέρες συλλέγονταν ατομικά δείγματα γάλακτος (ημέρα 0 και 15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> ημέρα). Στα δείγματα αυτά γινόταν συλλογή και ανάμιξη του 5 % της συνολικής πρωτεΐνης και βραδινής ποσότητας γάλακτος. Στη συνέχεια η ανάμιξη αυτών των δειγμάτων αποστελλόταν άμεσα για χημική ανάλυση σε ειδικά εξειδικευμένο εργαστήριο ISO του ΕΛΟΓΑΚ, Παραλίμνης, του Ε.Λ.Γ.Ο. Δήμητρα, με σκοπό τον προσδιορισμό της χημικής σύστασής του. Αναμειγμένα ατομικά, νωπά δείγματα γάλακτος συλλέχθηκαν (15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> ημέρα) και αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C) για τον προσδιορισμό των ΛΟ. Σε δείγματα γάλακτος προσδιορίστηκαν οι δραστικότητες αντιοξειδωτικών ενζύμων, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες.

#### **6.1.3. Συλλογή ατομικών δειγμάτων αίματος**

Ατομικά δείγματα αίματος λαμβάνονταν κάθε 15 ημέρες (15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> ημέρα) καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών περιόδων. Η αιμοληψία πραγματοποιούνταν πάντα τις πρωινές ώρες προ της χορήγησης του σιτηρεσίου. Το ολικό αίμα ελήφθη από τη σφαγίτιδα φλέβα και αμέσως συλλέχθηκε σε φιαλίδια Vacutainer με 17 U/mL νατριούχο ηπαρίνη. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 2500 στροφές (rpm) για 15 λεπτά της ώρας στους 4 °C προκειμένου να διαχωριστεί το πλάσμα του αίματος από τα ερυθροκύτταρα. Έπειτα, τα

συλλεχθέντα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι την ανάλυσή τους για τον προσδιορισμό των ΛΟ, της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και των δεικτών οξειδωτικού στρες. Τέλος, ατομικά δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε Vacutainer με 17 U/mL νατριούχο ηπαρίνη για τον διαχωρισμό των μονοκύτταρων και των ουδετερόφιλων.

#### 6.1.4. Συλλογή ατομικών δειγμάτων υγρού και στερεού περιεχομένου της μεγάλης κοιλίας

Ατομικά δείγματα υγρού μεγάλης κοιλίας (Υ.Μ.Κ.) συλλέχθηκαν όπως περιγράφονται από τους Tsiplakou *et al.* (2016). Πιο συγκεκριμένα, τοποθετήθηκε οισοφαγικός καθετήρας στις προβατίνες ο οποίος έφτανε μέχρι περίπου τα 150 εκ., εντός του πεπτικού σωλήνα, ενώ ήταν συνδεδεμένος με αντίστροφο συμπιεστή χαμηλής ροής. Η πρώτη ποσότητα (20 - 40 mL) απομακρύνθηκε από τον καθετήρα για την αποφυγή συλλογής σιέλου. Το περιεχόμενο της Μ.Κ. στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη 1,5 L και στη συνέχεια διηθήθηκε με ύφασμα με υλικό τύπου γάζας με σκοπό να διαχωριστεί το Υ.Μ.Κ. από το στερεό. Τα συλλεχθέντα δείγματα μεταφέρθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο για την αποφυγή δράσης των πρωτεϊνών στα νουκλεϊκά οξέα (Εικόνα 6.1.).



**Εικόνα 6.1.** α) Διήθηση υγρού μεγάλης κοιλίας με υλικό τύπου γάζας, β) Διαχωρισμός και απομόνωση στερεού μεγάλης κοιλίας, γ) Άμεση μεταφορά δειγμάτων σε υγρό άζωτο

## 6.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 6.2.1. Αναλύσεις ζωοτροφών

Δείγματα ζωοτροφών αναλύθηκαν για οργανική ουσία, ξηρά ουσία και ολικές αζωτούχες σύμφωνα με τη μέθοδο AOAC (1984), ενώ για τα aNDFom και ADFom ακολουθώντας τη μέθοδο των Van Soest *et al.* (1991). Περαιτέρω, το εκχύλισμα αιθέρα προσδιορίστηκε σύμφωνα

με τη μέθοδο των Soxhlet *et al.* (1897). Επιπλέον, το προφίλ αμινοξέων προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Prandi *et al.* (2021). Το προφίλ των ΛΟ των ζωοτροφών προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Ο' Fallon *et al.* (2007).

### **6.2.2. Αναλύσεις χημικής σύστασης του γάλακτος**

Ο προσδιορισμός της χημικής σύστασης του γάλακτος πραγματοποιήθηκε στον εργαστηριακό χώρο του ΕΛΟΓΑΚ, Παραλίμνη, του Ε.Λ.Γ.Ο. Δήμητρα. Πιο συγκεκριμένα, ατομικά δείγματα γάλακτος αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της λιποπεριεκτικότητας των πρωτεϊνών, της λακτόζης και των στερεών άνευ λίπους μέσω της φασματοσκοπίας υπέρυθρης ακτινοβολίας (Milcoscan 6000, FOSS, Hillerød, Δανία) και για τον αριθμό των σωματικών κυττάρων με τη χρήση μετρητή κυττάρων Fossomatic 400 (FOSS, Hillerød, Δανία).

### **6.2.3. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων**

#### **6.2.3.1. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας**

Το προφίλ των ΛΟ του Υ.Μ.Κ. προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Ο' Fallon *et al.* (2007) της άμεσης σύνθεσης μεθυλεστέρων. Στα δείγματα Υ.Μ.Κ. που χρησιμοποιήθηκαν για την εν λόγω ανάλυση, είχε απομακρυνθεί η στερεή φάση του υγρού όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 6.4. Αφού τα δείγματα ξεπάγωσαν ομαλά και έφτασαν σε θερμοκρασία δωματίου, ζυγίστηκε 1 g σε ζυγό ακριβείας 4<sup>ov</sup> δεκαδικών ψηφίων.

#### **6.2.3.2. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο πλάσμα του αίματος**

Το προφίλ των ΛΟ σε δείγματα πλάσματος του αίματος προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου των Bondia-Pons *et al.* (2004).

#### **6.2.3.3. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο γάλα**

Για τον προσδιορισμό των ΛΟ πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του λίπους σαν πρώτο στάδιο σύμφωνα με τη μέθοδο Jiang *et al.* (1996). Το δεύτερο στάδιο αφορά στη μεθυλεστεροποίηση σύμφωνα με τη μέθοδο των Kelly *et al.* (1998). Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε το C<sub>23:0</sub> (Fluka, Sigma, Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) ως εσωτερικό πρότυπο διάλυμα, το οποίο δεν απαντάται στο γάλα.

#### 6.2.3.4. Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων με τη χρήση αέριου χρωματογράφου

Για τον προσδιορισμό των ΛΟ χρησιμοποιήθηκε ο χρωματογράφος της εταιρείας Agilent 6890 N εξοπλισμένο με πολική στήλη HP-88 μήκους 60 m, διαμέτρου 0,25 mm και πάχους εσωτερικού φιλμ 0,20 nm (Agilent, Santa Clara, USA), η οποία λειτουργεί σε θερμοκρασία 50 - 260 °C. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν φλόγας ιοντισμού (FID) ρυθμιζόμενος στους 260 °C. Η χρωματογραφική ανάλυση περιλάμβανε μια προγραμματισμένη θερμοκρασία που ξεκινούσε από τους 120 °C η οποία διατηρήθηκε για 1 λεπτό. Ακολούθησαν δύο κλιμακωτές ράμπες, μία από 1,25 °C/min έως 230 °C και μία άλλη 10 °C έως 240 °C που διατηρήθηκε για 3 λεπτά. Το υδρογόνο χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο με γραμμική ταχύτητα ρυθμισμένη στα 30 cm/s και το ήλιο ως αέριο σύνθεσης. Κάθε κορυφή ταυτοποιήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο μείγματος FAME 37 standard (Supelco, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Τα *cis-9*, *trans-11* C18:2, *trans-10*, *cis-12* C18:2 και *trans-11* C18:1 ΛΟ χρησιμοποιήθηκαν ως επιπλέον πρότυπα (Sigma Adrich Co., St. Louis, MO, USA), ενώ το C23:0 ΛΟ (Fluka, Sigma, Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) ως εσωτερικό πρότυπο διάλυμα για τα δείγματα του γάλακτος και το C13:0 ΛΟ για δείγματα πλάσματος αίματος. Οι ομαδοποιήσεις των ΛΟ πραγματοποιήθηκαν ως εξής:

$$\text{Μικρής αλύσου ΛΟ (SCFA)} = \text{C4:0} + \text{C6:0} + \text{C8:0} + \text{C10:0} + \text{C11:0},$$

$$\text{Μεσαίας αλύσου ΛΟ (MCFA)} = \text{C12:0} + \text{C14:0} + \text{C15:0} + \text{C16:0},$$

$$\text{Μακράς αλύσου ΛΟ (LCFA)} = \text{C17:0} + \text{C18:0} + \text{C20:0} + \text{C22:0},$$

$$\text{Μονοακόρεστα ΛΟ (MUFA)} = \text{C14:1} + \text{C15:1} + \text{C16:1 n-7} + \text{C17:1 n-7} + \text{C18:1 trans} + \text{trans-11 C18:1} + \text{cis-9 C18:1} + \text{C20:1 n-9},$$

$$\text{Πολυακόρεστα ΛΟ (PUFA)} = \text{cis-9, trans-11 C18:2} + \text{cis C18:2n-6} + \text{trans C18:2 n-6} + \text{C18:3 n-3} + \text{C18:3 n-6} + \text{C20:3 n-3} + \text{C20:4 n-6},$$

$$\text{Κορεσμένα ΛΟ (SFA)} = \text{SCFA} + \text{MCFA} + \text{LCFA},$$

$$\text{Ακόρεστα ΛΟ (UFA)} = \text{PUFA} + \text{MUFA},$$

$$\text{Κορεσμένα/Ακόρεστα (SFA/UFA)} = (\text{SCFA} + \text{MCFA} + \text{LCFA})/(\text{PUFA} + \text{MUFA}),$$

Επίσης ο αθηρωματικός δείκτης υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{AI} = (\text{C12:0} + 4 \times \text{C14:0} + \text{C16:0})/(\text{PUFA} + \text{MUFA}),$$

ο δείκτης θρομβογένεσης:

$$TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0)/(0.5 \times MUFA) + (0.5 \times \omega-6 \text{ PUFA}) + (3 \times \omega-3 \text{ PUFA}) + (\omega-3 \text{ PUFA}/\omega-6 \text{ PUFA})$$

και ο δείκτης προώθησης της υγείας:

$$HPI = (\omega-6 \text{ PUFA} + \omega-3 \text{ PUFA} + MUFA)/(C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0).$$

#### 6.2.4. Φωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και των δεικτών οξειδωτικού στρες

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και των δεικτών οξειδωτικού στρες πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου GENESYS 180 UV-VIS Spectrophotometer της ThermoFisher Scientific.

##### 6.2.4.1. Φωτομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων

###### 1) Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

Η δραστηριότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) σε δείγματα πλάσματος του αίματος και γάλακτος προσδιορίστηκε σύμφωνα με τους McCord και Fridovich (1969). Η SOD αποτελεί τον βιολογικό καταλύτη για την μετατροπή του ανιόντος του  $O_2^{\bullet-}$  σε  $H_2O_2$ . Η ρίζα αυτή παράγεται μέσω της αντίδρασης που καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης. Το οξειδωμένο κυτόχρωμα C ανάγεται από τη ρίζα του υπεροξειδίου. Η δισμουτάση του υπεροξειδίου αναστέλλει την αναγωγή του κυτοχρώματος C ανταγωνιζόμενη τη ρίζα υπεροξειδίου. Η δραστηριότητα της SOD προσδιορίστηκε με παρακολούθηση της αναστολής της οξείδωσης του κυτοχρώματος C στα 550 nm.

Αντίδραση:



###### 2) Καταλάση (CAT)

Η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT) προσδιορίστηκε με τη χρήση εμπορικού κιτ (Catalase Assay Kit; CAT100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Η CAT καταλύει τη διάσπαση του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$  μέσω δύο διαφορετικών αντιδράσεων. Κατά τη πρώτη αντίδραση η CAT μετατρέπει το

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O και O<sub>2</sub> και έπειτα η ενζυματική αυτή αντίδραση σταματάει με το υδραζωτικό νάτριο (NaN<sub>3</sub>).

Αντίδραση:



### 3) Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px)

Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSH-Px) προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Paglia και Valentine (1967). Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης ανάγουν οργανικά και ανόργανα υπεροξεία προς τις αντίστοιχες αλκοόλες. Η κυριότερη αντίδρασή της αφορά τη μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O με ταυτόχρονη οξείδωση δύο μορίων γλουταθειόνης (GSH). Η δραστηριότητα της GSH-Px προσδιορίστηκε παρακολουθώντας τη μείωση της απορρόφησης της φωσφορικής δινουκλεοτιδικής νικοτιναμιδικής αδενίνης (NADPH) στα 340 nm, παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Αντίδραση:



### 4) Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η δραστηριότητα της αναγωγής της γλουταθειόνης (GR) στο πλάσμα του αίματος μετρήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο των Mavis και Stellwagen (1968). Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Επίσης, η GR χρησιμοποιεί ως συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Ως επακόλουθο σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH. Η δραστηριότητα της GR προσδιορίστηκε με μέτρηση της αναγωγής της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) για την αναγωγή της γλουταθειόνης παρουσία NADPH στα 340 nm.



Αντίδραση:



### 5) Μεταφοράση της γλουταθειόνης (GST)

Η δραστικότητα της μεταφοράσης της γλουταθειόνης σε δείγματα στο πλάσμα του αίματος προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που αναλύθηκε από τους Labrou *et al.* (2001), με παρακολούθηση της σύνδεσης της GSH με το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) στα 340 nm). Η αντίδραση βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας του σχηματισμού του συμπλόκου της γλουταθειόνης με το 1-χλώρο-2,4- δινιτροβενζόλιο (GS-CDNB) (Labrou *et al.*, 2001), σε μήκος κύματος 340 nm και συντελεστή απόσβεσης  $\epsilon = 6,22 \text{ L/mmole}\cdot\text{cm}$ .

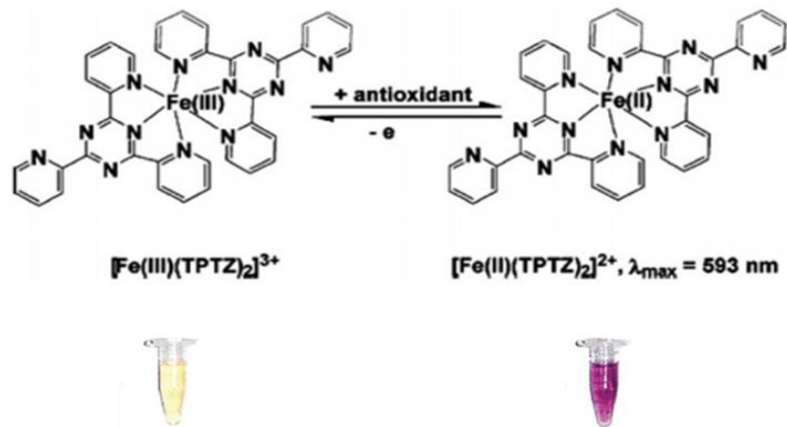
Αντίδραση:



### 6.2.4.2. Φωτομετρικό προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

#### 1) Μέθοδος FRAP

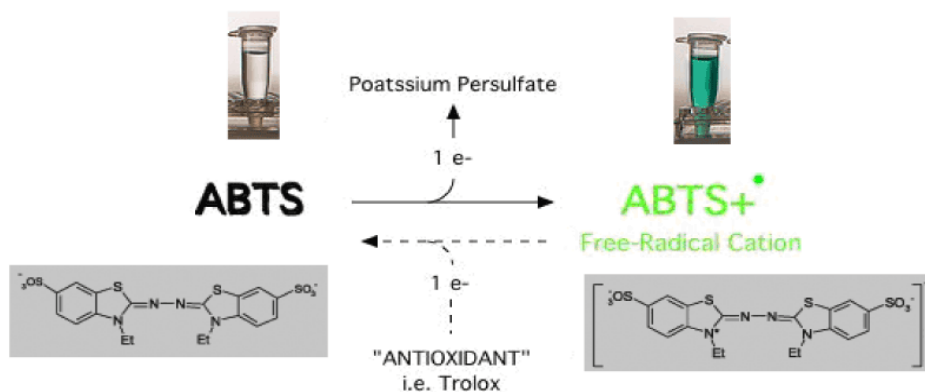
Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP στηρίχτηκε στους Benzie και Strain (1996). Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων πλάσματος αίματος και γάλακτος εκφράστηκε ως % αναστολή. Η μέθοδος καταγράφει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να ανάγουν το  $\text{Fe}^{3+}$  στο σύμπλοκο σίδηρο- 2,4,6, τριπυριδουλ-s-τριαζίνης (Fe (III)- TPTZ) σε  $\text{Fe}^{2+}$  στο αντίστοιχο σίδηρο-σύμπλοκο (Fe (II)- TPTZ) σε όξινο περιβάλλον χρησιμοποιώντας 2,4,6-τριπυριδουλ-δ-τριαζίνη στα 593 nm (Σχήμα 6.1.).



**Σχήμα 6.1.** Απεικόνιση της αντίδρασης της μεθόδου FRAP

## 2) Μέθοδος ABTS

Ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σύμφωνα με τη μέθοδο ABTS στηρίχτηκε στους Pellegrini *et al.* (2003) και Li *et al.* (2011). Οξείδωση του 2,2'azinobis-(3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate) παράγει κατιόν  $\text{ABTS}^+$ , έντονου γαλαζοπράσινου χρώματος (Σχήμα 6.2.). Η μέθοδος βασίζεται στον αποχρωματισμό του παραπάνω ριζικού κατιόντος  $\text{ABTS}^+$  στα 734 nm.

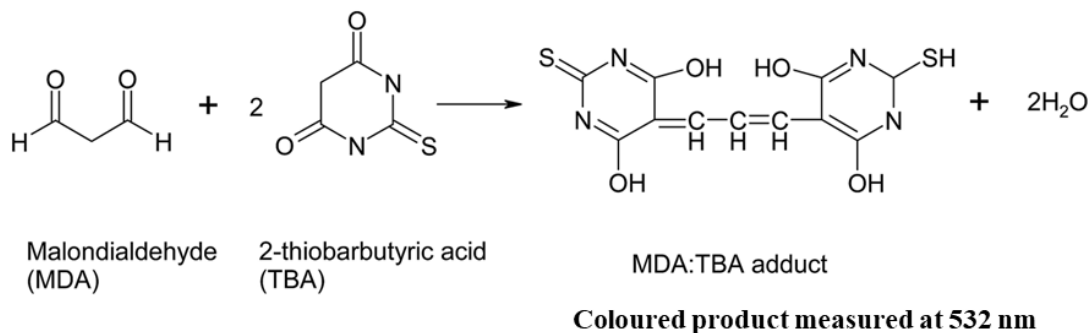


**Σχήμα 6.2.** Απεικόνιση της αντίδρασης της μεθόδου ABTS

### 6.2.4.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

#### 1) Δείκτης μηλονικής διαλδεΐδης (MDA)

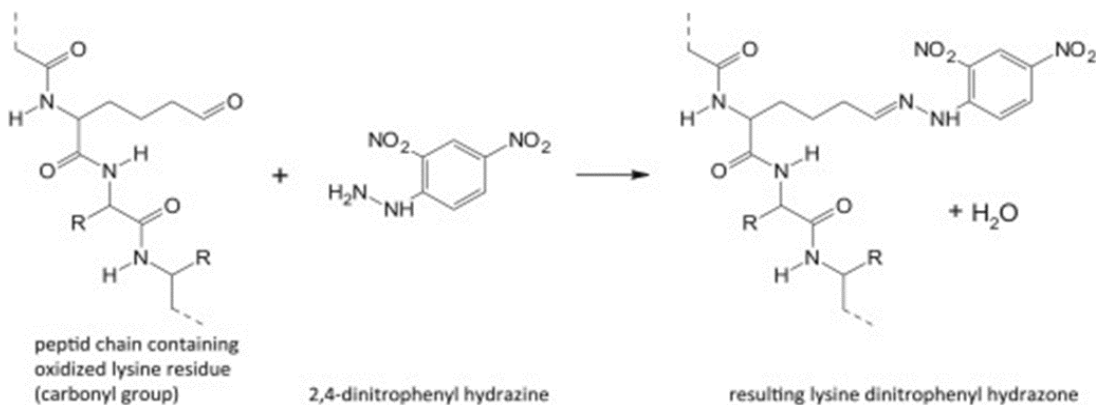
Τα επίπεδα οξείδωσης του λίπους προσδιορίστηκαν στηριζόμενοι στη μέθοδο των Nielsen *et al.* (1997) με προσαρμοσμένες τροποποιήσεις που αναλύθηκαν από τους Tsiplakou *et al.* (2017d). Η MDA μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) σε όξινο περιβάλλον. Στο τέλος της αντίδρασης σχηματίζεται χρωμογόνο σύμπλοκο που φωτομετράται στα 532 nm (Σχήμα 6.3.). Η ένταση του χρώματος του συμπλόκου δείχνει την έκταση της υπεροξειδωσης λιπιδίων.



Σχήμα 6.3. Αντίδραση της μηλονικής διαλδεΐδης με το θειοβαρβιτουρικό οξύ

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

Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τους Patsoukis *et al.* (1994). Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αντιδρούν με τη 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH), οπότε και προκύπτουν πρωτεϊνικές υδραζόνες, που απορροφούν στα 375 nm (Σχήμα 6.4.).



Σχήμα 6.4. Αντίδραση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με τη 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη

### 6.2.5. Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία

Ατομικά δείγματα ολικού αίματος συλλέχθηκαν την τελευταία εβδομάδα των πειραματισμών, για την απομόνωση των μονοκύτταρων και των ουδετερόφιλων. Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε με τη χρήση αντιδραστηρίου Histopaque 1077 πυκνότητας 1,077 g/mL (Sigma-Aldrich Co., USA). Μετά τη φυγοκέντρηση τα κύτταρα διαχωρίστηκαν (Εικόνα 6.2.).



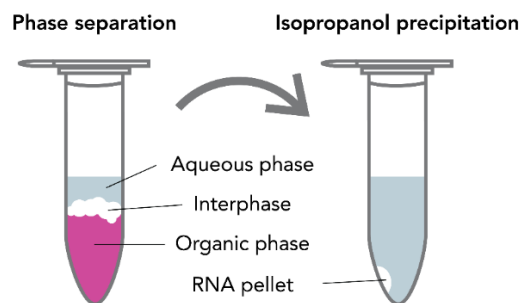
**Εικόνα 6.2.** Διαχωρισμός των κυττάρων μετά τη φυγοκέντρηση

Στη συνέχεια, απορρίφθηκε η πρώτη στρώση του υπερκείμενου (πλάσμα) και η στρώση των μονοκύτταρων μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα όπου πραγματοποιήθηκε 3 φορές πλύση σε Phosphate Buffer Saline (PBS) με διαδοχικές ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις μέχρι να επιτευχθεί η καθαρότητα των κυττάρων στον πυθμένα του σωλήνα.

Επίσης, στη στρώση των ερυθροκυττάρων όπου βρίσκονται τα ουδετερόφιλα έπειτα της φυγοκέντρησης, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με υπερκαθαρό νερό και ενδελεχείς ανακινήσεις με ισοτονικό διάλυμα μέχρι τη λήψη καθαρών κυττάρων. Με το πέρας πολλαπλών πλύσεων, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε θρεπτικό μέσο και πραγματοποιήθηκε ξανά πλύση σε PBS. Στη συνέχεια και μετά από φυγοκέντρηση και απόρριψης του υπερκείμενου, τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων.

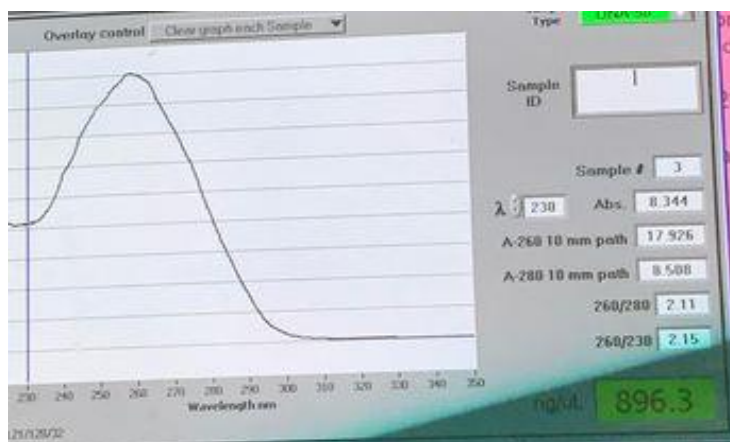
#### **Απομόνωση του RNA:**

Για την απομόνωση ολικού RNA από περίπου  $5 \times 10^6$  κυττάρων/δείγμα, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο reagent GOLD TriFast (VWR, International), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Εικόνα 6.3.).



**Εικόνα 6.3.** Διαχωρισμός νουκλεϊκών οξέων και κατακρήμνιση του RNA

Η ποσότητα και ποιότητα των RNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη χρήση του NanoDrop (Quawell) και των λόγων A260/A280 και A260/A230 (Εικόνα 6.4.).



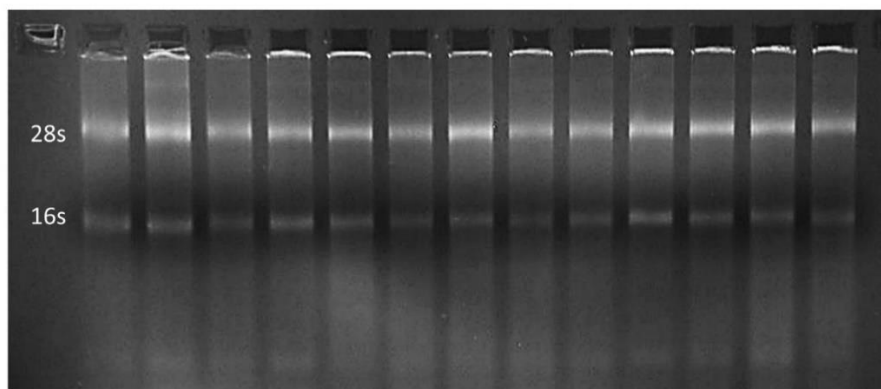
**Εικόνα 6.4.** Προσδιορισμός της ποσότητας και ποιότητας των RNA φωτομετρικά με τη χρήση του NanoDrop (Quawell) και των λόγων A260/A280 και A260/A230

### **Καθαρισμός ολικού RNA από DNase**

Σε 5 μg RNA κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά με Turbo DNase (2 U/μl) (Invitrogen, California, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή προκειμένου να αποδιαταχθεί τυχόν μόλυνση από DNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση της DNase στα δείγματα, η οποία επιτεύχθηκε με θέρμανση σε προκαθορισμένες κατάλληλες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας. Για την ολική απενεργοποίηση ακολουθήθηκε ένα πρωτόκολλο απενεργοποίησης με τη χρήση φαινόλης/χλωροφόρμιου.

Μετά την επώαση, τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ως PCR template με τη χρήση της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (*GAPDH*) και της Taq πολυμεράσης σε

PCR πρωτόκολλο 28 κύκλων με τη χρήση αρνητικού μάρτυρα για την εύρεση πιθανής επιμόλυνσης του δείγματος από γενωμικό DNA, αλλά και με ένα θετικό μάρτυρα αποτελούμενο από γενωμικό DNA. Στη συνέχεια, τα προϊόντα της PCR φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,7 % ώστε να διερευνηθεί η απουσία γενωμικού DNA έπειτα της επώασης της DNase (Εικόνα 6.5.).



**Εικόνα 6.5.** Ενδεικτική απεικόνιση του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης για τον ποιοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων μετά την απομόνωση

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

Το RNA μέσω της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής, μετατράπηκε σε cDNA το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν μήτρα. Πεντακόσια (500) ng καθαρού RNA μεταγράφηκαν αναστρόφως με χρήση του εμπορικού κιτ PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit (Takara Japan) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με χρήση των τυχαίων εξαμερών αλλά και των ολίγο- dT εκκινητών.

### **Σχεδιασμός εκκινητών**

Τα ζεύγη των εκκινητών σχεδιάστηκαν αποκλειστικά στο είδος *Ovis aries* σύμφωνα με την κωδικοποιητική αλληλουχία (CDS) του GenBank, μέσω του προγράμματος PerlPrimer (Πίνακας 6.1.) . Πιο 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 MAP κινάσες- 1 (*MAPK1*), ο μεταγραφικός πυρηνικός παράγοντας κάππα-Β (*NFKB*), η συντηρημένη ουβικόνη κινάση έλικα-βρόγχου-έλικα (*CHUK*), ο μεταγραφικός παράγοντας JUND (*JUND*), ο ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης- 3 (*IRF3*), ο ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης- 5 (*IRF5*), ο μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής- 3 (*STAT3*), η ιντερλευκίνη- 1β (*IL1B*), η ιντερλευκίνη- 2 (*IL2*), η

ιντερλευκίνη- 6 (*IL6*), η ιντερλευκίνη- 8 (*IL8*), η ιντερελευκίνη- 10 (*IL10*), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (*TNFA*), η C-X-C χυμειοκίνη 5 (*CXCL5*), η C-X-C χυμειοκίνη 16 (*CXCL16*), οξυγενάση της αίμης - 1 (*HMOX1*).

### **Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR)**

Η σχετική έκφραση των ανωτέρω γονιδίων στόχων προσδιορίστηκε με διπλές τεχνικές επαναλήψεις σε μηχανήμα 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ως χρωστική αναφοράς 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). Για μια τυπική αντίδραση τελικού όγκου 10 μl αναμίχθηκαν: 1 μl μήτρα cDNA, 5 μl SYBR Select Master Mix, 2 μl εκκινητής F (0,5 Mm) και 2 μl εκκινητής R (0,5 Mm).

Το πρόγραμμα που ορίστηκε στη PCR προέβλεπε αρχικά αποδιάταξη στους 95 °C για 15 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι διπλές έλικες σε μονές. Ακολούθησαν 40 κύκλοι με αποδιάταξη για 15 δευτερόλεπτα και πρόσδεση των εκκινητών για 1 λεπτό σε θερμοκρασία που κυμαινόταν από τους 60 - 65 °C ανάλογα με το γονίδιο-στόχο. Η ειδίκευση των εκκινητών και η πιθανότητα δημιουργίας διμερών μεταξύ τους ελεγχόταν βάση της καμπύλης αποδιάταξης των προϊόντων με την αύξηση της θερμοκρασίας (melt curve analysis) (Πίνακας 6.1.).

Επίσης, ως ενδογενή γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των *GADPH* και *YWHAZ* για την κανονικοποίηση των γονιδίων στόχων. Ο λόγος της επιλογής τους έγινε διότι θεωρούνται ως τα πιο σταθερά γονίδια σε φαγοκύτταρα προβάτων σύμφωνα με τους Vorachek *et al.* (2013). Η αξιολόγησή τους πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), το οποίο έδειξε σημαντική ( $P < 0,001$ ), θετική και γραμμική παλινδρόμηση.

**Πίνακας 6.1.** Αλληλουχίες, μέγεθος αμπλικονίου και θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών που χρησιμοποιούνται σε qPCR σε πραγματικό χρόνο

<b>Gene</b>	<b>Acc. No.</b>	<b>bp</b>	<b>Tm °C</b>	<b>Forward primer 5'-3'</b>	<b>Reverse primer 5'-3'</b>
<i>TLR4</i>	XM_042242671	70	60	ATGAACCACTCCACTCGCTC	TCTTGCTCCTTAGAGGCCGT
<i>TNFA</i>	NM_001024860	70	60	GGGAGACACAACTAAGGGCT	AACCTGCAGTTCAGCTCCG
<i>NFKB</i>	XM_042251202	70	60	AAGCTGTGGTGGAGGACTTG	ACAGAGTTACCCAAGCGGTC
<i>IL1B</i>	NM_001009465	70	60	TGGATAGCCCATGTGTGCTG	CAGAACACCACTTCTCGGCT
<i>IL2</i>	NM_001009806	70	60	AAATCCCGAGAACCTCAAGCT	TGTAGCGTTAACCTTGGGCA
<i>IL6</i>	NM_001009392	61	60	CAGCAAGGAGACACTGGCAGA	TCCATCTTTTTCTCCATTTTTGG
<i>IL8</i>	NM_001009401	71	60	CCTGCTCTCTGCAGCTCTGTG	TGCATTGGCATCGAAGTTCTG
<i>IL10</i>	NM_001009327	100	60	CTGGGGGAGAAGCTGAAGAC	CTCTCTTCACCTGCTCCACC
<i>CCL5</i>	XM_027975305	61	61	CAAGTGCTCCATGGCAGCAG	GTTGGCGCACACCTGACG
<i>CXCL16</i>	XM_015098600	70	60	GTGCCTGTGTTGTCCCTCTT	GCTTGCACACCACGTAGAGT
<i>TRIF</i>	XM_042250120	106	61	GCACGTCTAGCCTGCTTAC	TTGCGGGCCCGCAGCATCT
<i>TRAF3</i>	XM_027957435	100	60	TAAGTCTGCATTCGCTCCA	GGAACACAAAGCTGGGGTTG
<i>MYD88</i>	NM_001166183	99	58	ACAGACAAACTATCGGCTGA	CACCTCTTCTCAATGAGTTCA
<i>CHUK</i>	XM_027960582	70	60	TGCAGGGAAAGAGGCAGAAA	GACCGAGCAGAACTCTGTGT
<i>JUND</i>	XM_027969415	100	60	ACGCAGTTCCTCTTTCCCAA	CCAGCTGGTTTTGCTTGTGT



<i>MAPK</i>	XM_027956867	100	60	GCAACGACCACATCTGCTAC	AGGTTGGAAGGCTTGAGGTC
<i>IRF3</i>	XM_004015378	92	64	CCAGAGGCTGGGGCACTGCC	CCTTCGGGACCTCGCCGTC
<i>IRF5</i>	XM_042248808	100	60	ACATCCCCAGTGAGAAGCAG	ATGGCATAACAGATCCTGGCC
<i>STAT3</i>	XM_015098788	142	58	TGTGACACCAACGACCTG	CATGTCGAACGTGAGGGA
<i>HMOX1</i>	XM_027967703	100	60	GAGCTGACCCGAGAAGGTTT	AGACGGGGTTCTCCTTGTTG
<i>GAPDH</i>	NM_001190390	75	60	AAAGGCCATCACCATCTTCCA	ACCACGTACTCAGCACCAGCAT
<i>YWHAZ</i>	NM_001267887	70	60	TGTTCTATTGTGCCTAGTACTGT	CATCAAGACTCACTGCCTCCC

---

## **Κανονικοποίηση**

Για την κανονικοποίηση σύμφωνα με τους Pfaffl *et al.* (2004) χρησιμοποιήθηκε ο εξής μαθηματικός τύπος:

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

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

### **6.2.6. Μεταγονιδωματική ανάλυση του βακτηριώματος της μεγάλης κοιλίας με τη χρήση αλληλούχισης νέας γενιάς**

Στην εν λόγω διατριβή, δείγματα DNA (50 ng/uL) από κάθε ατομικό δείγμα Υ.Μ.Κ., συγκεντρώθηκαν (pooled) για κάθε ομάδα (λήφθηκαν 4 δείγματα). Στα συνονθυλευμένα (pooled) δείγματα Υ.Μ.Κ. ανά ομάδα, πραγματοποιήθηκε μεταγονιδωματική ανάλυση του βακτηριώματος της Μ.Κ. με τη χρήση αλληλούχισης νέας γενιάς και τη χρήση εμπορικού κιτ (SQK-RAB204, Oxford Nanopore technologies (ONT), Oxford, UK). Το Oxford Nanopore παρέχει μια πλήρη ροή εργασιών ανάλυσης 16S, επιτρέποντας στους χρήστες να ταξινομούν μικτά δείγματα και να λαμβάνουν ακριβή αποτελέσματα για μεμονωμένες αναγνώσεις σε επίπεδο γένους. Η βιβλιοθήκη αλληλουχίας για τον προσδιορισμό αλληλουχίας γονιδίου 16S rRNA δημιουργήθηκε από 20 ng DNA χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο κιτ εμπορίου 16S (SQK-RAB204, Oxford Nanopore Technologies (ONT), Oxford, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και φορτώθηκε σε κελί ροής MinION (R9.4.1, FLO-MIN106). Το κελί ροής τοποθετήθηκε στη συσκευή MinION-Mk1B (Oxford Nanopore Technologies) για αλληλούχιση και ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού MinKNOW της ONT. Το basecalling των ακατέργαστων δεδομένων αλληλουχίας (αρχεία FAST5) πραγματοποιήθηκε με αλγόριθμους που εφαρμόστηκαν στο λογισμικό GUPPY (ONT) και οι αναγνώσεις αποπολυπλέχθηκαν σύμφωνα με τους χρησιμοποιούμενους γραμμωτούς κώδικες. Οι καθαρές αλληλουχίες ελήφθησαν μετά την περικοπή των γραμμωτών κωδίκων, των αλληλουχιών

προσαρμογέα και εκκινήτων. Οι επεξεργασμένες αναγνώσεις (αρχεία FASTQ) μεταφορτώθηκαν στη ροή εργασιών EPI2ME (Metrichor, Οξφόρδη, UK) για ταξινόμηση βακτηρίων στις ακόλουθες κύριες τάξεις: Υπερβασίλειο/Φύλο/Ομοταξία/Τάξη/Οικογένεια/Γένος/Είδος. Η ανάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων «16S Ribosomal RNA» του NCBI (βακτηριακά και αρχαϊκά στελέχη) με όριο ταυτότητας 85% και ελάχιστο βαθμό ποιότητας 15.

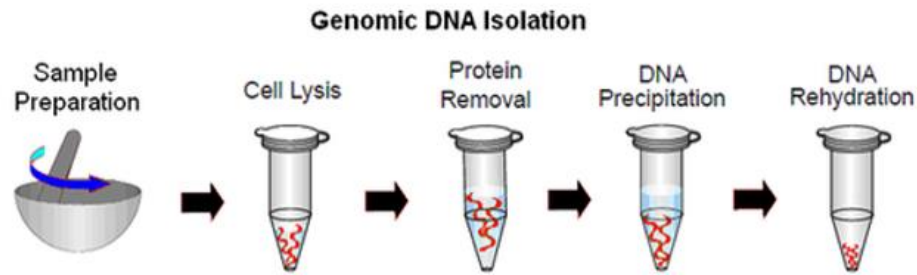
#### 6.2.7. Γονιδιωματική ανάλυση του μικροβιώματος της μεγάλης κοιλίας

Στο περιεχόμενο της Μ.Κ. (υγρό και στερεό), πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA ακολουθώντας πρωτόκολλο σύμφωνα με τους Manrommatis *et al.* (2021d). Πιο συγκεκριμένα, 1 g υγρού μεταφέρθηκε σε εργαστηριακό πορσελάνινο ιγδίο, το οποίο είχε αποστειρωθεί προηγουμένως και ήταν παγωμένο από υγρό άζωτο (Εικόνα 6.6.).



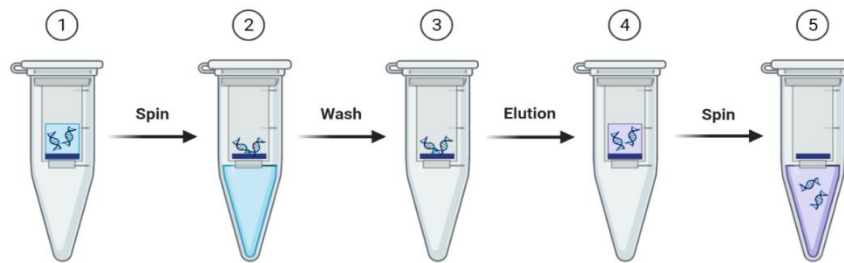
**Εικόνα 6.6.** Ομογενοποίηση υγρού και στερεού περιεχομένου της μεγάλης κοιλίας με τη χρήση ιγδίου και υγρού αζώτου

Ως αποτέλεσμα της ανωτέρου διαδικασίας προέκυψε πούδρα η οποία μετά την ομογενοποίησή της μεταφέρθηκε σε σωληνάριο Falcon των 50 mL και προστέθηκαν άμεσα 5 mL διαλύματος λύσης. Στη συνέχεια, τα δείγματα αυτά 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 με σκοπό να αποδιαταχθεί πιθανή επιμόλυνση της RNase με DNase. Έπειτα, απομονώθηκε το DNA με ίσο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου ισοαμλικής αλκοόλης, αναδεύτηκε σχολαστικά, φυγοκεντρήθηκε και ανακτήθηκε το υπερκείμενο για 3 συνεχόμενες φορές και τέλος κατακρημνίστηκε το DNA με ισοπροπανόλη και ολονύκτια επώαση στους -20 °C (Εικόνα 6.7.).



**Εικόνα 6.7.** Στάδια απομόνωσης DNA

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 7500 g για 15 λεπτά στους 4 °C. Το σύμπηκτο που υπήρχε στον πυθμένα του σωλήνα στη συνέχεια πλύθηκε μια φορά με 75 % αιθανόλη και έπειτα με αιθανόλη 100 %. Στη συνέχεια, αφού απορρίφθηκε όλη η ποσότητα της αιθανόλης, το σύμπηκτο του DNA επαναδιαλύθηκε σε υπερκάθαρο νερό. Στο επόμενο στάδιο, 150 μl των δειγμάτων επεξεργάστηκαν με τη χρήση στηλών επιτάχυνσης NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel GmbH & Co., KG, Düren, Germany), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Εικόνα 6.8.).



**Εικόνα 6.8.** Διαδικασία απομόνωσης DNA με τη χρήση στηλών επιτάχυνσης NucleoSpin® Tissue

Τέλος, η ποιότητα και ποσότητα του DNA των ατομικών δειγμάτων προσδιορίστηκε βάση της αφθονίας της ποσότητας σε DNA και του επιπέδου επιμολύνσεων με τις αναλογίες 260/230 και 260/280, μέσω της χρήσης φωτομέτρου ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA) και με τη χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτώματος αγαρόζης (gel) 0,7 %.

### 6.2.8. Γονιδιωματική ανάλυση του μικροβιώματος της M.K. μέσω της Real-Time PCR

Για την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων επιλεγμένων βακτηρίων, πρωτόζωων και μυκήτων, τα απομονωμένα δείγματα DNA ενισχύθηκαν αναλόγως, με τους εκκινητές που επιλέχθηκαν (Πίνακας 6.2.). Η εν λόγω ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε σε μηχανήμα Step-One Plus Real-Time PCR System (Applied, Biosystems, Austin, TX, USA), τα

ζεύγη των εκκινητών σε τελική συγκέντρωση 0,2 μM και 1 μl κάθε DNA ως PCR template (40 ng/μl). Το προκαθορισμένο πρόγραμμα της PCR ξεκίνησε με αποδιάταξη στους 94 °C για 4 λεπτά προκειμένου να διαχωριστούν οι διπλές έλικες σε μονές. Για τη συνέχεια του προγράμματος ελήφθη υπόψιν το μέγεθος του αμπλικονίου. Η ειδίκευση των εκκινητών και η πιθανότητα δημιουργίας διμερών μεταξύ τους, ελεγχόταν μέσω της αύξησης της θερμοκρασίας (melt curve analysis) και ηλεκτροφόρησης 2 % πηκτώματος αγαρόζης (gel). Η σχετική γενωμική συγκέντρωση των ειδών στόχων, υπολογίστηκε ως προς την αναλογία επί της γενωμικής συγκέντρωσης των ολικών βακτηρίων με τον εξής τύπο:

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

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 6.2.** Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιούνται για qPCR, γονιδιοωματικές περιοχές ενίσχυσης PCR, μέγεθος αμπλικονίων, αποδοτικότητα εκκινητών και θερμοκρασία υβριδισμού

Είδος στόχος	Γονιδιοωματική περιοχή ενίσχυσης PCR	Αλληλουχία εκκινητών	Αποδοτ/τα	Προϊόν	Tm °C	Βιβλ.
<i>Total bacteria</i>	16s rRNA	F: 5'-CGGCAACGAGCGCAACCC-3' R: 5'-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC-3'	99	130	60	Denman <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacteroidetes</i>	16s rRNA	F: 5'-CGGCAACGAGCGCAACCC-3' R: 5'-AGCTGACGACAACCATGCAG-3'	98	126	62	Bahl <i>et al.</i> , 2012
<i>Firmicutes</i>	16s rRNA	F: 5'-GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA-3' R: 5'-AGCTGACGACAACCATGCAC-3'	98	126	62	Bahl <i>et al.</i> , 2012
<i>Archaea</i>	16s rRNA	F: 5'-TTCGGTGGATCDCARAGRGC-3' R: 5'-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC-3'	98	141	60	Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Protozoa</i>	18s rRNA	F: 5'-GCTTTCGWTGGTAGTGTATT-3' R: 5'-CTTGCCCTCYAATCGTWCT-3'	97	321	55	Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Entodinium</i>	18s rRNA	F: 5'-GAGCTAATACATGCTAAGGC-3' R: 5'-CCCTCACTACAATCGAGATTTAAGG-3'	96	317	59	Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Total fungi</i>	18s rRNA ITS1	F: 5'- GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC-3' R: 5'-CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT-3'	95	120	58	Denman <i>et al.</i> , 2006
<i>Neocallimastigales</i>	18s rRNA ITS1	F: 5'-TTGACAATGGATCTCTTGGTTCTC-3' R: 5'-GTGCAATATGCGTTCGAAGATT-3'	96	110	63	Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Methanogen</i>	mcrA	F: 5'-TTCGGTGGATCDCARAGRGC-3' R: 5'-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC-3'	96	145	58	Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	16s rRNA	F: 5'-TAACATGAGAGTTTGATCCTGGCTC-3' R: 5'-CGTACTCACCCGTCCGC-3'	96	136	58	Yang <i>et al.</i> , 2009
<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	16s rRNA	F: 5'-TCCGGTGGTATGAGATGGGC-3' R: 5'-GTCGCTGCATCAGAGTTTCCT-3'	99	200	60	Vargas <i>et al.</i> , 2016
<i>Eubacterium ruminantium</i>	16s rRNA	F: 5'-CTCCCGAGACTGAGGAAGCTTG-3' R: 5'-GTCCATCTCACACCACCGGA-3'	98	184	62	Elolimy <i>et al.</i> , 2018

<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	16s rRNA	F: 5'-CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG-3' R: 5'-CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC-3'	97	132	60	Denman <i>et al.</i> , 2006
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	16s rRNA	F: 5'-GCGGGATTGAATGTACCTTGAGA-3' R: 5'-TCCGCCTGCCCCTGAACTATC-3'	97	204	60	Yang <i>et al.</i> , 2009
<i>Ruminococcus albus</i>	16s rRNA	F: 5'-CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG-3' R: 5'-CCTCCTTGCGGTTAGAACA-3'	100	175	62	Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	16s rRNA	F: 5'-ATGCAAGTCGAACGGTAACAGCAGG-3' R: 5'-GCACCCGTTTCCAGGTGTTGTCC-3'	96	115	65	Duval <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptococcus bovis</i>	16s rRNA	F: 5'-TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG-3' R: 5'-ATGATGGCAACTAACAAATAGGGGT-3'	95	127	57	Elolimy <i>et al.</i> , 2018
<i>Selenomonas ruminantium</i>	16s rRNA	F: 5'-CAATAAGCATTCCGCCTGGG-3' R: 5'-TTCACTCAATGTCAAGCCCTGG-3'	98	138	57	Elolimy <i>et al.</i> , 2018
<i>Prevotella sp.</i>	16s rRNA	F: 5'-GGTTCTGAGAGGAAGGTCCCC-3' R: 5'-TCCTGCACGCTACTTGGCTG-3'	99	121	60	Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Prevotella brevis</i>	16s rRNA	F: 5'-GGTTTCCTTGAGTGTATTCGACGTC-3' R: 5'-CTTTCGCTTGGCCGCTG-3'	97	219	64	Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Prevotella ruminicola</i>	16s rRNA	F: 5'-GAAAGTCGGATTAATGCTCTATGTTG-3' R: 5'-CATCCTATAGCGGTAAACCTTTGG-3'	94	74	63	Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	16s rRNA	F: 5'-CTTA ACTATAAGAATTGCTGGAG-3' R: 5'-TTCGTTACTCACCGTCAAGATC-3'	96	150	58	Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Methanomassiliicoccales</i>	16s rRNA	F: 5'-TTCTGGGGTAGGGGTAAAATC-3' R: 5'-GTCTGCAGCGTTTACACCCT-3'	97	149	62	Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Methanobrevibacter spp.</i>	16s rRNA	F: 5'-TGGGAATTGCTGGWGATACTRTT-3' R: 5'-GGAGCRGCTCAAAGCCA-3'	97	231	60	Kim <i>et al.</i> , 2017

### 6.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (IBM Corp. Released 2016. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY).

Ένα γενικό γραμμικό μοντέλο ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της επίδρασης της διατροφικής επέμβασης μεταξύ των τεσσάρων ομάδων. Ελήφθησαν συνολικά 144 παρατηρήσεις για το σωματικό βάρος (δώδεκα προβατίνες × τέσσερις διατροφικές ομάδες × τρεις φορές δειγματοληψίας) και 240 παρατηρήσεις (δώδεκα προβατίνες × τέσσερις διατροφικές ομάδες × πέντε φορές δειγματοληψίας) για τη γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος, για κάθε πειραματισμό. Οι διατροφικές επεμβάσεις (D) (CON, CS6, CS11 και CS16 για τον πρώτο και CON, SP5, SP10 και SP15 για τον δεύτερο πειραματισμό) ορίστηκαν ως η σταθερή παράμετρος και ο χρόνος δειγματοληψίας (S) (0, 30 και 60 ημέρες για το σωματικό βάρος και 0, 15, 30, 45, και 60 ημέρες για την απόδοση γάλακτος) ως η επαναλαμβανόμενη μέτρηση για το σωματικό βάρος, τη γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος, ενώ αξιολογήθηκαν επίσης οι αλληλεπιδράσεις τους (D × S), σύμφωνα με το ακόλουθο μοντέλο:

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

όπου  $Y_{ijk}$  είναι η εξαρτημένη μεταβλητή,  $\mu$  ο μέσος όρος,  $D_i$  η επίδραση της διατροφικής επέμβασης ( $i = 4$ : CON, CS6, CS11, CS16 και CON, SP5, SP10, SP15 για τους δύο πειραματισμούς, αντίστοιχα),  $S_j$  η επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας ( $j = 3$ : 0, 30 και 60 ημέρες για το σωματικό βάρος και  $j = 5$ : 0, 15, 30, 45 και 60 ημέρες για τη γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος),  $A_k$  είναι η τυχαία επίδραση του ζώου,  $(D \times S)_{ij}$  είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων και του χρόνου δειγματοληψίας και  $e_{ijkl}$  είναι το σφάλμα καταλοίπων (residual errors).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA) για τη σύγκριση της επίδρασης της διατροφικής επέμβασης (CON, CS6, CS11, CS16 και CON, SP5, SP10, SP15) στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των μελετημένων γονιδίων καθώς και στη σχετική αφθονία των μικροοργανισμών της M.K. σύμφωνα με το μοντέλο:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + e_{ijk}$$



όπου  $Y_{ijk}$  είναι η εξαρτημένη μεταβλητή,  $\mu$  ο συνολικός μέσος όρος,  $D_i$  η επίδραση της διατροφικής επέμβασης ( $i = 4$ ) και  $\epsilon_{ijk}$  το σφάλμα καταλοίπων (residual errors).

Προέκυψαν συνολικά 48 μεταβλητές (δώδεκα προβατίνες  $\times$  τέσσερις διατροφικές ομάδες  $\times$  ένας χρόνος δειγματοληψίας) για τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων, τα ΛΟ του Y.M.K. και τη σχετική αφθονία των μικροοργανισμών της M.K.

Σε όλες τις μεμονωμένες βάσεις δεδομένων, αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ομοιογένειας μέσω του Lavene τεστ προκειμένου να προσδιοριστεί αν τα δεδομένα ακολουθούσαν την ίδια κατανομή. Πρόσθετα, πραγματοποιήθηκε και έλεγχος της κανονικότητας με το Shapiro-Wilk τεστ. Όταν δεν παραβιάζονταν τα παραπάνω τεστ, τότε η Post hoc ανάλυση πραγματοποιούνταν με την κατάλληλη χρήση της δοκιμής πολλαπλής εμβέλειας συγκρίσεων του Tukey. Αντίθετα, όπου υπήρχε παραβίαση, λήφθηκε υπόψιν το τεστ Games-Howell. Το επίπεδο σημαντικότητας ( $P$  value) τέθηκε στο 0.05.

Διεξήχθη επίσης διαχωριστική ανάλυση στα συγκεντρωτικά δεδομένα του προφίλ των ΛΟ για τον πειραματισμό της καμελίνας. Διαχωριστική ανάλυση διεξήχθη και στα δεδομένα των σχετικών επιπέδων έκφρασης των μελετημένων γονιδίων και για τους δύο πειραματισμούς, προκειμένου να διευκρινιστεί πώς οι μεταβλητές μπορούν να διακριθούν και να ταξινομηθούν μεταξύ των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων καθώς και στον διαφορετικό τύπο κυττάρων (μονοκύτταρα έναντι ουδετερόφιλων). Είκοσι μεταβλητές για μονοκύτταρα και είκοσι για ουδετερόφιλα καθώς και σαράντα για μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα προστέθηκαν για την ανάπτυξη τριών μοντέλων περιοχών για διάκριση των σαράντα οκτώ μεμονωμένων δειγμάτων των διατροφικών ομάδων ( $n = 12$  ανά διατροφική ομάδα) σε κάθε πειραματισμό. Ωστόσο, όσον αφορά τον πειραματισμό με την ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας διεξήχθη μια ακόμα διαχωριστική ανάλυση για τη διερεύνηση της ταυτόχρονης επίδρασης του διαφορετικού κυτταρικού τύπου (μονοκύτταρα έναντι ουδετερόφιλων) στις διατροφικές επεμβάσεις και τη διάκρισή τους. Όσον αφορά αυτή την ανάλυση, προστέθηκαν είκοσι μεταβλητές (γονιδιακές εκφράσεις) χωρισμένες σε οκτώ ομάδες (τέσσερις διατροφικές ομάδες ανά τύπο κυττάρου) για την ανάπτυξη ενός μοντέλου για τη διάκριση των ενενήντα έξι μεμονωμένων δειγμάτων των διατροφικών επεμβάσεων ( $n = 12$  ανά διατροφική ομάδα  $\times$  4 διατροφικές ομάδες  $\times$  2 τύποι κυττάρων). Για τον ίδιο πειραματισμό, διεξήχθη επίσης διαχωριστική ανάλυση για την αξιολόγηση του διαχωρισμού των ομάδων με βάση τις συγκεντρώσεις των αμινοξέων των τεσσάρων διαφορετικών μειγμάτων ΣΖ. Για όλες τις διαχωριστικές αναλύσεις που

πραγματοποιήθηκαν, η stepwise μέθοδος λήφθηκε υπόψιν για να εκτιμηθεί ποιες μεταβλητές συμβάλλουν περισσότερο στον διαχωρισμό των μεταβλητών μεταξύ των ομάδων. Το κριτήριο Λάμδα ( $\lambda$ ) του Wilk (Wilk's  $\lambda$ ) εξετάστηκε για να προσδιοριστεί πώς χωρίζεται κάθε συνάρτηση σε ομάδες.

Επιπλέον, διεξήχθη ανάλυση συσχέτισης των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν τόσο στα μονοκύτταρα όσο και στα ουδετερόφιλα μέσω του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson. Ειδικότερα, για τον πειραματισμό με την ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια των προβατινών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης στο προφίλ των ΛΟ του γάλακτος καθώς και μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν σε μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα και των μεμονωμένων διατροφικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων και των προφίλ αμινοξέων των τεσσάρων μειγμάτων ΣΖ των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11, CS16).

## 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

### 7.1. ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ, ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ

Η μέση ημερήσια κατανάλωση των ζωοτροφών (g/προβατίνα/ημέρα), των θρεπτικών συστατικών (g/προβατίνα/ημέρα) και των κύριων ΛΟ (g/προβατίνα/ημέρα) παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.1.

**Πίνακας 7.1.** Ημερήσια κατανάλωση των ζωοτροφών (g/προβατίνα/ημέρα) και πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και κύριων λιπαρών οξέων (g/προβατίνα/ημέρα) των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)

Ημερήσια κατανάλωση ζωοτροφών (g/προβατίνα/ημέρα)	Διατροφικές επεμβάσεις			
	CON	CS6	CS11	CS16
Άχυρο σίτου	200	200	200	200
Μηδική	1500	1500	1500	1500
Μείγμα ΣΖ	1500	1500	1500	1500
Ημερήσια πρόσληψη θρεπτικών συστατικών (g/προβατίνα/ημέρα)	Διατροφικές επεμβάσεις			
	CON	CS6	CS11	CS16
Ξηρά ουσία	2880	2874	2882	2888
Τέφρα	284	276	264	254
Ολικές αζωτούχες ουσίες	601	600	602	620
Ολικές λιπαρές ουσίες	40	80	107	133
aNDFom	1284	1285	1287	1301
ADFom	665	711	712	719
Ημερήσια πρόσληψη κύριων ΛΟ (g/προβατίνα/ημέρα)	Διατροφικές επεμβάσεις			
ΛΟ	CON	CS6	CS11	CS16
C14:0	0,18	0,24	0,27	0,25
C16:0	7,50	9,57	10,74	11,78
C16:1 n-7	0,20	0,23	0,25	0,27

C18:0	1,34	2,14	2,62	3,08
<i>cis</i> -9 C18:1	7,47	13,57	18,35	22,41
<i>cis</i> C18:2 n-6	19,94	29,08	31,74	37,67
C20:0	0,11	0,33	0,51	0,67
C18:3 n-3	2,02	14,40	23,01	30,88
C20:1 n-9	0,21	6,71	11,41	15,63
C20:2 n-6	0,16	0,85	1,38	1,80
C20:3 n-3	0,14	0,24	0,34	0,41
C22:0	0,07	0,13	0,18	0,16
C24:0	0,22	0,26	0,31	0,37

Το σωματικό βάρος των προβατινών, όπως καταγράφηκε στην έναρξη, στο μέσο (30<sup>η</sup> ημέρα) και στο τέλος (60<sup>η</sup> ημέρα), παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.2. Πιο συγκεκριμένα, το μέσο σωματικό βάρος των ομάδων δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων ομάδων.

**Πίνακας 7.2.** Μέσο σωματικό βάρος (ΣΒ, kg) των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη την πειραματική περίοδο (0, 30<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> πειραματική ημέρα)

	Διατροφή (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)				Επίδραση		
	CON	CS6	CS11	CS16	SEM <sup>a</sup>	0	30 <sup>η</sup>	60 <sup>η</sup>	SEM <sup>a</sup>	Δ	X	Δ × X
ΣΒ, kg	55,1	55,3	54,5	54,7	0,5	54,6 <sup>AB</sup>	55,1 <sup>A</sup>	54,8 <sup>B</sup>	0,8	0,26	0,33	0,45

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (A, B) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά. <sup>a</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. <sup>b</sup>Επίδραση: Η διατροφική επέμβαση (Δ), ο χρόνος (X) και η αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων × χρόνος (Δ × X) αναλύθηκαν μέσω ANOVA χρησιμοποιώντας ένα γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και post-hoc ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την κατάλληλη χρήση της δοκιμής πολλαπλής εμβέλειας του Tukey.

## 7.2. ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Η ημερήσια ποσότητα παραγόμενου γάλακτος (g/ημέρα), η διορθωμένη ως προς την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή (g/ημέρα), η διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγή (6%) (g/ημέρα), η λιποπεριεκτικότητα (%), η ημερήσια απόδοση λίπους (g/ημέρα) η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (%), η ημερήσια απόδοση πρωτεΐνης (g/ημέρα), η λακτόζη (%), τα σωματικά κύτταρα (1000/mL), τα ολικά στερεά (%) και τα στερεά άνευ λίπους (%), παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 7.3. Στην ημερήσια γαλακτοπαραγωγή, στη διορθωμένη ως προς την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή και στη διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγή (6 %) παρατηρήθηκε αύξηση στις διατροφικές επεμβάσεις της καμελίνας (CS6, CS11 και CS16) σε σύγκριση με την ομάδα CON. Ωστόσο η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, η λιποπεριεκτικότητα μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ( $P = 0,046$ ) στην ομάδα CS16 σε σύγκριση με τις CON και CS11. Επίσης η περιεκτικότητα της ομάδας CS16 σε ολικά στερεά ήταν μικρότερη σε σύγκριση με τις υπόλοιπες κάτι που οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση ( $P = 0,044$ ) μόνο σε σύγκριση με την ομάδα CS11. Όσον αφορά την ημερήσια απόδοση λίπους, την πρωτεΐνη, την ημερήσια απόδοση πρωτεΐνης, τη λακτόζη, τα σωματικά κύτταρα, τα ολικά στερεά και τα στερεά άνευ λίπους στο γάλα δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων.

**Πίνακας 7.3.** Η γαλακτοπαραγωγή, η χημική σύσταση του γάλακτος των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη την πειραματική περίοδο (0, 15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> πειραματική ημέρα)

	Διατροφική επέμβαση (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)					Επίδραση <sup>β</sup>			
	CON	SP5	SP10	SP15	SEM <sup>α</sup>	0	15 <sup>η</sup>	30 <sup>η</sup>	45 <sup>η</sup>	60 <sup>η</sup>	SEM <sup>α</sup>	Δ	X	Δ × X
Γαλ/γη (kg/ημέρα)	1,71	1,86	1,87	1,89	0,02	1,973 <sup>A</sup>	1,869 <sup>B</sup>	1,866 <sup>AB</sup>	1,700 <sup>BC</sup>	1,743 <sup>AB</sup>	0,05	0,433	<0,001	0,050
FCM <sub>6%</sub> <sup>γ</sup> (kg/ημέρα)	1,68	1,79	1,81	1,73	0,02	1,85 <sup>AB</sup>	1,87 <sup>C</sup>	1,74 <sup>BC</sup>	1,68 <sup>C</sup>	1,62 <sup>C</sup>	0,05	0,577	<0,001	0,252
ECM <sup>δ</sup> (kg/ημέρα)	1,47	1,58	1,63	1,58	0,02	1,65 <sup>A</sup>	1,66 <sup>A</sup>	1,56 <sup>B</sup>	1,50 <sup>C</sup>	1,47 <sup>C</sup>	0,36	0,424	<0,001	0,193
Λιπ/τα (%)	5,89 <sup>a</sup>	5,71 <sup>ab</sup>	5,85 <sup>a</sup>	5,35 <sup>b</sup>	0,15	5,56 <sup>B</sup>	6,02 <sup>A</sup>	5,48 <sup>B</sup>	5,98 <sup>A</sup>	5,46 <sup>B</sup>	0,10	0,046	<0,001	<0,001
Λίπος (g/ημέρα)	99,8	105,7	107,1	99,8	2,66	107,8 <sup>A</sup>	112,1 <sup>A</sup>	101,1 <sup>B</sup>	100,4 <sup>B</sup>	94,0 <sup>C</sup>	2,89	0,511	<0,001	0,131
Πρωτεΐνη (%)	5,22	5,29	5,44	5,24	0,07	5,29 <sup>AB</sup>	5,38 <sup>A</sup>	5,23 <sup>B</sup>	5,27 <sup>AB</sup>	5,30 <sup>AB</sup>	0,04	0,145	0,010	0,008
Πρωτεΐνη (g/ημέρα)	89,2	97,7	101,3	98,6	2,48	103,9 <sup>A</sup>	100,4 <sup>AB</sup>	97,6 <sup>B</sup>	89,4 <sup>C</sup>	92,2 <sup>C</sup>	2,80	0,267	<0,001	0,067
Λακτόζη (%)	4,94	5,00	5,04	5,03	0,05	5,07 <sup>A</sup>	5,00 <sup>BC</sup>	4,97 <sup>BC</sup>	4,95 <sup>C</sup>	5,02 <sup>AB</sup>	0,03	0,456	<0,001	0,011
Σωματικά κύτταρα (1000/mL)	349,7	601,6	454,7	352,9	168,6	204,5 <sup>B</sup>	599,6 <sup>A</sup>	496,4 <sup>AB</sup>	415,8 <sup>AB</sup>	482,3 <sup>AB</sup>	101,55	0,689	0,011	0,502
Ολικά στερεά (%)	16,73 <sup>ab</sup>	16,56 <sup>ab</sup>	16,90 <sup>a</sup>	16,18 <sup>b</sup>	0,19	16,49 <sup>AB</sup>	16,97 <sup>A</sup>	16,25 <sup>B</sup>	16,76 <sup>AB</sup>	16,48 <sup>AB</sup>	0,12	0,044	<0,001	<0,001
Στερεά άνευ λίπους (%)	10,84	10,86	11,05	10,83	0,08	10,93 <sup>A</sup>	10,95 <sup>A</sup>	10,78 <sup>C</sup>	10,79 <sup>BC</sup>	11,02 <sup>A</sup>	0,05	0,165	<0,001	<0,001

Οι μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα (a, b, c) μεταξύ των ομάδων και (A, B, C, D) μεταξύ των χρονικών σημείων δειγματοληψίας διαφέρουν σημαντικά. <sup>α</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. <sup>β</sup>Επίδραση: Η διατροφική επέμβαση ( $\Delta$ ), ο χρόνος ( $X$ ) και η αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων  $\times$  χρόνος ( $\Delta \times X$ ) αναλύθηκαν μέσω ANOVA χρησιμοποιώντας ένα γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και post-hoc ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την κατάλληλη χρήση της δοκιμής πολλαπλής εμβέλειας του Tukey. <sup>γ</sup>Διορθωμένη γαλακτοπαραγωγή ως προς τη λιποπεριεκτικότητα (FCM) σε 6 %, <sup>δ</sup>Διορθωμένη γαλακτοπαραγωγή ως προς την ενέργεια (ECM).

### **7.3. ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ**

#### **7.3.1. Προφίλ των λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας**

Το προφίλ των ΛΟ στο υγρό της Μ.Κ. των προβατινών παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.4. Η συγκέντρωση του  $C_{16:0}$  στο υγρό των προβατινών της CS6 αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,007$ ) σε σύγκριση με τις ομάδες CS11 και CS16. Η συγκέντρωση των *cis*-9  $C_{18:1}$  και  $C_{18:3\ n-3}$  αυξήθηκαν σημαντικά ( $P = 0,001$  και  $P = 0,003$ , αντίστοιχα) στις ομάδες CS11 και CS16 σε σύγκριση με τις ομάδες CON και CS6.

**Πίνακας 7.4.** Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ) στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)

Διατροφική Επέμβαση (Δ)						
ΛΟ	CON	CS6	CS11	CS16	SEM <sup>a</sup>	P
C14:0	1,22	0,91	0,72	0,57	0,11	0,235
C14:1	1,51	1,26	0,88	1,00	0,11	0,180
C15:0	0,86	0,87	1,02	0,94	0,08	0,887
C16:0	24,33 <sup>ab</sup>	29,32 <sup>a</sup>	21,09 <sup>b</sup>	21,84 <sup>b</sup>	0,10	0,007
C16:1 n-7	0,26	0,04	0,09	0,18	0,04	0,310
C17:0	0,22	0,00	0,04	0,10	0,03	0,138
C18:0	46,37	42,78	45,07	42,18	0,87	0,308
<i>trans</i> C18:1	0,82	1,16	1,68	1,39	0,24	0,644
<i>trans-11</i> C18:1	5,93	5,32	8,01	7,78	0,50	0,137
<i>cis-9</i> C18:1	8,03 <sup>b</sup>	9,02 <sup>b</sup>	11,84 <sup>a</sup>	12,40 <sup>a</sup>	0,49	0,001
<i>trans</i> C18:2 n-6	0,00	0,00	0,06	0,07	0,02	0,622
<i>cis</i> C18:2 n-6	5,91	4,71	4,58	4,73	0,26	0,265
C20:0	0,39	0,50	0,23	0,80	0,14	0,275
C18:3 n-3	0,48 <sup>b</sup>	0,59 <sup>b</sup>	1,53 <sup>a</sup>	1,30 <sup>a</sup>	0,13	0,003
<i>cis-9, trans-11</i> C18:2	3,54	3,32	2,55	3,71	0,26	0,395
C20:2 n-6	0,11	0,10	0,05	0,22	0,04	0,413
C20:4 n-6	0,38	0,16	0,56	0,81	0,14	0,445

Συντομογραφίες: CON = επέμβαση μάρτυρα. CS6 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 6 % σπερμάτων καμελίνας, CS11 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 11 % σπερμάτων καμελίνας, CS16 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 16 % σπερμάτων καμελίνας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) μεταξύ των ομάδων διαφέρουν σημαντικά. <sup>a</sup>SEM = τυπικός μέσος όρος σφάλματος, P = P τιμή.



### 7.3.2. Προφίλ των λιπαρών οξέων στο πλάσμα του αίματος

Το προφίλ των ΛΟ στο πλάσμα του αίματος των προβατινών παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.5. Στο πλάσμα των προβατινών που στα σιτηρέσιά τους ενσωματώθηκαν σπέρματα καμελίνας, οι συγκεντρώσεις αρκετών SFA μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του C<sub>14:0</sub> μειώθηκε σημαντικά ( $P = 0,001$ ) στις προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν καμελίνα. Επίσης η συγκέντρωση του C<sub>15:0</sub> μειώθηκε στις προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν καμελίνα, αλλά αυτή η μείωση ήταν σημαντική ( $P = 0,025$ ) μόνο για την CS16. Επιπλέον, η συγκέντρωση του C<sub>16:0</sub> βρέθηκε να είναι σημαντικά μειωμένη ( $P = 0,018$ ) στη CS11, ενώ του C<sub>17:0</sub> μειώθηκε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις CS6 και CS11 σε σύγκριση με τις ομάδες CON και CS16. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των C<sub>16:1 n-7</sub> ( $P = 0.007$ ) και *cis-9* C<sub>18:1</sub> ( $P = 0.003$ ) μειώθηκαν σημαντικά στην CS16. Η συγκέντρωση του *trans* C<sub>18:2 n-6</sub> αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,007$ ) στο CS16 σε σύγκριση με το CON και το CS11, ενώ του *cis* C<sub>18:2 n-6</sub> αυξήθηκε στις CS- ομάδες, αλλά αυτή η αύξηση ήταν σημαντική ( $P < 0,001$ ) μόνο για την CS11. Επίσης, η συγκέντρωση του C<sub>20:3 n-3</sub> αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0.001$ ) στην CS6, του C<sub>24:1 n-9</sub> αυξήθηκε σημαντικά ( $P < 0.001$ ) στην CS11 και στην CS16 σε σύγκριση με την CS6, ενώ η συγκέντρωση του C<sub>22:6 n-3</sub> αυξήθηκε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις CS11 και CS16 σε σύγκριση με τις CON και CS6. Τέλος, οι συγκεντρώσεις των C<sub>11:0</sub>, C<sub>17:1 n-7</sub>, C<sub>18:0</sub>, *trans* C<sub>18:1</sub>, *trans-II* C<sub>18:1</sub>, ALA, C<sub>20:3 n-6</sub> και C<sub>22:2 n-6</sub> δεν τροποποιήθηκαν στατιστικώς σημαντικά.

**Πίνακας 7.5.** Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ) στο πλάσμα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> πειραματική ημέρα)

ΛΟ	Διατροφική επέμβαση (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)					Επίδραση <sup>β</sup>		
	CON	CS6	CS11	CS16	SEM <sup>α</sup>	15	30	45	60	SEM <sup>α</sup>	Δ	X	Δ × X
C11:0	0,29	0,24	0,59	0,31	0,29	0,53 <sup>A</sup>	0,21 <sup>C</sup>	0,33 <sup>B</sup>	0,36 <sup>B</sup>	0,55	<0,001	0,001	<0,001
C14:0	1,02 <sup>a</sup>	0,70 <sup>b</sup>	0,65 <sup>b</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,34	0,90 <sup>A</sup>	0,69 <sup>B</sup>	0,77 <sup>AB</sup>	0,64 <sup>B</sup>	0,61	0,001	0,022	0,174
C15:0	0,37 <sup>a</sup>	0,29 <sup>ab</sup>	0,32 <sup>ab</sup>	0,17 <sup>b</sup>	0,19	0,29	0,26	0,25	0,35	0,37	0,025	0,273	0,393
C16:0	21,46 <sup>a</sup>	20,57 <sup>ab</sup>	19,83 <sup>b</sup>	20,92 <sup>ab</sup>	0,19	22,63 <sup>A</sup>	20,53 <sup>B</sup>	20,34 <sup>BC</sup>	19,28 <sup>C</sup>	0,34	0,018	<0,001	0,001
C16:1 n-7	1,06 <sup>a</sup>	0,76 <sup>ab</sup>	0,79 <sup>ab</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,42	1,12 <sup>A</sup>	0,66 <sup>B</sup>	0,67 <sup>B</sup>	0,70 <sup>B</sup>	0,79	0,007	0,001	0,655
C17:0	2,40 <sup>a</sup>	1,73 <sup>b</sup>	1,39 <sup>b</sup>	2,66 <sup>a</sup>	0,10	2,41 <sup>A</sup>	2,21 <sup>AB</sup>	2,15 <sup>B</sup>	1,42 <sup>B</sup>	0,25	<0,001	0,006	<0,001
C17:1 n-7	0,02	0,05	0,02	0,05	0,01	0,03	0,04	0,06	0,02	0,01	0,351	0,518	0,275
C18:0	21,10	21,10	20,44	20,70	0,34	20,62 <sup>AB</sup>	20,03 <sup>B</sup>	20,65 <sup>AB</sup>	22,05 <sup>A</sup>	0,60	0,849	0,044	0,485
<i>trans</i> C18:1	0,15 <sup>t</sup>	0,19	0,29 <sup>t</sup>	0,27 <sup>t</sup>	0,03	0,04 <sup>D</sup>	0,17 <sup>BC</sup>	0,27 <sup>C</sup>	0,42 <sup>A</sup>	0,39	0,056	<0,001	0,047
<i>trans-11</i> C18:1	1,01	0,88	0,89	0,83	0,04	0,57 <sup>C</sup>	0,81 <sup>B</sup>	0,98 <sup>B</sup>	1,25 <sup>A</sup>	0,07	0,583	<0,001	0,024
<i>cis-9</i> C18:1	15,91 <sup>a</sup>	15,03 <sup>ab</sup>	14,66 <sup>ab</sup>	12,55 <sup>b</sup>	0,30	14,40	13,75	14,84	15,17	0,59	0,003	0,356	0,020
<i>trans</i> C18:2 n-6	0,03 <sup>b</sup>	0,05 <sup>ab</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,05	0,00 <sup>C</sup>	0,00 <sup>C</sup>	0,04 <sup>B</sup>	0,17 <sup>A</sup>	0,13	0,007	<0,001	0,014

<i>cis</i> C18:2 n-6	19,26 <sup>b</sup>	23,13 <sup>a</sup>	21,66 <sup>a</sup>	20,98 <sup>ab</sup>	0,27	22,51 <sup>A</sup>	19,97 <sup>C</sup>	20,99 <sup>BC</sup>	21,57 <sup>AB</sup>	0,54	<0,001	0,002	0,028
C18:3 n-3	2,71 <sup>t</sup>	3,28 <sup>t</sup>	3,04	3,00	0,09	1,97 <sup>D</sup>	2,67 <sup>C</sup>	3,31 <sup>B</sup>	4,07 <sup>A</sup>	0,31	0,098	<0,001	0,062
C20:3 n-6	0,18	0,06	0,13	0,17	0,02	0,07 <sup>B</sup>	0,07 <sup>B</sup>	0,16 <sup>A</sup>	0,24 <sup>A</sup>	0,15	0,428	0,044	0,101
C20:3 n-3	3,21 <sup>b</sup>	3,80 <sup>a</sup>	3,36 <sup>b</sup>	3,20 <sup>b</sup>	0,08	4,10 <sup>A</sup>	3,67 <sup>B</sup>	3,10 <sup>C</sup>	2,70 <sup>D</sup>	0,14	0,001	<0,001	0,037
C22:2 n-6	0,84	0,94	0,92	0,84	0,03	0,58 <sup>B</sup>	0,88 <sup>B</sup>	0,98 <sup>AB</sup>	1,11 <sup>A</sup>	0,89	0,486	<0,001	0,728
C24:1 n-9	8,24 <sup>bc</sup>	6,44 <sup>c</sup>	9,85 <sup>a</sup>	10,80 <sup>ab</sup>	0,34	6,98 <sup>C</sup>	12,20 <sup>A</sup>	8,82 <sup>B</sup>	7,34 <sup>C</sup>	0,62	<0,001	<0,001	<0,001
C22:6 n-3	0,47 <sup>b</sup>	0,61 <sup>b</sup>	1,00 <sup>a</sup>	1,02 <sup>a</sup>	0,05	0,16 <sup>B</sup>	1,04 <sup>A</sup>	0,98 <sup>A</sup>	0,92 <sup>A</sup>	0,07	<0,001	<0,001	<0,001

Οι μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα (a, b, c) μεταξύ των ομάδων και (A, B, C, D) μεταξύ των χρονικών σημείων δειγματοληψίας διαφέρουν σημαντικά. <sup>a</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. <sup>β</sup>Επίδραση: Η διατροφική επέμβαση ( $\Delta$ ), ο χρόνος ( $X$ ) και η αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων  $\times$  χρόνος ( $\Delta \times X$ ) αναλύθηκαν μέσω ANOVA χρησιμοποιώντας ένα γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και post-hoc ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την κατάλληλη χρήση της δοκιμής πολλαπλής εμβέλειας του Tukey.

### 7.3.3. Προφίλ των λιπαρών οξέων στο γάλα των προβατινών

Το προφίλ των ΛΟ στο γάλα των προβατινών παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.6. Η ενσωμάτωση των σπερμάτων καμελίνας στα τρία διαφορετικά μελετημένα επίπεδα στη διατροφή των προβατινών μείωσε στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,001$ ) το περιεχόμενο σε SFA. Αναλυτικά, το συνολικό περιεχόμενο σε SCFA και MCFA και, πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των C8:0, C10:0, C11:0, C12:0 και C16:0 μειώθηκαν γραμμικά ( $P < 0,001$ ) στις προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που ενσωματώθηκαν σπέρματα καμελίνας. Το περιεχόμενο των MCFA αυξήθηκε σημαντικά την 30η ημέρα δειγματοληψίας σε σύγκριση με την 15η ( $P = 0,045$ ). Οι συγκεντρώσεις των C6:0 ( $P < 0.001$ ) και C15:0 ( $P < 0.001$ ) μειώθηκαν σημαντικά στις CS11 και CS16, ενώ του C14:0 βρέθηκε σημαντικά μειωμένη ( $P = 0.005$ ) στην CS16. Αντίθετα, η συγκέντρωση του C4:0 αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0.174$ ) στην CS6, του C17:0 αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0.011$ ) στην CS6 σε σύγκριση με την CS11 και του C22:0 αυξήθηκε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν σπέρματα καμελίνας. Επιπλέον, η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στη διατροφή των προβατινών αύξησε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) τις συγκεντρώσεις των C18:0 και C20:0 μεταξύ των ομάδων CS και σε σύγκριση με την CON. Όσον αφορά το C18:0, αυξημένη τιμή παρατηρήθηκε την 15η ημέρα του πειραματισμού σε σύγκριση με την 30η και την 60η ( $P = 0,002$ ).

Η συνολική συγκέντρωση των MUFA αυξήθηκε γραμμικά ( $P < 0,001$ ) μεταξύ των προβατινών που διατρέφονταν με σιτηρέσια που ενσωματώθηκαν σπέρματα καμελίνας. Αναλυτικά, η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας σε ποσοστό 11 % (CS11), αύξησε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) τη συγκέντρωση του *trans-11* C18:1, ενώ η ενσωμάτωση σε ποσοστό 16 % (CS16) σχεδόν τριπλασίασε σημαντικά τη συγκέντρωσή του ( $P < 0,001$ ). Η συγκέντρωση του γάλακτος σε *trans-11* C18:1 αυξήθηκε σημαντικά την 15η και την 60η σε σύγκριση με την 45η πειραματική ημέρα ( $P = 0,046$ ). Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των C14:1 ( $P < 0.001$ ), C15:1 ( $P = 0.001$ ) και C17:1 n-7 ( $P < 0.001$ ) μειώθηκαν στις CS11 και CS16, ενώ η συγκέντρωση του C16:1 n-7 μειώθηκε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις προβατίνες που τρεφόντουσαν με σπέρματα καμελίνας (Πίνακας 7.6.). Η συγκέντρωση των συνολικών *trans* C18:1 ( $P < 0.001$ ) αυξήθηκε σημαντικά για τις ομάδες CS, ενώ οι συγκεντρώσεις των *cis-9* C18:1 ( $P < 0.001$ ) και C20:1 n-9 ( $P < 0.001$ ) αυξήθηκαν σημαντικά και γραμμικά στο γάλα των προβατινών των ομάδων CS σε σύγκριση με την ομάδα CON.

Επιπλέον, η ενσωμάτωση των σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια των προβατινών αύξησε γραμμικά τη συνολική συγκέντρωση σε LCFA ( $P < 0.001$ ), UFA ( $P < 0.001$ ) και PUFA ( $P < 0.001$ ), με το τελευταίο να είναι διπλάσιο στην CS16 σε σχέση με την CON. Αυτή η αύξηση των PUFA παρουσιάστηκε στις 30 και 45 ημέρες αλλά ήταν σημαντική ( $P = 0,005$ ) μόνο στην τελική δειγματοληψία (60 ημέρες), με αποτέλεσμα να διαπιστωθεί σημαντική αλληλεπίδραση ( $P = 0,013$ ) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και του χρόνου δειγματοληψίας. Αναλυτικά, οι συγκεντρώσεις των *trans* C18:2 n-6 ( $P < 0.001$ ), C18:3 n-3 (ALA) ( $P < 0.001$ ), *cis-9, trans-11* C18:2 (CLA) ( $P < 0.001$ ), *trans-10 cis-12* C18:2 (CLA) ( $P < 0,001$ ) και αραχιδονικού οξέος (C20:4 n-6) ( $P < 0,001$ ) αυξήθηκαν γραμμικά μεταξύ των προβατινών που κατανάλωναν σιτηρέσια στα οποία ενσωματώθηκαν σπέρματα καμελίνας σε σύγκριση με την ομάδα CON. Αναλυτικότερα, στην CS16, η συγκέντρωση του ALA διπλασιάστηκε, ενώ η συγκέντρωση του *cis-9, trans-11* C18:2 (CLA) ήταν τριπλάσια σε σύγκριση με την ομάδα CON. Για το ALA, η συγκέντρωση ήταν αυξημένη την 60η σε σύγκριση με την 30η πειραματική ημέρα ( $P = 0,010$ ), ενώ για το *cis-9, trans-11* C18:2 η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε στις 45η και 60η σε σύγκριση με την 15η και την 30η πειραματική ημέρα ( $P < 0,001$ ) κάτι που οδήγησε σε σημαντική ( $P = 0,003$ ) αλληλεπίδραση μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και του χρόνου δειγματοληψίας. Είναι ενδιαφέρον ότι το ποσοστό αποτελεσματικής μεταφοράς του ALA από τις επεμβάσεις στο γάλα ήταν 5,8, 4 και 3,6 % για τις προβατίνες των ομάδων CS6, CS11 και CS16, αντίστοιχα. Ακόμα, η συγκέντρωση του *cis* C18:2 n-6 αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,001$ ) στις προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν σπέρματα καμελίνας, ενώ η συγκέντρωση του C20:3 n-3 μειώθηκε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις CS11 και CS16 σε σύγκριση με τις CON και CS6. Τέλος, η αναλογία SFA/UFA μειώθηκε γραμμικά σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που ενσωματώθηκαν σπέρματα καμελίνας σε σύγκριση με την ομάδα CON.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τόσο η συγκέντρωση σε ω-6 όσο και σε ω-3 αυξήθηκαν γραμμικά ( $P < 0,001$ ) στις προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που ενσωματώθηκαν σπέρματα καμελίνας. Αξιοσημείωτα, ο λόγος ω-6/ω-3 μειώθηκε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις ομάδες της καμελίνας. Επίσης, ο αθηρωματικός δείκτης (AI) και ο δείκτης θρομβωγένεσης (TI) μειώθηκαν γραμμικά ( $P = 0,006$  και  $P < 0,001$ , αντίστοιχα) μεταξύ των τεσσάρων ομάδων. Επιπλέον, ο δείκτης προαγωγής της υγείας (HPI) βελτιώθηκε γραμμικά μεταξύ των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων ( $P < 0,001$ ). Σχετικά με τους δείκτες αφυδρογονάσης Δ-9, ο δείκτης C14:1/C14:0 δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Αντίθετα, ο C16:1/C16:0 αυξήθηκε σημαντικά ( $P =$

0.024) στην CS16, ο *cis-9* C18:1 /C18:0 επίσης αυξήθηκε ( $P < 0.001$ ) στις CS11 και CS16 και ο *cis-9, trans-11* C18:2 /*trans-11* C18:1 αυξήθηκε γραμμικά ( $P < 0,001$ ) μεταξύ των τεσσάρων ομάδων.

**Πίνακας 7.6.** Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ), των ομαδοποιήσεών τους, των δεικτών υγείας των ΛΟ και των δεικτών αφυδρογονάσης στο γάλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> πειραματική ημέρα)

ΛΟ	Διατροφική επέμβαση (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)					Επίδραση <sup>β</sup>		
	CON	CS6	CS11	CS16	SEM <sup>α</sup>	15 <sup>η</sup>	30 <sup>η</sup>	45 <sup>η</sup>	60 <sup>η</sup>	SEM <sup>α</sup>	Δ	X	Δ × X
C4:0	4,23 <sup>b</sup>	4,45 <sup>a</sup>	4,32 <sup>ab</sup>	4,40 <sup>ab</sup>	0,070	4,48 <sup>A</sup>	4,20 <sup>B</sup>	4,40 <sup>AB</sup>	4,32 <sup>AB</sup>	0,069	0,174	0,042	<0,001
C6:0	3,33 <sup>a</sup>	3,18 <sup>a</sup>	2,84 <sup>b</sup>	2,29 <sup>c</sup>	0,053	2,96	2,84	2,93	2,91	0,052	<0,001	0,476	<0,001
C8:0	3,08 <sup>a</sup>	2,80 <sup>b</sup>	2,39 <sup>c</sup>	1,72 <sup>d</sup>	0,057	2,54	2,48	2,49	2,48	0,058	<0,001	0,872	0,079
C10:0	9,53 <sup>a</sup>	7,88 <sup>b</sup>	6,56 <sup>c</sup>	4,55 <sup>d</sup>	0,187	7,17	7,13	7,08	7,15	0,176	<0,001	0,981	0,077
C11:0	0,37 <sup>a</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,28 <sup>c</sup>	0,19 <sup>d</sup>	0,009	0,27 <sup>B</sup>	0,29 <sup>AB</sup>	0,29 <sup>AB</sup>	0,31 <sup>A</sup>	0,009	<0,001	0,010	0,093
C12:0	5,15 <sup>a</sup>	4,22 <sup>b</sup>	3,72 <sup>c</sup>	2,91 <sup>d</sup>	0,099	3,97	4,09	3,80	3,94	0,089	<0,001	0,334	0,109
C14:0	12,64 <sup>a</sup>	11,43 <sup>ab</sup>	11,92 <sup>a</sup>	10,02 <sup>b</sup>	0,504	11,00	12,49	11,04	11,48	0,380	0,005	0,161	0,211
C14:1	0,42 <sup>a</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	0,38 <sup>bc</sup>	0,37 <sup>c</sup>	0,007	0,37 <sup>B</sup>	0,40 <sup>A</sup>	0,41 <sup>A</sup>	0,38 <sup>AB</sup>	0,008	<0,001	0,002	0,174
C15:0	0,92 <sup>a</sup>	0,89 <sup>a</sup>	0,81 <sup>b</sup>	0,80 <sup>b</sup>	0,014	0,83 <sup>B</sup>	0,89 <sup>A</sup>	0,86 <sup>AB</sup>	0,83 <sup>B</sup>	0,014	<0,001	0,006	0,889
C15:1	0,28 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0,007	0,27 <sup>A</sup>	0,28 <sup>A</sup>	0,28 <sup>A</sup>	0,24 <sup>B</sup>	0,007	0,001	<0,001	0,399
C16:0	28,55 <sup>a</sup>	24,95 <sup>b</sup>	23,40 <sup>c</sup>	22,26 <sup>d</sup>	0,271	24,27 <sup>B</sup>	24,39 <sup>A</sup>	25,50 <sup>A</sup>	24,99 <sup>AB</sup>	0,280	<0,001	0,011	0,500
C16:1 n-7	1,07 <sup>a</sup>	0,96 <sup>b</sup>	0,90 <sup>b</sup>	0,92 <sup>b</sup>	0,028	0,87 <sup>C</sup>	0,91 <sup>BC</sup>	0,99 <sup>AB</sup>	1,07 <sup>A</sup>	0,028	<0,001	<0,001	0,004
C17:0	0,52 <sup>ab</sup>	0,53 <sup>a</sup>	0,49 <sup>b</sup>	0,50 <sup>ab</sup>	0,009	0,54 <sup>A</sup>	0,52 <sup>AB</sup>	0,49 <sup>BC</sup>	0,48 <sup>C</sup>	0,010	0,011	<0,001	0,019
C17:1 n-7	0,25 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,20 <sup>b</sup>	0,007	0,23	0,23	0,23	0,22	0,007	<0,001	0,525	0,014
C18:0	7,68 <sup>c</sup>	8,86 <sup>b</sup>	9,10 <sup>b</sup>	9,96 <sup>a</sup>	0,119	9,42 <sup>A</sup>	8,83 <sup>B</sup>	9,09 <sup>AB</sup>	8,26 <sup>B</sup>	0,233	<0,001	0,002	0,602
<i>trans</i> C18:1	0,52 <sup>b</sup>	1,07 <sup>a</sup>	1,41 <sup>a</sup>	1,57 <sup>a</sup>	0,046	1,12 <sup>AB</sup>	1,20 <sup>A</sup>	1,15 <sup>AB</sup>	1,08 <sup>B</sup>	0,039	<0,001	0,169	0,021
<i>trans-11</i> C18:1	0,69 <sup>c</sup>	0,86 <sup>bc</sup>	1,13 <sup>b</sup>	1,85 <sup>a</sup>	0,105	1,27 <sup>A</sup>	1,01 <sup>AB</sup>	0,95 <sup>B</sup>	1,31 <sup>A</sup>	0,084	<0,001	0,046	0,015
<i>cis-9</i> C18:1	16,58 <sup>d</sup>	20,38 <sup>c</sup>	21,77 <sup>b</sup>	24,86 <sup>a</sup>	0,279	21,34	20,59	20,80	20,85	0,553	<0,001	0,509	0,219

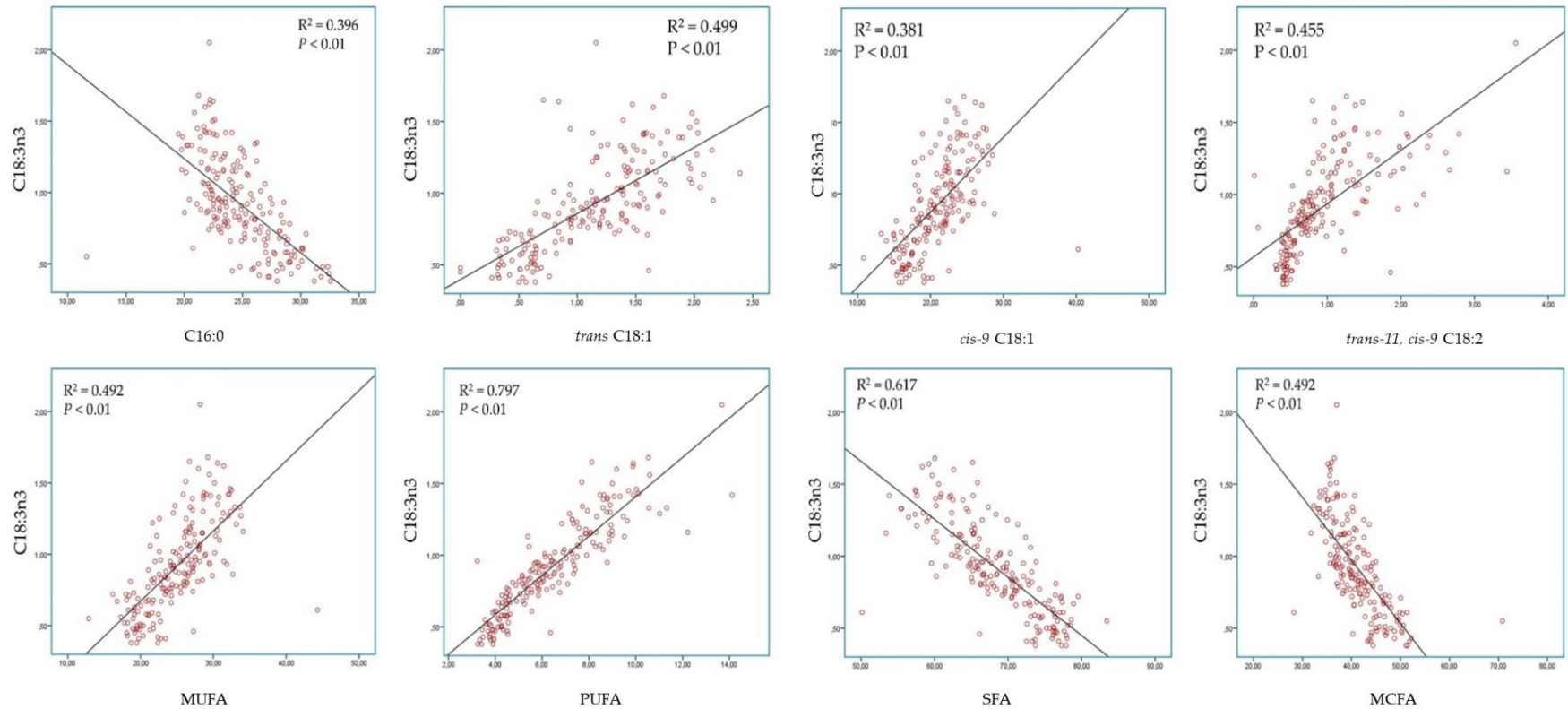
<i>trans</i> C18:2 n-6	0,19 <sup>d</sup>	0,55 <sup>c</sup>	0,87 <sup>b</sup>	1,21 <sup>a</sup>	0,030	0,68 <sup>B</sup>	0,70 <sup>AB</sup>	0,65 <sup>B</sup>	0,80 <sup>A</sup>	0,030	<0,001	0,011	0,082
<i>cis</i> C18:2 n-6	2,70 <sup>b</sup>	2,90 <sup>a</sup>	2,95 <sup>a</sup>	3,09 <sup>a</sup>	0,064	2,90	2,88	2,91	2,95	0,058	0,001	0,849	0,218
C20:0	0,11 <sup>d</sup>	0,58 <sup>c</sup>	0,85 <sup>b</sup>	1,12 <sup>a</sup>	0,017	0,65	0,67	0,66	0,68	0,018	<0,001	0,605	0,006
C18:3 n-3	0,54 <sup>d</sup>	0,84 <sup>c</sup>	1,04 <sup>b</sup>	1,26 <sup>a</sup>	0,028	0,92 <sup>AB</sup>	0,87 <sup>B</sup>	0,90 <sup>AB</sup>	0,97 <sup>A</sup>	0,028	<0,001	0,010	0,361
<i>cis-9, trans-11</i> C18:2	0,45 <sup>d</sup>	0,68 <sup>c</sup>	1,03 <sup>b</sup>	1,65 <sup>a</sup>	0,048	0,82 <sup>B</sup>	0,85 <sup>B</sup>	1,06 <sup>A</sup>	1,08 <sup>A</sup>	0,05	<0,001	<0,001	0,003
C20:1 n-9	0,00 <sup>d</sup>	0,37 <sup>c</sup>	0,63 <sup>b</sup>	0,88 <sup>a</sup>	0,036	0,57 <sup>A</sup>	0,59 <sup>A</sup>	0,28 <sup>C</sup>	0,44 <sup>B</sup>	0,032	<0,001	<0,001	<0,001
<i>trans-10, cis-12</i> C18:2	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,006	0,004 <sup>B</sup>	0,03 <sup>A</sup>	0,005 <sup>B</sup>	0,03 <sup>A</sup>	0,005	<0,001	<0,001	<0,001
C22:0	0,09 <sup>c</sup>	0,20 <sup>b</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,010	0,14 <sup>C</sup>	0,20 <sup>AB</sup>	0,21 <sup>A</sup>	0,17 <sup>B</sup>	0,009	<0,001	<0,001	<0,001
C20:3 n-3	0,23 <sup>a</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,20 <sup>b</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,004	0,22 <sup>A</sup>	0,20 <sup>B</sup>	0,20 <sup>B</sup>	0,20 <sup>B</sup>	0,004	<0,001	0,001	0,442
C20:4 n-6	0,00 <sup>c</sup>	0,02 <sup>c</sup>	0,31 <sup>b</sup>	0,61 <sup>a</sup>	0,015	0,18 <sup>C</sup>	0,22 <sup>BC</sup>	0,25 <sup>AB</sup>	0,29 <sup>A</sup>	0,016	<0,001	<0,001	<0,001
$\Delta^{-9}$ δείκτες Αφυδρογονάσης													
C14:1/C14:0	0,033	0,035	0,032	0,037	0,002	0,03	0,04	0,03	0,04	0,002	0,520	0,198	0,526
C16:1/C16:0	0,037 <sup>b</sup>	0,038 <sup>ab</sup>	0,038 <sup>ab</sup>	0,041 <sup>a</sup>	0,001	0,036 <sup>B</sup>	0,037 <sup>B</sup>	0,038 <sup>AB</sup>	0,042 <sup>A</sup>	0,001	0,024	<0,001	0,010
<i>cis-9</i> C18:1 /C18:0	2,16 <sup>c</sup>	2,30 <sup>bc</sup>	2,39 <sup>ab</sup>	2,50 <sup>a</sup>	0,263	2,28 <sup>B</sup>	2,35 <sup>B</sup>	2,34 <sup>B</sup>	2,59 <sup>A</sup>	0,177	<0,001	0,366	0,388
<i>cis-9 trans-11</i> C18:2 / <i>trans-11</i> C18:1	0,65 <sup>d</sup>	0,79 <sup>c</sup>	0,91 <sup>a</sup>	0,89 <sup>b</sup>	0,025	0,64 <sup>C</sup>	0,83 <sup>B</sup>	1,06 <sup>A</sup>	0,94 <sup>B</sup>	0,029	<0,001	<0,001	<0,001
Ομαδοποιημένα ΛΟ													
SCFA	20,54 <sup>a</sup>	18,62 <sup>b</sup>	16,39 <sup>c</sup>	13,15 <sup>d</sup>	0,303	17,40	16,94	17,18	17,18	0,300	<0,001	0,744	0,001
MCFA	47,28 <sup>a</sup>	41,51 <sup>b</sup>	39,85 <sup>c</sup>	36,00 <sup>d</sup>	0,420	40,09 <sup>B</sup>	41,86 <sup>A</sup>	41,32 <sup>AB</sup>	41,36 <sup>AB</sup>	0,442	<0,001	0,075	0,045
LCFA	8,19 <sup>d</sup>	9,80 <sup>c</sup>	10,45 <sup>b</sup>	11,60 <sup>a</sup>	0,207	10,61 <sup>A</sup>	9,88 <sup>AB</sup>	10,12 <sup>AB</sup>	9,43 <sup>B</sup>	0,218	<0,001	0,004	0,488
MUFA	19,78 <sup>d</sup>	24,68 <sup>c</sup>	26,68 <sup>b</sup>	30,90 <sup>a</sup>	0,349	26,02	25,36	25,18	25,49	0,694	<0,001	0,464	0,003
PUFA	4,12 <sup>d</sup>	5,19 <sup>c</sup>	6,44 <sup>b</sup>	8,11 <sup>a</sup>	0,129	5,74 <sup>B</sup>	5,76 <sup>B</sup>	5,98 <sup>B</sup>	6,38 <sup>A</sup>	0,254	<0,001	0,005	0,013



SFA	76,01 <sup>a</sup>	69,93 <sup>b</sup>	66,69 <sup>c</sup>	60,75 <sup>d</sup>	0,412	68,10	68,68	68,62	67,97	0,440	<0,001	0,598	0,001
UFA	23,90 <sup>d</sup>	29,87 <sup>c</sup>	33,12 <sup>b</sup>	39,01 <sup>a</sup>	0,412	31,76	31,12	31,16	31,86	0,438	<0,001	0,526	0,001
SFA/UFA	3,18 <sup>a</sup>	2,34 <sup>b</sup>	2,01 <sup>c</sup>	1,56 <sup>d</sup>	0,048	2,25	2,37	2,29	2,31	0,049	<0,001	0,504	0,005
ω-6	2,91 <sup>d</sup>	3,46 <sup>c</sup>	4,14 <sup>b</sup>	4,91 <sup>a</sup>	0,069	3,76 <sup>B</sup>	3,79 <sup>B</sup>	3,82 <sup>B</sup>	4,04 <sup>A</sup>	0,136	<0,001	0,063	0,005
ω-3	0,77 <sup>d</sup>	1,05 <sup>c</sup>	1,24 <sup>b</sup>	1,44 <sup>a</sup>	0,023	1,14 <sup>AB</sup>	1,07 <sup>B</sup>	1,10 <sup>B</sup>	1,19 <sup>A</sup>	0,361	<0,001	0,024	0,341
ω-6/ω-3	3,78 <sup>a</sup>	3,30 <sup>b</sup>	3,34 <sup>b</sup>	3,41 <sup>b</sup>	0,038	3,39 <sup>B</sup>	3,59 <sup>A</sup>	3,56 <sup>AB</sup>	3,46 <sup>AB</sup>	0,074	<0,001	0,189	0,628
Δείκτες υγείας ΛΟ													
AI	3,55 <sup>d</sup>	2,54 <sup>c</sup>	2,16 <sup>b</sup>	1,70 <sup>a</sup>	0,056	2,40 <sup>B</sup>	2,53 <sup>A</sup>	2,46 <sup>AB</sup>	2,56 <sup>A</sup>	0,555	0,006	0,101	0,003
TI	3,52 <sup>a</sup>	2,60 <sup>b</sup>	2,36 <sup>b</sup>	1,90 <sup>c</sup>	0,054	2,51	2,69	2,61	2,56	0,107	<0,001	0,294	0,040
HPI	0,28 <sup>d</sup>	0,39 <sup>c</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,58 <sup>a</sup>	0,010	0,44	0,41	0,42	0,43	0,020	<0,001	0,493	0,005

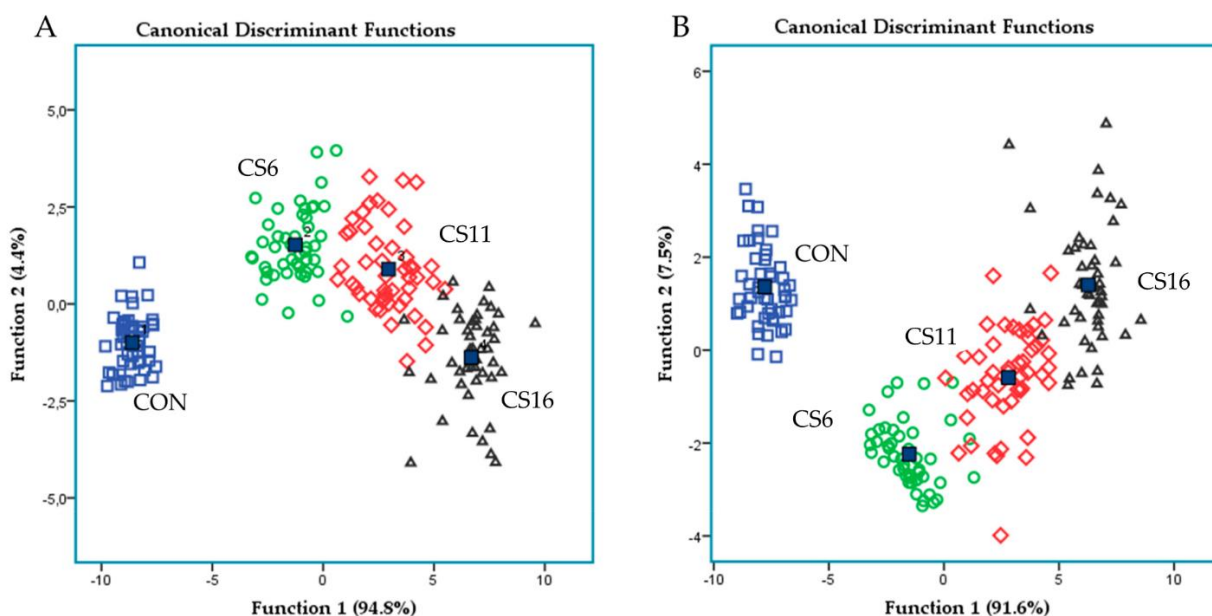
Οι μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα (a, b, c) μεταξύ των ομάδων και (A, B, C, D) μεταξύ των χρονικών σημείων δειγματοληψίας διαφέρουν σημαντικά. <sup>α</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. <sup>β</sup>Επίδραση: Η διατροφική επέμβαση ( $\Delta$ ), ο χρόνος ( $X$ ) και η αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων  $\times$  χρόνος ( $\Delta \times X$ ) αναλύθηκαν μέσω ANOVA χρησιμοποιώντας ένα γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και post-hoc ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την κατάλληλη χρήση της δοκιμής πολλαπλής εμβέλειας του Tukey.

Στο Διάγραμμα 7.1. παρουσιάζεται η συσχέτιση κατά Pearson του ALA με συγκεκριμένα ΛΟ και τις ομαδοποιήσεις των λιπαρών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, η συσχέτιση κατά Pearson οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το ALA συσχετίστηκε θετικά με το *cis*-9 C18:1 ( $R^2 = 0.381$ ;  $P < 0.01$ ), *trans* C18:1 ( $R^2 = 0.499$ ;  $P < 0.01$ ), *trans*-11, *cis*-9 C18:2 ( $R^2 = 0.455$ ;  $P < 0.01$ ), MUFA ( $R^2 = 0.492$ ;  $P < 0.01$ ), και PUFA ( $R^2 = 0.797$ ,  $P < 0.01$ ). Από την άλλη πλευρά, το ALA συσχετίστηκε αρνητικά με C16:0 ( $R^2 = 0.396$ ;  $P < 0.01$ ), SFA ( $R^2 = 0.617$ ;  $P < 0.01$ ) και MCFA ( $R^2 = 0.492$ ;  $P < 0.01$ ).



**Διάγραμμα 7.1.** Συσχέτιση κατά Pearson του  $\alpha$ -λινολενικού οξέος (ALA) με συγκεκριμένα λιπαρά οξέα και ομαδοποιήσεις λιπαρών οξέων

Το Διάγραμμα 7.2. παρουσιάζει τη γραφική απεικόνιση της διαχωριστικής ανάλυσης (discriminant analysis) των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON: μπλε □, CSS6: πράσινο ○, CSS11: κόκκινο ◇ και CSS16: μαύρο Δ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου με βάση τις συγκεντρώσεις των ΛΟ του γάλακτος, τα ομαδοποιημένα ΛΟ, τους δείκτες υγείας των ΛΟ και τους δείκτες αφυδρογονάσης Δ-9. Με την εισαγωγή των ανεξάρτητων μεταβλητών, οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων που ταξινομήθηκαν σωστά ήταν 96,3 %, ενώ το Wilk's λ παρατηρήθηκε στο 0,009 για τη συνάρτηση 1 ( $P < 0,001$ ) και στο 0,306 για τη συνάρτηση 2 ( $P < 0,001$ ) (Διάγραμμα 7.2.A). Η CON διέφερε σημαντικά (συνάρτηση 1) από αυτές των ομάδων που διατρέφονταν με σιτηρέσια που ενσωματώθηκαν σπέρματα καμελίνας, ενώ οι ομάδες CS κατανέμονταν προοδευτικά στο δεξιό μισό (Διάγραμμα 7.2.A). Εφαρμόζοντας μια σταδιακή μέθοδο με στόχο την αποφυγή οποιασδήποτε πολυγραμμικότητας (stepwise method), επιτεύχθηκε υψηλότερη σωστή ταξινόμηση (97,4 %). Το Wilk's λ παρατηρήθηκε στο 0,008 για τη συνάρτηση 1 ( $P < 0,001$ ) και στο 0,238 για τη συνάρτηση 2 ( $P < 0,001$ ), ενώ οι συγκεντρώσεις των C20:0, C20:4 n-6, *trans* C18:1, C22:0, *trans-11* C18:1, C11:0, C18:2 n-6, C14:0, C18:0 και *trans-10*, *cis-12* C18:2 ήταν οι μεταβλητές (10 από 19) που συνέβαλαν περισσότερο (Διάγραμμα 7.2.B). Οι μεταβλητές που αφορούν την ομάδα CON (συνάρτηση 1) ήταν σημαντικά διαφορετικές από εκείνες των ομάδων καμελίνας (Διάγραμμα 7.2.B).



**Διάγραμμα 7.2.** Γραφική απεικόνιση της διαχωριστικής ανάλυσης (discriminant analysis) των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (CON: μπλε □, CS6: πράσινο ○, CS11: κόκκινο ◇ και CS16: μαύρο Δ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου με βάση τις συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων του γάλακτος, τα ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα, τους δείκτες υγείας των λιπαρών οξέων και τους δείκτες αφυδρογονάσης Δ<sup>-9</sup>

#### 7.4. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ

Οι διαφορές των μέσων όρων στη δραστικότητα των μελετηθέντων αντιοξειδωτικών ενζύμων, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και η οξειδωτική κατάσταση του πλάσματος του αίματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.7. Σχετικά με τις δραστικότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων στο πλάσμα του αίματος, η δραστικότητα της SOD βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη ( $P = 0,014$ ) στην CS16 σε σύγκριση με την CON. Επίσης, παρατηρήθηκε ανοδική τάση στη δραστικότητα της SOD από την 15<sup>η</sup> έως την 60<sup>η</sup> πειραματική ημέρα ( $P < 0,001$ ). Στατιστικά σημαντική αυξημένη δραστικότητα ( $P = 0,006$ ) παρατηρήθηκε επίσης στην CAT στις ομάδες CS11 και CS16, με την κορύφωση στη δραστικότητα να αναφέρεται την 30<sup>η</sup> ημέρα δειγματοληψίας ( $P = 0,052$ ). Ωστόσο, δεν βρέθηκαν διαφορές στις δραστικότητες των ενζύμων που σχετίζονται με τη γλουταθειόνη (GSH-Px, GR και GST).

Όσον αφορά τους δείκτες οξειδωτικού στρες, η MDA αυξήθηκε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στην CS11 σε σύγκριση με τις CS6 και CON, ενώ τα PC αυξήθηκαν σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στην CS16 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες.

Επιπλέον, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις CS6 και CS11 σε σύγκριση με τις CON και CS16. Οι μέγιστες τιμές ABTS προσδιορίστηκαν την 30<sup>η</sup> πειραματική ημέρα ( $P < 0,001$ ), οδηγώντας σε σημαντική αλληλεπίδραση ( $P < 0,001$ ) μεταξύ της διατροφικής επέμβασης και του χρόνου δειγματοληψίας. Αντίθετα, στην CS16 η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη ( $P = 0,008$ ) σε σύγκριση με τις CON και CS6, ενώ φαίνεται να έχει τις χαμηλότερες τιμές την 45<sup>η</sup> πειραματική ημέρα ( $P = 0,001$ ).

#### 7.5. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Οι δραστικότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και η οξειδωτική κατάσταση του γάλακτος παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.7. Η δραστικότητα της SOD αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,019$ ) στην CS16. Ομοίως, η δραστικότητα της SOD αυξήθηκε σημαντικά μετά την 15<sup>η</sup> πειραματική ημέρα ( $P < 0,001$ ). Επιπλέον, η δραστικότητα της CAT αυξήθηκε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν σπέρματα καμελίνας. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα CS16 η δραστικότητα της CAT προσδιορίστηκε σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τις ομάδες CS6 και CS11, ενώ

παρουσίασε ακόμη και διπλάσια αύξηση σε σύγκριση με την ομάδα CON. Ομοίως, η δραστικότητα της GSH-Px βρέθηκε επίσης σημαντικά υψηλότερη ( $P < 0,001$ ) στις προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν σπέρματα καμελίνας. Είναι ενδιαφέρον ότι τόσο οι δραστικότητες των CAT και GSH-Px, ήταν σημαντικά υψηλότερες στις 15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> σε σύγκριση με την 45<sup>η</sup> πειραματική ημέρα, οδηγώντας σε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων και του χρόνου δειγματοληψίας ( $P = 0,007$ , και  $P < 0,001$  για CAT και GSH-Px, αντίστοιχα).

Όσον αφορά τους δείκτες οξειδωτικού στρες του γάλακτος, το υψηλότερο επίπεδο της MDA καταγράφηκε στην CS11, ενώ το χαμηλότερο στην CS16. Κατά συνέπεια, η MDA βρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη ( $P = 0,036$ ) μόνο για την CS11 σε σύγκριση με την CS16, με την ίδια τάση να αναφέρεται στην 30<sup>η</sup> και 45<sup>η</sup> πειραματική ημέρα σε σύγκριση με την 15<sup>η</sup> ( $P = 0,023$ ). Επιπλέον, τα επίπεδα των PC βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα ( $P < 0,001$ ) στην CS16 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες. Τα επίπεδα των PC ήταν σημαντικά χαμηλότερα την 15<sup>η</sup> πειραματική ημέρα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ( $P < 0,001$ ).

Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση ( $P = 0,001$ ) στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS στις CS11 και CS16. Επιπλέον, οι τιμές της FRAP αυξήθηκαν σημαντικά στις προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που ενσωματώθηκαν σπέρματα καμελίνας σε σύγκριση με την ομάδα CON ( $P = 0,008$ ). Αυτή η αύξηση στη FRAP ήταν γραμμική μεταξύ των τεσσάρων πειραματικών ομάδων και συγκεκριμένα στην CS16 προσδιορίστηκε σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με την CS6. Τόσο για την ABTS όσο και για την FRAP, η σημαντική αύξηση αναφέρθηκε στην πρώτη και στην τελευταία δειγματοληψία σε σύγκριση με τη δεύτερη και την τρίτη ( $P < 0,001$ , και  $P = 0,001$  για ABTS και FRAP, αντίστοιχα), η οποία οδήγησε σε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων και του χρόνου δειγματοληψίας ( $P < 0,001$ ).

**Πίνακας 7.7.** Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και οι δείκτες οξειδωτικής κατάστασης στο πλάσμα του αίματος και στο γάλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> πειραματική ημέρα)

	Διατροφική επέμβαση (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)					Επίδραση <sup>β</sup>		
	CON	CS6	CS11	CS16	SEM <sup>α</sup>	15 <sup>η</sup>	30 <sup>η</sup>	45 <sup>η</sup>	60 <sup>η</sup>	SEM <sup>α</sup>	Δ	X	Δ × X
<b>Πλάσμα του αίματος</b>													
SOD	14,44 <sup>b</sup>	15,57 <sup>ab</sup>	15,98 <sup>ab</sup>	16,91 <sup>a</sup>	0,426	14,36 <sup>C</sup>	14,91 <sup>B</sup>	17,05 <sup>A</sup>	16,57 <sup>A</sup>	0,400	0,014	<0,001	0,109
CAT	19,37 <sup>b</sup>	22,17 <sup>b</sup>	22,93 <sup>a</sup>	22,18 <sup>a</sup>	0,522	21,46 <sup>B</sup>	22,94 <sup>A</sup>	21,17 <sup>B</sup>	21,10 <sup>B</sup>	0,556	0,006	0,052	0,536
GSH-Px	0,24	0,26	0,28	0,27	0,009	0,33 <sup>A</sup>	0,27 <sup>B</sup>	0,24 <sup>C</sup>	0,22 <sup>D</sup>	0,007	0,112	<0,001	0,189
GR	0,05	0,05	0,05	0,06	0,001	0,049 <sup>B</sup>	0,054 <sup>A</sup>	0,051 <sup>B</sup>	0,054 <sup>A</sup>	0,001	0,102	0,011	<0,001
GSTs	0,15 <sup>t</sup>	0,17	0,17	0,19 <sup>t</sup>	0,009	0,14 <sup>B</sup>	0,19 <sup>A</sup>	0,19 <sup>A</sup>	0,16 <sup>B</sup>	0,009	0,137	<0,001	0,025
ABTS	30,10 <sup>b</sup>	32,81 <sup>a</sup>	33,52 <sup>a</sup>	31,01 <sup>b</sup>	0,554	31,04 <sup>B</sup>	34,70 <sup>A</sup>	31,79 <sup>B</sup>	29,91 <sup>C</sup>	0,518	<0,001	<0,001	<0,001
FRAP	0,93 <sup>b</sup>	0,91 <sup>b</sup>	0,97 <sup>ab</sup>	1,04 <sup>a</sup>	0,028	1,00 <sup>A</sup>	0,99 <sup>A</sup>	0,88 <sup>B</sup>	0,98 <sup>A</sup>	0,028	0,008	0,001	<0,001
MDA	0,63 <sup>bc</sup>	0,61 <sup>c</sup>	0,74 <sup>a</sup>	0,70 <sup>ab</sup>	0,021	0,66	0,66	0,69	0,66	0,022	<0,001	0,516	<0,001
PC	2,45 <sup>b</sup>	2,24 <sup>b</sup>	2,47 <sup>b</sup>	3,08 <sup>a</sup>	0,213	3,35 <sup>A</sup>	2,71 <sup>AB</sup>	2,31 <sup>BC</sup>	1,87 <sup>C</sup>	0,195	<0,001	<0,001	<0,001
<b>Γάλα</b>													
SOD	131,49 <sup>b</sup>	142,76 <sup>ab</sup>	141,37 <sup>ab</sup>	149,63 <sup>a</sup>	1,685	131,78 <sup>C</sup>	143,27 <sup>AB</sup>	140,11 <sup>B</sup>	150,09 <sup>A</sup>	3,245	0,019	0,006	0,109
CAT	3,68 <sup>c</sup>	5,16 <sup>b</sup>	5,96 <sup>b</sup>	7,85 <sup>a</sup>	0,359	5,70 <sup>B</sup>	7,02 <sup>A</sup>	4,45 <sup>C</sup>	5,49 <sup>B</sup>	0,391	<0,001	<0,001	0,007
GSH-Px	0,28 <sup>b</sup>	0,32 <sup>a</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,32 <sup>a</sup>	0,007	0,31 <sup>B</sup>	0,33 <sup>A</sup>	0,27 <sup>C</sup>	0,32 <sup>AB</sup>	0,007	<0,001	<0,001	<0,001
ABTS	48,04 <sup>bc</sup>	50,32 <sup>b</sup>	53,36 <sup>a</sup>	54,46 <sup>a</sup>	1,412	54,71 <sup>B</sup>	45,99 <sup>C</sup>	47,02 <sup>C</sup>	58,46 <sup>A</sup>	1,221	0,001	<0,001	<0,001
FRAP	3,00 <sup>c</sup>	4,77 <sup>b</sup>	5,21 <sup>ab</sup>	5,85 <sup>a</sup>	0,302	4,33 <sup>B</sup>	3,56 <sup>C</sup>	3,66 <sup>C</sup>	7,27 <sup>A</sup>	0,261	0,008	0,001	<0,001
MDA	0,24 <sup>ab</sup>	0,25 <sup>ab</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,244	0,21 <sup>C</sup>	0,25 <sup>B</sup>	0,27 <sup>AB</sup>	0,22 <sup>BC</sup>	0,242	0,036	0,023	0,074
PC	1,71 <sup>a</sup>	1,63 <sup>a</sup>	1,60 <sup>a</sup>	1,28 <sup>b</sup>	0,086	1,20 <sup>B</sup>	1,77 <sup>A</sup>	1,68 <sup>A</sup>	1,57 <sup>A</sup>	0,080	<0,001	<0,001	<0,001

Οι μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα (a, b, c) μεταξύ των ομάδων και (A, B, C, D) μεταξύ των χρονικών σημείων δειγματοληψίας διαφέρουν σημαντικά. <sup>a</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. <sup>b</sup>Επίδραση: Η διατροφική επέμβαση ( $\Delta$ ), ο χρόνος (X) και η αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων  $\times$  χρόνος ( $\Delta \times X$ ) αναλύθηκαν μέσω ANOVA χρησιμοποιώντας ένα γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και post-hoc ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την κατάλληλη χρήση της δοκιμής πολλαπλής εμβέλειας του Tukey. Η FRAP εκφράζεται ως  $\mu\text{M}$  ισοδύναμα ασκορβικού οξέος, η ABTS ως % αναστολή, η MDA ως  $\mu\text{M}$  MDA και τα PC ως  $\text{nmol/mL}$ .

## 7.6. ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΕΚΦΡΑΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η ενσωμάτωση 6 % σπερμάτων καμελίνας (CS6) στο μείγμα ΣΖ των προβατινών, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του *TLR4* στα μονοκύτταρα ( $P = 0,019$ ) και ουδετερόφιλα ( $P = 0,002$ ) σε σύγκριση με την CS11 (Πίνακες 9.7. και 9.8., αντίστοιχα). Στα μονοκύτταρα, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *MYD88* δεν επηρεάστηκαν, ενώ στα ουδετερόφιλα, μειώθηκαν στις προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν σπέρματα καμελίνας, με στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P = 0,005$ ) για την ομάδα CS11 σε σύγκριση με την ομάδα CON (Πίνακας 7.8. και Πίνακας 7.9., αντίστοιχα).

Στα μονοκύτταρα, η σχετική έκφραση των *TRIF* και *TRAF3* γονιδίων βρέθηκε σημαντικά αυξημένη ( $P = 0,005$  και  $P = 0,010$ , αντίστοιχα) στην ομάδα CS11 σε σύγκριση με τις CON και CS6. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική αλλαγή στα ουδετερόφιλα (Πίνακες 9.7. και 9.8., αντίστοιχα). Ομοίως, η σχετική έκφραση του γονιδίου *MAPK* αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,044$ ) στα μονοκύτταρα της CS11, χωρίς σημαντική τροποποίηση στα ουδετερόφιλα (Πίνακας 7.8. και Πίνακας 7.9., αντίστοιχα). Στην ίδια κατεύθυνση, στα μονοκύτταρα, η σχετική έκφραση του ρυθμιστικού παράγοντα ιντερφερόνης 5 (*IRF5*) αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,002$ ) για την CS11, αλλά δεν επηρεάστηκε σημαντικά στα ουδετερόφιλα (Πίνακας 7.8. και Πίνακας 7.9., αντίστοιχα). Επιπλέον, η σχετική έκφραση του *STAT3* γονιδίου ήταν σημαντική ( $P = 0,003$ ) στα ουδετερόφιλα των CS11 και CS16, ενώ δεν βρέθηκε σημαντική μεταβολή στη σχετική έκφραση στα μονοκύτταρα (Πίνακας 7.8. και Πίνακας 7.9., αντίστοιχα).

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *IL1B* ενισχύθηκε σημαντικά στα μονοκύτταρα της CS6 ( $P = 0,015$ ) και στα ουδετερόφιλα των προβατινών των CS6 και CS16 ομάδων ( $P = 0,001$ , Πίνακας

7.8. και Πίνακας 7.9., αντίστοιχα). Επίσης, στα ουδετερόφιλα των προβατινών της CS6, η σχετική έκφραση του *IL10* αυξήθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τις CON και CS11 ( $P = 0,007$ ), χωρίς να βρεθούν σημαντικές τροποποιήσεις στα μονοκύτταρα (Πίνακας 7.8. και Πίνακας 7.9., αντίστοιχα). Επιπλέον, η σχετική έκφραση του *IL8* αυξήθηκε σημαντικά στα ουδετερόφιλα της CS6 σε σύγκριση με τις CON και CS11. Αντίθετα, η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στα μείγματα ΣΖ των προβατινών δεν επηρέασε σημαντικά τη σχετική έκφραση των *IL2*, *IL6* και *TNFA* τόσο στα μονοκύτταρα όσο και στα ουδετερόφιλα.

Ομοίως, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στη σχετική έκφραση των *IRF3*, *CHUK*, *JUND*, *NFKB*, *CXCL16* και *HMOX1* γονιδίων (Πίνακας 7.8. και Πίνακας 7.9., αντίστοιχα). Ακόμα, η σχετική έκφραση του γονιδίου *CCL5* μειώθηκε στα μονοκύτταρα όσο και στα ουδετερόφιλα των προβατινών των ομάδων CS όχι όμως στατιστικώς σημαντικά (Πίνακας 7.8. και Πίνακας 7.9., αντίστοιχα).

**Πίνακας 7.8.** Η σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)

Γονίδια	Διατροφική επέμβαση				SEM <sup>a</sup>	P
	CON	CS6	CS11	CS16		
<i>TLR4</i>	0,18 <sup>ab</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,16 <sup>ab</sup>	0,005	0,019
<i>MYD88</i>	0,57	0,64	0,78	0,46	0,111	0,272
<i>TRIF</i>	0,01 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,01 <sup>ab</sup>	0,001	0,005
<i>TRAF3</i>	0,09 <sup>b</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,10 <sup>ab</sup>	0,002	0,010
<i>IRF3</i>	0,02	0,02	0,03	0,02	0,000	0,316
<i>IRF5</i>	0,30 <sup>b</sup>	0,30 <sup>b</sup>	0,51 <sup>a</sup>	0,35 <sup>b</sup>	0,007	0,002
<i>MAPK</i>	0,26 <sup>b</sup>	0,27 <sup>ab</sup>	0,37 <sup>a</sup>	0,27 <sup>ab</sup>	0,004	0,005
<i>CHUK</i>	0,07	0,07	0,07	0,08	0,000	0,571
<i>JUND</i>	0,19	0,23	0,24	0,20	0,035	0,368
<i>STAT3</i>	0,20	0,20	0,21	0,19	0,002	0,356
<i>NFKB</i>	0,34	0,33 <sup>t</sup>	0,42 <sup>t</sup>	0,34	0,040	0,079
<i>TNFA</i>	0,08	0,07	0,08	0,08	0,002	0,977
<i>IL1B</i>	0,02 <sup>b</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,03 <sup>ab</sup>	0,05 <sup>ab</sup>	0,001	0,015
<i>IL2</i>	0,003 <sup>t</sup>	0,002	0,001 <sup>t</sup>	0,002	0,000	0,086
<i>IL6</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,666



<i>IL8</i>	0,17	0,24	0,13	0,17	0,013	0,849
<i>IL10</i>	0,01	0,02	0,01	0,01	0,000	0,259
<i>CCL5</i>	0,55 <sup>t</sup>	0,41	0,47	0,33 <sup>t</sup>	0,009	0,078
<i>CXCL16</i>	0,04	0,04	0,03	0,03	0,001	0,684
<i>HMOX1</i>	0,09	0,10	0,10	0,06	0,002	0,180

Συντομογραφίες: CON = επέμβαση μάρτυρα. CS6 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 6 % σπερμάτων καμελίνας, CS11 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 11 % σπερμάτων καμελίνας, CS16 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 16 % σπερμάτων καμελίνας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) μεταξύ των ομάδων διαφέρουν σημαντικά, t = τάση προς στατιστικώς σημαντική διαφορά (0,05 < t < 0,10). <sup>a</sup>SEM = τυπικός μέσος όρος σφάλματος, P = P τιμή.

**Πίνακας 7.9.** Η σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων σε ουδετερόφιλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)

Γονίδια	Διατροφική επέμβαση				SEM <sup>a</sup>	P
	CON	CS6	CS11	CS16		
<i>TLR4</i>	0,27 <sup>ab</sup>	0,36 <sup>a</sup>	0,14 <sup>b</sup>	0,28 <sup>ab</sup>	0,006	0,005
<i>MYD88</i>	1,28 <sup>a</sup>	0,96 <sup>ab</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,84 <sup>ab</sup>	0,021	0,005
<i>TRIF</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,000	0,500
<i>TRAF3</i>	0,05	0,07	0,09	0,07	0,002	0,260
<i>IRF3</i>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,000	0,924
<i>IRF5</i>	0,17	0,20	0,23	0,23	0,012	0,328
<i>MAPK</i>	0,34	0,30	0,30	0,28	0,003	0,397
<i>CHUK</i>	0,07	0,07	0,08	0,07	0,001	0,124
<i>JUND</i>	0,19	0,23	0,15	0,16	0,005	0,292
<i>STAT3</i>	0,30 <sup>a</sup>	0,25 <sup>ab</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,009	0,003
<i>NFKB</i>	0,37	0,36	0,33	0,34	0,036	0,709
<i>TNFA</i>	0,17	0,12	0,15	0,16	0,002	0,102
<i>IL1B</i>	0,03 <sup>b</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,003	<0,001
<i>IL2</i>	0,003 <sup>t</sup>	0,004	0,006 <sup>t</sup>	0,002	0,000	0,062
<i>IL6</i>	0,001	0,001	0,002	0,001	0,000	0,681
<i>IL8</i>	0,08 <sup>b</sup>	0,33 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,20 <sup>ab</sup>	0,010	0,017

<i>IL10</i>	0,011 <sup>b</sup>	0,024 <sup>a</sup>	0,011 <sup>b</sup>	0,018 <sup>ab</sup>	0,001	0,007
<i>CCL5</i>	1,33	1,08	1,18	0,84	0,221	0,122
<i>CXCL16</i>	0,04	0,04	0,04	0,05	0,001	0,510
<i>HMOX1</i>	0,08	0,09	0,06	0,07	0,002	0,366

Συντομογραφίες: CON = επέμβαση μάρτυρα. CS6 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 6 % σπερμάτων καμελίνας, CS11 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 11 % σπερμάτων καμελίνας, CS16 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 16 % σπερμάτων καμελίνας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) μεταξύ των ομάδων διαφέρουν σημαντικά, t = τάση προς στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $0,05 < t < 0,10$ ). <sup>a</sup>SEM = τυπικός μέσος όρος σφάλματος, P = P τιμή.

### 7.6.1. Συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων

Βρέθηκαν θετικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων των σχετικών εκφράσεων των γονιδίων *TLR4* και *MYD88* σε μονοκύτταρα ( $r = 0,625$ ,  $P < 0,001$ ) και ουδετερόφιλα ( $r = 0,550$ ,  $P < 0,001$ ) καθώς και μεταξύ των επιπέδων των σχετικών εκφράσεων των γονιδίων *TRIF* και *TRAF3* σε μονοκύτταρα ( $r = 0,851$ ,  $P < 0,001$ ) και ουδετερόφιλα ( $r = 0,728$ ,  $P < 0,001$ ) (Διάγραμμα 7.3.). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *MAPK* συσχετίστηκε θετικά με αυτά του *MYD88* γονιδίου στα μονοκύτταρα ( $r = 0,342$ ,  $P = 0,025$ , Διάγραμμα 7.3.). Στα ουδετερόφιλα, το σχετικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *STAT3* συσχετίστηκε επίσης σημαντικά τόσο με το επίπεδο σχετικής έκφρασης του *TLR4* ( $r = 0,393$ ,  $P = 0,006$ ) όσο και με το *MYD88* ( $r = 0,670$ ,  $P < 0,001$ , Διάγραμμα 7.3.). Τόσο στα μονοκύτταρα όσο και στα ουδετερόφιλα, το επίπεδο σχετικής έκφρασης του γονιδίου *IL1B* συσχετίστηκε θετικά με του *TLR4* ( $r = 0,621$ ,  $P < 0,001$  και  $r = 0,584$ ,  $P < 0,001$ , αντίστοιχα, Διάγραμμα 7.3.).

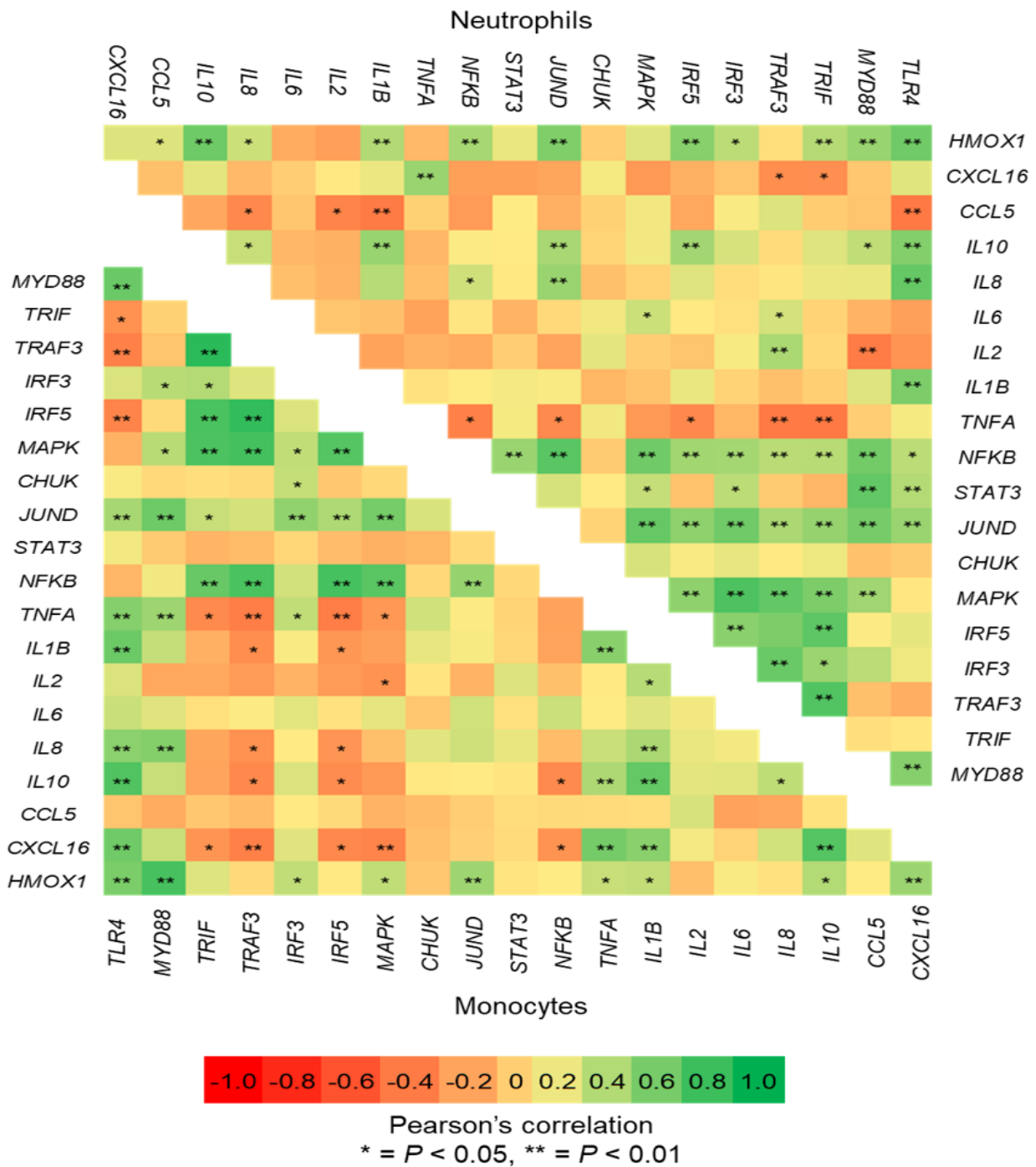
Θετική ήταν η συσχέτιση μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *IL10* και *TLR4* ( $r = 0,714$ ,  $P < 0,001$ ) στα μονοκύτταρα, ενώ στα ουδετερόφιλα τα επίπεδα σχετικής έκφρασης των *IL10* με τα αντίστοιχα των *TLR4* ( $r = 0,559$ ,  $P < 0,001$ ) και *MYD88* ( $r = 0,354$ ,  $P = 0,015$ , Διάγραμμα 7.3.). Στα ουδετερόφιλα, αρνητική ήταν η συσχέτιση μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *MYD88* και *IL2* ( $r = -0,395$ ,  $P = 0,006$ ). Επιπλέον, στα μονοκύτταρα, θετική ήταν η συσχέτιση μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *TNFA*, *TLR4* ( $r = 0,527$ ,  $P < 0,001$ ) και *MYD88* ( $r = 0,437$ ,  $P = 0,003$ , Διάγραμμα 7.3.). Το ίδιο συνέβη και με τα επίπεδα σχετικής έκφρασης του γονιδίου *IL8*, ενώ στα ουδετερόφιλα, τα επίπεδα σχετικής

έκφρασης του εν λόγω γονιδίου συσχετίστηκε θετικά μόνο με του γονιδίου *TLR4* ( $r = 0,505$ ,  $P < 0,001$ , Διάγραμμα 7.3.).

Η μελέτη των συσχετίσεων μεταξύ των σχετικών εκφράσεων των γονιδίων που μελετήθηκαν σε μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα και των αμινοξέων των τεσσάρων μειγμάτων ΣΖ, ανέδειξε σημαντικές συσχετίσεις μόνο με συγκεκριμένα αμινοξέα των τεσσάρων μειγμάτων ΣΖ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.1. και Πίνακα 18.2. του Παραρτήματος, αντίστοιχα.

Πιο αναλυτικά, βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *MAPK* στα μονοκύτταρα και της περιεκτικότητας των μειγμάτων ΣΖ σε θρεονίνη ( $r = -0,971$ ,  $P = 0,029$ ). Το αντίθετο παρατηρήθηκε μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *IL2* στα μονοκύτταρα και της περιεκτικότητας των μειγμάτων ΣΖ σε τυροσίνη ( $r = 0,973$ ,  $P = 0,027$ ). Επιπλέον, εμφανίστηκε μια τάση για αρνητική συσχέτιση μεταξύ της θρεονίνης και των σχετικών επιπέδων έκφρασης του *IRF5* ( $r = -0,924$ ,  $P = 0,076$ ). Επιπλέον, βρέθηκαν θετικές συσχετίσεις μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *MYD88* στα ουδετερόφιλα και της περιεκτικότητας των μειγμάτων ΣΖ σε σερίνη ( $r = 0,966$ ,  $P = 0,037$ ) και τυροσίνη ( $r = 0,949$ ,  $P = 0,050$ ) αντίστοιχα.

Αρνητικές ήταν οι συσχετίσεις μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *TRIF* στα μονοκύτταρα και της περιεκτικότητας των μειγμάτων ΣΖ σε θρεονίνη ( $r = -0,951$ ,  $P = 0,049$ ) καθώς και μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *TRAF3* στα ουδετερόφιλα και της περιεκτικότητας των μειγμάτων ΣΖ σε τυροσίνη ( $r = -0,973$ ,  $P = 0,027$ ) και σερίνη ( $r = -0,996$ ,  $P = 0,004$ ), αντίστοιχα. Στα μονοκύτταρα παρατηρήθηκε τάση για θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των μειγμάτων ΣΖ σε ισολευκίνη και των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *IL10* ( $r = 0,927$ ,  $P = 0,073$ ) και μεταξύ της περιεκτικότητας των μειγμάτων ΣΖ σε βαλίνη και των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *IL1B* ( $r = 0,932$ ,  $P = 0,068$ ).

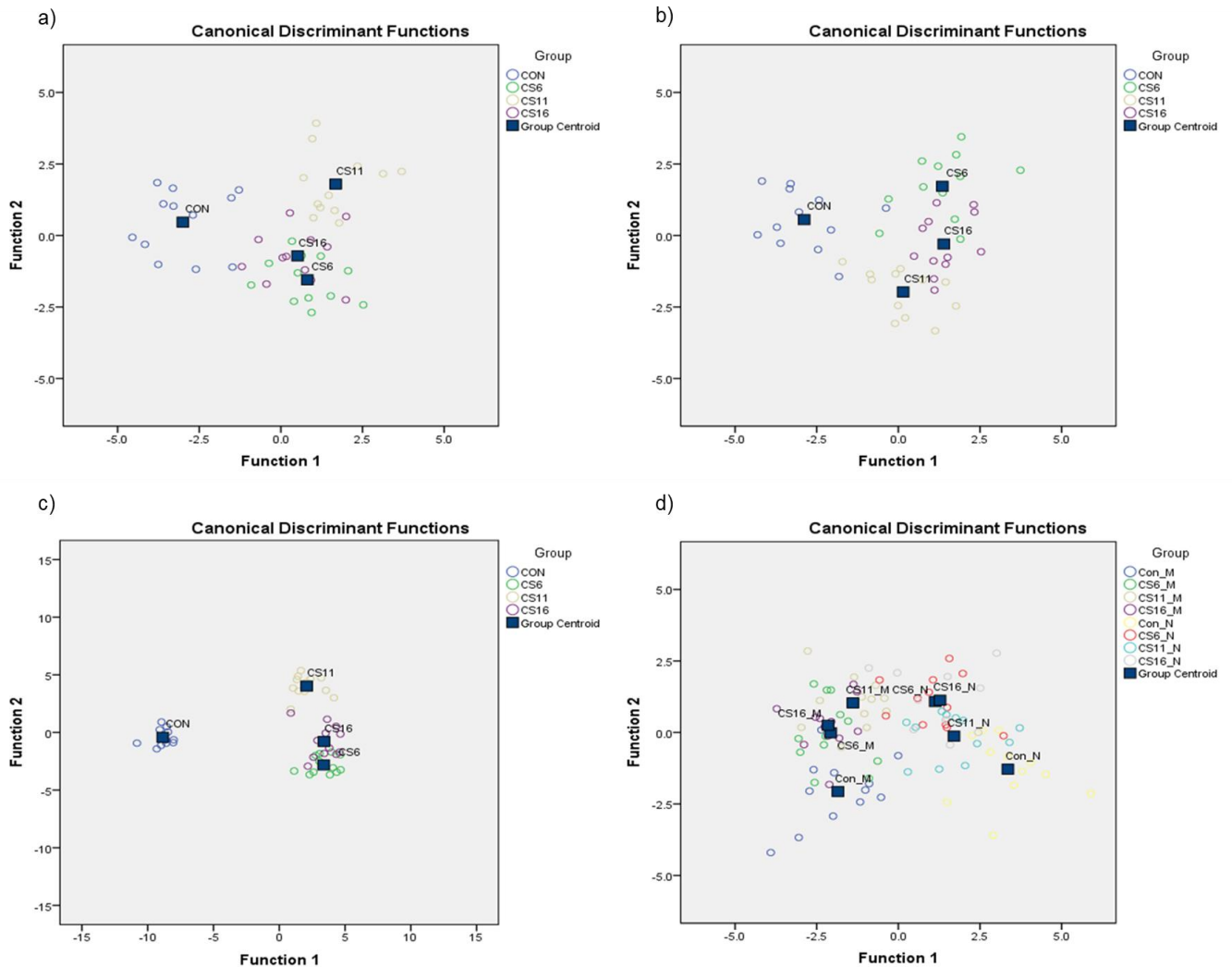


**Διάγραμμα 7.3.** Γραφική απεικόνιση heatmap της συσχέτισης Pearson μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων στα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα

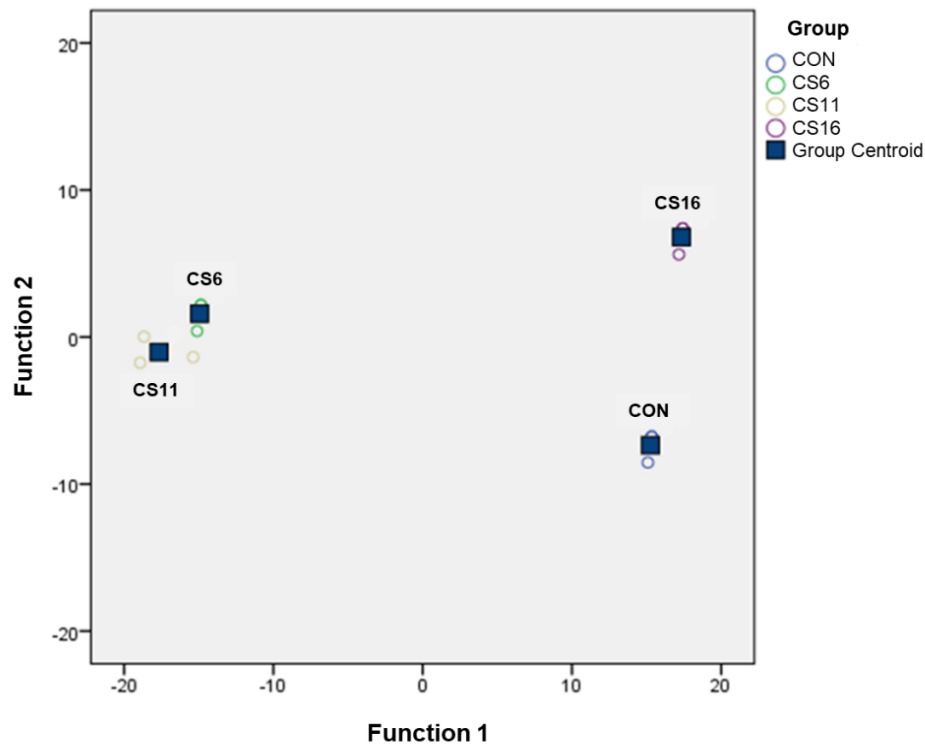
### 7.6.2. Αποτελέσματα διαχωριστικής ανάλυσης στα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα και στο προφίλ των αμινοξέων των μειγμάτων συμπυκνωμένων ζωοτροφών

Στις σχετικές εκφράσεις των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων ξεχωριστά, καθώς και στα συνδυασμένα επίπεδα της σχετικής έκφρασης τους, διεξήχθη διαχωριστική ανάλυση (Διάγραμμα 7.4.) για να διερευνηθεί σε ποιο βαθμό τα δείγματα διαχωρίστηκαν με βάση τη διατροφική επέμβαση (CON, CS6, CS11, CS16). Δεδομένης της διατροφικής επέμβασης και της εισαγωγής είκοσι ανεξάρτητων μεταβλητών (σχετικές γονιδιακές εκφράσεις), στην ανάλυση κατατάχθηκε το 85,4 % των δειγμάτων στη σωστή ομάδα, αποκλειστικά μόνο για τα μονοκύτταρα ή τα ουδετερόφιλα, ενώ το 97,9 % των δειγμάτων, λαμβάνοντας υπόψιν τόσο τα μονοκύτταρα όσο και τα ουδετερόφιλα (σαράντα μεταβλητές/σχετικές γονιδιακές εκφράσεις) στην ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, στα μονοκύτταρα, η συνάρτηση 1 εξήγησε το 62,3 % της διακύμανσης και η συνάρτηση 2 εξήγησε το 31,1 %. Ως εκ τούτου, το Wilk's λ βρέθηκε στο 0,06 για τη συνάρτηση 1 ( $P = 0,003$ ) και 0,267 για τη συνάρτηση 2 ( $P = 0,120$ ). Επίσης, λαμβάνοντας υπόψιν τη μέθοδο stepwise, οι μεταβλητές που συνέβαλαν περισσότερο ήταν οι *TNF*, *IRF5* και *IL1B*. Όσον αφορά τα ουδετερόφιλα, η συνάρτηση 1 εξήγησε το 55,5 % της διακύμανσης, ενώ η συνάρτηση 2 εξήγησε το 35,2 %. Το Wilk's λ βρέθηκε να είναι ίσο με 0,047 για τη συνάρτηση 1 ( $P < 0,05$ ) και 0,203 για τη συνάρτηση 2 ( $P = 0,077$ ). Οι *STAT3* και *IL1B* ήταν οι κύριες μεταβλητές που συνέβαλαν στον διαχωρισμό μέσω της μεθόδου stepwise. Στα συνδυασμένα επίπεδα σχετικής έκφρασης των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων, το 75,4 % της διακύμανσης εξηγήθηκε στη συνάρτηση 1 και το 17,7 % στη συνάρτηση 2. Το Wilk's λ βρέθηκε να είναι ίσο με 0,001 για τη συνάρτηση 1 ( $P < 0,001$ ) και 0,035 ( $P > 0,001$ ) για τη συνάρτηση 2. Επιπλέον, το 75,0 % των δειγμάτων ταξινομήθηκε για τη διάκριση των είκοσι μεταβλητών (σχετικές γονιδιακές εκφράσεις) στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων (μονοκύτταρα έναντι ουδετερόφιλων) κάθε διατροφικής επέμβασης. Η συνάρτηση 1 εξήγησε το 53,9 % της διακύμανσης, ενώ οι συναρτήσεις 2, 3, 4, 5, 6 και 7 εξήγησαν το 16,3, 15,7, 7,9, 3,1, 2,4 και 0,8 % της διακύμανσης, αντίστοιχα. Το Wilk's λ βρέθηκε να ισούται με 0,014 στη συνάρτηση 1 ( $P < 0,001$ ) και 0,076 ( $P < 0,001$ ), 0,175 ( $P < 0,001$ ), 0,392 ( $P = 0,238$ ), 0,636 ( $P = 0,885$ ), 0,636 ( $P = 0,885$ ), 0,636 ( $P = 0,885$ ), 0,076 ( $P = 0,885$ ), 0,076 ( $P = 0,885$ ) και 0,943 ( $P = 0,989$ ) για τις συναρτήσεις 2 έως 7, αντίστοιχα. Τα *CCL5*, *IL1B*, *TNFA*, *STAT3* και *IRF5* ήταν οι κύριες μεταβλητές που συνέβαλαν στον διαχωρισμό μέσω της μεθόδου stepwise.

Διαχωριστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε επίσης και στο προφίλ των αμινοξέων των τεσσάρων μειγμάτων ΣΖ για να προσδιοριστεί το επίπεδο διαχωρισμού τους (Διάγραμμα 7.5.). Πιο συγκεκριμένα, η συνάρτηση 1 εξήγησε το 91,1 % των τιμών, ενώ η συνάρτηση 2 το υπόλοιπο 8,9 %. Για τη συνάρτηση 1 το Wilk's  $\lambda$  βρέθηκε να είναι  $< 0,001$  ( $P < 0,001$ ) και για τη συνάρτηση 2 να ισούται με 0,025 ( $P < 0,001$ ).



**Διάγραμμα 7.4.** Γραφική απεικόνιση της διαχωριστικής ανάλυσης που διαχωρίζει τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON, CS6, CS11 και CS16) σύμφωνα με τη σχετική έκφραση γονιδίων των: a) μονοκυττάρων, b) ουδετεροφίλων, c) μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων και d) μονοκυττάρων έναντι ουδετεροφίλων



**Διάγραμμα 7.5.** Γραφική απεικόνιση της ανάλυσης που διαχωρίζει τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON, CS6, CS11 και CS16) σύμφωνα με το προφίλ αμινοξέων

### 7.7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΝΕΑΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ

Η μεταγονιδιωματική αλληλούχιση των DNA που απομονώθηκαν από συγκεντρωμένα δείγματα (pooled) Υ.Μ.Κ. είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση 19, 19, 18 και 15 φύλα, 50, 57, 53 και 44 οικογένειες και 108, 139, 126 και 86 γένη για τις CON, CS6, CS11 και CS16, αντίστοιχα. Ορίστηκε ελάχιστο κριτήριο ομοιότητας το 85 % και ελάχιστο σκορ ποιότητας 15 και περίπου 100.000 αναγνώσεις/δείγμα αντιστοιχίστηκαν σε διάφορα ταξινομικά επίπεδα με μέση βαθμολογία ομοιότητας 90 %. Η σάρωση είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση μεγάλου αριθμού ειδών τα οποία δεν μπορούν να αναφερθούν στο σύνολό τους. Στον Πίνακα 7.10. και στο Διάγραμμα 7.6. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής σάρωσης των DNA που απομονώθηκαν από τα συνονθυλευμένα δείγματα Υ.Μ.Κ. για κάθε ομάδα σε επίπεδο φύλου. Το υψηλότερο ποσοστό για το φύλο *Bacteroidetes* παρατηρήθηκε στην ομάδα CS16 (46,7 %) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες (CON: 39,3 %, CS6: 35,0 % και CS11: 34,2 %, αντίστοιχα). Αντίθετα, το φύλο *Firmicutes* βρέθηκε υψηλότερο στην ομάδα CS6 (56,4 %) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες (CON: 51,0 %, CS11: 45,7 % και CS16: 37,6 %, αντίστοιχα). Όσον αφορά τα

Proteobacteria, το μεγαλύτερο ποσοστό απαντήθηκε στην ομάδα CS11 (18,6 %) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες διατροφικές επεμβάσεις (CON: 7,7 %, CS6: 6,5 % και CS16: 14,2 %, αντίστοιχα). Ο λόγος *Firmicutes:Bacteroidetes* βρέθηκε στο χαμηλότερο επίπεδο για την ομάδα CS16 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες.

Η κλάση των *Bacteroidia* ήταν η κυρίαρχη στην ομάδα CON ακολουθούμενη από την κλάση *Clostridia*, *Gammaproteobacteria* κ.α. Οι κλάσεις των *Bacteroidia* και *Clostridia* ήταν οι κυρίαρχες και για τις ομάδες CS11 και CS16 ακολουθούμενες όμως από την κλάση *Negativicutes*. Αντίθετα, για την ομάδα CS6 η κυρίαρχη κλάση σε αφθονία ήταν αυτή των *Clostridia* με τις κλάσεις *Bacteroidia* *Negativicutes* και *Gammaproteobacteria* να ακολουθούν.

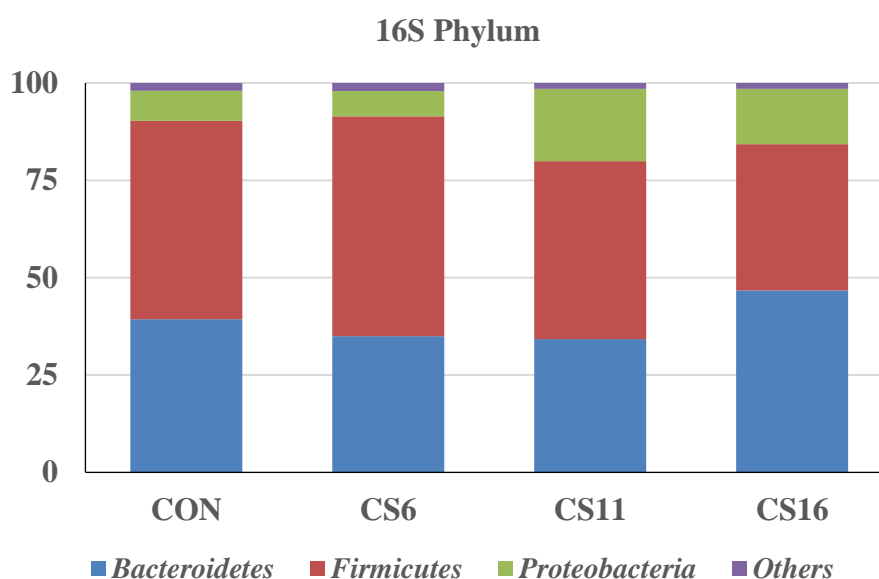
Η οικογένεια *Prevotellaceae* ήταν η κυρίαρχη και για τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON: 37,4 %, CS6: 32,8 %, CS11: 33,1 % και CS16: 44,5 %, αντίστοιχα). Για τις ομάδες CON και CS6 ακολούθησε η οικογένεια *Lachnospiraceae*, ενώ για τις ομάδες CS11 και CS16, ακολούθησε η *Succinivibrionaceae*. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε επίπεδο οικογένειας παρατίθεται στο Διάγραμμα 7.7.

Τα βακτήρια του γένους *Prevotella* ήταν οι κύριοι εκπρόσωποι του φύλου *Bacteroidetes* και για τις τέσσερις ομάδες (Διάγραμμα 7.7.). Το υψηλότερο ποσοστό βρέθηκε στην ομάδα CS16 (43,1 %) σε σύγκριση με τις CON (36,0 %), CS6 (31,9 %) και CS11 (32,3 %). Τα κυρίαρχα βακτήρια του εν λόγω γένους ήταν τα *Prevotella ruminicola* και για τις τέσσερις επεμβάσεις. Επιπλέον, το γένος *Butyrivibrio* βρέθηκε να ακολουθεί για την ομάδα CON, ενώ τα *Ruminococcus*, *Ruminobacter* και *Selenomonas* ακολούθησαν για τις ομάδες CS6, CS11 και CS16, αντίστοιχα. Σε επίπεδο είδους τα *Ruminobacter amylophilus* και *Butyrivibrio Proteoclasticus* βρέθηκαν στο υψηλότερο ποσοστό στις ομάδες CON και CS16 (Διάγραμμα 7.8.).

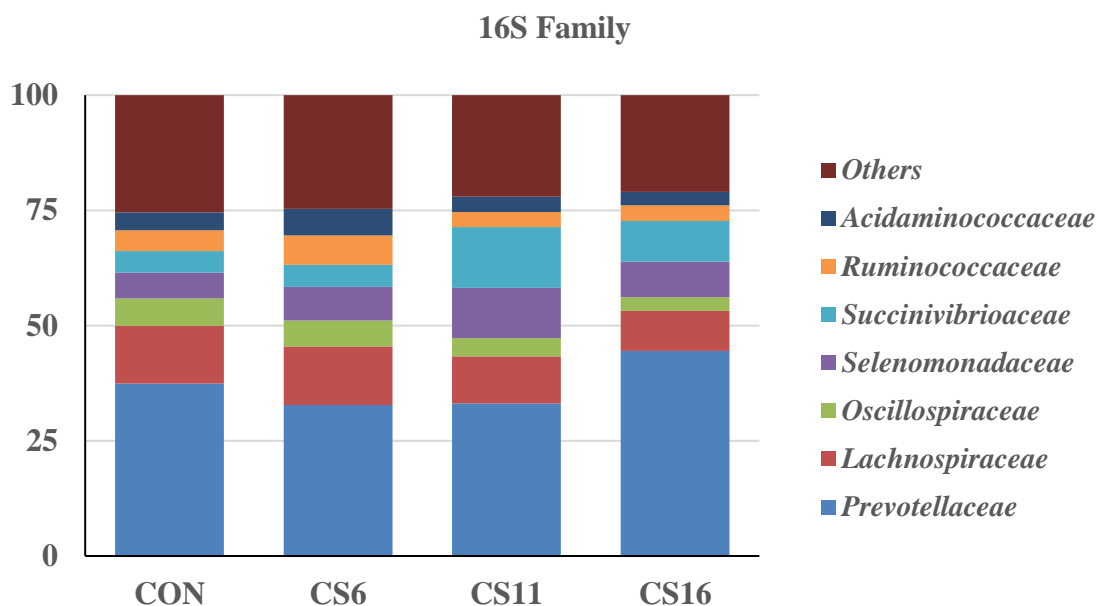


**Πίνακας 7.10.** Μεταγονιδιωματική σύρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ) σε επίπεδο φύλου

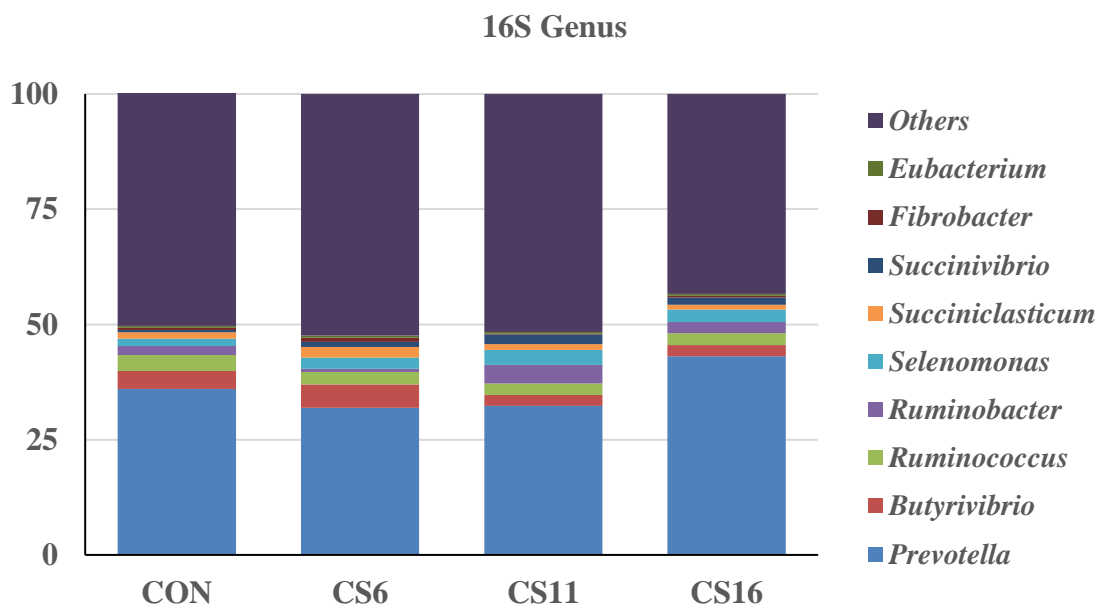
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Λοιπά</i>	<i>Firmicutes:Bacteroidetes</i>
	%				
<b>CON</b>	39,3	51,0	7,7	2,0	1,3
<b>CS6</b>	35,0	56,4	6,5	2,1	1,6
<b>CS11</b>	34,2	45,7	18,6	1,5	1,3
<b>CS16</b>	46,7	37,6	14,2	1,5	0,8



**Διάγραμμα 7.6.** Μεταγονιδιωματική σύρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11, CS16) σε επίπεδο φύλου



**Διάγραμμα 7.7.** Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11, CS16) σε επίπεδο οικογένειας



**Διάγραμμα 7.8.** Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11, CS16) σε επίπεδο γένους

## 7.8. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΥΓΡΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ

Οι διαφορές στους μέσους όρους στις διαφορετικές διατροφικές επεμβάσεις της σχετικής αφθονίας των μικροοργανισμών στο υγρό της Μ.Κ. παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.11. Η σχετική αφθονία των *Bacteroidetes* και *Firmicutes* δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των

τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων. Όσον αφορά τον λόγο Firmicutes:Bacteroidetes, παρατηρήθηκε αριθμητικά αυξημένος στις ομάδες CS6 και CS11. Η σχετική αφθονία των *Protozoa* και αυξήθηκαν σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στην ομάδα CS6 κατά 61,25, 66,25 και 45 %, σε σύγκριση με τις CON, CS11 και CS16, αντίστοιχα. Σημαντική αύξηση ( $P < 0,001$ ) παρατηρήθηκε και στη σχετική αφθονία των *Entodinium* για την CS6 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες διατροφικές επεμβάσεις. Επίσης, υπήρξε τάση προς αύξηση στη σχετική αφθονία των *Archaea* στην ίδια ομάδα σε σύγκριση με την ομάδα CS11. Όσον αφορά τη σχετική αφθονία των *Methanogen*, παρατηρήθηκε αριθμητική μείωση στις ομάδες CS11 και CS16, ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, η σχετική αφθονία των *Ruminobacter amylophilus* αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,002$ ) στην ομάδα CS11, ενώ η σχετική αφθονία των *Fibrobacter succinogenes* αυξήθηκε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στην CS6 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες.

**Πίνακας 7.11.** Σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)

	Διατροφικές επεμβάσεις					
	CON	CS6	CS11	CS16	SEM <sup>a</sup>	P
Bacteroidetes	0,421	0,388	0,396	0,449	0,012	0,307
Firmicutes	0,351	0,413	0,412	0,370	0,022	0,737
Firmicutes:Bacteroidetes	0,844	1,055	1,047	0,806	0,048	0,137
<i>Prevotella sp.</i>	0,257	0,263	0,260	0,269	0,007	0,952
<i>Prevotella ruminocola</i>	0,160	0,136	0,166	0,122	0,007	0,116
<i>Prevotella brevis</i>	0,007	0,007	0,006	0,005	0,002	0,867
Protozoa	0,031 <sup>b</sup>	0,080 <sup>a</sup>	0,027 <sup>b</sup>	0,044 <sup>b</sup>	0,005	<0,001
Total Fungi	0,0006	0,0010	0,0006	0,0005	0,0001	0,159
<i>Neocallimastigales</i>	0,0005 <sup>t</sup>	0,0009 <sup>t</sup>	0,0005 <sup>t</sup>	0,0006	0,0001	0,051
<i>Entodinium</i>	0,010 <sup>b</sup>	0,025 <sup>a</sup>	0,006 <sup>b</sup>	0,013 <sup>b</sup>	0,002	<0,001
Archaea	0,009	0,015 <sup>t</sup>	0,008 <sup>t</sup>	0,012	0,001	0,070
Total Methanogens	0,0010	0,0010	0,0006	0,0008	0,0001	0,262
<i>Methanomassiliicoccales</i>	0,009	0,009	0,007	0,008	0,001	0,478
<i>Methanobrevibacter</i>	<0,0001	0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,402
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,469
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0,0004	0,0004	0,0002	0,0003	0,0001	0,553

<i>Ruminobacter amylophilus</i>	0,006 <sup>b</sup>	0,002 <sup>b</sup>	0,014 <sup>a</sup>	0,004 <sup>b</sup>	0,001	0,002
<i>Ruminococcus albus</i>	0,010	0,011	0,011	0,008	0,001	0,518
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	0,090	0,094	0,102	0,092	0,005	0,794
<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	0,021	0,019	0,028	0,020	0,002	0,342
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	0,007 <sup>b</sup>	0,027 <sup>a</sup>	0,004 <sup>b</sup>	0,009 <sup>b</sup>	0,002	<0,001
<i>Selenomonas ruminantium</i>	0,020	0,016	0,017	0,015	0,001	0,703
<i>Streptococcus bovis</i>	0,0006	0,0003 <sup>t</sup>	0,0007 <sup>t</sup>	0,0005	0,0001	0,084
<i>Eubacterium ruminantium</i>	0,001	0,002	0,002	0,002	0,0003	0,548

Συντομογραφίες: CON = επέμβαση μάρτυρα. CS6 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 6 % σπερμάτων καμελίνας, CS11 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 11 % σπερμάτων καμελίνας, CS16 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 16 % σπερμάτων καμελίνας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) μεταξύ των ομάδων διαφέρουν σημαντικά, t = τάση προς στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $0,05 < t < 0,10$ ). <sup>a</sup>SEM = τυπικός μέσος όρος σφάλματος, P = P τιμή.

## 7.9. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΣΤΕΡΕΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ

Οι διαφορές στους μέσους όρους στις διαφορετικές διατροφικές επεμβάσεις της σχετικής αφθονίας των μικροοργανισμών στο στερεό περιεχόμενο της Μ.Κ. παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.12. Η σχετική αφθονία των *Bacteroidetes* και *Firmicutes* δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων. Αντίθετα, ο λόγος της σχετικής αφθονίας *Firmicutes*:*Bacteroidetes* βρέθηκε αριθμητικά μειωμένος στις ομάδες CS11 και CS16 σε σύγκριση με τις CON και CS6. Η σχετική αφθονία των *Protozoa* αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,010$ ) για την ομάδα CS6 κατά 87,5, 114,3 και 66,7 %, σε σύγκριση με τις CON, CS11 και CS16, αντίστοιχα. Τάση προς μείωση παρατηρήθηκε στη σχετική αφθονία των *Neocallimastigales* στην ομάδα με το μεγαλύτερο ποσοστό ενσωμάτωσης (CS16) σε σύγκριση με τον μάρτυρα (CON). Επίσης, η σχετική αφθονία των *Archaea* μειώθηκε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις CS11 και CS16 σε σύγκριση με τις CON και CS6. Όσον αφορά τη σχετική αφθονία των *Methanogen*, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ( $P = 0,025$ ) στις ομάδες CS11 και CS16 σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα και την CS6. Επιπλέον, η σχετική αφθονία του είδους *Ruminococcus flavefaciens* μειώθηκε σημαντικά ( $P = 0,022$ ) στις CS11 και CS16 σε σύγκριση με την CON. Η σχετική αφθονία του είδους *Ruminobacter amylophilus* αυξήθηκε σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στην CS11 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες, ενώ για τη σχετική αφθονία του είδους

*Ruminococcus albus* βρέθηκε τάση προς αύξηση για την CS6 σε σύγκριση με την CS16. Όσον αφορά τη σχετική αφθονία του είδους *Butyrivibrio fibrisolvens*, μειώθηκε σημαντικά για τη CS16 ( $P = 0,006$ ), ενώ του είδους *Butyrivibrio Proteoclasticus* αυξήθηκε σημαντικά στην CS11 ( $P = 0,001$ ). Τέλος, υπήρξε τάση προς αύξηση στην CS6 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες για τη σχετική αφθονία του είδους *Fibrobacter succinogenes*, ενώ του *Selenomonas ruminantium* αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,001$ ) στις ομάδες CS11 και CS16 σε σύγκριση με τις ομάδες CON και CS6.

**Πίνακας 7.12.** Σχετική ποσότητα επιλεγμένων μικροοργανισμών στο στερεό περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, CS6, CS11 και CS16) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (6 %, 11 % και 16 % στο μείγμα ΣΖ)

	Διατροφικές επεμβάσεις					
	CON	CS6	CS11	CS16	SEM <sup>a</sup>	P
Bacteroidetes	0,391	0,390	0,431	0,439	0,014	0,504
Firmicutes	0,373	0,422	0,379	0,375	0,016	0,727
Firmicutes:Bacteroidetes	0,962	1,112	0,892	0,866	0,040	0,143
<i>Prevotella spp.</i>	0,231	0,236	0,289	0,303	0,013	0,120
<i>Prevotella ruminicola</i>	0,036	0,027	0,038	0,038	0,002	0,157
<i>Prevotella brevis</i>	0,022	0,025	0,023	0,020	0,0002	0,848
Protozoa	0,024 <sup>b</sup>	0,045 <sup>a</sup>	0,021 <sup>b</sup>	0,027 <sup>b</sup>	0,003	0,010
Total Fungi	0,0030 <sup>a</sup>	0,0023 <sup>ab</sup>	0,0019 <sup>ab</sup>	0,0014 <sup>b</sup>	0,0002	0,043
<i>Neocallimastigales</i>	0,017 <sup>t</sup>	0,013	0,011	0,010 <sup>t</sup>	0,0001	0,067
<i>Entodinium</i>	0,069	0,147	0,060	0,096	0,001	0,136
Archaea	0,013 <sup>a</sup>	0,016 <sup>a</sup>	0,010 <sup>b</sup>	0,010 <sup>b</sup>	0,001	<0,001
Total Methanogens	0,0012 <sup>a</sup>	0,0012 <sup>a</sup>	0,0006 <sup>b</sup>	0,0007 <sup>b</sup>	0,0001	0,025
<i>Methanomassiliicoccales</i>	0,0013	0,0014	0,0009	0,0011	0,0001	0,307
<i>Methanobrevibacter</i>	0,00016	0,00019	0,00013	0,00011	<0,0001	0,385
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	<0,0001	0,842
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0,0009 <sup>a</sup>	0,0006 <sup>ab</sup>	0,0003 <sup>b</sup>	0,0003 <sup>b</sup>	0,0001	0,022
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	0,011 <sup>b</sup>	0,002 <sup>b</sup>	0,025 <sup>a</sup>	0,011 <sup>b</sup>	0,002	<0,001
<i>Ruminococcus albus</i>	0,071	0,081 <sup>t</sup>	0,066	0,048 <sup>t</sup>	0,001	0,079
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	0,089 <sup>a</sup>	0,094 <sup>a</sup>	0,089 <sup>a</sup>	0,068 <sup>b</sup>	0,003	0,006
<i>Butyrivibrio Proteoclasticus</i>	0,038 <sup>b</sup>	0,031 <sup>b</sup>	0,056 <sup>a</sup>	0,031 <sup>b</sup>	0,003	0,001

<i>Fibrobacter succinogenes</i>	0,024 <sup>t</sup>	0,022 <sup>t</sup>	0,012 <sup>t</sup>	0,012 <sup>t</sup>	0,002	0,080
<i>Selenomonas ruminantium</i>	0,009 <sup>b</sup>	0,005 <sup>b</sup>	0,013 <sup>a</sup>	0,015 <sup>a</sup>	0,001	0,001
<i>Streptococcus bovis</i>	0,0007	0,0004	0,0007	0,0006	0,0001	0,131
<i>Eubacterium ruminantium</i>	0,006	0,006	0,006	0,004	0,0004	0,247

---

Συντομογραφίες: CON = επέμβαση μάρτυρα. CS6 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 6 % σπερμάτων καμελίνας, CS11 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 11 % σπερμάτων καμελίνας, CS16 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 16 % σπερμάτων καμελίνας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) μεταξύ των ομάδων διαφέρουν σημαντικά, t = τάση προς στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $0,05 < t < 0,10$ ). <sup>a</sup>SEM = τυπικός μέσος όρος σφάλματος, P = P τιμή.

## 8. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 1<sup>ΟΥ</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

Η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας και των υποπροϊόντων της στη διατροφή των παραγωγικών ζώων προς μερική αντικατάσταση του σογιάλευρου μπορεί να θεωρηθεί βιώσιμη στρατηγική για την ανάπτυξη γαλακτοκομικών προϊόντων υψηλής θρεπτικής αξίας, συμβάλλοντας θετικά στην προάσπιση του περιβάλλοντος και ταυτόχρονα στη διατήρηση της βιοποικιλότητας. Ωστόσο, πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή όσον αφορά την οξειδωτική σταθερότητα τόσο του οργανισμού όσο και των παραγόμενων προϊόντων. Δεδομένου ότι ένα σιτηρέσιο με υψηλό ποσοστό σπερμάτων καμελίνας δύναται να υπερβαίνει πιθανώς τα αποδεκτά όρια λιπαρών ουσιών στο σιτηρέσιο και λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε PUFA, θα πρέπει να προσδιοριστεί η οξειδωτική σταθερότητα για την αξιολόγηση του βέλτιστου επιπέδου ενσωμάτωσης, ικανού να αναπτύξει προϊόν υψηλής ποιότητας με βέλτιστη διάρκεια ζωής που σέβεται και την οξειδωτική κατάσταση του οργανισμού. Η εν λόγω μελέτη κάλυψε μια πειραματική περίοδο 60 ημερών, η οποία εξασφάλισε για κάθε προβατίνα ατομική διατροφή χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στις αποδόσεις τους. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημείο αναφοράς για περαιτέρω υποθέσεις και έρευνες που θα διεξαχθούν σχετικά με τη συνεχή κατανάλωση σπερμάτων καμελίνας που θα αντικαθιστούσαν εν μέρει το σογιάλευρο στη διατροφή των προβατινών και την πιθανή επίδραση των αντιδιαιτητικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζονται σε αυτά.

### 8.1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΗ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Μέχρι σήμερα, η ενσωμάτωση των σπερμάτων καμελίνας στη διατροφή των μηρυκαστικών είχε αμφιλεγόμενη επίδραση σχετικά με τη γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της εν λόγω διατριβής, οι Hurtaud και Peyraud (2007) και Mierlita *et al.* (2011), δεν διαπίστωσαν καμία σημαντική διαφορά όσον αφορά την γαλακτοπαραγωγή, όταν σπέρματα και άλευρο καμελίνας ενσωματώθηκαν στα σιτηρέσια τόσο των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής όσο και των προβατινών αντίστοιχα. Αντίθετα, οι Mierlita *et al.* (2018) διαπίστωσαν αυξημένη γαλακτοπαραγωγή σε προβατίνες που διατρέφονταν σε βοσκότοπους σε συνδυασμό με μείγμα ΣΖ που περιλάμβανε σπέρματα καμελίνας (100 g/kg). Η χορήγηση ελαίου καμελίνας σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (60 g/kg DM), μείωσε τη γαλακτοπαραγωγή και τη διορθωμένη ως προς την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή (ECM) (Bayat *et*

al., 2015). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της διατριβής, οι Szumacher-Strabel *et al.* (2011), διαπίστωσαν σημαντικά χαμηλότερη λιποπεριεκτικότητα μετά από χορήγηση πλακούντα καμελίνας στα σιτηρέσια προβατινών. Σε αντίθεση με τα ευρήματα της εν λόγω διατριβής, η χορήγηση 80 g/ημέρα και 100 g/ημέρα σπερμάτων καμελίνας σε βοσκούσες προβατίνες αύξησε τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος (Mierlita *et al.*, 2011, Mierlita *et al.*, 2015). Αντίθετα, η ενσωμάτωση ελαίου καμελίνας στο σιτηρέσιο αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, μείωσε το λίπος, την πρωτεΐνη και τη λακτόζη (Bayat *et al.*, 2015). Στην εν λόγω διατριβή, η μειωμένη λιποπεριεκτικότητα που αναφέρθηκε στην ομάδα με το υψηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας έως και 16 %, μπορεί να συμβάλει στο σύνδρομο MFD. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι η ενσωμάτωση ελαιούχων σπερμάτων σε σιτηρέσια αγελάδων γαλακτοπαραγωγής τείνει να μειώσει τη λιποπεριεκτικότητα, προκαλώντας MFD (Shingfield & Griinari, 2007). Πιο συγκεκριμένα, το *trans-10, cis-12 C<sub>18:2</sub>* (CLA) μπορεί επίσης να δράσει ως αναστολέας της σύνθεσης του λίπους του γάλακτος και μια υψηλή ποσότητα ολικής συγκέντρωσης *trans-* ΛΟ στο γάλα μπορεί επίσης να συμβάλει στην MFD (Shingfield & Griinari, 2007).

## **8.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΥΓΡΟ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ**

Η πλούσια σε PUFA διατροφή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της βιοϋδρογόνωσης κάτι που οδηγεί σε MFD. Αν και στη CS16 η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος μειώθηκε σημαντικά, η συγκέντρωση του C18:0 στο γάλα αυξήθηκε, επομένως μπορούμε να υποθέσουμε ότι η βιοϋδρογόνωση στη M.K. δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Ωστόσο, στη CS16, το C18:0 μειώθηκε αριθμητικά ενώ το VA αυξήθηκε ελαφρώς στο Y.M.K., υποδεικνύοντας σύνδεση μεταξύ μιας μικρής αναστολής της βιοϋδρογόνωσης της M.K. και του MFD. Η αύξηση της συγκέντρωσης του C18:3 n-3 στο Y.M.K. των προβατινών των ομάδων CS11 και CS16, πιθανώς οφείλεται στην υψηλότερη συγκέντρωση αυτών των ΛΟ στα σιτηρέσια των συγκεκριμένων ομάδων σε σύγκριση με τα σιτηρέσια των ομάδων CON και CS6. Όπως χαρακτηριστικά ανέφεραν οι Loor *et al.* (2002), το μοτίβο των ισομερών C18:1 και C18:2 που σχηματίζονται κατά τη βιοϋδρογόνωση στα μηρυκαστικά, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το προφίλ των ακόρεστων λιπαρών οξέων στα σιτηρέσια. Πιο συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση ελαιοκράμβης στα σιτηρέσια των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής (35 g/kg ΞΟ) αύξησε τη συγκέντρωση των *trans-*



ισομερών του C18:1 σε σύγκριση με αγελάδες που στα σιτηρέσιά τους ενσωματώθηκε σόγια ή τόσο σόγια όσο και ελαιοκράμβη. Ωστόσο, η συγκέντρωση του *trans-10*, *cis-12* C18:2 δεν διέφερε σημαντικά, κάτι που επίσης παρατηρήθηκε στην εν λόγω διατριβή.

### **8.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ**

Τα σπέρματα της καμελίνας είναι πλουσιότερα σε PUFA (73 %) σε σύγκριση με ελαιούχα σπέρματα όπως ο λιναρόσπορος, ο ηλίανθος, η σόγια και η ελαιοκράμβη (Hurtaud & Peyraud, 2007). Πιο συγκεκριμένα, περιέχει κατά μέσο όρο κυρίως α-λινολενικό (C18:3 n-3) (~ 37 %), C18:2 n-6 (15,2 %), *cis-9* C18:1 (~ 15 %), C20:1 n-9 (15,5 %) και C22:1 n-9 (~ 3 %) (Zubr & Matthaus, 2002). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης, η ενσωμάτωση σπερμάτων, ελαίου, αλεύρου, πλακούντα και εξωθημένης καμελίνας, στη διατροφή των μηρυκαστικών μειώνουν τη συγκέντρωση σε SFA στο λίπος του γάλακτος (Mierlita *et al.*, 2011, Mierlita *et al.*, 2015, Mierlita *et al.*, 2018, Hurtaud & Peyraud, 2007, Bayat *et al.*, 2015). Έχει αναφερθεί ότι η ενσωμάτωση ελαιούχων σπερμάτων πλούσιων σε C18 UFA στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών, μειώνει τη συγκέντρωση σε SCFA και MCFA στο γάλα (Chilliard & Ferlay, 2004). Τα ελαιούχα σπέρματα είναι υπεύθυνα για δοσοεξαρτώμενες μειώσεις στη συγκέντρωση του C10:0 μέχρι το C16:0 (Shingfield *et al.*, 2013), και επίσης υπεύθυνα για την αυξημένη περιεκτικότητα των C18:0, *cis-9* C18:1 και ολικών *trans* C18:1, κάτι που επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, η μείωση των SFA υπέρ του C18:0 μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι τα LCFA μεταφέρονται κυρίως από το αίμα και ανταγωνίζονται την *de novo* λιπογένεση των SCFA και MCFA στον μαστικό αδένα (Chilliard & Ferlay, 2004). Αύξηση στη συγκέντρωση των C14:0, C15:0, C16:0 και C17:0 που βρέθηκαν στα δείγματα γάλακτος των προβατινών των ομάδων CS, σχετίζονται με τη συγκέντρωση αυτών των ΛΟ στο πλάσμα του αίματός τους.

Αυξήσεις στις συγκεντρώσεις των *cis-9* C18:1 και των ολικών *trans* C18:1 παρατηρήθηκαν επίσης μέσω της χορήγησης ελαιούχων σπερμάτων στη διατροφή των μηρυκαστικών (Shingfield *et al.*, 2013). Πράγματι, η ενσωμάτωση ελαιούχων σπερμάτων πλούσιων σε PUFA και ειδικά σε ALA στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών μπορεί να αυξήσει την συγκέντρωση των *trans* C18:1, λόγω της λιπόλυσης και της βιοϋδρογόνωσης των C18 PUFA στην Μ.Κ. (Chilliard & Ferlay, 2004). Επιπλέον, η αναφερόμενη αύξηση στη συγκέντρωση του *trans-11* C18:1 του γάλακτος,

διαπιστώθηκε επίσης σε προβατίνες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν σπέρματα και άλευρο καμελίνας (Mierlita *et al.*, 2011, Mierlita *et al.*, 2015, Mierlita *et al.*, 2018, Shingfield & Griinari, 2007). Ομοίως, σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, η χορήγηση σπερμάτων και αλεύρου καμελίνας οδήγησε σε αύξηση της συνολικής συγκέντρωσης σε MUFA και της συγκέντρωσης των ολικών *trans* C18:1 (Hurtaud & Peyraud, 2007, Bayat *et al.*, 2015). Ωστόσο, η αναφερόμενη αύξηση στην περιεκτικότητα του *trans-11* C18:1 στο πρόβειο γάλα οφείλεται πιθανώς στη δράση των μακράς αλυσίδας ω-3 PUFA, η οποία αναστέλλει το τελικό στάδιο της βιοϋδρογόνωσης (Dewanckele *et al.*, 2020).

Η διατροφή με ελαιούχα σπέρματα αντί με εκχυλισμένο έλαιο είναι ένας πιο αποτελεσματικός τρόπος για την ενίσχυση της συγκέντρωσης των PUFA στο λίπος του γάλακτος, λόγω του ότι το κέλυφος των σπερμάτων προστατεύει από τη λιπόλυση και τη βιοϋδρογόνωση στη Μ.Κ. (Givens & Kliem, 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ικανότητα ενίσχυσης του γάλακτος των μηρυκαστικών με ALA είναι περιορισμένη ακόμη και όταν ελαιούχα σπέρματα πλούσια σε ALA χορηγούνται στα μηρυκαστικά (Shingfield *et al.*, 2013). Ωστόσο, στην εν λόγω διατριβή το ALA αυξήθηκε γραμμικά και σημαντικά στο γάλα των διατροφικών επεμβάσεων με καμελίνα, υποδεικνύοντας μια αποτελεσματική μεταφορά μέσω των τριών επιπέδων ενσωμάτωσης. Παρόλα αυτά, η μεταφορά του ALA στο λίπος του γάλακτος δεν αντιστοιχεί στην προσλαμβανόμενη ποσότητά του μέσω της καμελίνας. Αυτό συμβαίνει γιατί το ALA εκτίθεται σε εκτεταμένη βιοϋδρογόνωση από τα βακτήρια της Μ.Κ. (Gonthier *et al.*, 2005). Κατά τη βιοϋδρογόνωση του ALA παράγεται το *trans-11* C18:2 (CLA) το οποίο είναι το κύριο ισομερές του CLA στο γάλα των μηρυκαστικών καθώς και το *trans-11* C18:1 που αποτελεί πρόδρομη ένωση σύνθεσης CLA μέσω της Δ-9 αφυδρογονάση στον μαστικό αδέν. Ως εκ τούτου, η σημαντική γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του *cis-9, trans-11* C18:2 (CLA) στο γάλα των προβατινών, συνδέεται με τη συγκέντρωση του *trans-11* C18:1. Σε προηγούμενες μελέτες, όπως και στην παρούσα διατριβή, η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας αύξησε την αναλογία ALA και CLA στο πρόβειο γάλα (Mierlita *et al.*, 2011, Mierlita *et al.*, 2015, Mierlita *et al.*, 2018, Shingfield & Griinari, 2007). Επιπλέον, σε προβατίνες που βρίσκονταν σε βοσκή και τους χορηγήθηκαν σπέρματα καμελίνας (80 g/ημέρα) οι συγκεντρώσεις των ALA και *cis-9, trans-11* C18:2 (CLA) στο γάλα, ενισχύθηκαν σημαντικά (Mierlita *et al.*, 2011). Ομοίως, σε προβατίνες στις οποίες χορηγήθηκε ενσίρωμα χόρτου ή αραβοσίτου με 70 g/kg ΞΟ σπερμάτων καμελίνας βρέθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των ALA και CLA στο γάλα (Mierlita *et al.*, 2015). Επιπλέον, ο συνδυασμός βοσκήσιμης ύλης και μείγματος ΣΖ που περιλάμβανε σπέρματα

καμελίνας (100 g/kg στο μείγμα ΣΖ), αύξησε τη συγκέντρωση των ALA, *cis-9, trans-11* C18:2 (CLA), DHA και EPA στο γάλα προβατινών (Mierlita *et al.*, 2018). Αντίθετα, οι Hurtaud και Peyraud (2007) ανέφεραν ότι η ενσωμάτωση καμελίνας στα σιτηρέσια αγελάδων γαλακτοπαραγωγής δεν επηρέασε σημαντικά τη συγκέντρωση του ALA, ενώ αύξησε αυτή του CLA. Η χορήγηση 60 g ελαίου καμελίνας/kg ΞΟ σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, αύξησε τη συγκέντρωση των C18:2, ALA, CLA, ολικών C20:0 και C22:0, PUFA και ολικών *trans*- ΛΟ (Bayat *et al.*, 2015).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ω-3 PUFA δεν μπορούν να συντεθούν αποτελεσματικά από τους ιστούς των μηρυκαστικών. Η χρησιμοποίησή τους στη διατροφή των ανθρώπων συνδέθηκε με τη μείωση του κινδύνου καρδιακών προσβολών, στεφανιαίων παθήσεων, δερματικών παθήσεων και αρθρίτιδας. Μπορούν επίσης να μειώσουν τη συστηματική φλεγμονή και να βελτιώσουν την αντίσταση στην ινσουλίνη (Shahidi & Ambigaipalan, 2018). Επίσης, το *cis-9, trans-11* C18:2 (CLA), το οποίο είναι επίσης γνωστό ως ρουμενικό οξύ, έχει αντικαρκινογόνο και αντιαθηρογόνο δραστηριότητα (Virsangbhai *et al.*, 2020). Ως εκ τούτου, οι αναφερόμενες αυξημένες συγκεντρώσεις των προαναφερθέντων ΛΟ στις τρεις διατροφικές επεμβάσεις που ενσωματώθηκαν σπέρματα καμελίνας στα μείγματα ΣΖ, θεωρείται σημείο αναφοράς για την ανάπτυξη ενός προϊόντος υψηλής θρεπτικής αξίας σε σεβασμό προς τις ανάγκες των καταναλωτών.

Ευνοϊκό αποτέλεσμα μπορεί να θεωρηθεί επίσης το γεγονός ότι ο AI και ο λόγος ω-6/ω-3, μειώθηκαν γραμμικά στις τρεις ομάδες CS και σε σύγκριση με την ομάδα CON, καθώς η υψηλότερη αναλογία AI και ω-6/ω-3 θεωρούνται επιβλαβή για την υγεία (Bo *et al.*, 2018). Επιπρόσθετα, οι αναφερόμενες σημαντικές τροποποιήσεις στους δείκτες TI και HPI ήταν υπέρ της βελτίωσης της ποιότητας του γάλακτος από άποψη ανθρώπινης υγείας.

Σε αυτή τη μελέτη, η συσχέτιση μεταξύ των βασικών ΛΟ επιβεβαιώνει περαιτέρω την προαναφερθείσα υπόθεση σχετικά με τον ανταγωνισμό των ALA και SFA. Πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα του γάλακτος σε ALA συσχετίστηκε αρνητικά με τη περιεκτικότητα σε C16:0, SFA και MCFA. Αντίθετα, η βιοϋδρογόνωση του ALA σε *trans* C18:1 ισομερή επιβεβαιώθηκε επίσης από τη θετική του συσχέτιση με τα *trans* C18:1, *cis-9* C18:1 και CLA.

#### 8.4. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν δεν υπάρχει ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Επομένως, δεδομένου ότι τα PUFA αποτελούν περισσότερο από το ήμισυ των συνολικών ΛΟ που απαντώνται στην καμελίνα, μια κοινή πεποίθηση θα υποδήλωνε ότι το έλαιο θα παρουσίαζε χαμηλή οξειδωτική σταθερότητα (Eidhin *et al.*, 2003). Τα υψηλά επίπεδα των ω-3 μακράς αλυσίδας PUFA σε ένα σιτηρέσιο θα μπορούσαν να προκαλέσουν διαταραχή της οξειδωτικής ισορροπίας όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Ισορροπημένο ποσοστό ενσωμάτωσης δύναται να ενεργοποιεί αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε πολλά κύτταρα (Giordano & Visioli, 2014) και έτσι να περιορίσει το οξειδωτικό στρες (Zanatta *et al.*, 2014). Το έλαιο καμελίνας παρουσιάζει ισχυρή οξειδωτική σταθερότητα σε σύγκριση με το λινέλαιο, το οποίο είναι επίσης πλούσιο σε ακόρεστα ΛΟ, αλλά είναι λιγότερο σταθερό σε σύγκριση με το κραμβέλαιο, το έλαιο σησάμου και το ηλιέλαιο (Eidhin *et al.*, 2003). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το έλαιο καμελίνας είναι αξιοσημείωτη πηγή γ-τοκοφερόλης (Zubr & Matthaus, 2002), ολικών φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών (Russo & Reggiani, 2018).

Είναι γεγονός ότι δεν υπάρχουν σχετικές μελέτες που να διερευνούν το βέλτιστο επίπεδο συμμετοχής των σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια προβατινών, το οποίο δεν θα θέτει σε κίνδυνο την οξειδωτική κατάσταση των προβατινών και κατά συνέπεια την απόδοσή τους. Στη παρούσα διατριβή, το υψηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης (16 %) αύξησε τη δραστηριότητα της SOD, η οποία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των ROS (Wang *et al.*, 2018). Αυτό μπορεί να είναι ένας πρόδρομος μιας απόκρισης στην ανοχή του οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της δραστηριότητας της SOD μπορεί να είναι μια απάντηση προς την εξουδετέρωση μιας αυξημένης συγκέντρωσης του ανιόντος του υπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ). Η χορήγηση ω-3 PUFA στην ανθρώπινη διατροφή είναι υπέρ της μορφοποίησης του  $O_2^{\bullet-}$  (Duričić *et al.*, 2015), μέσω των αναπνευστικών μιτοχονδρίων. Το παλμιτικό οξύ στη διατροφή αρουραίων είχε ως αποτέλεσμα παρόμοια δραστηριότητα (Gao *et al.*, 2014). Εκτός αυτού, η οξειδάση NADPH προκαλεί επίσης τη συγκέντρωση του  $O_2^{\bullet-}$  (Katsuyama, 2010). Αυξημένη δραστηριότητας της SOD αναφέρθηκε επίσης στο πλάσμα αίματος αιγών που διατρέφονταν με σιτηρέσιο υψηλής συγκέντρωσης PUFA (Mavrommatis *et al.*, 2021a). Επιπλέον, η ενσωμάτωση σπερμάτων σησάμου στα σιτηρέσια αιγών (Mitsiropoulou *et al.*, 2021a), αύξησε επίσης τη δραστηριότητα της

SOD. Η αυξημένη δραστηριότητα της SOD στο πλάσμα του αίματος και τα αυξημένα επίπεδα  $O_2^{\bullet-}$ , καταλύουν αποτελεσματικά τη μετατροπή του τελευταίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), μια λιγότερο ασταθή ρίζα και κατά συνέπεια οδηγεί σε αυξημένο επίπεδο  $H_2O_2$  και των παραπροϊόντων του.

Σε συμφωνία με τα προαναφερθέντα, το  $H_2O_2$  αποτοξινώνεται από την CAT ή/και από την GSH-Px. Πιο συγκεκριμένα, η CAT είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση των υπεροξειδίων και τη μετατροπή τους σε  $O_2$  (Yu, 1994). Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα της CAT βρέθηκε αυξημένη στις CS11 και CS16 σε σύγκριση με την CON, πιθανώς λόγω των αυξημένων επιπέδων υποστρώματος. Ωστόσο, η δραστηριότητα της CAT από μόνη της, πιθανώς δεν ήταν σε θέση να αποτοξινώσει το  $H_2O_2$  με επιτυχία, καθώς η δραστηριότητα της GSH-Px δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των πειραματικών ομάδων. Αυξημένη δραστηριότητα της CAT αναφέρθηκε επίσης σε αίγες που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν σπέρματα σιτάμου (Mitsioroulou *et al.*, 2021a). Λόγω της δράσης του  $H_2O_2$ , μπορεί να προκύψει υψηλότερη παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου ( $OH^-$ ), λόγω της αντίδρασης Fenton. Αυτό υποστηρίζεται στην παρούσα διατριβή, μέσω της υψηλότερης αναφερόμενης συγκέντρωσης της MDA στο πλάσμα των προβατινών των ομάδων CS11 και CS16. Ωστόσο, το χαμηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης των σπερμάτων καμελίνας (6 %), είχε ως αποτέλεσμα το χαμηλότερο παρατηρούμενο επίπεδο της MDA, σε σύγκριση με τις CS11 και CS16. Αυτό υποδηλώνει απουσία οξειδωτικού stress στην CS6 ομάδα. Έτσι, τα αυξημένα επίπεδα PUFA στα δύο υψηλότερα επίπεδα στα σιτηρέσια των προβατινών, μπορεί να συμβάλλουν σε αυτή την άνοδο της MDA. Συγκεκριμένα, η MDA είναι το πιο μελετημένο προϊόν υπεροξειδωσίας λιπιδίων (Nielsen *et al.*, 1997). Ωστόσο, τα αναφερόμενα επίπεδα της MDA ήταν εντός εύρους σε σύγκριση με μελέτες που διεξήχθησαν με προβατίνες γαλακτοπαραγωγής (Mavrommatis *et al.*, 2020b, Mavrommatis *et al.*, 2021g). Ομοίως, τα PC μελετήθηκαν ως βιοδείκτης οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών (Weber *et al.*, 2015). Το αναφερόμενο επίπεδο των PC στις πειραματικές ομάδες ακολούθησε την ίδια τάση με εκείνη της MDA, κάτι που υποστηρίζει περαιτέρω την υπόθεση οξειδωτικής απόκρισης στο υψηλότερο επίπεδο χορήγησης σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια των προβατινών. Στην πραγματικότητα, υψηλά επίπεδα PUFA στα σιτηρέσια αιγών οδήγησαν επίσης σε αυξημένα επίπεδα MDA και PC (Mavrommatis *et al.*, 2021a). Επομένως, το αυξημένο επίπεδο PC στην ομάδα CS16 μπορεί να σχετίζεται με την οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

Σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις σχετικά με την επίδραση των υψηλότερων επιπέδων συμμετοχής των σπερμάτων καμελίνας στην οξειδωτική κατάσταση (πλάσμα του αίματος) των προβατινών, η οξειδωτική σταθερότητα του γάλακτος ενισχύθηκε σημαντικά και δεν διακυβεύτηκε. Παρά τη σημαντική γραμμική αύξηση που αναφέρθηκε προηγουμένως σε PUFA στις ομάδες CS σε σύγκριση με την ομάδα CON, διαπιστώθηκε ισχυρή οξειδωτική σταθερότητα. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής, οι Mierlita *et al.* (2015) ανέφεραν επίσης ότι οι προβατίνες που διατρέφονται με ενσίρωμα χλωράς νομής και μείγμα ΣΖ με σπέρματα καμελίνας ενίσχυσαν την οξειδωτική σταθερότητα του γάλακτος, η οποία μετρήθηκε με την ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα Trolox. Σε αντίθεση, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ολιστικά η οξειδωτική σταθερότητα του γάλακτος κυρίως προσδιορίζοντας όχι μόνο την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αλλά και τη δραστηριότητα βασικών αντιοξειδωτικών ενζύμων που εμπλέκονται στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς καθώς και βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες.

Η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στα τρία επίπεδα ενσωμάτωσης, ενίσχυσε τις αντιοξειδωτικές ενζυμικές δραστηριότητες και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες δεν επηρεάστηκαν. Αυτή η συνδυασμένη αναφερόμενη αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων στο γάλα των προβατινών, παράλληλα με τη σημαντική αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του γάλακτος μπορεί να οδηγήσει σε ένα πιο σταθερό προϊόν με καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και εκτεταμένη διάρκεια ζωής (Tsiplakou *et al.*, 2017c). Σε προηγούμενη μελέτη, η χορήγηση σπερμάτων σησάμου ενίσχυσε επίσης την αντιοξειδωτική ικανότητα που μετρήθηκε μέσω των δοκιμών ABTS και FRAP του αίγιου γάλακτος (Mitsiropoulou *et al.*, 2021a). Επιπλέον, ενσωμάτωση PUFA στα σιτηρέσια προβατινών και αιγών αύξησε τη δραστηριότητα της CAT και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP (Tsiplakou *et al.*, 2017). Αντίθετα, μια έγχυση υψηλής δόσης λινολενικού ΛΟ σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, παρά το γεγονός ότι είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη περιεκτικότητα σε ω-3 PUFA στο γάλα, επηρέασε αρνητικά την οξειδωτική του σταθερότητα (Liu *et al.*, 2010), ενώ η χορήγηση ALA *in vitro* συνδέθηκε με αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών σε επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη σε σύγκριση με τη χορήγηση με λινολεϊκό οξύ (Meng *et al.*, 2013). Τέλος, το γεγονός ότι οι βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά, υποστηρίζει περαιτέρω την υπόθεση ότι ενισχύθηκε η οξειδωτική σταθερότητα του γάλακτος και ότι υπάρχει δυνατότητα ανάπτυξης ενός γαλακτοκομικού προϊόντος υψηλής θρεπτικής αξίας ικανού να καλύψει τις απαιτήσεις των καταναλωτών.

## 8.5. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ ΣΤΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ

Στα μονοκύτταρα των προβατινών της CS11 ομάδας, σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα (CON), το γονιδιακό δίκτυο MAPK ενεργοποιήθηκε μέσω της οδού TRAF3 που ρυθμίζεται από την οδό TRIF (Hacker *et al.*, 2006; Oganessian *et al.*, 2006). Τα γονίδια της οικογένειας MAPKs ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, της κυτταρικής ανάπτυξης, της μετανάστευσης, του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης (Cuadrado & Nebreda, 2010; Yue & Lopez, 2020) και έχουν τον ίδιο μεταμεταφραστικό μηχανισμό διέγερσης κινάσης, ο οποίος περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση τόσο της τυροσίνης όσο και της θρεονίνης, όπως έχει ήδη βρεθεί σε διάφορα κύτταρα θηλαστικών (Ferrell & Bhatt, 1997). Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η θρεονίνη επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των εξωκυτταρικών κινασών ρυθμιζόμενων μέσω σηματοδότησης (ERK), p38 και των N-τερματικών κινασών Jun (JNK) (MAPK cascade) σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα μυών *in vitro* (Ryu & Han, 2011). Επιπλέον, μια πρόσφατη ανασκόπηση υποδεικνύει τη θρεονίνη ως διατροφικό ρυθμιστή του εντερικού ανοσοποιητικού συστήματος σε χοίρους και πτηνά μέσω πολύπλοκης δικτύωσης σηματοδότησης συμπεριλαμβανομένου του MAPK (Tang *et al.*, 2021). Επιπλέον, ένα εναλλακτικό μοντέλο προτείνει ότι η ενδοκυττάρωση της ενεργοποιημένης MEK παρά των ενεργοποιημένων υποδοχέων των κινασών τυροσίνης είναι επίσης σημαντική για την ενεργοποίηση της οδού MAPK (Kranenburg *et al.*, 1999). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η MAPK (που εμπλέκεται στη ρύθμιση της οδού MAPK), είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε θρεονίνη, τυροσίνη και σερίνη στο μείγμα ΣΖ της CS11 μπορεί να εξηγούν εν μέρει την ενεργοποίηση της μεταβολικής οδού MAPK στα μονοκύτταρά τους. Πράγματι, η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου έκφρασης mRNA του γονιδίου *MAPK* στα μονοκύτταρα και της περιεκτικότητας σε θρεονίνη, υποδηλώνει τη στενή τους σχέση. Στο μονοπάτι σηματοδότησης MAPK, το *NFKB* είναι το επόμενο γονίδιο του γονιδιακού δικτύου, το οποίο επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων των κυτταροκινών (Qi *et al.*, 2014). Ωστόσο, σε αυτή τη διατριβή, η αυξημένη τάση στο επίπεδο έκφρασης mRNA του γονιδίου *NFKB* στα μονοκύτταρα των προβατινών της CS11 δεν προώθησε την έκφραση των φλεγμονωδών κυτταροκινών εκτός από αυτήν της *IL2* που έτεινε να μειώνεται. Ο ρόλος της *IL-2* στη φλεγμονώδη διαδικασία είναι πολύπλοκος και περιλαμβάνει προφλεγμονώδεις καθώς και ρυθμιστικές πτυχές, ενώ η απορρύθμιση έχει συσχετιστεί με φλεγμονή στη Μ.Κ. των αγελάδων

που διατρέφονταν με σιτηρέσιο υψηλής περιεκτικότητας σε σιτηρά (Zhang *et al.*, 2016) και διάφορες ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος στους ανθρώπους (Hanisch *et al.*, 1996; Lal & Bromberg 2008). Στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, η επαγωγή της IL-2 ρυθμίζεται από κυτταρικά σήματα, τα οποία διεγείρονται από τη β-υπομονάδα των υποδοχέων IL-2. Έχει αποδειχθεί ότι οι θέσεις φωσφορυλίωσης θρεονίνης, τυροσίνης και σερίνης έχουν ρυθμιστικό ρόλο επίσης στην ικανότητα της β-υπομονάδας του υποδοχέα IL-2, και συνεπώς στο επίπεδο έκφρασης mRNA της *IL2*, σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους *in vitro*, συμπεριλαμβανομένου πρωτογενών ανθρώπινων λεμφοκυττάρων (Ruiz-Medina *et al.*, 2015). Επιπλέον, η ανεπάρκεια θρεονίνης μείωσε περισσότερο την εντερική φλεγμονώδη απόκριση ιχθύων, τα οποία είχαν μολυνθεί με βακτήρια, ενισχύοντας την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL1B, IL6, IL8) μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης σηματοδότησης NF-κB (Habte *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το μείγμα ΣΖ των προβατινών της CS11 ομάδας είχε τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε θρεονίνη, τυροσίνη και σερίνη, επομένως χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να καθοριστεί ο ρόλος τους στο ανοσοποιητικό σύστημα των προβατινών καθώς και το βέλτιστο επίπεδο ένταξής τους στα σιτηρέσιά τους. Επιπλέον, η θετική συσχέτιση μεταξύ του σχετικού επιπέδου έκφρασης του γονιδίου *IL2* στα μονοκύτταρα και της περιεκτικότητας σε τυροσίνη, υποδεικνύει τον ρυθμιστικό ρόλο αυτού του αμινοξέος στην έκφραση του *IL2*.

Υπάρχει στενή αλληλεπίδραση μεταξύ των IRF5 και NF-κB. Όπως έχει αποδειχθεί στους ανθρώπους το IRF5 σχηματίζει ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα με το NF-κB RelA (Krausgruber *et al.*, 2010). Επιπλέον, το κιστρόμιο IRF:RelA εξηγείται καλύτερα από την παρουσία συναινετικού NF-κB όπως έχει αποδειχθεί χρησιμοποιώντας *in vivo* και *in vitro* ανάλυση σε μακροφάγα (Saliba *et al.*, 2014). Το IRF ρυθμίζει μεταγραφικά τα γονίδια που εξαρτώνται από την ιντερφερόνη τύπου I (IFN), ενώ ρυθμίζει επίσης την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και τον κυτταρικό θάνατο (Barnes *et al.*, 2001; Lazear *et al.*, 2013). Η φωσφορυλίωση σερίνης/θρεονίνης ρυθμίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα IRF5 (Chen *et al.*, 2008). Πράγματι, σε πολλά κυτταρικά μοντέλα, το παροδικά εκφρασμένο IRF5 φωσφορυλιώνεται από κινάσες σερίνης/θρεονίνης (Foreman *et al.*, 2012). Τα στοιχεία συνδέουν επίσης την έκφραση IRF5 με φωσφορυλίωση τυροσίνης (Hu & Barnes, 2009). Αναλυτικά, έχει αποδειχθεί ότι το ενεργοποιημένο IRF5 σχετίζεται με την έλλειψη φωσφορυλίωσης τυροσίνης, υποδηλώνοντας ότι αυτό πιθανώς σχετίζεται με την καταστολή της διενεργοποίησης του IRF5. Και σε αυτή τη περίπτωση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το μείγμα ΣΖ των προβατινών της CS11 είχε τη



χαμηλότερη περιεκτικότητα σε θρεονίνη, τυροσίνη και σερίνη, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει το αυξημένο επίπεδο έκφρασης mRNA του γονιδίου *IRF5* στα μονοκύτταρά τους. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από την τάση για αρνητική συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ της θρεονίνης και των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA του γονιδίου *IRF5*. Σε αρκετές περιπτώσεις, η ενεργοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης MAPK μπορεί να ρυθμιστεί μέσω του MyD88- εξαρτώμενου μονοπατιού (Akira *et al.*, 2006) όπως επιβεβαιώνεται από τις θετικές συσχετίσεις, που παρατηρούνται μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων *MYD88* και *MAPK* τόσο στα μονοκύτταρα όσο και στα ουδετερόφιλα. Ωστόσο, το επίπεδο έκφρασης mRNA του *MYD88* μειώθηκε στα ουδετερόφιλα των προβατινών της CS11. Οι θετικές συσχετίσεις μεταξύ του σχετικού επιπέδου έκφρασης του γονιδίου *MYD88* στα ουδετερόφιλα και της περιεκτικότητας σε σερίνη και τυροσίνη αντίστοιχα, δύνανται να καταδεικνύουν τη συμμετοχή αυτών των αμινοξέων στο επίπεδο έκφρασης mRNA του γονιδίου *MYD88*. Επιπλέον, η σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου έκφρασης mRNA των γονιδίων *MYD88* και *TLR4* στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα των προβατινών επιβεβαιώνει τη στενή τους σχέση. Τα TLR διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία αφού αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παθογόνων (Qian & Cao, 2013) αν και μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν μέσω υπερβαίνουσας παρουσίας λιπιδίων (Tynan *et al.*, 2014) και οξειδωτικού στρες (McCathy, 2013). Η ενεργοποίηση των TLRs επάγει την έκφραση του γονιδίου *IL1*. Έτσι, τα αποτελέσματα της διατριβής σχετικά με το επίπεδο έκφρασης mRNA των γονιδίων *TLR4*, *MYD88* και *IL1B* μπορεί να αποδεικνύουν την απουσία οποιουδήποτε μικροβιακού παθογόνου στις προβατίνες της CS11, χωρίς να αποκλείεται ο ρυθμιστικός ρόλος των αμινοξέων στην έμφυτη ανοσία τους.

Τα αμινοξέα δύνανται επίσης να ρυθμίσουν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου *STAT3*. Η περίσσεια αμινοξέων ενεργοποίησε τη μεταγραφική δραστηριότητα *STAT3* σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα *in vitro* (Kim *et al.*, 2009). Έχει αποδειχθεί ότι όχι μόνο η φωσφορυλίωση τυροσίνης (705) (Rebe *et al.*, 2013) αλλά και η σερίνη (Kim *et al.*, 2009), εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της *STAT3* (Rebe *et al.*, 2013).

Είναι γεγονός ότι όχι μόνο η συνολική πρόσληψη πρωτεΐνης αλλά και η διαθεσιμότητα αμινοξέων όπως η γλουταμίνη, το γλουταμικό, η αργινίνη και πιθανώς η μεθειονίνη, η κυστεΐνη και η θρεονίνη πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν. Αν και οι διατροφικές ανάγκες σε πρωτεΐνη για την υποστήριξη της ανοσίας είναι καθορισμένες (Ruth & Field, 2013), μόλις πρόσφατα άρχισε να

διερευνάται η πιθανή χρήση μεμονωμένων διατροφικών αμινοξέων για τη βελτιστοποίηση των ανοσοποιητικών λειτουργιών. Ωστόσο, οι απαιτήσεις σε αμινοξέα στη διατροφή των προβατινών δεν έχουν ακόμα πλήρως προσδιοριστεί.

Τα αμινοξέα μπορεί να επηρεάσουν την έμφυτη ανοσία των προβατινών απευθείας μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα ισοθειοκυανικά (ITC) που είναι τα κύρια μεταβολικά προϊόντα των γλυκοσινολατών της καμελίνας στη Μ.Κ. (Sun, 2020). Πράγματι, έχει βρεθεί ότι τα ITC αντιδρούν με λυσίνη και κυστεΐνη και σχηματίζουν ανοσογόνα σύμπλοκα στα κύτταρα του δέρματος *in vitro* (Karlsson *et al.*, 2016). Τα ITC μπορούν να δημιουργήσουν βιοσυζεύγματα στη λυσίνη και την κυστεΐνη (Hermanson, 2013) αλλά η αποτελεσματικότητα της σύνδεσης επηρεάζεται όχι μόνο από τα χαρακτηριστικά της ομάδας των ITC αλλά και από το pH του περιβάλλοντος μέσω της κατάστασης πρωτονίωσης των αμινοξέων-στόχων (Petri *et al.*, 2020). Επιπλέον, η δράση των ITC μπορεί να εξαρτάται τόσο από τον χρόνο όσο και από το μείγμα ΣΖ, όπως έχει ήδη αποδειχθεί σε *in vitro* ζωικά μοντέλα γαστρικού καρκίνου και ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα στομάχου (Rabben *et al.*, 2021). Επιπλέον, οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι το φαιναιθυλο-ισοθειοκυανικό (το οποίο ανήκει στην οικογένεια ITC) τροποποιεί την ενδοκυτταρική αναλογία γλουταμίνης/γλουταμινικού, παρέχοντας μια θετική σύνδεση μεταξύ των ITC και του μεταβολισμού των αμινοξέων. Θα πρέπει να τονιστεί εδώ ότι η περιεκτικότητα σε λυσίνη στο μείγματα ΣΖ των ομάδων CS11 και CS6 ήταν υψηλότερη από εκείνα των προβατινών με CS16 και CON.

Η πολλαπλή ανάλυση της φωσφορυλίωσης αποκάλυψε αλλαγές στην ενεργοποίηση της MAPK και αυξημένη φωσφορυλίωση του c-JNN σε κύτταρα πολλαπλού μυελώματος (MM.1S και OPM-1) *in vitro*, όταν υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ITC (Jakubikova *et al.*, 2011). Ωστόσο, μια παρατεταμένη αύξηση στη φωσφορυλίωση του c-JUN (στις 2, 6 και 12 ώρες) και του p38 (στις 2 και 6 ώρες) (αλληλουχία MAPK) βρέθηκε μόνο στα κύτταρα OPM-1 (πολλαπλό μύελωμα) που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ισοθειοκυανικό φαινυλαιθυλεστέρα *in vitro* (Jakubikova *et al.*, 2011). Όμως, δεν βρέθηκαν επιδράσεις στην κατάσταση φωσφορυλίωσης του NF-κB p65 και STAT3 στα κύτταρα πολλαπλού μυελώματος MM.15 που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ITC από τους ίδιους ερευνητές (Jakubikova *et al.*, 2011). Φαίνεται ότι κάθε τύπος κυττάρου (όπως τα μονοκύτταρα έναντι των ουδετερόφιλων στην εν λόγω διατριβή) αποκαλύπτει διαφορετικούς ρυθμιστικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς σε απόκριση της διαθεσιμότητας των αμινοξέων και ITC. Ο τύπος των ITC και η συνεργιστική τους δράση ενδέχεται να έχουν διαφορετικό αντίκτυπο

στην έμφυτη ανοσία. Πράγματι, ο ισοθειοκυανικός αλλυλεστέρας ή η σουλφοραφάνη όταν προστέθηκαν ξεχωριστά σε καρκινικά κύτταρα A549 του πνεύμονα μείωσαν το επίπεδο έκφρασης του φωσφορυλιωμένου STAT3 (p-STAT3) με δοσοεξαρτώμενο τρόπο ενώ δεν τροποποίησαν το επίπεδο έκφρασης mRNA του *STAT3* (Rakariyathan *et al.*, 2019 ). Αντίθετα, όταν τόσο ο ισοθειοκυανικός αλλυλεστέρας όσο και η σουλφοραφάνη προστέθηκαν ταυτόχρονα στα καρκινικά κύτταρα A459 των πνευμόνων *in vitro*, παρατηρήθηκε μείωση του φωσφορυλιωμένου STAT3 (Rakariyathan *et al.*, 2019). Επομένως, χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να διευκρινιστεί ο συνεργιστικός ρόλος των αμινοξέων και των ITC στην έμφυτη ανοσία καθώς και στα βέλτιστα επίπεδα ένταξής τους στη διατροφή των προβατινών.

Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα σχετικά με τα συγκεκριμένα πρωτεϊνικού επιπέδου αποτελέσματα των γονιδίων που μελετήθηκαν για να υποστηριχθούν αυτά τα προκαταρκτικά αποτελέσματα. Διαφορετικοί και πολύπλοκοι μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί στη μετάφραση από mRNA σε πρωτεΐνη, διαφορετικοί χρόνοι ημιζωής πρωτεΐνης και πειραματικοί περιορισμοί τόσο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αποκλίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA και πρωτεΐνης.

Μια πιθανή εξήγηση των προαναφερθέντων αποτελεσμάτων μπορεί να αποδοθεί στο προφίλ αμινοξέων των τεσσάρων μειγμάτων ΣΖ ή στην αλληλεπίδραση των αμινοξέων με τα ITC, και όχι μόνο με τα ITC. Πιο συγκεκριμένα, τα μείγματα ΣΖ των CS6 και CS11 είχαν παρόμοιο προφίλ αμινοξέων, ενώ το προφίλ αμινοξέων του μείγματος ΣΖ της ομάδας CS16 ήταν πιο κοντά σε αυτό του CON. Έτσι, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα του μεταγραφικού γονιδίου μεταξύ των προβατινών των CON και CS16 ομάδων. Ωστόσο, η λευκίνη ήταν το μόνο αμινοξύ που ήταν χαμηλότερο στο μείγμα ΣΖ της CS16 σε σύγκριση με της CON και μπορεί να δικαιολογήσει την αναφερόμενη ανοδική τάση στα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *IL1B* τόσο στα μονοκύτταρα όσο και στα ουδετερόφιλα για την CS16. Άξιο αναφοράς είναι και το γεγονός ότι η ανεπάρκεια λευκίνης έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA των *IL1B*, *IL8* και *TNFA* στα βράγχια των ιχθύων (Jiang *et al.*, 2017).

Επιπλέον, βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν σπέρματα καμελίνας. Αναλυτικά, στα μονοκύτταρα των προβατινών της CS11, οι σημαντικές αλλαγές στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *TRIF*, *TRAF3* και *MAPK* σε σύγκριση με τις προβατίνες των CS6 και CS16 μπορεί να υποστηρίξουν περαιτέρω την υπόθεση σχετικά με το χαμηλότερο περιεχόμενο σε θρεονίνη, τυροσίνη και σερίνη που αναφέρθηκαν στο μείγμα ΣΖ της

CS11 σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Οι αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ του σχετικού επιπέδου έκφρασης του γονιδίου *TRIF* στα μονοκύτταρα και της περιεκτικότητας σε θρεονίνη καθώς και μεταξύ του σχετικού επιπέδου έκφρασης του γονιδίου *TRAF3* στα ουδετερόφιλα και των περιεχομένων τυροσίνης και σερίνης των συμπυκνωμάτων αντίστοιχα, ενισχύουν την παραπάνω υπόθεση. Όσον αφορά τα ουδετερόφιλα, τα σχετικά επίπεδα μεταγραφών του *TLR4* καθώς και εκείνα των *IL1B*, *IL8* και *IL10* βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στις προβατίνες της ομάδας CS6 σε σύγκριση με την CS11. Συνολικά, αυξημένα επίπεδα αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAA, ισολευκίνη, λευκίνη και βαλίνη) αναφέρθηκαν ότι ενεργοποιούν την οδό σηματοδότησης NF-kB (Ye *et al.*, 2020). Ως εκ τούτου, τα αυξημένα σχετικά επίπεδα έκφρασης των ιντερλευκινών που αναφέρθηκαν στις προβατίνες της CS6 μπορεί να αποδοθούν στις υψηλότερες περιεκτικότητες σε ισολευκίνη, λευκίνη και βαλίνη που βρέθηκαν στο προφίλ αμινοξέων, όπως συζητήθηκε διεξοδικά. Πράγματι, βρέθηκε μια τάση για θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε ισολευκίνη και του επιπέδου έκφρασης mRNA του γονιδίου *IL10* και μεταξύ της περιεκτικότητας σε βαλίνη και του επιπέδου έκφρασης mRNA του γονιδίου *IL1B* στα μονοκύτταρα.

## **8.6. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ ΚΑΜΕΛΙΝΑΣ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ**

Η επίδραση της ενσωμάτωσης καμελίνας και των υποπροϊόντων της στο μικροβίωμα της Μ.Κ. μελετήθηκε στο παρελθόν κυρίως *in vitro* και κατέδειξε ποικίλα σημαντικά αποτελέσματα στα διαφορετικά είδη μηρυκαστικών. Ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί στα μικρά μηρυκαστικά και πιο συγκεκριμένα στις γαλακτοπαραγωγές προβατίνες. Επομένως, με την εν λόγω διατριβή διερευνάται για πρώτη φορά *in vivo*, η επίδραση της ενσωμάτωσης διαφορετικών επιπέδων σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια των γαλακτοπαραγωγών προβατινών επί του μικροβιακού πληθυσμού σε υγρό και στερεό περιεχόμενο της Μ.Κ. και συγκεκριμένα σε μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στις ζυμωτικές διεργασίες της Μ.Κ. αλλά και στη παραγωγή CH<sub>4</sub>, αξιοποιώντας NGS και qPCR τεχνικές. Στην παρούσα διατριβή, η ταχεία και ισχυρή αλληλούχιση μακράς ανάγνωσης από την Oxford Nanopore χρησιμοποιήθηκε με στόχο την ολιστική αξιολόγηση της επίδρασης της ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια προβατινών, παρέχοντας έναν προκαταρκτικό έλεγχο του βακτηριακού πληθυσμού της Μ.Κ. Αυτή η τεχνική (Oxford Nanopore Technologies) είναι η πιο χρησιμοποιούμενη τεχνική για αλληλούχιση μακράς ανάγνωσης, καθιστά την αλληλούχιση μικροβιακού γονιδιώματος πιο

προσιτή και περιλαμβάνει τη δυνατότητα αλληλούχισης ολόκληρων γονιδιωμάτων ή συγκεκριμένων γονιδιωματικών περιοχών, ενώ έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην ακρίβειά της (Sereika *et al.*, 2022). Μετά την αρχική καταγραφή βακτηριακών πληθυσμών, η σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών της Μ.Κ. αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας μια καλά αξιολογημένη πλατφόρμα RT-qPCR. Αν και δεν υπήρχαν αμφιλεγόμενα αποτελέσματα μεταξύ των αποτελεσμάτων NGS και RT-qPCR, παρατηρήθηκαν ορισμένες αριθμητικές αποκλίσεις. π.χ. στη σχετική αφθονία των *Prevotella* και *Butyrivibrio* στο Υ.Μ.Κ. Αυτές οι διακυμάνσεις μπορεί να οφείλονται τόσο σε διαφορετικές αναλυτικές ροές εργασίας (συνονθυλευμένη ομαδοποίηση δειγμάτων DNA σε NGS έναντι μεμονωμένων σε RT-qPCR) όσο και στην ανόμοια περιοχή ενίσχυσης εντός του 16S rRNA (αλληλουχία μακράς ανάγνωσης στο NGS έναντι βραχυπρόθεσμης στόχευσης αμπλικονίου σε RT-qPCR).

Στο παρελθόν, έχει μελετηθεί η χορήγηση ελαίου καμελίνας σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής όπου δεν σημειώθηκαν μεταβολές στα ζυμωτικά χαρακτηριστικά της Μ.Κ. ή αλλαγές στον συνολικό αριθμό των βακτηρίων, των μεθανοβακτηρίων, των πρωτόζωων και των μυκήτων (Bayat *et al.*, 2015). Αντίθετα, σε βουβάλια που ενσωματώθηκε έλαιο καμελίνας σε σιτηρέσια με διαφορετικό λόγο ΧΖ:ΣΖ (70:30, 50:50 και 30:70), μειώθηκαν σημαντικά τα ολικά βακτήρια, τα πρωτόζωα, τα μεθανοβακτήρια, ενώ αυξήθηκε η αναλογία των Firmicutes:Bacteroidetes (Ebeid *et al.*, 2020). Σε *in vitro* σύστημα συνεχούς καλλιέργειας διπλής ροής μελετήθηκε η επίδραση των σπερμάτων καμελίνας και διαφορετικά επίπεδα ολικών λιπαρών ουσιών στον βακτηριακό πληθυσμό της Μ.Κ. (Dai *et al.*, 2017). Μελετήθηκαν δύο διαφορετικά επίπεδα ολικών λιπαρών ουσιών (5 και 8 %, αντίστοιχα) και 2 διατροφικές επεμβάσεις διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (7,7 και 17,7 %, αντίστοιχα) με διαφορετικό περιεχόμενο ολικών λιπαρών ουσιών για κάθε επέμβαση (5 και 8 %, αντίστοιχα). Τα φύλα με τη μεγαλύτερη αφθονία για όλες τις επεμβάσεις ήταν τα *Bacteroidetes* και *Firmicutes*. Ο βακτηριακός πληθυσμός τόσο στο υγρό όσο και στο στερεό περιεχόμενο τροποποιήθηκε με την ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας αλλά όχι λόγω των διαφορετικών επιπέδων ολικών λιπαρών ουσιών. Η χορήγηση σπερμάτων καμελίνας μείωσε τη σχετική αφθονία των *Ruminococcus* spp., *Fibrobacter* spp. και *Butyrivibrio* spp. Το πιο άφθονο γένος των διαφορετικών επεμβάσεων, *Prevotella*, μειώθηκε από τα υψηλά διατροφικά επίπεδα ολικών λιπαρών ουσιών, ενώ τα *Megasphaera* και *Succinivibrio* αυξήθηκαν με τη χορήγηση σπερμάτων καμελίνας στο υγρό περιεχόμενο (Dai *et al.*, 2017).

Στην εν λόγω διατριβή, η σημαντική μείωση στη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος των προβατινών της ομάδας CS16 αιτιολογείται από τα αποτελέσματα του λόγου των Firmicutes:Bacteroidetes. Ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκαν και σε εργασία στο μεγαλύτερο ποσοστό ενσωμάτωσης μικροφύκους πλούσιου σε DHA (Mavrommatis *et al.*, 2021c) και από τους Jami *et al.* (2014), οι οποίοι απέδειξαν θετική συσχέτιση του λόγου Firmicutes:Bacteroidetes με τη λιποπεριεκτικότητα στο γάλα αγελάδων.

Στις διατροφικές επεμβάσεις με τα μεγαλύτερα ποσοστά ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (CS11 και CS16) της παρούσας μελέτης, η σχετική αφθονία των μεθανοβακτηρίων μειώθηκε αριθμητικά στο Υ.Μ.Κ. και σημαντικά στο στερεό, κάτι που μπορεί να θεωρηθεί ως βασικό θέμα για περαιτέρω μελέτη καθώς αποτελεί σημαντικό εύρημα το οποίο συνδέεται με το περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Το είδος *Methanosphaera stadtmanae* είναι υπεύθυνο για την παραγωγή CH<sub>4</sub> μέσω της αναγωγής της μεθανόλης. Τα μεθανοβακτήρια βρίσκονται κυρίως στη Μ.Κ. και στα κατώτερα τμήματα του λεπτού και παχέος εντέρου των μηρυκαστικών, όπου χρησιμοποιούν τα αναγωγικά ισοδύναμα που προέρχονται από τις ζυμωτικές διεργασίες της Μ.Κ. για την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα, του μυρμηκικού οξέος ή των μεθυλαμίνων σε CH<sub>4</sub>. Η έρευνα για τα μεθανοβακτήρια της Μ.Κ. έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον κατά την τελευταία δεκαετία γιατί η εκπομπή CH<sub>4</sub> από τα μηρυκαστικά συμβάλλει στην εκπομπή αερίων θερμοκηπίου και αντιπροσωπεύει απώλεια της διατροφικής ενέργειας του σιτηρεσίου (Patra *et al.*, 2017). Η διατροφή των μηρυκαστικών με ζωτροφές πλούσιες σε ολικές λιπαρές ουσίες μειώνει τις εκπομπές CH<sub>4</sub> (Soliva *et al.*, 2004 και Moate *et al.*, 2013). Σύμφωνα με μετα-ανάλυση, η ενσωμάτωση λιπαρών ουσιών μείωσε το CH<sub>4</sub> κατά 3,77 % στα βοοειδή και κατά 4,30 % στα πρόβατα ανά 1 % διατροφικού λίπους (Patra, 2014). Επίσης, η δράση των λιπαρών ουσιών στη μείωση της παραγωγής CH<sub>4</sub> (εκφράζεται ως g/kg εύπεπτης ΞΟ) είναι περισσότερο αποτελεσματική στα πρόβατα παρά στα βοοειδή, κάτι που αποδόθηκε στη συγκριτικά χαμηλότερη καταστολή της πέψης της ΞΟ μαζί με την αριθμητικά μεγαλύτερη μείωση της παραγωγής CH<sub>4</sub> (g/kg DM) στα πρόβατα (Patra, 2014). Μεταξύ των ΛΟ, τα C12:0, C18:3 και άλλα PUFA είναι αποτελεσματικά σε σχέση με τα κορεσμένα ΛΟ στη μείωση της παραγωγής CH<sub>4</sub> (Patra, 2013 και Patra & Yu, 2013). Η μεθανοκατασταλτική αποτελεσματικότητα των λιπών γενικά διαρκεί (Patra, 2013), για τουλάχιστον 72 ημέρες (Grainger *et al.*, 2010 και Jordan *et al.*, 2006) στα βοοειδή. Οι ολικές λιπαρές ουσίες που ενσωματώνονται έως και σε ποσοστό 6 % της ΞΟ του σιτηρεσίου μπορούν επίσης να βελτιώσουν την παραγωγή γάλακτος καθώς και να μειώσουν αισθητά τις εκπομπές CH<sub>4</sub> (15 %) στα βοοειδή, ωστόσο, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να

δίνεται καθώς υψηλότερες συγκεντρώσεις δύνανται να προκαλέσουν μειωμένη παραγωγική απόδοση λόγω μείωσης της πέψης και ζύμωσης των ζωοτροφών (Patra, 2013). Τα MCFA και τα PUFA μπορούν να μειώσουν την αφθονία και τις μεταβολικές δραστηριότητες των μεθανοβακτηρίων της Μ.Κ. κάτι που αποδείχθηκε και στη συγκεκριμένη διατριβή και να προκαλέσουν αλλαγή στη σύνθεση του είδους τους (Soliva *et al.*, 2004, Patra & Yu, 2013 και Lillis *et al.*, 2011). Τα PUFA μπορούν να αναστείλουν άμεσα τα πρωτόζωα και χρησιμεύουν ως δεξαμενή υδρογόνου μέσω της βιοϋδρογόνωσης (Beauchemin *et al.*, 2009). Τόσο τα MCFA όσο και τα PUFA φαίνεται να καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη, καταργώντας έτσι την επιλεκτική διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση και την ανάπτυξη των μεθανοβακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών (Zhou *et al.*, 2013). Η ανασταλτική δράση των λιπαρών ουσιών στη μεθανογένεση είναι πιο έντονη στα βοοειδή που τρέφονται με σιτηρέσια που βασίζονται σε μείγματα ΣΖ σε σύγκριση με σιτηρέσια που βασίζονται σε ΧΖ (Patra, 2013). Επειδή τα C12:0 και C14:0 είναι πιο ανασταλτικά στο *M. ruminantium* σε pH 5 παρά σε pH 7 (Zhou *et al.*, 2013), η αντιμεθανογόνος αποτελεσματικότητα των MCFA και PUFA πιθανώς αποδίδεται στο χαμηλότερο pH που παρατηρείται σε σιτηρέσια με υψηλό ποσοστό ΣΖ.

Επίσης, υπάρχει αλληλεξάρτηση μεταξύ των Αρχαίων/μεθανοβακτηρίων και των μυκήτων, καθώς τα Αρχαία φυσικώς προσκολλώνται σε αναερόβιους μύκητες αυξάνοντας τη δραστηριότητά τους (Cheng *et al.*, 2009). Οι αναερόβιοι μύκητες μπορεί να επηρεάσουν τον υπόλοιπο μικροβιακό πληθυσμό καθώς παράγουν H<sub>2</sub> κατά την αρχική αποδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων και αυτό το H<sub>2</sub> μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για τους μηχανισμούς αποδόμησης άλλων πληθυσμών (Matthews *et al.*, 2019). Οι μύκητες αποικίζουν τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών και αντιπροσωπεύουν περίπου το 8 - 12 % της συνολικής μικροβιακής βιομάζας στη Μ.Κ., αλλά αυτό το ποσοστό ποικίλλει ευρέως ανάλογα με τη διατροφή (Krause *et al.*, 2013). Η ενασχόληση τόσο με την υγρή όσο και με τη στερεά φάση του περιεχομένου της Μ.Κ. είναι σημαντική για την ανίχνευση μυκητιακών ειδών καθώς ενώ οι περισσότεροι μύκητες που σχετίζονται με τις κυτταρίνες και τις ημικυτταρίνες διατηρούνται στη στερεά φάση, η υγρή φάση μπορεί να περιέχει μικρότερα σωματίδια στα οποία μπορεί να έχουν προσκολληθεί μύκητες (Matthews *et al.*, 2019). Αν και έμφαση δίνεται κυρίως στα βακτήρια, οι μύκητες θεωρούνται οι καλύτεροι αποδομητές (Matthews *et al.*, 2019). Παράγουν υψηλά επίπεδα κυτταρινών και ημικυτταρινών και έχουν την ικανότητα να διασπών τη ξυλάνη λόγω της παραγωγής ξυλανασών (Akin & Borneman, 1990). Οι μύκητες φαίνεται να ξεκινούν τη

διαδικασία διάσπασης της τροφής, υποδεικνύοντας ότι οι αναερόβιοι μύκητες μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματικότητα της αξιοποίησης των ζωοτροφών, την ανάπτυξη και την παραγωγικότητά των μηρυκαστικών που τρέφονται με βοσκή (Kittelmann *et al.*, 2012). Οι αναερόβιοι μύκητες πιστεύεται ότι έχουν εξελιχθεί μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων από βακτήρια και είναι οι μόνοι γνωστοί μύκητες που διατηρούν κυτταροσώματα, τα οποία είναι πολυενζυμικά σύμπλοκα που σχετίζονται με το κυτταρικό τοίχωμα (Akin & Borneman, 1990). Διασπώντας τους υδατάνθρακες, οι μύκητες παράγουν μεταβολίτες που χρησιμοποιούνται για διατροφικούς σκοπούς από τον ξενιστή (Kittelmann *et al.*, 2012). Έχουν πολλά χαρακτηριστικά που τους καθιστούν μοναδικούς σε σύγκριση με τους μύκητες που βρίσκονται εκτός της Μ.Κ., συμπεριλαμβανομένων των πολυμαστιγωτών ζωοσπορίων (ο λόγος για τον οποίο οι μύκητες της Μ.Κ. θεωρούνταν λανθασμένα πρωτόζωα), των υδρογονοσώματιων, των κυτταροσωμάτων και ενός ευρέως ενζυματικού φάσματος (Fliegerová *et al.*, 2010). Στην εν λόγω διατριβή, η σχετική αφθονία των μυκήτων μειώθηκε σημαντικά στη στερεά αλλά όχι στην υγρή φάση των δειγμάτων της Μ.Κ. της CS16. Οι Maia *et al.* (2007) ανέφεραν ότι τα PUFA έχουν επίσης τοξικά αποτελέσματα έναντι των αναερόβιων μυκήτων της Μ.Κ. *in vitro*, επομένως η μείωσή τους εν μέρει θα μπορούσε να δικαιολογηθεί. Η ασυνέπεια μεταξύ της υγρής και στερεάς φάσης της Μ.Κ. θα μπορούσε να αποδοθεί στην πηγή των PUFA στη μελέτη μας (σπέρματα). Πιο συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση ελαιούχων σπερμάτων πλούσιων σε PUFA μπορεί να σχετίζεται με βραδύτερη απελευθέρωση των PUFA μετά από δράση κυτταρινολυτικών ειδών στο κυτταρικό τοίχωμα των σπερμάτων. Δεδομένου ότι η κυτταρινολυτική δραστηριότητα λαμβάνει χώρα κυρίως στο κλάσμα των σωματιδίων της πεπτής τροφής της Μ.Κ., τα απελευθερωμένα PUFA μπορεί να επηρεάσουν σοβαρά τα είδη μυκήτων που επίσης προσκολλώνται στα σωματίδια τροφής.

Επιπλέον, εντός της Μ.Κ., τα πρωτόζωα σχηματίζουν δύο VFAs: το βουτυρικό και το οξικό, των οποίων η σύνθεση παράγει 2 και 4 M H<sub>2</sub> αντίστοιχα, ανά M ζυμωμένης γλυκόζης (Belanche *et al.*, 2014). Περίπου το 50 % αυτού του H<sub>2</sub> μετατρέπεται σε CH<sub>4</sub> μέσω των μεθανοβακτηρίων που βρίσκονται είτε στο εσωτερικό είτε στην επιφάνεια των πρωτόζωων (Guyader *et al.*, 2014, Belanche *et al.*, 2014, Newbold *et al.*, 2015). Η σχετική αφθονία των πρωτόζωων του πειραματισμού με ενσωμάτωση καμελίνας στα μείγματα των ΣΖ της εν λόγω διατριβής, αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα με το μικρότερο ποσοστό ενσωμάτωσης τόσο στο Υ.Μ.Κ. όσο και στο στερεό περιεχόμενο. Κατά συνέπεια αυξημένη βρέθηκε και η σχετική αφθονία του *Entodinium* στην ίδια ομάδα. Το *Entodinium* είναι υπεύθυνο για μεγάλο μέρος της βακτηριακής



πρωτεΐνης. Αντίθετα, έχει αποδειχθεί ότι υψηλή περιεκτικότητα ολικών λιπαρών ουσιών ίσως αποτελεί μία στρατηγική για την εξουδετέρωση των πρωτόζωων στη Μ.Κ. (Williams, 1989). Μέχρι στιγμής δεν έχει αναπτυχθεί καμία μέθοδος για τον έλεγχο των πρωτόζωων στη Μ.Κ. που να είναι ασφαλής και πρακτικά εφαρμόσιμη, ωστόσο έχει περιγράψει μια σειρά φυτικών εκχυλισμάτων ικανών να ελέγχει αν όχι να εξαλείφει πλήρως τα πρωτόζωα της Μ.Κ. (Newbold *et al.*, 2015). Οι τρέχουσες ανησυχίες σχετικά με τον ρόλο των παραγωγικών ζώων σε παγκόσμια κλίμακα σχετικά με της εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου οδήγησαν τους ερευνητές να αναζητήσουν στρατηγικές για τον χειρισμό των πρωτόζωων της Μ.Κ. για τη μείωση της παραγωγής CH<sub>4</sub>. Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης των πρωτόζωων και των εκπομπών CH<sub>4</sub> (Guyader *et al.*, 2014) και έχει υπολογιστεί ότι μεταξύ 9 και 37 % της παραγωγής CH<sub>4</sub> από τα μηρυκαστικά μπορεί να αποδοθεί στα μεθανοβακτήρια που σχετίζονται με τα πρωτόζωα της Μ.Κ. (Finlay *et al.*, 1994, Newbold *et al.*, 1995, Machmuller *et al.*, 2003). Οι περισσότερες προσεγγίσεις για την εξουδετέρωση των πρωτόζωων σπάνια καταλήγουν στην ολική απομάκρυνση των πρωτόζωων από τη Μ.Κ., με την αποτελεσματικότητά τους να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση του σιτηρεσίου (Hegarty, 1999). Οι στρατηγικές που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μερική ή πλήρη εξουδετέρωσή τους περιλαμβάνουν: χημικές ουσίες που είναι τοξικές για τα πρωτόζωα (θειικός χαλκός, σουλφοηλεκτρικό διοκτυλικό νάτριο, αιθοξυλική αλκοόλη ή αλκανικά άλατα, υπεροξείδιο του ασβεστίου), ιονοφόρα, λιπαρές ουσίες και σαπωνίνες (Williams & Coleman, 1992, Jouany, 1996, Hook *et al.*, 2010). Οι Guyader *et al.* (2014) απέδειξαν μέσω μετα-ανάλυσης ταυτόχρονη μείωση του αριθμού των πρωτόζωων και των εκπομπών CH<sub>4</sub> στο 31 % των 70 μελετών που χρησιμοποιούν διαφορετικές στρατηγικές μείωσης του CH<sub>4</sub>. Οι περισσότερες από τις μελέτες χρησιμοποίησαν λιπαρές ουσίες ως στρατηγική έλεγχου πρωτόζωων/μείωσης CH<sub>4</sub>. Οι συγγραφείς ανέφεραν επίσης ότι η αντιπρωτοζωική δράση των λιπαρών ουσιών εξαρτάται από τη σύνθεση των Λ.Ο. με τα MCFA να είναι πιο αποτελεσματικά από τα PUFA στον έλεγχο του αριθμού των πρωτόζωων. Συμπληρώματα πλούσια σε PUFA όπως το λινολεϊκό οξύ (C<sub>18:2</sub>, σόγια, ηλιάνθος κ.α.) και το λινολενικό οξύ (C<sub>18:3 n-3</sub>, καμελίνα κ.α.) έχει αποδειχθεί ότι έχουν αρνητική επίδραση στην παραγωγή CH<sub>4</sub> (4,1 και 4,8 % μείωση ανά εκατοστιαία μονάδα ενσωμάτωσης λιπαρών ουσιών, αντίστοιχα (Martin *et al.*, 2010). Η αντιμεθανογόνος δράση των PUFA έχει συσχετιστεί με την τοξική τους δράση στα κυτταρινολυτικά βακτήρια (Nagaraja *et al.*, 1997) και στα πρωτόζωα (Doreau & Ferlay, 1995). Αν και αρχικά προτάθηκε ότι η βιοϋδρογόνωση των PUFA στη Μ.Κ. θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μια εναλλακτική δεξαμενής H<sub>2</sub> στη

μεθανογένεση (Lennarz, 1966), τώρα πιστεύεται ότι η σημασία της βιοϋδρογόνωσης για τη συνολική δεξαμενή  $H_2$  είναι μικρή (Nagaraja *et al.*, 1997). Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει μειωμένη μεθανογένεση στα μηρυκαστικά, κατά τη λήψη συμπληρωμάτων  $C_{12:0}$  και  $C_{14:0}$  Λ.Ο., είτε σε καθαρές μορφές είτε σε προϊόντα πλούσια σε αυτά τα Λ.Ο. (έλαιο καρύδας) σε *in vitro* (Dohme *et al.*, 2001, Soliva *et al.*, 2004) ή σε *in vivo* συνθήκες (Machmuller *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2006). Οι Martin *et al.* (2010) ανέφεραν ότι τα MCFA, που παρέχονται κυρίως από το έλαιο καρύδας, οδήγησαν σε μείωση του  $CH_4$  κατά 7,3 % ανά εκατοστιαία μονάδα ενσωμάτωσης λιπαρών ουσιών. Ωστόσο, το φαινόμενο καταστολής  $CH_4$  που παρατηρήθηκε δεν σχετιζόταν πάντα με μια μείωση της συγκέντρωσης των πρωτόζωων (Machmuller *et al.*, 2003) που μπορεί να οφείλεται σε άμεση επίδραση των MCFA στα μεθανοβακτήρια (Dohme *et al.*, 1999; Panyakaew *et al.*, 2013). Μια πρόσφατη μελέτη (Faciola & Broderick, 2014), διαπίστωσε ότι τόσο το έλαιο καρύδας όσο και το  $C_{12:0}$  μείωσαν τον αριθμό των πρωτόζωων κατά 40 %, αλλά ενώ το  $C_{12:0}$  άλλαξε την πεπτικότητα των κυτταρινών το έλαιο καρύδας δεν το έκανε. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί μειώσεις στην παραγωγή  $CH_4$  και ταυτόχρονη μείωση της πρόσληψης ξηράς ουσίας όταν το έλαιο καρύδας και το  $C_{12:0}$  χρησιμοποιήθηκαν ως ανασταλτικοί παράγοντες (Hristov *et al.*, 2013), γεγονός που δυνητικά θα περιορίζει την πρακτική χρήση τους σε συνθήκες σταβλισμού. Είναι σαφές ότι χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να διερευνηθεί ο τρόπος χρήσης ελαίων και Λ.Ο. για τον έλεγχο των πρωτόζωων στη Μ.Κ. Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει όντως ισορροπία στον πληθυσμό των πρωτόζωων και των μεθανοβακτηρίων της Μ.Κ. στις διατροφικές επεμβάσεις, που αποδεικνύει ότι στο ελάχιστο ποσοστό ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας αυξήθηκαν σημαντικά κάτι που όμως δεν παρουσιάστηκε στα μεγαλύτερα ποσοστά ενσωμάτωσης.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η διάσπαση της κυτταρίνης στα μηρυκαστικά οφείλεται κυρίως στη βακτηριακή δραστηριότητα, ιδιαίτερα στη δραστηριότητα τριών κυρίαρχων ειδών: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* και *Ruminococcus flavefaciens* (Forsberg *et al.*, 1997). Πιο συγκεκριμένα, τα *Fibrobacter succinogenes* και *Ruminococcus albus* είναι τα πιο σημαντικά κυτταρινολυτικά είδη στη Μ.Κ. και σε σύγκριση με τα υπόλοιπα κυτταρινολυτικά είδη είναι αυτά που διασπούν τις κυτταρίνες ταχύτερα και σε μεγαλύτερο βαθμό (Kobayasi *et al.*, 2008, Abuelfatah *et al.*, 2016). Ωστόσο, λόγω τοξικότητας των PUFA η σχετική αφθονία βακτηριακών ειδών δύναται να μειωθεί (Maia *et al.*, 2007, 2010, 2016). Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση ελαιούχων σπερμάτων, λόγω της συγκέντρωσής τους σε PUFA, έχει αποδειχθεί ότι μειώνει βακτηριακά είδη με κυτταρινολυτική δράση (Abuelfatah *et al.*, 2016, Dai *et al.*, 2017). Στην εν

λόγω διατριβή, η σχετική αφθονία του είδους *Ruminococcus flavefaciens* μειώθηκε σημαντικά ενώ για του είδους *Fibrobacter succinogenes* βρέθηκε τάση προς μείωση, στο στερεό περιεχόμενο της Μ.Κ. των προβατινών των ομάδων με τα δύο μεγαλύτερα ποσοστά ενσωμάτωσης (CS11 και CS16) σε σύγκριση με τις ομάδες CON και CS6, κάτι που συμφωνεί και με την εργασία των Dai *et al.* (2017), όπου βρέθηκε μείωση στην αφθονία των *Ruminococcus* spp., *Fibrobacter* spp. και *Butyriviprio* spp. *in vitro*. Όμοια, η ενσωμάτωση λιναρόσπορου στα σιτηρέσια των αιγών σε ποσοστά 10 και 20 % μείωσε σημαντικά τους πληθυσμούς των *Fibrobacter succinogenes* και *Ruminococcus flavefaciens* αλλά όχι του *Ruminococcus albus* (Abuelfatah *et al.*, 2016). Αντίθετα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη σχετική αφθονία του *Fibrobacter succinogenes* στο Υ.Μ.Κ. της ομάδας με το μικρότερο ποσοστό ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας στα μείγματα ΣΖ (CS6). Επιπλέον, στο Υ.Μ.Κ. αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, η χορήγηση ελαιούχων σπερμάτων πλούσιων σε λινελαϊκό και ALA προκάλεσε αύξηση των *Ruminococcus albus* και *Ruminococcus flavefaciens* (Ivan *et al.*, 2013). Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι τα αυτή η τροποποίηση σε αυτά τα κυτταρολυτικά βακτήρια ήταν εις βάρος άλλων βακτηριακών πληθυσμών (Ivan *et al.*, 2013).

Ωστόσο, όχι μόνο αυτά τα κυτταρολυτικά είδη, αλλά και μη κυτταρολυτικά είδη είναι σημαντικά για την αποδόμηση των κυτταρινών στη Μ.Κ., επειδή τα μη κυτταρολυτικά βακτήρια μπορούν να ενεργοποιήσουν τα κυτταρολυτικά βακτήρια μέσω μιας αλληλεπίδρασης που ονομάζεται «διασταυρούμενη διατροφή» (Wolin *et al.*, 1997). Τα μη κυτταρολυτικά *Treponema bryantii* (Kudo *et al.*, 1987) και *Prevotella ruminicola* (Fondevila & Dehority, 1996) συνεργάζονται με κυτταρολυτικά βακτήρια για τη βελτίωση της πέψης των κυτταρινών. Η μεταφορά H<sub>2</sub> μεταξύ των ειδών και η απομάκρυνση ή/και η ανταλλαγή μεταβολιτών είναι παράγοντες που θεωρείται ότι συμβάλλουν σε μια τέτοια συνέργεια (Wolin *et al.*, 1997). Το *Selenomonas ruminantium* είναι ένα άλλο μη κυτταρολυτικό βακτηριακό είδος που μπορεί να αλληλοεπιδράσει με κυτταρολυτικά βακτήρια, επειδή αυτό το είδος ανιχνεύεται με υψηλή συχνότητα ως κύριο μέλος του βακτηριακού πληθυσμού που προσκολλάται στις κυτταρίνες (Koike *et al.*, 2003). Πράγματι, βελτιώνει την πέψη των κυτταρινών όταν συγκαλλιεργείται με το *Ruminococcus flavefaciens* με τη μετατροπή του ηλεκτρικού οξέος, ενός μεταβολίτη του *Ruminococcus flavefaciens*, σε προπιονικό (Sawanon & Kobayashi, 2006). Μια παρόμοια σχέση εικάστηκε για τον συνδυασμό των *Selenomonas ruminantium* και *Fibrobacter succinogenes* (Sawanon *et al.*, 2011, Scheifinger & Wolin, 1973), και διαπιστώθηκε ότι αυτός ο συνδυασμός βακτηρίων είχε ως αποτέλεσμα μια συνεργιστική αύξηση στην παραγωγή προπιονικού

(Scheifinger & Wolin, 1973). Η αξιολόγηση αυτής της συνέργειας είναι απαραίτητη για τη μεγιστοποίηση της πέψης των κυτταρινών της Μ.Κ. επειδή το *Fibrobacter succinogenes*, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, θεωρείται το πιο σημαντικό κυτταρινολυτικό είδος προς αυτήν την κατεύθυνση (Kobayashi *et al.*, 2008). Αξιοσημείωτα, η ενσωμάτωση καμελίνας στα δύο μεγαλύτερα ποσοστά ενσωμάτωσης στα μείγματα ΣΖ (CS11 και CS16) οδήγησε σε σημαντική αύξηση στη σχετική αφθονία του *Selenomonas ruminantium* κάτι που συμφωνεί με *in vitro* μελέτη συστήματος συνεχούς καλλιέργειας διπλής ροής που αξιολόγησε δύο διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (Dai *et al.*, 2017). Σαφέστατα, τα ανωτέρω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια των προβατινών προκαλεί ισορροπία στον πληθυσμό των βακτηρίων που εμπλέκονται στην αποδόμηση και πέψη των κυτταρινών.

Πέραν των βακτηρίων που συνδέονται με την αποδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων, υπάρχουν βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση μη δομικών πολυσακχαριτών ή αλλιώς του αμύλου (αμυλολυτικά). Από αυτά τα σπουδαιότερα είναι τα: *Ruminobacter amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* και *Streptococcus bovis*. Τέλος, υπάρχουν βακτηριακά είδη υπεύθυνα και για τη διάσπαση των πρωτεϊνών (πρωτεολυτικά). Τα ισχυρότερα είναι τα: *Prevotella sp.*, *Ruminobacter amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis* και *Megasphaera elsdenii*. Η ενσωμάτωση καμελίνας στα μείγματα ΣΖ προβατινών, δεν επηρέασε σημαντικά τη σχετική αφθονία των ειδών του γένους *Prevotella*, ωστόσο, αυτή του είδους *Ruminobacter amylophilus* αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα CS11 τόσο στο Υ.Μ.Κ. όσο και στο στερεό κάτι που επιβεβαιώθηκε και μέσω της NGS ανάλυσης, ενώ του *Selenomonas ruminantium* στις ομάδες CS11 και CS16 στο στερεό περιεχόμενο, αντίστοιχα. Η σχετική αφθονία του είδους *Butyrivibrio fibrisolvens*, υπεύθυνο για τη βιοϋδρογόνωση και εμπλεκόμενο στα αρχικά στάδια της στη Μ.Κ. κατά τα οποία τα PUFA υδρογονώνονται σε *trans-11* C18:1, μειώθηκε στο στερεό περιεχόμενο των προβατινών της CS16 κάτι που όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μπορεί να οφείλεται στην τοξικότητα των PUFA (Maia *et al.*, 2010). Από την άλλη, το είδος *Butyrivibrio proteoclasticus* υδρογονώνει το *trans-11* C18:1 σε C18:0. Παρόλα αυτά, στη συνέχεια, τα *Anaerovibrio lipolytica* και *Propionibacter* αναγνωρίστηκαν ως βακτήρια εμπλεκόμενα στη διαδικασία της βιοϋδρογόνωσης. Η ενσωμάτωση καμελίνας δεν επηρέασε σημαντικά τη σχετική αφθονία των προαναφερθέντων στο Υ.Μ.Κ., ωστόσο, στο στερεό περιεχόμενο, προκάλεσε σημαντική αύξηση στη σχετική αφθονία του είδους *Butyrivibrio proteoclasticus* στην CS11 και σημαντική μείωση του *Butyrivibrio*

*fibrisolvens* στην CS6. Τα αποτελέσματά μας όσον αφορά το προφίλ των Λ.Ο. τόσο στο πλάσμα του αίματος όσο και στο γάλα αποδεικνύουν ότι δεν επηρεάστηκαν αρνητικά από τις συγκεκριμένες τροποποιήσεις στους πληθυσμούς των προαναφερθέντων βακτηρίων στη Μ.Κ.

Επομένως, οι αντιστρόφως ανάλογες τροποποιήσεις που παρατηρήθηκαν στη σχετική αφθονία των *Ruminococcus flavefaciens*, *Selenomonas ruminantium* και *Fibrobacter succinogenes* στις ομάδες του πειράματος της εν λόγω διατριβής, δείχνει μία ισορροπία μεταξύ των κυτταρινολυτικών βακτηριακών πληθυσμών των ομάδων.

## 9. ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, λόγω της ραγδαίας αύξησης της ζήτησης ζωοκομικών προϊόντων, ως αποτέλεσμα της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού, η ζωική παραγωγή καλείται να διερευνήσει σε βάθος καινοτόμες λύσεις με απώτερο σκοπό την ορθολογικότερη εκμετάλλευση φυσικών πόρων, νέων μη συμβατικών καλλιεργειών, με τις ελάχιστες δυνατές απαιτήσεις. Ταυτόχρονα, επιβάλλεται να συμμορφωθεί με τις νέες τάσεις της αγοράς και πιο συγκεκριμένα της ανάγκης των καταναλωτών για ζωοκομικά προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας, με ταυτόχρονη βελτίωση της υγείας και ευζωίας των παραγωγικών ζώων και πάντα με σεβασμό προς το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της εκάστοτε εκμετάλλευσης.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα του πρώτου πειραματισμού της παρούσας διατριβής, προκύπτει ότι η ενσωμάτωση των τριών διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας προς μερική αντικατάσταση του σογιάλευρου και του αραβοσίτου, δεν επηρέασε σημαντικά το σωματικό βάρος και τη γαλακτοπαραγωγή των προβατινών. Ωστόσο, στο γάλα των προβατινών της ομάδας με το μεγαλύτερο ποσοστό ενσωμάτωσης (16 %, CS16) η λιποπεριεκτικότητα μειώθηκε σημαντικά. Σε συμφωνία με τις ολοένα και αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών για ζωοκομικά προϊόντα ικανά να βελτιώνουν την υγεία τους, αδιαμφισβήτητα και τα τρία διαφορετικά ποσοστά ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας, βελτίωσαν το προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος προς την επιθυμητή για τον καταναλωτή κατεύθυνση, με σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση των PUFA και «επιθυμητών» ΛΟ όπως τα α-λινολενικό (ALA) και συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (CLA), μείωση στα SFA, βελτίωσης του λόγου ω-6/ω-3 και των δεικτών βελτίωσης υγείας (AI και TI). Ως επιπρόσθετο πλεονέκτημα, βελτιώθηκε η οξειδωτική σταθερότητα καθώς και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του γάλακτος.

Εξίσου σημαντικό είναι να διασφαλίζεται η ορθή διαβίωση και η ευζωία των παραγωγικών ζώων. Στον εν λόγω πειραματισμό, στο πλάσμα του αίματος των προβατινών, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε και με τα τρία επίπεδα ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας στα μείγματα των ΣΖ, ενώ η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και CAT και τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες (MDA και PC) αυξήθηκαν σημαντικά στις ομάδες με τα δύο υψηλότερα επίπεδα ενσωμάτωσης (11 % και 16 %).

Όσον αφορά την έκφραση γονιδίων της έμφυτης ανοσίας, τα αποτελέσματα σε πρώτο βαθμό δεν μπόρεσαν να αποδοθούν στα βιολειτουργικά συστατικά των σπερμάτων καμελίνας. Τα σχετικά

επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *TRIF*, *TRAF3*, *IRF5* και *MAPK* αυξήθηκαν στα μονοκύτταρα των προβατινών της CS11. Επιπλέον, στις προβατίνες της CS6, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *IL1B* αυξήθηκαν στα μονοκύτταρα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα της CON, ενώ αυτά των *IL1B*, *IL8* και *IL10* αυξήθηκαν στα ουδετερόφιλα σε σύγκριση με τις CON και CS16. Το υψηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (CS16) δεν είχε αρνητικό αντίκτυπο στην έμφυτη ανοσία των προβατινών. Η απόκριση των μονοκυττάρων σε σχέση με το προφίλ των διατροφικών αμινοξέων των τεσσάρων μειγμάτων ΣΖ (κυρίως θρεονίνη, τυροσίνη, σερίνη και λυσίνη) είναι διαφορετική από αυτή των ουδετερόφιλων. Επομένως, τα ευρήματα αυτά προκάλεσαν πλήθος υποθέσεων που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης για να καθοριστεί ο ρόλος των αμινοξέων στην έμφυτη ανοσία των προβατινών τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο έκφρασης όσο και σε επίπεδα έκφρασης mRNA.

Τέλος, στις διατροφικές επεμβάσεις με τα μεγαλύτερα ποσοστά ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας στα μείγματα ΣΖ (CS11 και CS16), η σχετική αφθονία των μεθανοβακτηρίων μειώθηκε αριθμητικά στο Υ.Μ.Κ. και σημαντικά στο στερεό, κάτι που όπως αναφέρθηκε και στον σχολιασμό των αποτελεσμάτων είναι σημαντικό εύρημα το οποίο συνδέεται με το περιβαλλοντικό αποτύπωμα και δύναται να θεωρηθεί πυλώνας προς περαιτέρω διερεύνηση.

## 10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η καμελίνα δύναται να αποτελέσει εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης για τη σόγια. Λόγω των ελάχιστων καλλιεργούμενων απαιτήσεων και απόδοσής της σαν καλλιέργεια, αναγνωρίζεται ως μία αξιόλογη και αειφόρα εναλλακτική καλλιέργεια, πλούσια σε βιολειτουργικά συστατικά, με ποικίλες χρήσεις σε διαφορετικούς τομείς. Οι απαιτήσεις καθώς και το κλίμα στο οποίο ευδοκμεί η καλλιέργεια της καμελίνας φαντάζει ιδανικό για πολλές περιοχές της χώρας μας. Ως εκ τούτου, η καλλιέργειά της μπορεί να μειώσει το κόστος εισροών της σόγιας. Σε παγκόσμια κλίμακα αποτελεί σύμμαχο στις ανησυχίες που προκύπτουν από το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της εκτενούς καλλιέργειας της σόγιας, κάτι που απασχολεί όλο και περισσότερο τα τελευταία έτη.

Το μεγαλύτερο ποσοστό ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας στο μείγμα ΣΖ (16 % /προβατίνα/ημέρα, CS16) μείωσε τη λιποπεριεκτικότητα του παραγόμενου γάλακτος. Η ποιότητα του παραγόμενου γάλακτος όπως αποδεικνύεται από το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος και την οξειδωτική σταθερότητά του βελτιώθηκε μέσω της ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας στα μείγματα ΣΖ των προβατινών.

Η έμφυτη ανοσία των προβατινών, η οποία μελετήθηκε μέσω της έκφρασης ορισμένων γονιδίων, επηρεάστηκε από το προφίλ των αμινοξέων των τεσσάρων διαφορετικών μειγμάτων ΣΖ στα οποία συμμετείχε η καμελίνα και όχι από τα βιολειτουργικά χαρακτηριστικά και τους αντιδιατητικούς παράγοντες αυτής. Το μεγαλύτερο ποσοστό ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας (16 % /προβατίνα/ημέρα, CS16), επέφερε τη σημαντικότερη μείωση στα επίπεδα της σχετικής αφθονίας των μεθανοβακτηρίων της Μ.Κ.

Συμπερασματικά, η προσθήκη σπερμάτων καμελίνας στα μείγματα ΣΖ προς μερική αντικατάσταση του σογιάλεου και του αραβοσίτου είναι μία καινοτόμος διατροφική στρατηγική προς τη δημιουργία καινοτόμων ζωοκομικών προϊόντων, υψηλής διατροφικής αξίας, προς την επιθυμητή για τον καταναλωτή κατεύθυνση. Παρόλα αυτά, χρήζει διερεύνηση η σταθερή διάρκεια κατανάλωσή τους, λόγω των αντιδιατητικών παραγόντων που απαντώνται σε αυτά. Επίσης, η μείωση των μεθανοβακτηρίων και οι τροποποιήσεις στους μικροοργανισμούς της Μ.Κ. αναδεικνύουν σημαντικά ευρήματα σχετικά τόσο με τη μείωση των εκπομπών μεθανίου και κατ' επέκταση τη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος μίας κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης, όσο και για τις ζυμωτικές διεργασίες που πραγματοποιούνται εντός της Μ.Κ.



## 11. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η εν λόγω διατριβή μελέτησε σε βάθος, μέσω ολιστικών προσεγγίσεων, την επίδραση τριών διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης καμελίνας στα σιτηρέσια των γαλακτοπαραγωγών προβατινών. Η διεξοδική μελέτη διαφορετικών παραγωγικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών καθώς και βιοχημικών παραμέτρων, οδήγησε σε σημαντικά συμπεράσματα. Παρόλα αυτά, προκύπτουν σημαντικά ερωτήματα που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Αρχικά, πρέπει να αξιολογηθούν με συγκριτική μελέτη τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον εν λόγω πειραματισμό με μελέτες στις οποίες θα χορηγούνται υποπροϊόντα της καμελίνας στα σιτηρέσια των προβατινών. Η σπουδαιότητα της ανωτέρω πρότασης έγκειται στο γεγονός ότι η καμελίνα είναι εν δυνάμει εναλλακτική καλλιέργεια της σόγιας, υψηλών αποδόσεων, με χαμηλές ανάγκες καλλιέργειας.

Αδιαμφισβήτητα, όσον αφορά το παραγόμενο γάλα, τα αποτελέσματα αναδεικνύουν τη δυνατότητα παραγωγής γάλακτος υψηλής διατροφικής αξίας για τον καταναλωτή. Ωστόσο, η μακράς διάρκειας χορήγηση σπερμάτων καμελίνας θα βοηθούσε στο να αξιολογηθεί και σε βάθος χρόνου χωρίς να επηρεάζεται η υγεία των ζώων, λόγω των αντιδιατητικών παραγόντων που απαντώνται σε αυτά.

Επίσης, οι σημαντικές διαφοροποιήσεις στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία, χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης κυρίως σε πρωτεϊνικό επίπεδο και πιθανώς υπό στρεσογόνες συνθήκες.

Η γονιδιωματική ανάλυση στο υγρό και στερεό περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας των προβατινών ανέδειξε σημαντικά ευρήματα σχετικά με την επίδραση της ενσωμάτωσης σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια των γαλακτοπαραγωγών προβατινών στον βακτηριακό πληθυσμό της μεγάλης κοιλίας. Προκειμένου να κατανοηθεί σε βάθος η επίδραση των σπερμάτων καμελίνας και των διατροφικών PUFA στη βιοχημεία της μεγάλης κοιλίας, σαφέστερα συμπεράσματα δύναται να αντληθούν μέσω της αλληλούχισης απομονωθέντων RNA και τη μελέτη συγκεκριμένων περιοχών των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν. Εν κατακλείδι, ο προσδιορισμός του εκπεμπόμενου μεθανίου, μέσω σύγχρονων *in vitro* τεχνικών, αποτελεί μία ολιστική προσέγγιση αναφορικά με την επίδραση των σπερμάτων καμελίνας και των PUFA στη πιθανή μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος μίας κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης και ειδικότερα της παραγωγικής διαδικασίας.

## 12. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

### 12.1. ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ, ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ

Η μέση ημερήσια κατανάλωση των ζωοτροφών (g/προβατίνα/ημέρα), των θρεπτικών συστατικών (g/προβατίνα/ημέρα), των αμινοξέων και των κύριων ΛΟ παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.1.

**Πίνακας 12.1.** Ημερήσια κατανάλωση των ζωοτροφών (g/προβατίνα/ημέρα) και ημερήσια πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, αμινοξέων και κύριων λιπαρών οξέων (g/προβατίνα/ημέρα) των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)

Μέση ημερήσια κατανάλωση ζωοτροφών (g/προβατίνα/ημέρα)	Διατροφικές επεμβάσεις			
	CON	SP5	SP10	SP15
Άχυρο σίτου	200	200	200	200
Μηδική	1000	1000	1000	1000
Μείγμα ΣΖ	1500	1500	1500	1500
Μέση ημερήσια πρόσληψη θρεπτικών συστατικών (g/προβατίνα/ημέρα)	Διατροφικές επεμβάσεις			
	CON	SP5	SP10	SP15
Ξηρά ουσία	2433,2	2437,7	2442,2	2446,7
Τέφρα	238,4	239,2	240,0	240,9
Ολικές αζωτούχες ουσίες	510,1	512,9	515,7	518,6
Ολικές λιπαρές ουσίες	38,5	38,5	38,6	38,6
aNDFom	741,0	742,1	743,2	744,3
ADFom	503,0	503,2	503,4	503,6
Ημερήσια κατανάλωση αμινοξέων (g/προβατίνα/ημέρα)	Διατροφικές επεμβάσεις			
Αμινοξέα	CON	SP5	SP10	SP15
Αλανίνη	20,95	21,15	21,36	21,56
Αργινίνη	0,71	0,72	0,72	0,72
Ασπαρτικό οξύ	39,93	40,17	40,41	40,65
Κυστεΐνη	6,71	6,75	6,78	6,82
Γλουταμινικό οξύ	66,01	66,36	66,72	67,07
Γλυκίνη	19,37	19,53	19,69	19,85

Ιστιδίνη	0,21	0,21	0,21	0,21
Ισολευκίνη	0,52	0,52	0,52	0,52
Λευκίνη	0,82	0,82	0,82	0,82
Λυσίνη	0,36	0,36	0,37	0,37
Μεθειονίνη	0,25	0,26	0,26	0,26
Φαινυλαλανίνη	0,51	0,52	0,52	0,52
Προλίνη	23,31	23,42	23,52	23,63
Σερίνη	18,61	18,76	18,92	19,07
Θρεονίνη	0,53	0,54	0,54	0,54
Τρυπτοφάνη	0,07	0,07	0,07	0,07
Τυροσίνη	13,44	13,55	13,66	13,77
Βαλίνη	0,57	0,58	0,58	0,58

ΛΟ	Διατροφικές επεμβάσεις			
	CON	SP5	SP10	SP15
C14:0	0,149	0,149	0,149	0,150
C15:0	0,032	0,032	0,032	0,032
C16:0	6,887	6,895	6,902	6,910
C16:1 n-7	0,162	0,164	0,166	0,168
C17:0	0,023	0,023	0,023	0,023
C18:0	1,25	1,25	1,25	1,25
<i>cis</i> -9 C18:1	7,423	7,423	7,423	7,424
<i>cis</i> C18:2 n-6	19,709	19,712	19,716	19,720
C18:3 n-6	0,000	0,004	0,009	0,013
C20:0	0,105	0,105	0,105	0,105
C18:3 n-3	1,764	1,764	1,764	1,764
C20:1 n-9	0,209	0,209	0,209	0,209
C20:2 n-6	0,163	0,163	0,163	0,163
C20:3 n-3	0,142	0,142	0,142	0,142
C22:0	0,054	0,054	0,054	0,054
C24:0	0,178	0,178	0,178	0,002

Το σωματικό βάρος των προβατινών όπως καταγράφηκε στην έναρξη, στο μέσο (30<sup>η</sup> ημέρα) και στο τέλος (60<sup>η</sup> ημέρα) του πειραματισμού, παρουσιάζεται στον Πίνακα 12.2. Πιο συγκεκριμένα, το μέσο σωματικό βάρος των ομάδων δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων ομάδων.

**Πίνακας 12.2.** Μέσο σωματικό βάρος των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη την πειραματική περίοδο (0, 30<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> πειραματική ημέρα)

	Διατροφή (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)				Επίδραση <sup>β</sup>		
	CON	SP5	SP10	SP15	SEM <sup>α</sup>	0	30 <sup>η</sup>	60 <sup>η</sup>	SEM <sup>α</sup>	Δ	X	Δ × X
ΣΒ (kg)	54,6	53,7	52,7	54,6	0,5	53,9 <sup>A</sup>	53,3 <sup>B</sup>	54,5 <sup>A</sup>	0,8	0,823	0,003	0,767

Οι μέσοι όροι με διαφορετικό εκθέτη (A, B) μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας διέφεραν σημαντικά. <sup>α</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. <sup>β</sup>Επίδραση: Η διατροφική επέμβαση (Δ), ο χρόνος (X) και η αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων × χρόνος (Δ × X) αναλύθηκαν μέσω ANOVA χρησιμοποιώντας ένα γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και post-hoc ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την κατάλληλη χρήση της δοκιμής πολλαπλής εμβέλειας του Tukey.

## 12.2. ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Η ημερήσια ποσότητα παραγόμενου γάλακτος (g/ημέρα), η διορθωμένη ως προς την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή (g/ημέρα), η διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγή (6 %) (g/ημέρα), η λιποπεριεκτικότητα (%), η ημερήσια παραγωγή λίπους (g/ημέρα) η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (%), η ημερήσια παραγωγή πρωτεΐνης (g/ημέρα), η λακτόζη (%), τα σωματικά κύτταρα (1000/mL), τα ολικά στερεά (%) και τα στερεά άνευ λίπους (%), παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 12.3. Στην έναρξη του πειραματισμού δεν υπήρχε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τη γαλακτοπαραγωγή τη διορθωμένη ως προς την ενέργεια γαλακτοπαραγωγή (g/ημέρα), τη διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα γαλακτοπαραγωγή (6 %) (g/ημέρα) καθώς και τη χημική σύσταση του γάλακτος. Η ενσωμάτωση σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των προβατινών αύξησε την ημερήσια γαλακτοπαραγωγή, τη διορθωμένη ως προς τη λιποπεριεκτικότητα (6 %) και τη διορθωμένη ως προς την ενέργεια σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα (CON). Ωστόσο η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η ημερήσια παραγωγή λίπους, η πρωτεΐνη, η ημερήσια παραγωγή πρωτεΐνης, η

λακτόζη, τα σωματικά κύτταρα, τα ολικά στερεά και τα στερεά άνευ λίπους στο γάλα επίσης δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων.

**Πίνακας 12.3.** Η γαλακτοπαραγωγή, η χημική σύσταση του γάλακτος των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη την πειραματική περίοδο (0, 15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> πειραματική ημέρα)

	Διατροφική επέμβαση (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)					Επίδραση <sup>β</sup>			
	CON	SP5	SP10	SP15	SEM <sup>α</sup>	0	15 <sup>η</sup>	30 <sup>η</sup>	45 <sup>η</sup>	60 <sup>η</sup>	SEM <sup>α</sup>	Δ	X	Δ × X
Γαλ/γη (kg/ημέρα)	1,70	1,74	1,86	1,85	0,03	1,97 <sup>A</sup>	1,84 <sup>B</sup>	1,84 <sup>B</sup>	1,61 <sup>C</sup>	1,68 <sup>C</sup>	0,05	0,486	<0,001	0,322
FCM <sub>6%</sub> <sup>γ</sup> (kg/ημέρα)	1,68	1,73	1,77	1,86	0,03	1,85 <sup>A</sup>	1,86 <sup>A</sup>	1,78 <sup>AB</sup>	1,70 <sup>BC</sup>	1,63 <sup>C</sup>	0,07	0,529	<0,001	0,298
ECM <sup>δ</sup> (kg/ημέρα)	1,48	1,53	1,57	1,63	0,02	1,65 <sup>A</sup>	1,63 <sup>AB</sup>	1,57 <sup>AB</sup>	1,47 <sup>B</sup>	1,44 <sup>B</sup>	0,04	0,510	<0,001	0,255
Λιπ/τα (%)	5,88	6,02	5,66	6,07	0,17	5,57 <sup>C</sup>	6,07 <sup>B</sup>	5,72 <sup>C</sup>	6,48 <sup>A</sup>	5,72 <sup>A</sup>	0,11	0,342	<0,001	0,007
Λίπος (g/ημέρα)	99,78	104,0	104,4	111,8	1,48	107,9 <sup>AB</sup>	111,6 <sup>A</sup>	105,1 <sup>B</sup>	103,8 <sup>B</sup>	96,5 <sup>C</sup>	3,25	0,495	<0,001	0,155
Πρωτεΐνη (%)	5,21	5,48	5,16	5,39	0,11	5,24	5,33	5,29	5,39	5,31	0,06	0,152	0,004	0,429
Πρωτεΐνη (g/ημέρα)	89,20	94,7	95,8	99,5	1,30	102,8 <sup>A</sup>	98,3 <sup>A</sup>	97,2 <sup>AB</sup>	86,6 <sup>B</sup>	89,1 <sup>B</sup>	2,80	0,496	<0,001	0,127
Λακτόζη (%)	4,93	5,00	5,06	5,00	0,05	5,04 <sup>†</sup>	4,99	5,00	4,95 <sup>†</sup>	5,00	0,03	0,300	0,042	0,008
Σωματικά κύτταρα (1000/mL)	350,7	592,8	295,4	581,5	195,4	262,8	563,1	417,7	475,6	555,2	140,89	0,603	0,406	0,659
Ολικά στερεά (%)	17,83	17,06	16,48	17,01	0,25	16,42 <sup>C</sup>	16,95 <sup>AB</sup>	16,61 <sup>BC</sup>	17,39 <sup>A</sup>	16,73 <sup>B</sup>	0,14	0,316	<0,001	0,540
Στερεά άνευ λίπους (%)	10,87	11,04	10,82	10,94	0,10	10,85	10,89	10,89	10,91	11,01	0,07	0,411	0,207	0,002

Οι μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των ομάδων (a, b, c) και μεταξύ των χρονικών σημείων δειγματοληψίας (A, B, C, D) διαφέρουν σημαντικά. <sup>a</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. <sup>β</sup>Επίδραση: Η διατροφική επέμβαση ( $\Delta$ ), ο χρόνος (X) και η αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων  $\times$  χρόνος ( $\Delta \times X$ ) αναλύθηκαν μέσω ANOVA χρησιμοποιώντας ένα γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και post-hoc ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την κατάλληλη χρήση της δοκιμής πολλαπλής εμβέλειας του Tukey. <sup>γ</sup>Διορθωμένη γαλακτοπαραγωγή ως προς τη λιποπεριεκτικότητα (FCM) σε 6 %, <sup>δ</sup>Διορθωμένη γαλακτοπαραγωγή ως προς την ενέργεια (ECM).

### 12.3. ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

#### 12.3.1. Προφίλ των λιπαρών οξέων υγρού μεγάλης κοιλίας

Οι μέσοι όροι των ΛΟ στο Υ.Μ.Κ. των προβατινών των τριών ομάδων παρουσιάζεται στον Πίνακα 12.4. Η συγκέντρωση των C15:0 και C16:0 αυξήθηκαν σημαντικά ( $P = 0.003$  και  $P < 0.001$ , αντίστοιχα) στις ομάδες SP. Αντιθέτως, η συγκέντρωση του C18:0 μειώθηκε στις ομάδες SP σε σύγκριση με την ομάδα CON, ωστόσο η μείωση αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική ( $P = 0.010$ ) μόνο για την ομάδα SP15. Επίσης, υπήρξε τάση προς μείωση για τη συγκέντρωση του *cis*-9 C18:1 στην ομάδα SP10 σε σύγκριση με τις CON και SP15, τάση προς αύξηση της συγκέντρωσης του *cis* C18:2 n-6 για την ομάδα SP15 σε σύγκριση με την CON, τάση προς αύξηση της συγκέντρωσης του C18:3 n-3 στην ομάδα SP5 σε σύγκριση με την CON και τάση προς αύξηση στη συγκέντρωση του *cis*-9, *trans*-11 C18:2 στην SP15 σε σύγκριση με τις SP5 και SP10.

**Πίνακας 12.4.** Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ) στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)

ΛΟ	Διατροφική Επέμβαση ( $\Delta$ )					SEM <sup>a</sup>	P
	CON	SP5	SP10	SP15			
C14:0	1,23	1,15	1,35	1,11	0,10	0,834	
C14:1	1,52	1,19	1,83	1,18	0,14	0,304	
C15:0	0,85 <sup>b</sup>	1,70 <sup>a</sup>	1,69 <sup>a</sup>	1,56 <sup>a</sup>	0,10	0,003	
C16:0	24,32 <sup>b</sup>	30,47 <sup>a</sup>	29,82 <sup>a</sup>	33,66 <sup>a</sup>	0,81	<0,001	
C16:1 n-7	0,24	0,10	0,52	0,57	0,09	0,187	

C17:0	0,22	0,00	0,34	0,20	0,07	0,403
C18:0	46,37 <sup>a</sup>	40,96 <sup>ab</sup>	42,58 <sup>ab</sup>	34,98 <sup>b</sup>	1,29	0,010
<i>trans</i> C18:1	0,82	0,00	0,73	0,00	0,19	0,336
<i>trans-11</i> C18:1	5,93	4,94	4,71	5,49	0,38	0,678
<i>cis-9</i> C18:1	8,03 <sup>t</sup>	7,11	6,28 <sup>t</sup>	8,03 <sup>t</sup>	0,29	0,083
<i>trans</i> C18:2 n-6	0,00	0,00	0,07	0,00	0,16	0,407
<i>cis</i> C18:2 n-6	5,91 <sup>t</sup>	8,02	7,36	8,13 <sup>t</sup>	0,34	0,077
C20:0	0,39	0,00	0,00	0,00	0,01	0,407
C18:3 n-3	0,48 <sup>t</sup>	1,78 <sup>t</sup>	0,85	0,70	0,21	0,151
<i>cis-9, trans-11</i> C18:2	3,54	2,60 <sup>t</sup>	2,53 <sup>t</sup>	4,11 <sup>t</sup>	0,26	0,074
C20:2 n-6	0,11	0,00	0,00	0,05	0,03	0,543
C20:4 n-6	0,38	0,00	0,00	0,00	0,09	0,407

Συντομογραφίες: CON = επέμβαση μάρτυρα. SP5 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 5 g σπιρουλίνας, SP10 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 10 g σπιρουλίνας, SP15 = διατροφική επέμβαση με ενσωμάτωση 15 g σπιρουλίνας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) μεταξύ των ομάδων διαφέρουν σημαντικά. <sup>a</sup>SEM = τυπικός μέσος όρος σφάλματος, *P* = *P* τιμή.

### 12.3.2. Προφίλ των λιπαρών οξέων στο πλάσμα του αίματος

Το προφίλ των ΛΟ στο πλάσμα του αίματος των προβατινών παρουσιάζεται στον Πίνακα 12.5. Αναλυτικά, βρέθηκε μια τάση για αύξηση της συγκέντρωσης του C16:0 στο πλάσμα αίματος της SP15 ομάδας σε σύγκριση με αυτή των προβατινών της CON (*P* = 0,090). Από την άλλη πλευρά, οι συγκεντρώσεις του C18:0 στην SP5 (*P* = 0,001) και του *cis-9* C18:1 τόσο στην SP10 όσο και στην SP15 (*P* = 0,013) και του *trans-11* C18:1 σε όλες τις SP ομάδες (*P* = 0,001) μειώθηκαν σημαντικά. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των C18:3 n-6 (*P* < 0,001) και C22:6 n-3 (*P* < 0,001) αυξήθηκαν ενώ του C18:3 n-3 (*P* < 0,001) μειώθηκε σημαντικά στο πλάσμα αίματος των SP ομάδων. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις των C20:3 n-3 (*P* = 0,042) και *cis* C18:2 n-6 (*P* = 0,033) στο πλάσμα αίματος των προβατινών των SP5 και SP15 αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των C18:0 (*P* = 0,020), και C18:3 n-3 (*P* < 0,001) αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου.



**Πίνακας 12.5.** Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ) στο πλάσμα αίματος των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> πειραματική ημέρα)

ΛΟ	Διατροφική επέμβαση (Δ)					Χρόνος (ημέρες) (X)					Επίδραση <sup>β</sup>		
	CON	SP5	SP10	SP15	SEM <sup>α</sup>	15 <sup>η</sup>	30 <sup>η</sup>	45 <sup>η</sup>	60 <sup>η</sup>	SEM <sup>α</sup>	Δ	X	Δ × X
C8:0	0,02 <sup>b</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,10 <sup>ab</sup>	0,18 <sup>a</sup>	0,03	0,14 <sup>A</sup>	0,02 <sup>B</sup>	0,05 <sup>B</sup>	0,19 <sup>A</sup>	0,02	0,001	<0,001	0,008
C10:0	0,03 <sup>b</sup>	0,11 <sup>ab</sup>	0,08 <sup>ab</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0,02	0,16 <sup>A</sup>	0,07 <sup>B</sup>	0,12 <sup>AB</sup>	0,08 <sup>AB</sup>	0,03	0,001	0,026	0,055
C11:0	0,33	0,44 <sup>t</sup>	0,23 <sup>t</sup>	0,23 <sup>t</sup>	0,06	0,54 <sup>A</sup>	0,16 <sup>B</sup>	0,22 <sup>B</sup>	0,29 <sup>B</sup>	0,06	0,060	<0,001	0,209
C12:0	0,06	0,05	0,04	0,02	0,02	0,11 <sup>A</sup>	0,05 <sup>AB</sup>	0,00 <sup>B</sup>	0,01 <sup>B</sup>	0,02	0,557	0,006	0,676
C14:0	0,85	0,76	0,77	0,82	0,02	0,84	0,78	0,77	0,80	0,04	0,402	0,518	0,706
C15:0	0,36	0,28	0,35	0,33	0,02	0,33	0,41	0,39	0,20	0,04	0,245	0,001	0,011
C16:0	21,47 <sup>t</sup>	22,10	22,24	22,78 <sup>t</sup>	0,19	23,47 <sup>A</sup>	21,21 <sup>B</sup>	20,83 <sup>B</sup>	23,02 <sup>A</sup>	0,31	0,090	<0,001	<0,001
C16:1 n-7	1,08	1,37	1,11	1,06	0,05	1,53 <sup>A</sup>	1,19 <sup>B</sup>	0,86 <sup>C</sup>	1,02 <sup>BC</sup>	0,10	0,121	<0,001	0,100
C17:0	2,42 <sup>b</sup>	1,87 <sup>b</sup>	2,48 <sup>b</sup>	3,43 <sup>a</sup>	0,12	2,61 <sup>B</sup>	2,03 <sup>B</sup>	2,02 <sup>B</sup>	3,51 <sup>A</sup>	0,16	<0,001	<0,001	<0,001
C17:1 n-7	0,02 <sup>t</sup>	0,09	0,09	0,11 <sup>t</sup>	0,01	0,09	0,08	0,11	0,04	0,03	0,060	0,204	0,402
C18:0	21,12 <sup>a</sup>	18,17 <sup>b</sup>	20,72 <sup>a</sup>	20,38 <sup>a</sup>	0,38	18,44 <sup>B</sup>	20,59 <sup>A</sup>	20,19 <sup>A</sup>	21,15 <sup>A</sup>	0,61	0,001	0,020	0,010
<i>trans</i> C18:1	0,15	0,21	0,12	0,15	0,02	0,21	0,10	0,16	0,15	0,04	0,444	0,227	0,002
<i>trans-11</i> C18:1	1,03 <sup>a</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,61 <sup>b</sup>	0,04	0,50 <sup>B</sup>	0,80 <sup>A</sup>	0,75 <sup>A</sup>	0,58 <sup>AB</sup>	0,09	0,001	0,044	0,006
<i>cis-9</i> C18:1	16,13 <sup>a</sup>	15,95 <sup>a</sup>	13,27 <sup>b</sup>	13,14 <sup>b</sup>	0,39	16,08 <sup>t</sup>	14,87	13,49 <sup>t</sup>	13,83 <sup>t</sup>	0,80	0,013	0,115	0,044
<i>trans</i> C18:2 n-6	0,03	0,02 <sup>t</sup>	0,07 <sup>t</sup>	0,02 <sup>t</sup>	0,02	0,02 <sup>AB</sup>	0,01 <sup>B</sup>	0,08 <sup>A</sup>	0,03 <sup>AB</sup>	0,02	0,080	0,037	0,029
<i>cis</i> C18:2 n-6	19,24 <sup>a</sup>	20,60 <sup>a</sup>	20,72 <sup>a</sup>	22,03 <sup>b</sup>	0,27	18,99 <sup>B</sup>	21,52 <sup>B</sup>	22,97 <sup>A</sup>	19,13 <sup>C</sup>	0,52	0,033	<0,001	<0,001
C18:3 n-6	0,10 <sup>a</sup>	0,40 <sup>b</sup>	0,34 <sup>b</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,02	0,30 <sup>B</sup>	0,36 <sup>AB</sup>	0,44 <sup>A</sup>	0,21 <sup>C</sup>	0,04	<0,001	<0,001	0,121
C18:3 n-3	2,73 <sup>a</sup>	1,81 <sup>b</sup>	1,73 <sup>b</sup>	1,80 <sup>b</sup>	0,04	1,66 <sup>C</sup>	1,93 <sup>B</sup>	2,42 <sup>A</sup>	1,99 <sup>B</sup>	0,11	<0,001	<0,001	0,115
C20:3 n-6	0,18	0,16	0,18	0,18	0,01	0,15 <sup>AB</sup>	0,21 <sup>A</sup>	0,21 <sup>A</sup>	0,10 <sup>B</sup>	0,04	0,938	0,032	0,257

C20:3 n-3	3,20 <sup>b</sup>	3,78 <sup>a</sup>	3,56 <sup>ab</sup>	3,63 <sup>ab</sup>	0,05	3,57 <sup>B</sup>	3,63 <sup>A</sup>	3,79 <sup>A</sup>	3,38 <sup>B</sup>	0,10	0,042	0,014	<0,001
C22:2 n-6	0,87 <sup>a</sup>	0,59 <sup>ab</sup>	0,50 <sup>b</sup>	0,52 <sup>b</sup>	0,02	0,55	0,60	0,68	0,58	0,05	0,005	0,168	0,022
C24:1 n-9	8,30	9,67	9,85	8,56	0,27	9,15	8,69	8,46	10,17	0,54	0,200	0,124	0,035
C22:6 n-3	0,45 <sup>b</sup>	0,84 <sup>a</sup>	0,89 <sup>a</sup>	0,91 <sup>a</sup>	0,03	0,52 <sup>C</sup>	0,78 <sup>B</sup>	0,88 <sup>AB</sup>	0,90 <sup>A</sup>	0,05	<0,001	<0,001	0,034

Οι μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα (a, b, c) μεταξύ των ομάδων και (A, B, C, D) μεταξύ των χρονικών σημείων δειγματοληψίας διαφέρουν σημαντικά. <sup>a</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. <sup>β</sup>Επίδραση: Η διατροφική επέμβαση ( $\Delta$ ), ο χρόνος (X) και η αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων  $\times$  χρόνος ( $\Delta \times X$ ) αναλύθηκαν μέσω ANOVA χρησιμοποιώντας ένα γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και post-hoc ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την κατάλληλη χρήση της δοκιμής πολλαπλής εμβέλειας του Tukey.

### 12.3.3. Προφίλ των λιπαρών οξέων στο γάλα

Το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος των τεσσάρων ομάδων παρουσιάζεται στον Πίνακα 12.6. Οι συγκεντρώσεις των SCFA αυξήθηκαν στο γάλα των προβατινών των SP5 και SP10 ομάδων σε σύγκριση με τις προβατίνες της ομάδας CON ( $P = 0,001$ ) λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης σε C6:0 ( $P = 0,006$ ) και C8:0 ( $P = 0,001$ ). Αντίθετα, παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση του C16:0 ( $P < 0,001$ ) σε όλες τις ομάδες SP και στη συγκέντρωση των MCFA ( $P = 0,024$ ) στο γάλα προβατινών της SP10 σε σύγκριση με της CON. Η ενσωμάτωση σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των προβατινών δεν επηρέασε τις συγκεντρώσεις των LCFA και MUFA στο πρόβειο γάλα, αν και αύξησε τις συγκεντρώσεις των C22:0 ( $P = 0,006$ ) και *trans* C18:1 ( $P < 0,001$ ) που ανήκουν στις αντίστοιχες ομάδες ΛΟ. Επίσης, η ενσωμάτωση σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των προβατινών αύξησε τη συγκέντρωση των PUFA ( $P = 0,027$ ) και  $\omega$ -3 ( $P = 0,010$ ) στο γάλα τους, αλλά τα αποτελέσματα αναφέρονται ως στατιστικώς σημαντικά μόνο για το υψηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης (SP15). Η αύξηση της συγκέντρωσης του *cis* C18:2 n-6 στις προβατίνες των ομάδων SP10 και SP15 ( $P = 0,034$ ), του C20:3 n-3 σε όλα τα ζώα που διατρέφονταν με σιτηρέσια που ενσωματώθηκε σπιρουλίνα ( $P = 0,003$ ) και η τάση προς αύξηση της συγκέντρωσης του C18:3 n-3 στο γάλα προβατινών της SP15 ( $P = 0,054$ ) εξηγούν αυτά τα ευρήματα.

Επιπλέον, το υψηλότερο επίπεδο χορήγησης σπιρουλίνας (SP15) έτεινε να μειώσει τον AI ( $P = 0,093$ ) και μείωσε τον δείκτη TI ( $P = 0,029$ ) στο γάλα των προβατινών. Τέλος, ο χρόνος δειγματοληψίας είχε επίσης επίδραση στο προφίλ ΛΟ του γάλακτος. Πιο συγκεκριμένα, αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις των MCFA ( $P = 0,016$ ) και SFA ( $P = 0,028$ ), ο λόγος SFA/UFA ( $P = 0,015$ ) και οι δείκτες AI ( $P = 0,001$ ) και TI ( $P = 0,066$ ) σε όλη την πειραματική περίοδο.

**Πίνακας 12.6.** Οι μέσοι όροι των λιπαρών οξέων (ΛΟ) (% των συνολικών ΛΟ), των ομαδοποιήσεών τους, των δεικτών υγείας των ΛΟ και των δεικτών αφυδρογονάσης στο γάλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> πειραματική ημέρα)

ΛΟ	Διατροφική Επέμβαση (D)					Χρόνος (Ημέρες) (X)					Επίδραση <sup>β</sup>		
	CON	SP5	SP10	SP15	SEM <sup>α</sup>	15 <sup>η</sup>	30 <sup>η</sup>	45 <sup>η</sup>	60 <sup>η</sup>	SEM <sup>α</sup>	Δ	X	Δ×X
C4:0	4,25 <sup>a</sup>	4,30 <sup>a</sup>	4,25 <sup>a</sup>	3,97 <sup>b</sup>	0,060	4,10 <sup>B</sup>	4,25 <sup>AB</sup>	4,30 <sup>A</sup>	4,10 <sup>B</sup>	0,058	0,001	0,032	0,002
C6:0	3,32 <sup>b</sup>	3,50 <sup>a</sup>	3,49 <sup>a</sup>	3,35 <sup>b</sup>	0,041	3,35	3,43	3,45	3,43	0,040	0,006	0,351	0,166
C8:0	3,08 <sup>b</sup>	3,33 <sup>a</sup>	3,37 <sup>a</sup>	3,29 <sup>a</sup>	0,050	3,26	3,27	3,23	3,30	0,044	0,001	0,688	0,960
C10:0	9,51 <sup>b</sup>	10,45 <sup>a</sup>	10,37 <sup>a</sup>	10,23 <sup>a</sup>	0,177	10,04	10,22	9,98	10,34	0,142	0,003	0,208	0,959
C11:0	0,37	0,38	0,38	0,37	0,008	0,35 <sup>C</sup>	0,38 <sup>AB</sup>	0,37 <sup>BC</sup>	0,40 <sup>A</sup>	0,008	0,859	<0,001	0,615
C12:0	5,14 <sup>b</sup>	5,64 <sup>a</sup>	5,49 <sup>ab</sup>	5,49 <sup>ab</sup>	0,117	5,26	5,53	5,35	5,62	0,107	0,040	0,061	0,921
C14:0	12,60	12,28	12,29	12,38	0,205	12,13 <sup>B</sup>	12,44 <sup>AB</sup>	12,07 <sup>B</sup>	12,95 <sup>A</sup>	0,177	0,584	0,004	0,830
C14:1	0,42	0,42	0,42	0,43	0,007	0,41 <sup>B</sup>	0,45 <sup>A</sup>	0,43 <sup>AB</sup>	0,40 <sup>B</sup>	0,007	0,518	<0,001	0,014
C15:0	0,93	0,91	0,91	0,91	0,015	0,89 <sup>B</sup>	0,96 <sup>A</sup>	0,92 <sup>AB</sup>	0,89 <sup>B</sup>	0,014	0,986	0,002	0,927
C15:1	0,28	0,29	0,30	0,30	0,008	0,32 <sup>A</sup>	0,30 <sup>A</sup>	0,29 <sup>AB</sup>	0,27 <sup>B</sup>	0,008	0,386	0,003	0,382
C16:0	28,58 <sup>a</sup>	27,12 <sup>b</sup>	27,13 <sup>b</sup>	27,17 <sup>b</sup>	0,230	27,17	27,59	27,72	27,50	0,248	<0,001	0,468	0,895
C16:1 n-7	1,07 <sup>a</sup>	0,97 <sup>ab</sup>	0,96 <sup>b</sup>	0,98 <sup>ab</sup>	0,028	0,88 <sup>B</sup>	1,00 <sup>A</sup>	1,05 <sup>A</sup>	1,05 <sup>A</sup>	0,025	0,020	<0,001	<0,001
C17:0	0,52	0,53	0,52	0,53	0,007	0,56 <sup>A</sup>	0,52 <sup>B</sup>	0,52 <sup>BC</sup>	0,50 <sup>C</sup>	0,007	0,463	<0,001	0,010
C17:1 n-7	0,25	0,24	0,24	0,26	0,006	0,26 <sup>A</sup>	0,24 <sup>AB</sup>	0,25 <sup>AB</sup>	0,24 <sup>B</sup>	0,005	0,079	0,004	<0,001
C18:0	7,69	7,73	7,65	7,67	0,140	8,13 <sup>A</sup>	7,44 <sup>B</sup>	7,74 <sup>AB</sup>	7,31 <sup>B</sup>	0,124	0,856	<0,001	0,321
<i>trans</i> C18:1	0,50 <sup>b</sup>	0,69 <sup>a</sup>	0,73 <sup>a</sup>	0,69 <sup>a</sup>	0,140	0,73 <sup>A</sup>	0,73 <sup>A</sup>	0,60 <sup>B</sup>	0,57 <sup>B</sup>	0,024	<0,001	<0,001	<0,001
<i>trans-11</i> C18:1	0,68	0,66	0,71	0,71	0,020	0,79 <sup>A</sup>	0,66 <sup>B</sup>	0,68 <sup>B</sup>	0,63 <sup>B</sup>	0,018	0,324	<0,001	0,121

<i>cis</i> -9 C18:1	16,55	16,02	16,07	16,51	0,236	16,63	16,06	16,48	16,00	0,194	0,223	0,037	0,687
<i>trans</i> C18:2 n-6	0,19	0,19	0,20	0,20	0,006	0,19	0,19	0,20	0,20	0,005	0,707	0,530	0,732
<i>cis</i> C18:2 n-6	2,68 <sup>b</sup>	2,78 <sup>ab</sup>	2,91 <sup>a</sup>	2,92 <sup>a</sup>	0,059	2,83	2,86	2,83	2,80	0,052	0,034	0,884	0,984
C18:3 n-6	0,01	0,02	0,01	0,01	0,007	0,031 <sup>A</sup>	0,002 <sup>B</sup>	0,006 <sup>B</sup>	0,020 <sup>AB</sup>	0,006	0,474	0,005	0,490
C20:0	0,11	0,12	0,11	0,12	0,002	0,12 <sup>A</sup>	0,12 <sup>A</sup>	0,12 <sup>A</sup>	0,11 <sup>B</sup>	0,001	0,069	<0,001	<0,001
C18:3 n-3	0,54 <sup>t</sup>	0,57	0,58	0,60 <sup>t</sup>	0,015	0,57 <sup>AB</sup>	0,55 <sup>B</sup>	0,57 <sup>AB</sup>	0,60 <sup>A</sup>	0,014	0,054	0,049	0,997
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C18:2	0,44	0,43	0,45	0,47	0,012	0,44	0,44	0,46	0,45	0,012	0,219	0,491	0,336
C22:0	0,09 <sup>b</sup>	0,12 <sup>ab</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,009	0,13 <sup>A</sup>	0,11 <sup>AB</sup>	0,13 <sup>AB</sup>	0,09 <sup>B</sup>	0,008	0,006	0,014	<0,001
C20:3 n-3	0,22 <sup>b</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,005	0,26 <sup>A</sup>	0,24 <sup>B</sup>	0,24 <sup>B</sup>	0,24 <sup>B</sup>	0,004	0,003	0,001	0,409
$\Delta^9$ Δείκτες Αφυδρογονάσης													
C14:1/C14:0	0,03	0,04	0,03	0,03	0,003	0,03	0,04	0,04	0,03	0,002	0,303	0,175	0,606
C16:1/C16:0	0,04	0,04	0,04	0,04	0,001	0,03 <sup>B</sup>	0,04 <sup>A</sup>	0,04 <sup>A</sup>	0,04 <sup>A</sup>	0,001	0,361	<0,001	<0,001
<i>cis</i> -9 C18:1 /C18:0	2,21	2,11	2,11	2,17	0,040	2,06 <sup>B</sup>	2,18 <sup>AB</sup>	2,15 <sup>AB</sup>	2,21 <sup>A</sup>	0,034	0,196	0,012	0,824
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C18:2 / <i>trans</i> -11 C18:1	0,69	0,66	0,65	0,67	0,018	0,56	0,67	0,69	0,74	0,016	0,590	<0,001	0,001
Ομαδοποιημένα ΛΟ													
SCFA	20,55 <sup>b</sup>	21,95 <sup>a</sup>	21,86 <sup>a</sup>	21,21 <sup>ab</sup>	0,256	21,10	21,56	21,33	21,58	0,221	0,001	0,338	0,401
MCFA	47,29 <sup>a</sup>	45,97 <sup>ab</sup>	45,89 <sup>b</sup>	46,02 <sup>ab</sup>	0,349	45,59 <sup>B</sup>	46,54 <sup>AB</sup>	46,10 <sup>AB</sup>	46,95 <sup>A</sup>	0,319	0,024	0,016	0,796
LCFA	8,18	8,40	8,29	8,32	0,146	8,83 <sup>A</sup>	8,08 <sup>B</sup>	8,37 <sup>B</sup>	7,92 <sup>B</sup>	0,127	0,793	<0,001	0,192
MUFA	19,77	19,29	19,43	19,88	0,258	20,02 <sup>A</sup>	19,44 <sup>AB</sup>	19,77 <sup>AB</sup>	19,16 <sup>B</sup>	0,214	0,329	0,018	0,788
PUFA	4,10 <sup>b</sup>	4,26 <sup>ab</sup>	4,40 <sup>ab</sup>	4,45 <sup>a</sup>	0,079	4,34	4,28	4,31	4,30	0,071	0,027	0,948	0,907
SFA	76,00	76,33	76,04	75,55	0,289	75,51 <sup>B</sup>	76,17 <sup>AB</sup>	75,80 <sup>AB</sup>	76,45 <sup>A</sup>	0,245	0,299	0,028	0,679

UFA	23,88	23,55	23,83	24,32	0,289	24,35 <sup>A</sup>	23,72 <sup>AB</sup>	24,07 <sup>AB</sup>	23,46 <sup>B</sup>	0,244	0,310	0,037	0,737
SFA/UFA	3,21	3,26	3,22	3,12	0,049	3,11 <sup>B</sup>	3,23 <sup>AB</sup>	3,17 <sup>AB</sup>	3,29 <sup>A</sup>	0,041	0,217	0,015	0,721
ω-3	0,76 <sup>b</sup>	0,82 <sup>ab</sup>	0,83 <sup>ab</sup>	0,85 <sup>b</sup>	0,073	0,83	0,79	0,81	0,84	0,143	0,010	0,063	0,029
ω-6	2,92 <sup>t</sup>	3,00	3,12	3,13 <sup>t</sup>	0,027	3,05	3,05	3,04	3,02	0,054	0,050	0,968	0,977
ω-6/ω-3	3,82	3,66	3,79	3,71	0,029	3,68 <sup>B</sup>	3,88 <sup>A</sup>	3,76 <sup>AB</sup>	3,64 <sup>B</sup>	0,056	0,194	0,024	0,893

Δείκτες Υγείας ΛΟ

AI	3,57 <sup>t</sup>	3,55	3,46	3,39 <sup>t</sup>	0,263	3,35 <sup>B</sup>	3,52 <sup>AB</sup>	3,44 <sup>B</sup>	3,64 <sup>A</sup>	0,055	0,203	0,001	0,818
TI	3,53 <sup>a</sup>	3,43 <sup>b</sup>	3,38 <sup>b</sup>	3,31 <sup>b</sup>	0,022	3,33 <sup>B</sup>	3,44 <sup>A</sup>	3,40 <sup>AB</sup>	3,46 <sup>A</sup>	0,043	0,029	0,046	0,655
HPI	0,27	0,28	0,29	0,29	0,003	0,30 <sup>A</sup>	0,28 <sup>AB</sup>	0,29 <sup>A</sup>	0,27 <sup>B</sup>	0,005	0,556	0,009	0,753

Οι μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα (a, b, c) μεταξύ των ομάδων και (A, B, C, D) μεταξύ των χρονικών σημείων δειγματοληψίας διαφέρουν σημαντικά. <sup>a</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. <sup>β</sup>Επίδραση: Η διατροφική επέμβαση (Δ), ο χρόνος (X) και η αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων × χρόνος (Δ × X) αναλύθηκαν μέσω ANOVA χρησιμοποιώντας ένα γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και post-hoc ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την κατάλληλη χρήση της δοκιμής πολλαπλής εμβέλειας του Tukey.

#### 12.4. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ

Οι διαφορές των μέσων όρων στην δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων που μελετήθηκαν, στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και στους δείκτες οξειδωτικού στρες του πλάσματος του αίματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.7.

Αναλυτικά, η δραστικότητα της SOD αυξήθηκε ( $P = 0,014$ ) στο πλάσμα του αίματος των προβατινών που τους χορηγήθηκε σπιρουλίνα. Το ίδιο βρέθηκε για τις δραστικότητες των CAT, GSH-Px και GST στις προβατίνες των SP10 ( $P = 0,031$ ), SP15 ( $P < 0,001$ ) και SP5 ( $P = 0,026$ ) ομάδων, αντίστοιχα. Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα που μετρήθηκε με τον προσδιορισμό FRAP ήταν χαμηλότερη στο πλάσμα αίματος των προβατινών της SP10 ( $P = 0,020$ ). Επιπλέον, η ενσωμάτωση σπιρουλίνας μείωσε τα επίπεδα των PC στο πλάσμα αίματος των προβατινών ( $P < 0,001$ ). Όσον αφορά την επίδραση του χρόνου, την 45<sup>η</sup> και την 60<sup>η</sup> σε σύγκριση με την 15<sup>η</sup> πειραματική ημέρα, η δραστικότητα της SOD και τα επίπεδα της MDA αυξήθηκαν, ενώ οι δραστικότητες των GSH-Px, GR και GST μειώθηκαν.

#### 12.5. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Στον Πίνακα 12.7. παρουσιάζονται οι δραστικότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων, η αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς και τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες. Η ενσωμάτωση σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των προβατινών αύξησε τις δραστικότητες της SOD, CAT και GSH-Px στο γάλα, με τα αποτελέσματα να είναι σημαντικά για την SOD στις προβατίνες των SP10 και SP15 ομάδων ( $P < 0,007$ ) και για την CAT στις ομάδες SP5 και SP15 ( $P < 0,011$ ). Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, που μετρήθηκε με τη μέθοδο FRAP ( $P < 0,001$ ) και με την ABTS ( $P < 0,001$ ). Τέλος, η δραστικότητα της GSH-Px αυξήθηκε ( $P < 0,001$ ) ενώ η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ABTS μειώθηκε ( $P < 0,001$ ) σε όλη την πειραματική περίοδο.

**Πίνακας 12.7.** Οι δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/mL), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και οι δείκτες οξειδωτικής κατάστασης στο πλάσμα του αίματος και στο γάλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup> και 60<sup>η</sup> πειραματική ημέρα)

	Διατροφική επέμβαση (Δ)					Χρόνος (Ημέρες) (X)					Επίδραση <sup>β</sup>		
	CON	SP5	SP10	SP15	SEM <sup>α</sup>	15 <sup>η</sup>	30 <sup>η</sup>	45 <sup>η</sup>	60 <sup>η</sup>	SEM <sup>α</sup>	Δ	X	Δ×X
<b>Πλάσμα αίματος</b>													
SOD	14,42 <sup>b</sup>	16,66 <sup>a</sup>	17,01 <sup>a</sup>	17,53 <sup>a</sup>	16,39	14,17 <sup>B</sup>	14,54 <sup>B</sup>	18,39 <sup>A</sup>	18,39 <sup>A</sup>	16,44	0,014	<0,001	<0,001
CAT	19,34 <sup>b</sup>	21,45 <sup>ab</sup>	22,30 <sup>a</sup>	21,32 <sup>ab</sup>	0,26	20,92	20,48	21,64	21,40	0,52	0,031	0,178	<0,001
GSH-Px	0,24 <sup>b</sup>	0,27 <sup>b</sup>	0,27 <sup>b</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,27	0,34 <sup>A</sup>	0,22 <sup>C</sup>	0,28 <sup>B</sup>	0,23 <sup>C</sup>	0,27	<0,001	<0,001	<0,001
GR	0,05	0,05	0,05	0,05	0,001	0,049 <sup>B</sup>	0,053 <sup>A</sup>	0,049 <sup>B</sup>	0,046 <sup>C</sup>	0,05	0,820	<0,001	0,001
GST	0,14 <sup>b</sup>	0,18 <sup>a</sup>	0,17 <sup>ab</sup>	0,16 <sup>ab</sup>	0,16	0,17 <sup>B</sup>	0,16 <sup>B</sup>	0,19 <sup>A</sup>	0,14 <sup>C</sup>	0,16	0,026	<0,001	<0,001
ABTS	30,00	29,10	29,80	29,34	29,64	30,69	28,62	30,00	30,04	29,64	0,464	0,002	0,001
FRAP	0,94 <sup>a</sup>	0,90 <sup>ab</sup>	0,83 <sup>b</sup>	0,96 <sup>a</sup>	0,015	0,77 <sup>C</sup>	0,96 <sup>A</sup>	0,88 <sup>B</sup>	1,00 <sup>A</sup>	0,026	0,020	<0,001	<0,001
MDA	0,64	0,64	0,61	0,61	0,63	0,61 <sup>B</sup>	0,58 <sup>B</sup>	0,65 <sup>AB</sup>	0,67 <sup>A</sup>	0,64	0,677	0,049	0,411
PC	2,48 <sup>a</sup>	1,82 <sup>b</sup>	1,78 <sup>b</sup>	1,60 <sup>b</sup>	1,90	1,81 <sup>AB</sup>	2,09 <sup>A</sup>	1,74 <sup>B</sup>	2,01 <sup>A</sup>	1,90	<0,001	0,046	0,003
<b>Γάλα</b>													
SOD	131,39 <sup>a</sup>	143,13 <sup>ab</sup>	144,83 <sup>b</sup>	150,80 <sup>b</sup>	1,52	136,50	146,91	145,02	141,81	2,96	0,007	0,115	0,085
CAT	3,64 <sup>a</sup>	4,72 <sup>b</sup>	3,90 <sup>ab</sup>	4,60 <sup>b</sup>	0,13	4,22	4,29	4,37	4,02	0,26	0,011	0,736	<0,001
GSH-Px	0,25 <sup>a</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,58 <sup>b</sup>	0,62 <sup>c</sup>	0,02	0,29 <sup>D</sup>	0,35 <sup>C</sup>	0,75 <sup>A</sup>	0,65 <sup>B</sup>	0,02	<0,001	<0,001	<0,001
ABTS	48,00 <sup>a</sup>	52,73 <sup>b</sup>	51,62 <sup>b</sup>	54,86 <sup>b</sup>	0,60	55,48 <sup>A</sup>	54,39 <sup>AB</sup>	44,37 <sup>C</sup>	53,00 <sup>B</sup>	1,00	<0,001	<0,001	<0,001
FRAP	3,04 <sup>a</sup>	4,63 <sup>b</sup>	4,51 <sup>b</sup>	5,18 <sup>b</sup>	0,30	4,40 <sup>A</sup>	4,34 <sup>A</sup>	3,60 <sup>B</sup>	4,96 <sup>A</sup>	0,26	<0,001	0,001	0,242
MDA	0,23	0,26	0,23	0,19	0,05	0,17 <sup>C</sup>	0,27 <sup>B</sup>	0,28 <sup>AB</sup>	0,19 <sup>BC</sup>	0,03	0,114	0,001	0,285



PC	1,70 <sup>ab</sup>	1,90 <sup>a</sup>	1,65 <sup>ab</sup>	1,58 <sup>b</sup>	0,04	1,87 <sup>A</sup>	1,57 <sup>B</sup>	1,41 <sup>C</sup>	2,02 <sup>A</sup>	0,07	0,034	<0,001	<0,001
----	--------------------	-------------------	--------------------	-------------------	------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	------	-------	--------	--------

Οι μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα (a, b, c) μεταξύ των ομάδων και (A, B, C, D) μεταξύ των χρονικών σημείων δειγματοληψίας διαφέρουν σημαντικά. <sup>a</sup>SEM: Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. <sup>β</sup>Επίδραση: Η διατροφική επέμβαση ( $\Delta$ ), ο χρόνος ( $X$ ) και η αλληλεπίδραση μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων  $\times$  χρόνος ( $\Delta \times X$ ) αναλύθηκαν μέσω ANOVA χρησιμοποιώντας ένα γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και post-hoc ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την κατάλληλη χρήση της δοκιμής πολλαπλής εμβέλειας του Tukey. Η FRAP εκφράζεται ως  $\mu\text{M}$  ισοδύναμα ασκορβικού οξέος, η ABTS ως % αναστολή, η MDA ως  $\mu\text{M}$  MDA και τα PC ως  $\text{nmol/mL}$ .

## 12.6. ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΕΚΦΡΑΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η ενσωμάτωση 5 g σπιρουλίνας (SP5) στα μείγματα ΣΖ των προβατινών αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης των γονιδίων *TRIF* ( $P = 0,012$ ), *MAPK* ( $P = 0,010$ ) και *JUND* ( $P = 0,008$ ) στα μονοκύτταρα (Πίνακας 12.8.). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *IRF5* ( $P = 0,016$ ) αυξήθηκαν σημαντικά στα μονοκύτταρα της SP5 σε σύγκριση με την ομάδα CON, ενώ τα σχετικά επίπεδα έκφρασης *IRF3* έτειναν να αυξηθούν στην SP5 σε σύγκριση με τις CON και SP15 (Πίνακας 12.8.). Επιπλέον, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *TLR4*, *MYD88*, *TRAF3*, *STAT3*, *NFKB*, *TNFA*, *IL1B*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, *HMOX1*, *CCL5*, *CHUK*, και *CXCL16* δεν επηρεάστηκαν σημαντικά (Πίνακας 12.8.).

Όσον αφορά τα ουδετερόφιλα, βρέθηκε τάση προς μείωση στα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *TLR4* στην SP10 σε σύγκριση με την CON (Πίνακας 12.9.). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *MYD88* μειώθηκαν σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις ομάδες SP10 και SP15 σε σύγκριση με τις ομάδα CON και SP5, ενώ τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *NFKB* βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα ( $P = 0,010$ ) στην SP10 σε σύγκριση με την CON (Πίνακας 12.9.). Επιπλέον, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *STAT3* μειώθηκαν σημαντικά ( $P < 0,001$ ) στις ομάδες SP σε σύγκριση με την CON (Πίνακας 12.9.). Αντίθετα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *TRIF* αυξήθηκαν σημαντικά ( $P = 0,011$ ) στην ομάδα SP5 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες και βρέθηκε τάση προς αύξηση στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *TRAF3* και *IRF5* και στις ομάδες SP5 και SP15 σε σύγκριση με τις CON και SP10 (Πίνακας 12.9.). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των: *TLR4*, *TRAF3*, *IRF3*, *IRF5*, *MAPK*, *JUND*, *IL1B*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, *HMOX1*, *CHUK*, *CCL5* και *CXCL16* δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων (Πίνακας 12.9.).

**Πίνακας 12.8.** Η σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα μονοκύτταρα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)

Γονίδια	Διατροφική επέμβαση				SEM <sup>a</sup>	P
	CON	SP5	SP10	SP15		
<i>TLR4</i>	0,20	0,22	0,18	0,21	0,012	0,553
<i>MYD88</i>	0,60	0,83	0,58	0,70	0,043	0,118
<i>TRIF</i>	0,01 <sup>b</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,001	0,012
<i>TRAF3</i>	0,09 <sup>t</sup>	0,15 <sup>t</sup>	0,10	0,10	0,007	0,053
<i>IRF3</i>	0,02 <sup>t</sup>	0,04 <sup>t</sup>	0,03	0,02 <sup>t</sup>	0,001	0,056
<i>IRF5</i>	0,31 <sup>b</sup>	0,50 <sup>a</sup>	0,39 <sup>ab</sup>	0,37 <sup>ab</sup>	0,024	0,016
<i>MAPK</i>	0,25 <sup>b</sup>	0,38 <sup>a</sup>	0,30 <sup>b</sup>	0,33 <sup>b</sup>	0,013	0,010
<i>CHUK</i>	0,07	0,07	0,06	0,06	0,002	0,779
<i>JUND</i>	0,18 <sup>b</sup>	0,32 <sup>a</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,014	0,008
<i>STAT3</i>	0,20	0,21	0,20	0,20	0,007	0,933
<i>NFKB</i>	0,35 <sup>t</sup>	0,44 <sup>t</sup>	0,35 <sup>t</sup>	0,37	0,013	0,060
<i>TNFA</i>	0,08	0,07	0,08	0,08	0,006	0,123
<i>IL1B</i>	0,02	0,04	0,03	0,03	0,003	0,145
<i>IL2</i>	0,003 <sup>t</sup>	0,002	0,001 <sup>t</sup>	0,002	0,000	0,569
<i>IL6</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,926
<i>IL8</i>	0,15	0,11	0,05	0,04	0,027	0,339
<i>IL10</i>	0,01	0,02	0,01	0,01	0,001	0,247
<i>CCL5</i>	0,56	0,56	0,54	0,59	0,048	0,985
<i>CXCL16</i>	0,04	0,04	0,04	0,04	0,002	0,588
<i>HMOX1</i>	0,10	0,13	0,10	0,11	0,008	0,270

Συντομογραφίες: CON = επέμβαση μάρτυρα, SP5 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 5 g σπιρουλίνας, SP10 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 10 g σπιρουλίνας, SP15 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 15 g σπιρουλίνας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) μεταξύ των ομάδων διαφέρουν σημαντικά, t = τάση προς στατιστικώς σημαντική διαφορά (0,05 < t < 0,10). <sup>a</sup>SEM = τυπικός μέσος όρος σφάλματος, P = P τιμή.

**Πίνακας 12.9.** Η σχετική έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα ουδετερόφιλα των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)

Γονίδια	Διατροφική επέμβαση				SEM <sup>a</sup>	P
	CON	SP5	SP10	SP15		
<i>TLR4</i>	0,26 <sup>t</sup>	0,23	0,15 <sup>t</sup>	0,24	0,017	0,078
<i>MYD88</i>	1,30 <sup>a</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,78 <sup>b</sup>	0,021	<0,001
<i>TRIF</i>	0,01 <sup>b</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,001	0,011
<i>TRAF3</i>	0,05	0,08 <sup>t</sup>	0,06	0,08 <sup>t</sup>	0,005	0,089
<i>IRF3</i>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,001	0,435
<i>IRF5</i>	0,18 <sup>t</sup>	0,23 <sup>t</sup>	0,18 <sup>t</sup>	0,24 <sup>t</sup>	0,011	0,058
<i>MAPK</i>	0,33	0,35	0,29	0,32	0,011	0,210
<i>CHUK</i>	0,07	0,07	0,07	0,08	0,002	0,493
<i>JUND</i>	0,20	0,21	0,15	0,18	0,011	0,325
<i>STAT3</i>	0,30 <sup>a</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,009	<0,001
<i>NFKB</i>	0,36 <sup>a</sup>	0,36 <sup>a</sup>	0,27 <sup>b</sup>	0,33 <sup>ab</sup>	0,012	0,010
<i>TNFA</i>	0,17 <sup>a</sup>	0,15 <sup>ab</sup>	0,11 <sup>b</sup>	0,14 <sup>ab</sup>	0,007	0,034
<i>IL1B</i>	0,03	0,05	0,03	0,04	0,003	0,455
<i>IL2</i>	0,003	0,003	0,004	0,003	0,000	0,689
<i>IL6</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,294
<i>IL8</i>	0,08	0,03	0,03	0,05	0,009	0,151
<i>IL10</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,001	0,860
<i>CCL5</i>	1,35	1,47	1,83	1,30	0,104	0,235
<i>CXCL16</i>	0,04	0,04	0,05	0,04	0,002	0,731
<i>HMOX1</i>	0,09	0,10	0,06	0,08	0,006	0,283

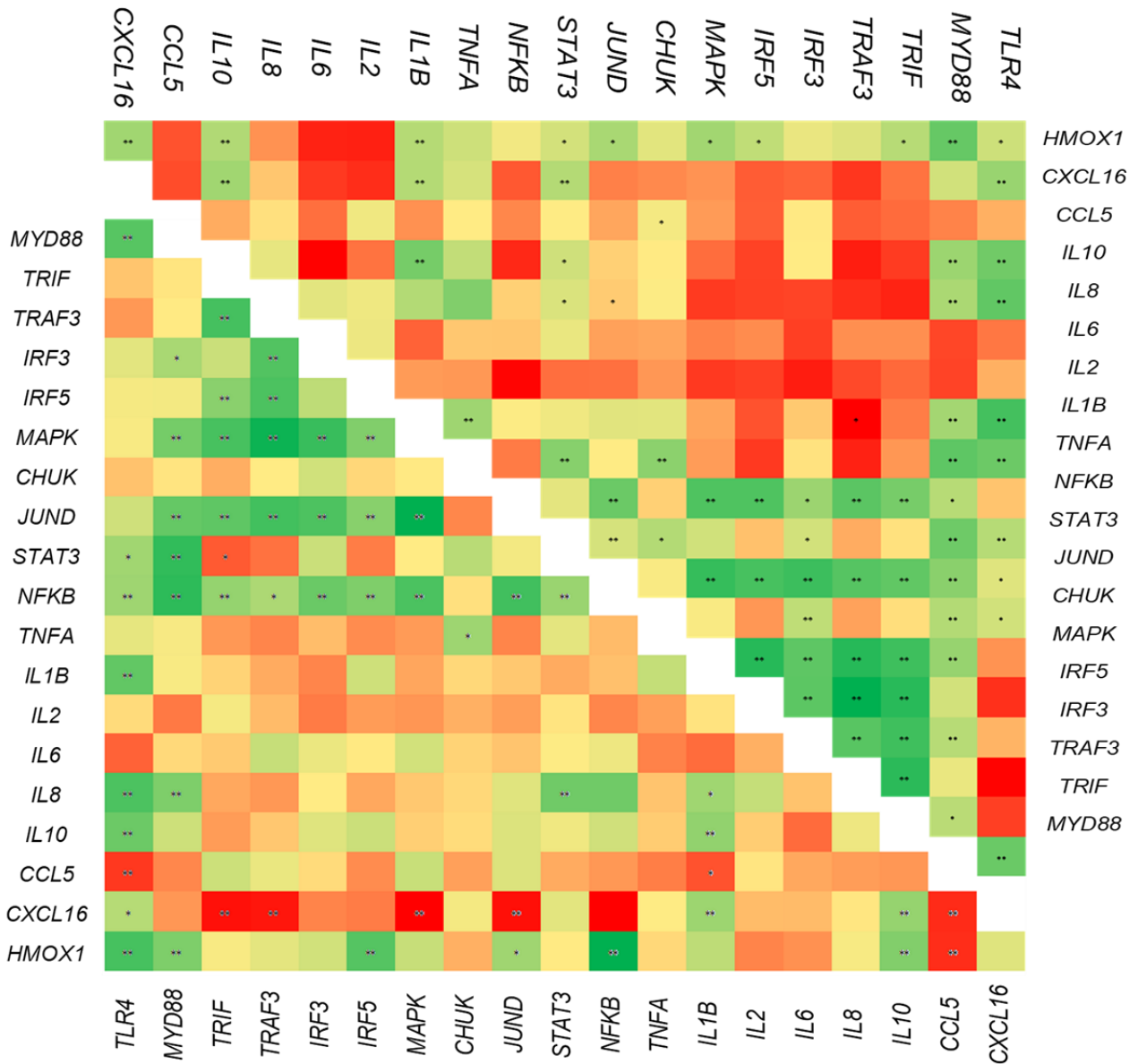
Συντομογραφίες: CON = επέμβαση μάρτυρα, SP5 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 5 g σπιρουλίνας, SP10 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 10 g σπιρουλίνας, SP15 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 15 g σπιρουλίνας. Οι μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) μεταξύ των ομάδων διαφέρουν σημαντικά, t = τάση προς στατιστικώς σημαντική διαφορά (0,05 < t < 0,10). <sup>a</sup>SEM = τυπικός μέσος όρος σφάλματος, P = P τιμή.

### 12.6.1. Συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων

Θετικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *TLR4* και *MYD88* στα μονοκύτταρα ( $r = 0,623$ ,  $P < 0,001$ ) και ουδετερόφιλα ( $r = 0,573$ ,  $P < 0,001$ ) καθώς και μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *TRIF* και *TRAF3* στα μονοκύτταρα ( $r = 0,804$ ,  $P < 0,001$ ) και ουδετερόφιλα ( $r = 0,623$ ,  $P < 0,001$ ) (Διάγραμμα 12.1.). Επίσης, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *MAPK* συσχετίστηκαν θετικά με του *MYD88* τόσο στα μονοκύτταρα ( $r = 0,406$ ,  $P = 0,005$ , Διάγραμμα 12.1.) όσο και στα ουδετερόφιλα ( $r = 0,489$ ,  $P = 0,001$ , Διάγραμμα 12.1.). Όσον αφορά τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *STAT3*, συσχετίστηκαν σημαντικά με των *TLR4* και *MYD88* στα μονοκύτταρα ( $r = 0,383$ ,  $P = 0,007$  και  $r = 0,635$ ,  $P < 0,001$ , αντίστοιχα, Διάγραμμα 12.1.) και στα ουδετερόφιλα ( $r = 0,368$ ,  $P = 0,013$  και  $r = 0,679$ ,  $P < 0,001$ , αντίστοιχα, Διάγραμμα 12.1.). Επιπλέον, στα μονοκύτταρα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *JUND* συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα έκφρασης του *TLR4* ( $r = 0,305$ ,  $P = 0,035$ ), ενώ τόσο στα μονοκύτταρα ( $r = 0,611$ ,  $P < 0,001$ ) όσο και στα ουδετερόφιλα ( $r = 0,679$ ,  $P < 0,001$ ) με του *MYD88* (Διάγραμμα 12.1.). Το επίπεδο των σχετικών επιπέδων έκφρασης *NFKB* συσχετίστηκε θετικά στα μονοκύτταρα και στα ουδετερόφιλα με τα επίπεδα των *MYD88* ( $r = 0,316$ ,  $P = 0,030$  και  $r = 0,692$ ,  $P < 0,001$ , αντίστοιχα, Διάγραμμα 12.1.), *TRIF* ( $r = 0,525$ ,  $P < 0,001$  και  $r = 0,402$ ,  $P < 0,001$ , αντίστοιχα, Διάγραμμα 12.1.), *TRAF3* ( $r = 0,621$ ,  $P < 0,001$  και  $r = 0,335$ ,  $P = 0,023$ , αντίστοιχα, Διάγραμμα 12.1.), *IRF3* ( $r = 0,363$ ,  $P = 0,011$  και  $r = 0,521$ ,  $P < 0,001$ , αντίστοιχα, Διάγραμμα 12.1.), *IRF5* ( $r = 0,622$ ,  $P < 0,001$  και  $r = 0,463$ ,  $P < 0,001$ , αντίστοιχα, Διάγραμμα 12.1.), *JUND* ( $r = 0,563$ ,  $P < 0,001$  και  $r = 0,636$ ,  $P < 0,001$ , αντίστοιχα, Διάγραμμα 12.1.) και *MAPK* ( $r = 0,596$ ,  $P < 0,001$  και  $r = 0,608$ ,  $P < 0,001$ , αντίστοιχα, Διάγραμμα 12.1.). Τόσο στα μονοκύτταρα ( $r = 0,373$ ,  $P = 0,010$ ) όσο και στα ουδετερόφιλα ( $r = 0,373$ ,  $P = 0,010$ ) τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *NFKB* συσχετίστηκαν θετικά και με τη σχετική έκφραση του *TLR4* (Διάγραμμα 12.1.).

Παράλληλα, τόσο στα μονοκύτταρα όσο και στα ουδετερόφιλα, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *IL1B* συσχετίστηκαν θετικά με του *TLR4* ( $r = 0,727$ ,  $P < 0,001$  και  $r = 0,543$ ,  $P < 0,001$ , αντίστοιχα, Διάγραμμα 12.1.), ενώ στα μονοκύτταρα συσχετίστηκαν θετικά και με του *MYD88* ( $r = 0,432$ ,  $P = 0,002$ , Διάγραμμα 12.1.). Επίσης, στα μονοκύτταρα ( $r = 0,488$ ,  $P < 0,001$ ) και στα ουδετερόφιλα ( $r = 0,516$ ,  $P < 0,001$ ), τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *TLR4* και *IL8* συσχετίστηκαν θετικά (Διάγραμμα 12.1.). Θετική ήταν η συσχέτιση μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης του *IL10* με των *TLR4* ( $r = 0,593$ ,  $P < 0,001$ , Διάγραμμα 12.1.) και *MYD88*

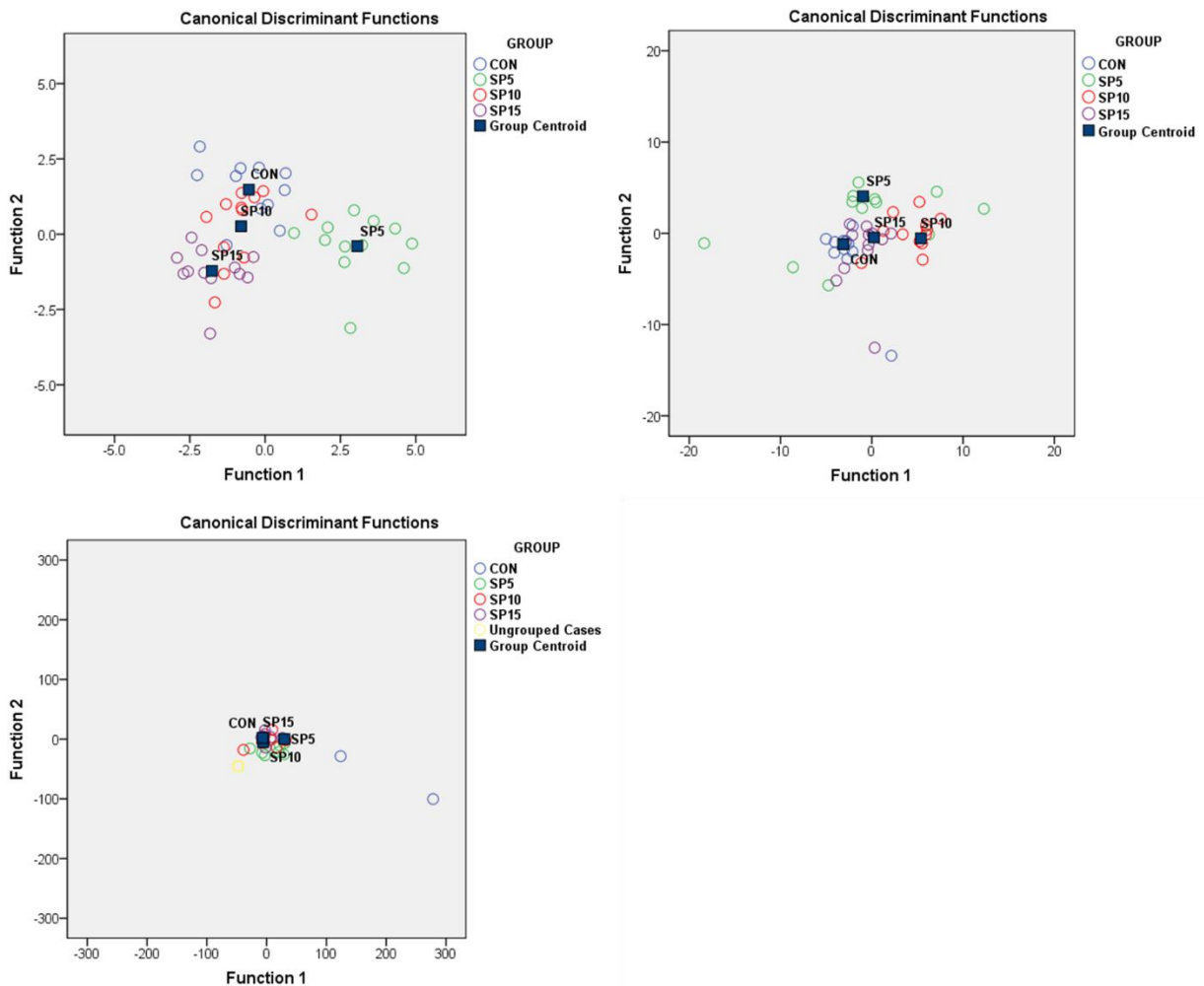
( $r = 0,412$ ,  $P = 0,004$ , Διάγραμμα 12.1.) στα μονοκύτταρα, ενώ στα ουδετερόφιλα συσχετίστηκαν θετικά με του *TLR4* ( $r = 0,516$ ,  $P < 0,001$ , Διάγραμμα 12.1.). Τέλος, στα μονοκύτταρα, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *TNFA* συσχετίστηκαν θετικά με του *TLR4* ( $r = 0,595$ ,  $P < 0,001$ , Διάγραμμα 12.1.) και του *MYD88* ( $r = 0,586$ ,  $P < 0,001$ , Διάγραμμα 12.1.).



**Διάγραμμα 12.1.** Γραφική απεικόνιση heatmap της συσχέτισης Pearson μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων στα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα

### 12.6.2. Αποτελέσματα διαχωριστικής ανάλυσης στα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα

Στα δεδομένα των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων ξεχωριστά, καθώς και στα συνδυασμένα επίπεδα σχετικής έκφρασης των γονιδίων σε αυτά, διεξήχθη σχετική ανάλυση (Διάγραμμα 12.2.) για να διερευνηθεί σε ποιο βαθμό τα δείγματα διαχωρίστηκαν με βάση τη διατροφική επέμβαση (CON, SP5, SP10 και SP15). Δεδομένης της διατροφικής επέμβασης και της εισαγωγής είκοσι ανεξάρτητων μεταβλητών (σχετικές γονιδιακές εκφράσεις) στο μοντέλο το 85,1 % των δειγμάτων κατατάχθηκε στη σωστή ομάδα αποκλειστικά στα μονοκύτταρα και 75,0 % αποκλειστικά στα ουδετερόφιλα, ενώ το 72,9 % όταν τα συνδυασμένα επίπεδα σχετικής έκφρασης των μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων (σαράντα μεταβλητές/σχετικές γονιδιακές εκφράσεις) εισήχθησαν μαζί στην ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, στα μονοκύτταρα, η συνάρτηση 1 εξήγησε το 67,3 % της διακύμανσης και η συνάρτηση 2 εξήγησε το 18,7 %. Ως εκ τούτου, το Wilk's  $\lambda$  βρέθηκε να ισούται με 0,06 για τη συνάρτηση 1 ( $P = 0,002$ ) και με 0,276 για τη συνάρτηση 2 ( $P = 0,239$ ). Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψιν τη μέθοδο stepwise, η μεταβλητή που συνέβαλε περισσότερο ήταν η *JUND*. Όσον αφορά τα ουδετερόφιλα, η συνάρτηση 1 εξήγησε το 70,0 % της διακύμανσης, ενώ η συνάρτηση 2 εξήγησε το 22,6 %. Το Wilk's  $\lambda$  βρέθηκε να είναι ίσο με 0,01 για τη συνάρτηση 1 ( $P = 0,019$ ) και με 0,09 για τη συνάρτηση 2 ( $P = 0,336$ ). Η *STAT3* ήταν η κύρια μεταβλητή που συνέβαλε στον διαχωρισμό μέσω της μεθόδου stepwise. Για τα συνδυασμένα επίπεδα σχετικής έκφρασης των μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων όταν εισήχθησαν μαζί στην ανάλυση, το 93,6 % της διακύμανσης εξηγήθηκε από τη συνάρτηση 1 και το 4,9 % από τη συνάρτηση 2, ενώ το Wilk's  $\lambda$  βρέθηκε να είναι ίσο με 0,00 για τη συνάρτηση 1 ( $P < 0,001$ ) και 0,02 ( $P = 0,270$ ) για τη συνάρτηση 2. Σύμφωνα με τη μέθοδο stepwise, οι μεταβλητές που συνέβαλαν στο διαχωρισμό ήταν οι *MAPK*, *STAT3* και *IL8* από τα μονοκύτταρα και η *MYD88* από τα ουδετερόφιλα.



**Διάγραμμα 12.2.** Γραφική απεικόνιση της ανάλυσης που διαχωρίζει τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON, SP5, SP10 και SP15) σύμφωνα με τη σχετική έκφραση γονιδίων των: a) μονοκυττάρων, b) ουδετεροφίλων, c) μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων και d) μονοκυττάρων έναντι ουδετεροφίλων

## 12.7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΝΕΑΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ

Η μεταγονιδιωματική αλληλούχιση των DNA που απομονώθηκαν από συγκεντρωμένα δείγματα (pooled) Y.M.K. είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση 19, 20, 17 και 19 φύλα, 50, 48, 53 και 49 οικογένειες και 108, 90, 91 και 90 γένη για τις CON, SP5, SP10 και SP15, αντίστοιχα. Ορίστηκε ελάχιστο κριτήριο ομοιότητας το 85 % και ελάχιστο σκορ ποιότητας 15 και περίπου 100.000 αναγνώσεις/δείγμα αντιστοιχίστηκαν σε διάφορα ταξινομικά επίπεδα με μέση βαθμολογία ομοιότητας 90 %. Η σάρωση είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση μεγάλου αριθμού ειδών τα



οποία δεν μπορούν να αναφερθούν στο σύνολό τους. Στον Πίνακα 12.10. και στο Διάγραμμα 12.3. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωμιακής σάρωσης των DNA που απομονώθηκαν από τα συνονθυλευμένα δείγματα Υ.Μ.Κ. για κάθε ομάδα σε επίπεδο φύλου. Το υψηλότερο ποσοστό για το φύλο *Bacteroidetes* ανιχνεύτηκε στην ομάδα CON (39,3 %) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες (26,5 %, 36,1 % και 29,2 % για τις SP5, SP10, SP15, αντίστοιχα). Αντίθετα, το φύλο *Firmicutes* βρέθηκε υψηλότερο στην ομάδα SP15 (63,0 %) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες (50,7 %, 59,4 % και 55,3 %, για τις CON, SP5 και SP10, αντίστοιχα). Όσον αφορά τα *Proteobacteria*, το μεγαλύτερο ποσοστό απαντήθηκε στην ομάδα SP5 (12,5 %) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες διατροφικές επεμβάσεις (7,9 %, 6,2 % και 5,8 % για τις CON, SP10 και SP15, αντίστοιχα). Ο λόγος *Firmicutes*:*Bacteroidetes* βρέθηκε στο υψηλότερο επίπεδο για την ομάδα SP5 και SP15 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες.

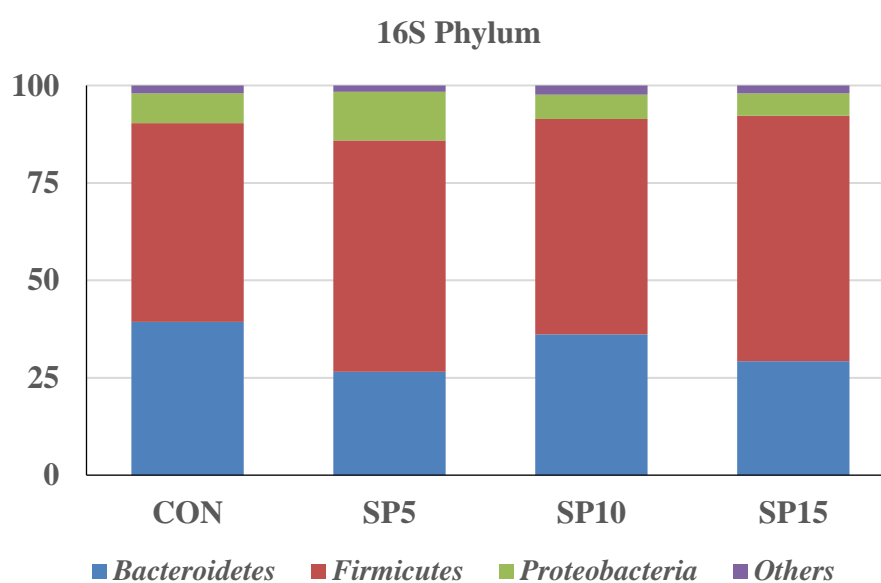
Η κλάση των *Bacteroidia* ήταν η κυρίαρχη στην ομάδα CON ακολουθούμενη από την κλάση *Clostridia*, *Gammaproteobacteria* κ.α. Οι κλάσεις των *Clostridia* και *Bacteroidia* ήταν οι κυρίαρχες και για τις ομάδες που ενσωματώθηκε σπιρουλίνα στα μείγματα ΣΖ ακολουθούμενες από την κλάση *Negativicutes* και *Gammaproteobacteria*.

Η οικογένεια *Prevotellaceae* ήταν η κυρίαρχη και για τις τέσσερις διατροφικές επεμβάσεις (CON: 37,4 %, SP5: 24,1 %, SP10: 32,8 % και SP15: 26,6 %, αντίστοιχα) με την οικογένεια *Lachnospiraceae* να ακολουθεί. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε επίπεδο οικογένειας παρατίθεται στο Διάγραμμα 12.4.

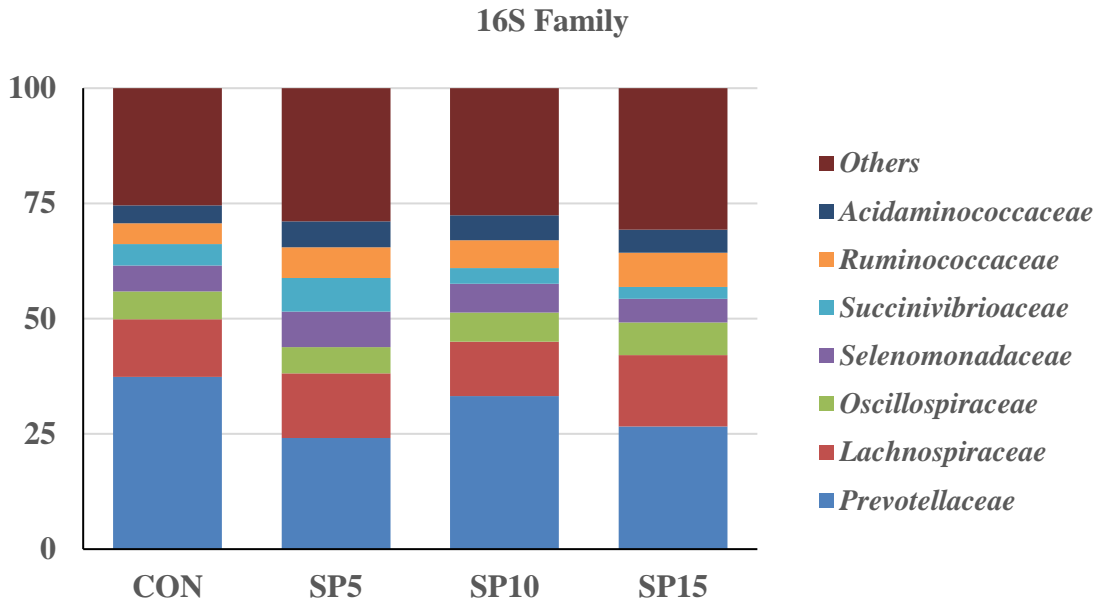
Τα βακτήρια του γένους *Prevotella* ήταν οι κύριοι εκπρόσωποι του φύλου *Bacteroidetes* και για τις τέσσερις ομάδες (Διάγραμμα 12.4.). Το υψηλότερο ποσοστό βρέθηκε στην ομάδα CON (36,0 %) σε σύγκριση με τις SP5 (23,3 %), SP10 (31,9 %) και SP15 (25,5 %). Τα κυρίαρχα βακτήρια του εν λόγω γένους ήταν τα *Prevotella ruminicola* και για τις τέσσερις επεμβάσεις. Επιπλέον, το γένος *Butyrivibrio* βρέθηκε να ακολουθεί για την ομάδα CON, ενώ τα φύλα *Ruminococcus*, *Ruminobacter* και *Butyrivibrio* ακολούθησαν για τις ομάδες SP, αντίστοιχα. Σε επίπεδο είδους αξίζει να σημειωθεί ότι είδος *Ruminobacter amylophilus* βρέθηκε στο χαμηλότερο επίπεδο στις ομάδες SP (Διάγραμμα 12.5.).

**Πίνακας 12.10.** Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ) σε επίπεδο φύλου

	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Λοιπά</i>	<i>Firmicutes:Bacteroidetes</i>
	%				
<b>CON</b>	39,3	50,7	7,9	2,1	1,3
<b>SP5</b>	26,5	59,4	12,5	1,6	2,2
<b>SP10</b>	36,1	55,3	6,2	2,4	1,5
<b>SP15</b>	29,2	63,0	5,8	2,0	2,2



**Διάγραμμα 12.3.** Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10, SP15) σε επίπεδο φύλου



**Διάγραμμα 12.4.** Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10, SP15) σε επίπεδο οικογένειας



**Διάγραμμα 12.5.** Μεταγονιδιωματική σάρωση του γενωμικού DNA του υγρού μεγάλης κοιλίας των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10, SP15) σε επίπεδο γένους

## 12.8. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΥΓΡΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ

Η κανονικοποίηση των μικροοργανισμών στο Υ.Μ.Κ. μέσω της ανίχνευσης και τον προσδιορισμό τους με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε με τη σχετική αφθονία των ολικών βακτηρίων (16S). Οι διαφορές στους μέσους όρους της σχετικής αφθονίας των μικροοργανισμών στο Υ.Μ.Κ. των διαφορετικών διατροφικών επεμβάσεων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.11. Η σχετική αφθονία των *Bacteroidetes*, τα *Firmicutes* καθώς και ο λόγος των Firmicutes:Bacteroidetes δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Πίνακα 12.11.). Η σχετική αφθονία του είδους *Prevotella brevis* αυξήθηκε σημαντικά ( $P = 0,001$ ) στις SP5 και SP10 σε σύγκριση με τις CON και SP15 (Πίνακα 12.11.). Από την άλλη, υπήρξε τάση προς αύξηση στη σχετική αφθονία των *Protozoa* στην ομάδα SP15 (Πίνακα 12.11.). Οι σχετικές αφθονίες των μυκήτων, των *Archaea* και των *Methanogen* δεν διέφεραν σημαντικά (Πίνακα 12.11.). Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε τάση προς αύξηση για τη σχετική αφθονία του *Methanobrevibacter* στο μεγαλύτερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (SP15) (Πίνακα 12.11.). Επίσης, η σχετική αφθονία του είδους *Ruminobacter amylophilus* μειώθηκε σημαντικά στην SP10 σε σύγκριση με τον μάρτυρα ( $P = 0,012$ ), ενώ υπήρξε τάση προς αύξηση για τη σχετική αφθονία του είδους *Ruminococcus albus* στην SP15 σε σύγκριση με τις CON και SP10 (Πίνακα 12.11.). Επιπλέον, η σχετική αφθονία των *Fibrobacter succinogenes* ( $P = 0,008$ ) και *Eubacterium ruminantium* ( $P = 0,005$ ) αυξήθηκε σημαντικά στην SP15 (Πίνακα 12.11.).

**Πίνακας 12.11.** Σχετική ποσότητα επιλεγμένων μικροοργανισμών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)

	Διατροφικές επεμβάσεις					
	CON	SP5	SP10	SP15	SEM <sup>a</sup>	P
Bacteroidetes	0,422	0,530	0,474	0,427	0,026	0,421
Firmicutes	0,349	0,386	0,500	0,344	0,047	0,640
Firmicutes:Bacteroidetes	0,842	0,778	0,938	0,853	0,054	0,786
<i>Prevotella sp.</i>	0,259	0,324	0,268	0,313	0,015	0,356
<i>Prevotella ruminicola</i>	0,162	0,170	0,155	0,140	0,007	0,511
<i>Prevotella brevis</i>	0,007 <sup>b</sup>	0,012 <sup>a</sup>	0,012 <sup>a</sup>	0,008 <sup>b</sup>	0,001	0,001
Protozoa	0,032 <sup>t</sup>	0,033 <sup>t</sup>	0,035 <sup>t</sup>	0,062 <sup>t</sup>	0,005	0,060

Total Fungi	0,0006	0,0006	0,0005	0,0007	0,0001	0,462
<i>Neocallimastigales</i>	0,0005	0,0005	0,0005	0,0006	0,0001	0,715
<i>Entodinium</i>	0,010	0,010	0,012	0,016	0,001	0,215
Archaea	0,009	0,009	0,013	0,017	0,001	0,128
Total Methanogens	0,001	0,001	0,001	0,001	0,0002	0,554
<i>Methanomassiliicoccales</i>	0,009	0,011	0,009	0,011	0,001	0,821
<i>Methanobrevibacter</i>	0,00001 <sup>t</sup>	0,00001 <sup>t</sup>	0,00006	0,00008 <sup>t</sup>	<0,0001	0,053
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,343
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0,0004	0,0007	0,0007	0,0005	0,0001	0,723
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	0,006 <sup>a</sup>	0,003 <sup>ab</sup>	0,002 <sup>b</sup>	0,003 <sup>ab</sup>	0,001	0,012
<i>Ruminococcus albus</i>	0,010 <sup>t</sup>	0,012	0,010 <sup>t</sup>	0,016 <sup>t</sup>	0,001	0,095
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	0,090	0,097	0,093	0,103	0,005	0,893
<i>Butyrivibrio Proteoclasticus</i>	0,020	0,019	0,020	0,018	0,001	0,823
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	0,007 <sup>b</sup>	0,008 <sup>b</sup>	0,007 <sup>b</sup>	0,014 <sup>a</sup>	0,001	0,008
<i>Selenomonas ruminantium</i>	0,020	0,012	0,014	0,013	0,001	0,121
<i>Streptococcus bovis</i>	0,0005	0,0003	0,0003	0,0003	<0,0001	0,111
<i>Eubacterium ruminantium</i>	0,0013 <sup>b</sup>	0,0019 <sup>b</sup>	0,0017 <sup>b</sup>	0,0029 <sup>a</sup>	0,0002	0,005

Συντομογραφίες: CON = επέμβαση μάρτυρα, SP5 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 5 g σπιρουλίνα, SP10 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 10 g σπιρουλίνα, SP15 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 15 g σπιρουλίνα. Οι μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) μεταξύ των ομάδων διαφέρουν σημαντικά, t = τάση προς στατιστικώς σημαντική διαφορά (0,05 < t < 0,10). <sup>a</sup>SEM = τυπικός μέσος όρος σφάλματος, P = P τιμή.

## 12.9. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΣΤΕΡΕΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ

Η σχετική αφθονία των *Bacteroidetes*, *Firmicutes* καθώς και ο λόγος των *Firmicutes*:*Bacteroidetes* δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων διατροφικών επεμβάσεων (Πίνακας 12.12.). Επίσης, η σχετική αφθονία των *Protozoa* δεν διέφερε σημαντικά (Πίνακας 12.12.). Η σχετική αφθονία των μυκήτων, των *Archaea* και *Methanogen* δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων (Πίνακας 12.12.). Παρόλα αυτά, βρέθηκε τάση προς αύξηση για τη σχετική αφθονία του *Methanobrevibacter* στο μεγαλύτερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (SP15) στα μείγματα ΣΖ σε σύγκριση με την SP5 (Πίνακας 12.12.). Αντίθετα, η σχετική αφθονία

του είδους *Ruminobacter amylophilus* μειώθηκε σημαντικά στις επεμβάσεις με σπιρουλίνα σε σύγκριση με τον μάρτυρα ( $P < 0.001$ ), ενώ του *Ruminococcus albus* αυξήθηκε σημαντικά στην SP15 σε σύγκριση με την CON ( $P = 0,046$ ) (Πίνακας 12.12.). Επιπλέον, η σχετική αφθονία του είδους *Fibrobacter succinogenes* μειώθηκε σημαντικά στην SP5 και SP10 σε σύγκριση με την CON ( $P = 0,017$ ), ενώ η σχετική αφθονία του *Selenomonas ruminantium* μειώθηκε σημαντικά ( $P = 0,001$ ) στις ομάδες SP5 και SP15 σε σύγκριση με την CON (Πίνακας 12.12.). Τέλος, η σχετική αφθονία του είδους *Streptococcus bovis* μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες SP σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα (CON) ( $P < 0,001$ ) (Πίνακας 12.12.).

**Πίνακας 12.12.** Σχετική ποσότητα επιλεγμένων μικροοργανισμών στο στερεό περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας των προβατινών των διατροφικών επεμβάσεων (CON, SP5, SP10 και SP15) με διαφορετικά επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (5 g, 10 g και 15 g στο μείγμα ΣΖ)

	Διατροφικές επεμβάσεις					
	CON	SP5	SP10	SP15	SEM <sup>a</sup>	P
Bacteroidetes	0,390	0,428	0,452	0,413	0,014	0,472
Firmicutes	0,952	0,900	0,768	0,880	0,011	0,688
Firmicutes:Bacteroidetes	0,960	0,921	0,789	0,906	0,034	0,313
<i>Prevotella sp.</i>	0,230	0,266	0,251	0,244	0,010	0,701
<i>Prevotella ruminicola</i>	0,035	0,031	0,029	0,029	0,001	0,282
<i>Prevotella brevis</i>	0,023	0,028	0,025	0,024	0,0002	0,694
Protozoa	0,026	0,032	0,029	0,039	0,003	0,229
Total Fungi	0,003	0,002	0,002	0,003	0,0002	0,500
<i>Neocallimastigales</i>	0,018	0,011	0,010	0,014	0,0001	0,221
<i>Entodinium</i>	0,070	0,059	0,071	0,079	0,001	0,861
Archaea	0,013	0,012	0,014	0,015	0,001	0,397
Total Methanogens	0,0013	0,0016	0,009	0,0015	0,0001	0,460
<i>Methanomassiliicoccales</i>	0,0013	0,0013	0,0011	0,0011	0,0001	0,613
<i>Methanobrevibacter</i>	0,00018	0,00007 <sup>t</sup>	0,00014	0,00029 <sup>t</sup>	<0,0001	0,060
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	0,0003	0,0002	0,0003	0,0003	<0,0001	0,793
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0,0008	0,0008	0,0010	0,0011	0,0001	0,886
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	0,012 <sup>a</sup>	0,006 <sup>b</sup>	0,004 <sup>b</sup>	0,002 <sup>b</sup>	0,001	<0,001
<i>Ruminococcus albus</i>	0,007 <sup>b</sup>	0,010 <sup>ab</sup>	0,010 <sup>ab</sup>	0,012 <sup>a</sup>	0,001	0,046

<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	0,087	0,080	0,081	0,090	0,002	0,377
<i>Butyrivibrio Proteoclasticus</i>	0,037	0,028	0,029	0,032	0,002	0,187
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	0,023 <sup>a</sup>	0,010 <sup>b</sup>	0,009 <sup>b</sup>	0,017 <sup>ab</sup>	0,002	0,017
<i>Selenomonas ruminantium</i>	0,010 <sup>a</sup>	0,005 <sup>b</sup>	0,007 <sup>ab</sup>	0,004 <sup>b</sup>	0,001	0,001
<i>Streptococcus bovis</i>	0,0007 <sup>a</sup>	0,0003 <sup>b</sup>	0,0003 <sup>b</sup>	0,0002 <sup>b</sup>	0,0001	<0,001
<i>Eubacterium ruminantium</i>	0,006	0,007	0,006	0,007	0,0004	0,416

Συντομογραφίες: CON = επέμβαση μάρτυρα, SP5 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 5 g σπιρουλίνα, SP10 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 10 g σπιρουλίνα, SP15 = διατροφική επέμβαση με χορήγηση 15 g σπιρουλίνα. Οι μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) μεταξύ των ομάδων διαφέρουν σημαντικά, t = τάση προς στατιστικώς σημαντική διαφορά (0,05 < t < 0,10). <sup>a</sup>SEM = τυπικός μέσος όρος σφάλματος, P = P τιμή.

## **13. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 2<sup>ΟΥ</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ**

### **13.1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΗ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**

Μέχρι και σήμερα, δεν υπάρχουν διαθέσιμες έρευνες σχετικά με τη χορήγηση σπιρουλίνας ως συμπλήρωμα στη διατροφή των γαλακτοπαραγωγών προβατινών, ενώ υπάρχουν κάποιες στη διατροφή γαλακτοπαραγωγών αγελάδων.

Υπάρχουν διαφοροποιήσεις σχετικά με την επίδραση που έχει η σπιρουλίνα στην απόδοση και τη χημική σύσταση του αγελαδινού γάλακτος. Πιο συγκεκριμένα, η γαλακτοπαραγωγή και η χημική σύσταση του γάλακτος των αγελάδων δεν επηρεάστηκε όταν ενσωματώθηκαν 40 g/ημέρα σπιρουλίνας στο μείγμα ΣΖ (Christaki *et al.*, 2012). Το ίδιο διαπιστώθηκε, όταν η σόγια αντικαταστάθηκε από σπιρουλίνα (5 %) σε σιτηρέσιο αγελάδων (Manzocchi *et al.*, 2020). Αντίθετα, διαπιστώθηκε αύξηση στην παραγωγή του αγελαδινού γάλακτος και στην περιεκτικότητα σε λίπος, όταν τα ζώα κατανάλωναν 200 g σπιρουλίνας ημερησίως (Kulrps *et al.*, 2009). Αύξηση της γαλακτοπαραγωγής, της περιεκτικότητας σε λίπος, πρωτεΐνες και λακτόζη παρατηρήθηκε επίσης στις αγελάδες, όταν χορηγήθηκαν 2 g σπιρουλίνας σε μια διατροφή στηριζόμενη στη βοσκή (Simkus *et al.*, 2007). Επιπλέον, μείωση της λιποπεριεκτικότητας έχει αναφερθεί σε αγελάδες που στα σιτηρέσιά τους ενσωματώθηκαν 7,4 g αποξηραμένης σπιρουλίνας/kg ΞΟ (Ρότι *et al.*, 2015). Τα διαφορετικά αυτά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στη χημική σύσταση της σπιρουλίνας (πρωτεΐνη, ολικές λιπαρές ουσίες κ.α.), τη μορφή της (νωπή-αποξηραμένη), το επίπεδο ενσωμάτωσης στο σιτηρέσιο, τη σύσταση του σιτηρεσίου, τη φυσιολογία του ζώου, το επίπεδο ενέργειας και πρωτεϊνών στο σιτηρέσιο ή τις πειραματικές συνθήκες.

### **13.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΥΓΡΟ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ**

Το γεγονός ότι η σπιρουλίνα που ενσωματώθηκε στα μείγματα ΣΖ των ομάδων SP ως πρόσθετο, ήταν χαμηλής περιεκτικότητας σε ολικές λιπαρές ουσίες, πιθανώς να αιτιολογεί τις μικρές τροποποιήσεις στο προφίλ των ΛΟ στο Υ.Μ.Κ. των προβατινών. Αντίθετα, η συγκέντρωση του C18:0 μειώθηκε σημαντικά γεγονός που πιθανώς να υποδηλώνει μικρού βαθμού αναστολή της βιοϋδρογόνωσης των PUFA σε C18:0 στη Μ.Κ.



### 13.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ

Η ενσωμάτωση σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των αγελάδων δεν τροποποίησε τις συγκεντρώσεις των C14:0 και C16:0 στο γάλα τους (Manzocchi *et al.*, 2020), σε αντίθεση με ό,τι παρατηρήθηκε στην εν λόγω διατριβή για τη συγκέντρωση του C16:0 και κατά συνέπεια τη συγκέντρωση των MCFA στο πρόβειο γάλα. Επίσης, βρέθηκε σημαντική μείωση στη συγκέντρωση του C14:0 στο γάλα αγελάδων που διατρέφονταν με σιτηρέσιο που περιείχε σπιρουλίνα κατά τη 15η πειραματική ημέρα, αλλά όχι κατά την 35η και την 45η ημέρα, καθιστώντας τις τροποποιήσεις αυτές σύμφωνες με τα ευρήματά της παρούσας διατριβής (Christaki *et al.* , 2012).

Αντίθετα, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής που αφορούν το υψηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας συμφωνούν με αυτά των Christaki *et al.* (2012), οι οποίοι βρήκαν αύξηση στη συγκέντρωση των PUFA στο αγελαδινό γάλα. Πιο συγκεκριμένα, οι Christaki *et al.* (2012) ανέφεραν σημαντική αύξηση την 45η πειραματική ημέρα στην περιεκτικότητα του *cis* C18:2 n-6 στο γάλα αγελάδων που τους χορηγήθηκε σιτηρέσιο στο οποίο είχε ενσωματωθεί σπιρουλίνα, το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με όσα παρατηρήθηκαν για το συγκεκριμένο ΛΟ τόσο στο αίμα όσο και στο γάλα των προβατινών που διατρέφονταν με το υψηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης (SP15). Από τα PUFA, το C18:3 n-6 είναι το χαρακτηριστικό ΛΟ της σπιρουλίνας (Madeira *et al.*, 2017) η κατανάλωση της οποίας δύναται να αυξήσει τα επίπεδά του στο πλάσμα. Παρόλα αυτά αυτή η αύξηση δεν παρατηρήθηκε στο γάλα προβατινών που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν σπιρουλίνα. Αντίστοιχα, έχει παρατηρηθεί μικρού επιπέδου αύξηση στη συγκέντρωση του C18:3 n-6 σε γάλα των αγελάδων που τους χορηγήθηκε σπιρουλίνα (Manzocchi *et al.*, 2020), το οποίο θεωρείται επιθυμητό στη διατροφή των ανθρώπων λόγω των υποχοληστερολαιμικών ιδιοτήτων του (Sugano *et al.*, 1986). Ωστόσο, η επίδραση της ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα μείγματα των ΣΖ στην εν λόγω διατριβή τόσο στον ΑΙ όσο και στον ΤΙ στο πρόβειο γάλα μπορεί να θεωρηθεί ως ευεργετικό εύρημα για την ανθρώπινη υγεία (Fehily *et al.*, 1994), ενώ δεν μπορεί να αξιολογηθεί με την ίδια βεβαιότητα η συγκέντρωση σε *trans* C18:1 η επίδραση των οποίων εξακολουθεί να συζητείται ως αμφιλεγόμενη (de Souza *et al.*, 2015). Η συγκέντρωση των MUFA μεταξύ των διατροφικών επεμβάσεων δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Αντίθετα, οι Róti *et al.* (2015) παρατήρησαν ότι η ενσωμάτωση σπιρουλίνας στο σιτηρέσιο αγελάδων προκάλεσε αύξηση στη συγκέντρωση των MUFA. Αυτά τα αποτελέσματα

ενδέχεται να δείχνουν διαφορές μεταξύ ειδών και συγκεκριμένα μεταξύ αγελάδων και μικρών μηρυκαστικών (προβατίνες και αίγες) και μπορούν επίσης να αιτιολογηθούν από τα ευρήματα των Kouřimská *et al.* (2014) οι οποίοι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, βρήκαν σημαντική μείωση στο C16:0 και αύξηση στο *cis* C18:2 n-6 στο γάλα αιγών που διατρέφονταν με σιτηρέσιο που περιείχε 10 g εκχυλίσματος χαμηλής περιεκτικότητας σε αιθέρα *Chlorella vulgaris*. Άλλα μικροφύκη με υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικές λιπαρές ουσίες (π.χ. *Schizochytrium* sp.) έχουν ισχυρότερη επίδραση στη τροποποίηση του προφίλ των ΛΟ του γάλακτος μέσω εντελώς διαφορετικών φυσιολογικών οδών, δεδομένου ότι η υψηλή περιεκτικότητά τους σε PUFA επηρεάζει τη διαδικασία της βιοϋδρογόνωσης της Μ.Κ. Συμπερασματικά, το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος των μικρών μηρυκαστικών μπορεί να τροποποιηθεί μέσω της ενσωμάτωσης μικροφυκών στα σιτηρέσια, αλλά το επίπεδο τροποποίησης σχετίζεται στενά με την περιεκτικότητά τους σε ολικές λιπαρές ουσίες (Tsiplakou *et al.*, 2017a, Tsiplakou *et al.*, 2017b, Mavrommatis & Tsiplakou, 2020a, Mavrommatis *et al.*, 2021a) και τα επίπεδα ενσωμάτωσης (Mavrommatis & Tsiplakou, 2020a).

#### **13.4. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**

Οι αντιοξειδωτικές και θεραπευτικές ιδιότητες της σπιρουλίνας αποδίδονται στις πρωτεΐνες, τους πολυσακχαρίτες, τα PUFA, τις βιταμίνες, τα καροτινοειδή και άλλες βιοδραστικές ενώσεις (φαινόλες, χλωροφύλλη κ.λπ.) με αντιοξειδωτική δράση (Liestianty *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2021). Η σπιρουλίνα αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων και αυξάνει τις δραστηριότητες των SOD, CAT και GSH-Px σε διάφορους τύπους κυττάρων μετά από έκθεση σε οξειδωτικό στρες *in vitro* (Wu *et al.*, 2016). Έχει διαπιστωθεί γραμμική αύξηση στις δραστηριότητες των SOD, CAT και υπεροξειδάσης και αυξημένες συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε καλλιεργημένα κύτταρα με σπιρουλίνα, η οποία συνοδεύτηκε επίσης από αύξηση των ποσοτήτων κυτταρικών αντιοξειδωτικών ενώσεων (λιπόφιλα και υδρόφιλα) (Abd El-Baky *et al.*, 2009). Τα ευρήματα από τις *in vivo* μελέτες είναι επίσης όμοια. Πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε MDA και τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία μειώθηκαν ενώ οι δραστηριότητες των SOD, GSH και GST αυξήθηκαν στον ορό ασθενών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια που λάμβαναν σπιρουλίνα (Ismail *et al.*, 2014). Αύξηση στις δραστηριότητες των GSH-Px, GSH και GR και αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στο ήπαρ κουνελιών που προηγουμένως διατρέφονταν με σιτηρέσιο

υψηλής χοληστερόλης διαπιστώθηκε με την κατανάλωση σπιρουλίνας (Kim *et al.*, 2010). Αύξηση της δραστηριότητας της GSH στο αίμα και μείωση της περιεκτικότητας του ορού του αίματος σε MDA βρέθηκε σε παχυνόμενα αρνιά όταν έλαβαν 1 g/10 kg ΣΒ/ημέρα σπιρουλίνα (El-Sabagh *et al.*, 2014).

Αύξηση της δραστηριότητας της SOD και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού και του μήκιστου θωρακικού και οσφυϊκού μυ (*Longissimus thoracis et lumborum*) των προβάτων παρατηρήθηκε όταν το υψηλής ενέργειας σιτηρέσιο τους συμπληρώθηκε με 3 και όχι με 1 % σπιρουλίνα (Liang *et al.*, 2020). Επιπλέον, ούτε τα 15 ούτε τα 30 g σπιρουλίνας είχαν επίδραση στο οξειδωτικό στρες κατά τη μεταβατική περίοδο στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής που διατηρούνταν σε βοσκή (Garcés *et al.*, 2019). Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι η οξειδωτική κατάσταση των προβατινών σε αυτή τη μελέτη, βελτιώθηκε με όλα τα επίπεδα ενσωμάτωσης σπιρουλίνας, παρά το γεγονός ότι τα ζώα δεν αντιμετώπιζαν οξειδωτικό στρες. Ομοίως, αύξηση στις δραστηριότητες των GSH-Px και SOD κατά 240 και 60 % αντίστοιχα, διαπιστώθηκε σε υγιείς αρουραίους που έλαβαν σπιρουλίνα (Guldas *et al.*, 2021). Αυτά τα ευρήματα μπορεί να δείξουν τις ευεργετικές επιδράσεις της σπιρουλίνας, στον οργανισμό του ζώου για την αντιμετώπιση μελλοντικών προκλήσεων, συμπεριλαμβανομένων στρεσογόνων παραγόντων. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι πιο έντονες επιδράσεις της σπιρουλίνας στο οξειδωτικό ισοζύγιο του οργανισμού των προβατινών παρατηρήθηκαν με το υψηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης, το επίπεδο ενσωμάτωσης πρέπει να καθοριστεί σε σχέση με το φυσιολογικό στάδιο και τις συνθήκες των ζώων για να διασφαλιστεί η αποτελεσματικότητά του.

Μικροφύκη όπως η *Chlorella* και η σπιρουλίνα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της θρεπτικής αξίας και της οξειδωτικής σταθερότητας του γάλακτος (Tsiplakou *et al.*, 2017a, Tsiplakou *et al.*, 2017b) και του γιαουρτιού (Beheshtipour *et al.*, 2012; Barkallah *et al.*, 2017). Πράγματι, η περιεκτικότητα σε β-καροτένιο του αγελαδινού γάλακτος αυξήθηκε και η συνολική οξειδωτική του ικανότητα δεν άλλαξε όταν η σόγια αντικαταστάθηκε εν μέρει από σπιρουλίνα (5 %) σε σιτηρέσιο με βάση το σανό (Manzocchi *et al.*, 2020). Από την άλλη, έχει παρατηρηθεί βελτίωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, που προσδιορίζεται με τις μεθόδους DPPH και FRAP, σε γιαούρτια στα οποία προστέθηκε σκόνη σπιρουλίνας σε ποσοστό 0,25 % (Barkallah *et al.*, 2017). Επιπλέον, σε συμφωνία με τα ευρήματα της εν λόγω διατριβής, διαπιστώθηκε αύξηση της δραστηριότητας της SOD και μείωση του επιπέδου των PC στο αίγιο γάλα, όταν τα ζώα κατανάλωναν καθημερινά 6,18 g *Chlorella vulgaris* χαμηλής περιεκτικότητας σε ολικές λιπαρές

ουσίες (Tsiplakou *et al.*, 2017a). Η SOD είναι η πρώτη γραμμή άμυνας κατά των ROS και το πρώτο ένζυμο που μετατρέπει τις ρίζες οξυγόνου σε υπεροξειδία. Στη συνέχεια, η CAT και η GSH-Px εμπλέκονται στην εξουδετέρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και η CAT δευτερευόντως εμπλέκεται στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και τη μετατροπή τους σε O<sub>2</sub> (Yu, 1994). Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί εδώ ότι το υψηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας, είχε τον πιο ευεργετικό αντίκτυπο στις οξειδωτικές παραμέτρους του γάλακτος, υποδεικνύοντας και πάλι τη σπουδαιότητα του επιπέδου ενσωμάτωσης μικροφυκών στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων το οποίο πρέπει να καθοριστεί κατόπιν μελέτης.

### **13.5. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ ΣΤΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ**

Αναμφίβολα, η κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών ενεργοποίησης που συνδέονται με τη δράση της σπιρουλίνας είναι περιορισμένη. Μέχρι τώρα, η επίδραση της χορήγησης σπιρουλίνας και των βιοδραστικών ενώσεων της στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία δεν έχει διερευνηθεί σε βάθος στα μηρυκαστικά. Αρχικά, τα καροτενοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικό ανοσοδιεγερτικό για τη βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του ανοσοποιητικού συστήματος (Babin *et al.*, 2015). Ωστόσο, οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν εστιάσει στη C-φυκοκυανίνη και το β-καροτένιο ως τα κύρια αντιοξειδωτικά, ανοσοδιεγερτικά και αντιφλεγμονώδη συστατικά (Wu *et al.*, 2016). Η C-φυκοκυανίνη είναι το μέρος των συμπλεγμάτων φυκοχολοπρωτεΐνη (Chethana *et al.*, 2015) που πέραν της δραστηριότητάς του ως αντιοξειδωτικό, αντιμυκητιακό και αντικαρκινικό (Bhat *et al.*, 2011, Asrami *et al.*, 2019) επίσης δρα ως ανοσοδιεγερτικό και ηπατοπροστατευτικό. Ωστόσο, ο μηχανισμός και ο βαθμός κατά τον οποίον το β-καροτένιο και η φυκοκυανίνη επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα των προβατινών δεν έχει ερευνηθεί. Λιπιδικό εκχύλισμα σπιρουλίνας (Ku *et al.*, 2013) έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει την έκφραση και την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IL-6) μέσω αναστολής της οδού NF-Kb σε επίμυες. Η σπιρουλίνα περιέχει επίσης το επταδεκάνιο, ένα πτητικό συστατικό που έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει τις εκφράσεις των προφλεγμονωδών γονιδίων μειώνοντας τη δραστηριότητα του NF-kB (Kim *et al.*, 2013). Ωστόσο, οι πολυσακχαρίτες (Tang *et al.*, 2014) που περιέχονται στη σπιρουλίνα μπορούν να επάγουν την οδό NF-kB (Finamore *et al.*, 2017). Αξίζει να σημειωθεί ότι

αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά την επίδραση των διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των προβατινών.

Η κατανάλωση σπιρουλίνας, πλούσια σε βιοενεργά συστατικά έχει διαφορετική απόκριση στα διαφορετικά είδη ζώων. Ειδικότερα, έχει διαπιστωθεί ότι η θετική επίδραση της ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα μονογαστρικά μέχρι και σήμερα δεν απαντάται στα μηρυκαστικά (Keller *et al.*, 2021). Είναι γεγονός ότι τα μηρυκαστικά πέπτουν επαρκώς κυρίως τα κλάσματα υδατανθράκων της σπιρουλίνας, ωστόσο, περίπου το 20 % της σπιρουλίνας εξακολουθεί να παρακάμπτεται στη Μ.Κ. (Gouveia *et al.*, 2008, Panjaitan *et al.*, 2010). Δεν υπάρχουν όμως πολλές πληροφορίες σχετικά με την αποδόμηση των βιοδραστικών ενώσεων της σπιρουλίνας εντός της Μ.Κ. Φαίνεται ωστόσο πιθανό ότι οι διαφορετικές πεπτικές διεργασίες στα μονογαστρικά και τα μηρυκαστικά έχουν ως αποτέλεσμα τη διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα των βιοδραστικών ενώσεων της σπιρουλίνας. Αυτό μπορεί με τη σειρά του να επηρεάσει διαφορετικά τις ευεργετικές επιδράσεις της σπιρουλίνας στο αντιοξειδωτικό και το ανοσοποιητικό σύστημα των ζώων. Η υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος της σπιρουλίνας και οι ζυμωτικές διεργασίες εντός Μ.Κ. δύνανται σε πρωταρχικό στάδιο να ενισχύσουν την απελευθέρωση και επομένως τη βιοδιαθεσιμότητα βιοδραστικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένης και της φυκοκυανίνης που όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως είναι το κύριο βιολειτουργικό συστατικό της σπιρουλίνας με αντιοξειδωτική καθώς και αντιφλεγμονώδη δράση. Ωστόσο, η παρατεταμένη έκθεση σε ζυμωτικές διεργασίες πιθανώς οδηγεί σε μικροβιακή αποδόμηση της πρωτεϊνικής ένωσης της φυκοκυανίνης και ενδεχομένως επίσης του χρωμοφόρου. Έτσι, στην περίπτωση των μηρυκαστικών, οι βιοενεργές ενώσεις που συμβάλλουν στις αντιοξειδωτικές και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες της σπιρουλίνας μπορεί να χαθούν (Keller *et al.*, 2021).

Αποτελέσματα μελέτης έδειξαν ότι σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες και ταύρους το β-καροτένιο στο πλάσμα, η α-τοκοφερόλη και οι φαινόλες πιθανώς δεν επηρεάζουν την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη γονιδιακή έκφραση σε μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) (Keller *et al.*, 2021). Βρέθηκε αριθμητική αύξηση του *TLR4* και σημαντική αύξηση της έκφρασης των *NFKB2* και των κυτταροκίνων *TNFA*, *IL1B*, *CXCL8*, *IL10* και *IFNG* σε απομονωμένα και διεγερμένα *in vitro* με πολυσακχαρίτες μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος ταύρων. Στην εν λόγω διατριβή, επηρεάστηκαν σημαντικά οι εκφράσεις γονιδίων (*TRIF*, *IRF5*, *MAPK*, *JUND*) μόνο για την ομάδα με το μικρότερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (SP5) και μόνο στα μονοκύτταρα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε όμοια απόκριση στα

ουδετερόφιλα. Έχει αποδειχθεί ότι τα διαφορετικά είδη κυττάρων έχουν διαφορετική απόκριση στα διατροφικά ερεθίσματα (Manrommatis *et al.*, 2021b; Mitsiouroulou *et al.*, 2021b).

Όμοια, έχει επισημανθεί η επίδραση της σπιρουλίνας στην έκφραση προφλεγμονωδών μορίων όπως τα *IL1B*, *IL2*, *IL8*, *TNFA*, του μεταγραφικού παράγοντα *NFKB*, καθώς και του *PTGS2* σε διαφορετικά μονογαστρικά (Ravi *et al.*, 2010). Σε μελέτες *in vitro* και σε ανθρώπους η χορήγηση σπιρουλίνας επηρέασε τη συσσώρευση NK κυττάρων σε ιστούς, ενίσχυσε την φαγοκύτωση από τα μακροφάγα και τροποποίησε την παραγωγή φλεγμονωδών μορίων όπως τα *INFG*, *IL2*, *IL1B* και *IFNB* (Mao *et al.*, 2000, Mao *et al.*, 2005). Η *in vitro* επώαση ανθρώπινων PBMCs με σπιρουλίνα αύξησε την έκκριση των *INFG*, *IL1B* και *IL4* κατά 2,0, 3,3, και 13,6 φορές, αντίστοιχα (Mao *et al.*, 2000). Μερικώς παρόμοια αποτελέσματα ανέφεραν και οι El Sheikh *et al.* (2014) σε PBMCs που επώαστηκαν με φυκοκυανίνη, όπου η παραγωγή της *INFG* αυξήθηκε και της *IL-4* μειώθηκε. Αντίθετα, οι Mao *et al.* (2005) παρατήρησαν μείωση των επιπέδων *IL4* σε ανθρώπους που έπασχαν από αλλεργική ρινίτιδα, ενώ η από του στόματος πρόσληψη σπιρουλίνας αύξησε την παραγωγή *INFG* (Hirahashi *et al.*, 2002). Επιπρόσθετα, έχει διερευνηθεί *in vitro* η ανοσολογική απόκριση λευκοκυττάρων σε δύο ξένα αντιγόνα ανάκλησης του *Candida albicans* και του τοξοειδούς τετάνου μέσω της κατανάλωσης ενός εκχυλίσματος πολυσακχαρίτη υψηλού μοριακού βάρους της σπιρουλίνας που ονομάζεται *Immulina*. Η κατανάλωση του πολυσακχαρίτη από 11 υγιείς άρρενες εθελοντές αύξησε προσωρινά τον πολλαπλασιασμό των  $CD4^+$  T-helper (Th) κυττάρων που προκαλείται από τα *Candida albicans*. Ο επαγόμενος από τοξοειδή τέτανο πολλαπλασιασμός των κυττάρων Th αυξήθηκε σε άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών και συσχετίστηκε με την ηλικία τους. Η κατανάλωση *Immulina*, για 8 ημέρες, ενίσχυσε τον επαγόμενο από *Candida albicans* πολλαπλασιασμό των B κυττάρων, αλλά μετά από 56 ημέρες παρατηρήθηκε μείωση. Η προκαλούμενη από *Candida albicans* παραγωγή των Th1 κυτταροκίνων *TNFA*, *IL-2* και *INFG* αυξήθηκε μετά από χορήγηση *Immulina* για 3 ημέρες και η αυξημένη παραγωγή *IL-2* παρέμεινε και μετά από τις 56 ημέρες. Οι αποκρίσεις *TNFA*, *INFG* και *IL-6* από τοξοειδές τέτανο ενισχύθηκαν μετά από 8 και 14 ημέρες, ενώ οι αποκρίσεις της *IL-5* αυξήθηκαν σημαντικά μέσα σε 3 ημέρες ενώ έπεσαν κάτω από τα βασικά επίπεδα μετά από 14 ημέρες. Αντίθετα, η κατανάλωση *Immulina*, για 3 ημέρες, ανέστειλε τις αποκρίσεις της *IL-4* και στα δύο ξένα αντιγόνα. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν επιδράσεις στις αποκρίσεις *IL-10*. Με προσθήκη σε κανονικά μονοπύρρηνα κύτταρα *in vitro*, ο πολυσακχαρίτης *Immulina* προκάλεσε ισχυρές αποκρίσεις *TNFA*, *IL-1* και *IL-6*, υποδεικνύοντας ότι δρα προκαλώντας προφλεγμονώδη απόκριση. Συνολικά, τα δεδομένα απέδειξαν ότι η κατανάλωση ενός εκχυλίσματος

πολυσακχαρίτη υψηλού μοριακού βάρους της σπιρουλίνας προκαλεί μια εξαρτώμενη από την ηλικία, προσωρινή ενίσχυση προσαρμοστικών ανοσολογικών αντιδράσεων (Løbner *et al.*, 2008).

Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, η έκφραση των *INFG* και *IL1B* αυξήθηκε μέσω της δράσης του β-καροτενίου και της φυκοκυανίνης σε πειραματισμό με τιλάπια Νείλου και *Oreochromis niloticus* (Hassan *et al.*, 2021). Στην ίδια μελέτη η προστατευτική δράση των εν λόγω βιολειτουργικών συστατικών συσχετίστηκε με την αύξηση στην ευεργετική εντερική χλωρίδα, υπεύθυνη για την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων που ρυθμίζουν τη φλεγμονώδη απόκριση (Hassan *et al.*, 2021). Η έκφραση του γονιδίου *TNFA* αυξήθηκε σε πέστροφες (*Oncorhynchus mykiss*) (Sheikhzadeh *et al.*, 2019), κυπρίνους, *Cyprinus carpio* (Watanuki *et al.*, 2006) και τιλάπια Νείλου (Mahmoud *et al.*, 2018) ως απόκριση στην ενσωμάτωση *Spirulina platensis* στα σιτηρέσιά τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μελέτη που διεξήχθη με νεαρούς κυπρίνους, διερευνήθηκε η αντοχή τους έναντι μόλυνσης από *Aeromonas hydrophila* αντικαθιστώντας το ιχθυάλευρο με *Spirulina platensis* (Cao *et al.*, 2018). Σε αυτή τη μελέτη, τα μεταγραφικά επίπεδα των *TLR2*, *MYD88*, *IL1B* και *TNFA1* σε δείγματα από σπλήνα και νεφρό αυξήθηκαν σημαντικά ακόμα και στο χαμηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσής της στα σιτηρέσια προ και μετά συνθηκών βακτηριακής μόλυνσης. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της εν λόγω διατριβής, όπου στα μονοκύτταρα της ομάδας με το χαμηλότερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα μείγματα των ΣΖ (SP5) παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία.

Συμπερασματικά, η επίδραση της σπιρουλίνας σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα *in vivo*, *in vitro*, διαφορετικά είδη ζώων (μονογαστρικά/μηρυκαστικά) και στον άνθρωπο έδειξαν διαφορετικές αποκρίσεις κάτι που χρήζει περαιτέρω διερεύνηση.

### **13.6. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ**

Οι μέχρι σήμερα μελέτες με ενσωμάτωση σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων έχουν κυρίως εστιάσει στην επίδρασή της στην ανάπτυξη των ζώων, την παραγωγικότητα και την ποιότητα των ζωοκομικών προϊόντων. Σε *in vitro* μελέτες έχει διερευνηθεί η αντιμικροβιακή δράση της σπιρουλίνας με αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Ωστόσο, δεν έχει διερευνηθεί σε *in vivo* πειραματισμούς με παραγωγικά ζώα, η επίδραση της ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στο μικροβιακό πληθυσμό. Στα μηρυκαστικά οι μικροοργανισμοί της Μ.Κ. συνδέονται στενά με διεργασίες

πέψης και αποδόμησης υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπών και κατ' επέκταση τις παραγωγικές αποδόσεις. Επομένως, η εν λόγω διατριβή είναι η πρώτη ερευνητική προσέγγιση που διερευνά την επίδραση της σπιρουλίνας στον πληθυσμό μικροοργανισμών της Μ.Κ. των γαλακτοπαραγωγών προβατινών. Επίσης, και για τον πειραματισμό με τη σπιρουλίνα, πραγματοποιήθηκε αρχική καταγραφή βακτηριακών πληθυσμών και στη συνέχεια η σχετική αφθονία επιλεγμένων μικροοργανισμών της Μ.Κ. αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας μια καλά αξιολογημένη πλατφόρμα RT-qPCR.

Η ενσωμάτωση σπιρουλίνας ως πρόσθετο στο μείγμα ΣΖ των προβατινών δεν επηρέασε σημαντικά τη σχετική αφθονία των μεθανοβακτηρίων. Τα Αρχαία αποτελούν περίπου το 0,3 έως 4 % του μικροβιακού DNA της Μ.Κ. (16s και 18s rRNAs) (Tapio *et al.*, 2014). Περίπου όλα αυτά τα Αρχαία, είναι μεθανοβακτήρια που παράγουν μεθάνιο (CH<sub>4</sub>) μέσω δύο κύριων οδών: (α) της υδρογονοτροφικής οδού (*Methanobrevibacter* spp., *Methanobacterium formicicum*), που μετατρέπει το H<sub>2</sub> και το CO<sub>2</sub> που σχηματίζονται από τα βακτήρια, τα πρωτόζωα και τους μύκητες σε CH<sub>4</sub>, και (β) της μεθυλοτροφικής οδού (*Methanosphaera stadmanae*) στην οποία η μεθανόλη που προκύπτει από την υδρόλυση μεθανολικών πλευρικών ομάδων φυτικών πολυσακχαριτών μεταβολίζεται σε CH<sub>4</sub> (Morgani *et al.*, 2010). Τα ευρήματα αναφορικά με τα ολικά μεθανοβακτήρια στο Υ.Μ.Κ. και στο στερεό περιεχόμενο που παρατηρήθηκαν στον πειραματισμό με την προσθήκη σπιρουλίνας είναι σε αντίθεση με αυτά εργασίας που μελέτησε την επίδραση της *Chlorella vulgaris*, μικροφύκους επίσης χαμηλής περιεκτικότητας σε ολικές λιπαρές ουσίες, στα σιτηρέσια αιγών και αποδείχθηκε ότι η προσθήκη 10 g/kg ΞΟ ΣΖ αύξησε τα ολικά μεθανοβακτήρια (Tsiplakou *et al.*, 2016). Αντίθετα, η ενσωμάτωση του *Scizochytrium* spp. υψηλής περιεκτικότητας σε ολικές λιπαρές ουσίες και ΛΟ, ειδικότερα σε DHA, στο στερεό περιεχόμενο αιγών, μείωσε την σχετική αφθονία των *Methanomassiliicoccales*, *Methanobrevibacter* spp. *Methanosphaera stadmanae* και *Methanobacterium formicicum* (Mavrommatis *et al.*, 2021c). Επίσης, στο Υ.Μ.Κ. τα μεθανοβακτήρια και τα *Methanomassiliicoccales* εμφάνισαν τάση μείωσης μετά από χορήγηση 20 και 40 g, σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα και ο σχετικός πληθυσμός των *Methanomicrobium mobile* αυξήθηκε σημαντικά στις αίγες που ενσωματώθηκαν 60 g/αίγα/ημέρα *Scizochytrium* sp. στο μείγμα ΣΖ (Mavrommatis *et al.*, 2021d). Επομένως, φαίνεται ότι η μείωση των μεθανοβακτηρίων μέσω της προσθήκης μικροφυκών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητα σε ολικές λιπαρές ουσίες και ΛΟ (π.χ. DHA). Συμπερασματικά, όσον αφορά την επίδραση των μικροφυκών στην αφθονία των μεθανοβακτηρίων αποδεικνύεται ισχυρή συσχέτιση της περιεκτικότητας σε ολικές



λιπαρές ουσίες και των PUFA σε αυτά. Επιπλέον, αν και τα *Selenomonas ruminantium* μπορούν επίσης να παράγουν H<sub>2</sub>, η αμοιβαία σχέση τους με τα μεθανοβακτήρια έχει αναφερθεί σε συγκαλλιέργειες *in vitro* (Scheifinger *et al.*, 1975). Στην εν λόγω διατριβή, η σχετική αφθονία των *Selenomonas ruminantium* μειώθηκε στις επεμβάσεις με χορήγηση σπιρουλίνας σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα, αριθμητικά στο υγρό και σημαντικά για τις SP5 και SP15 στο στερεό περιεχόμενο.

Ένα άλλο στοιχείο που χρήζει αναφοράς είναι το γεγονός ότι η αριθμητική αύξηση στα πρωτόζωα στην ομάδα με το μεγαλύτερο ποσοστό ενσωμάτωσης (SP15), τόσο στο Y.M.K. όσο και στο στερεό περιεχόμενο, είναι σε συμφωνία με την αναφερόμενη αύξηση στα πρωτόζωα στον πειραματισμό με ενσωμάτωση της *Chlorella vulgaris* (10 g/kg ΣΖ ΞΟ) στα σιτηρέσια αιγών (Tsiplakou *et al.*, 2016).

Όσον αφορά τη σχετική αφθονία βακτηριακών ειδών, η ενσωμάτωση σπιρουλίνας αύξησε τη σχετική αφθονία των ειδών *Eubacterium ruminantium*, *Fibrobacter succinogenes* στο Y.M.K. και των *Ruminococcus albus* μόνο στο στερεό στην ομάδα με το μεγαλύτερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας (SP15), εύρημα ιδιαίτερος αξιοσημείωτο καθώς από τα κυτταρινολυτικά βακτήρια, τα *Fibrobacter succinogenes* και *Ruminococcus albus*, είναι επιθυμητά με ισχυρή κυτταρινολυτική δράση, όπως αναφέρθηκε και στον σχολιασμό των αποτελεσμάτων του πειραματισμού με την ενσωμάτωση σπερμάτων καμελίνας στα σιτηρέσια των προβατινών. Σε αντίθεση, η ενσωμάτωση 10 g *Chlorella vulgaris* στο μείγμα ΣΖ αιγών μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των *Ruminococcus albus* στο Y.M.K. (Tsiplakou *et al.*, 2016).

Η σπουδαιότητα των μη κυτταρινολυτικών ειδών είναι να ενισχύουν την κυτταρινολυτική δραστηριότητα μέσω της αλληλεπίδρασης που αναφέρθηκε και προηγουμένως στον σχολιασμό των αποτελεσμάτων του πειραματισμού με καμελίνα και ονομάζεται «διασταυρούμενη διατροφή». Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τα μη κυτταρινολυτικά είδη *Prevotella ruminicola* και *Selenomonas ruminantium* τα οποία συνεργάζονται με τα κυτταρινολυτικά βακτήρια για τη βελτίωση της πέψης των κυτταρινών, η σχετική αφθονία των *Selenomonas ruminantium* μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες SP5 και SP15 στο στερεό περιεχόμενο της M.K., όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

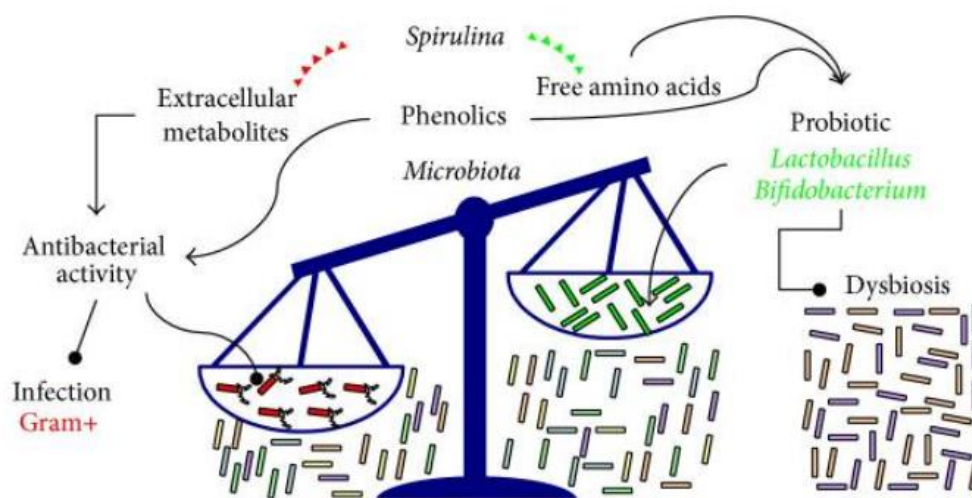
Η σημαντική μείωση της σχετικής αφθονίας του είδους *Streptococcus bovis* στο στερεό περιεχόμενο της M.K. των προβατινών των ομάδων SP σε σύγκριση με την ομάδα CON κρίνεται

άξια αναφοράς ιδιαίτερα εφόσον το είδος *Streptococcus bovis* συνδέεται έμμεσα με την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, η οξέωση των μηρυκαστικών εμφανίζεται κατά τις απότομες αλλαγές από σιτηρέσιο βασισμένο σε χονδροειδείς ζωοτροφές σε σιτηρέσιο χαμηλό σε κυτταρίνες με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (Gill *et al.*, 2000). Η περίσσεια εύπεπτων υδατανθράκων μπορεί να οδηγήσει στην υπερανάπτυξη βακτηρίων που μεταβολίζουν το άμυλο, τα οποία είναι ανθεκτικά στα οξέα, και παράγουν γαλακτικό οξύ, όπως τα *Streptococcus bovis* και *Lactobacillus* spp. (Freer, 1993, Shu *et al.*, 1999, Asanuma & Hino, 2002). Όταν χορηγείται σιτηρέσιο υψηλής περιεκτικότητας σε άμυλο, το είδος *Streptococcus bovis* μπορεί να ξεπεράσει άλλα βακτήρια. Επομένως, η μείωσή του στις ομάδες που χορηγήθηκε σπιρουλίνα ως πρόσθετο, αξιολογείται ως σημαντικό εύρημα πιθανών ανασταλτικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται και δύναται να ρυθμίσουν τον πληθυσμό των συγκεκριμένων βακτηρίων στις προαναφερθείσες συνθήκες. Η μειωμένη ζύμωση του αμύλου στη Μ.Κ. είναι επιθυμητή για την πρόληψη της οξέωσης και για την αύξηση της παροχής γλυκογονικών υποστρωμάτων (Svihus *et al.*, 2005). Η ζύμωση του αμύλου αυξάνει την παραγωγή VFAs και γαλακτικού οξέος, τα οποία μπορούν να μειώσουν το pH της Μ.Κ. και να επηρεάσουν τον πληθυσμό και μεταβολισμό των κυτταρινολυτικών μικροοργανισμών, οδηγώντας σε μειωμένη πεπτικότητα και πρόσληψη ξηρής ουσίας. Επίσης, μπορεί να προκαλέσουν μεταβολικές διαταραχές όπως οξεία και υποξεία οξέωση της Μ.Κ., γαλακτοξαιμία, αιμοσυμπύκνωση, απανθράκωση του βλενογόνου της Μ.Κ. ηπατικά αποστήματα και πολυεγκεφαλομαλακία (Plaizier *et al.*, 2009). Ο κίνδυνος οξέωσης των μηρυκαστικών βαίνει αυξανόμενος του ρυθμού πέψης του αμύλου.

Η σχετική αφθονία των βακτηρίων του γένους *Prevotella*, δεν επηρεάστηκε σημαντικά λόγω της ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των προβατινών. Τα *Prevotella* spp. αναπτύσσονται αποτελεσματικότερα σε συνθήκες χαμηλού pH (Khafipour *et al.*, 2009). Το είδος *Prevotella ruminicola* συμμετέχει στην αποδόμηση των ημικυτταρινών και των πηκτινών καθώς και στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων (Yu *et al.*, 2020). Αξίζει να αναφερθεί ότι χρησιμοποιεί το εξωκυτταρικό H<sub>2</sub> για τη μετατροπή του φουμαρικού σε ηλεκτρικό και στη συνέχεια με αποκαρβοξυλίωση μετατρέπει το ηλεκτρικό σε προπιονικό και CO<sub>2</sub>. Ως εκ τούτου, η υψηλότερη αναλογία προπιονικού σχετίζεται και με αύξηση της δραστηρότητας της α-αμυλάσης αλλά και του είδους *Prevotella ruminicola*.

Επίσης, η σχετική αφθονία των *Butyrivibrio fibrisolvens* και *Butyrivibrio Proteoclasticus* δεν επηρεάστηκε σημαντικά σε αυτό τον πειραματισμό της διδακτορικής διατριβής, σε αντίθεση με τους Tsiplakou *et al.* (2016) που βρήκαν αύξηση του είδους *Butyrivibrio fibrisolvens* στο Υ.Μ.Κ. αιγών που τους χορηγήθηκαν 10 g *Chlorella vulgaris* στα μείγματα ΣΖ/ημέρα.

Μελέτες στο παρελθόν αξιολόγησαν την επίδραση της σπιρουλίνας στον μικροβιακό πληθυσμό σε καλλιέργειες και την ανασταλτική δράση της έναντι σε Gram-negative και Gram-positive βακτήρια (Bhowmik *et al.*, 2009). Αντιθέτως, έχει επίσης αναφερθεί ότι εξωκυττάρια προϊόντα της σπιρουλίνας, που ελήφθησαν από εκθετική φάση καλλιέργειας προχωρημένου σταδίου και διαχωρίζονται με διήθηση, προάγουν σημαντικά την *in vitro* ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Finamore *et al.*, 2017). Παρόλο που η καλύτερη ανάπτυξη και επιβίωση έχει αποδοθεί στο υψηλό επίπεδο αζωτούχων ουσιών, ιδιαίτερα ελεύθερων αμινοξέων, στη βιομάζα της σπιρουλίνας (Beheshtiour *et al.*, 2013), επίσης οι φαινολικές ενώσεις έχουν αποδειχθεί ότι ασκούν αντιμικροβιακές ή βακτηριοστατικές δραστηριότητες και βελτιώνουν την ανάπτυξη προβιοτικών (Peluso *et al.*, 2014). Στην πραγματικότητα, η σπιρουλίνα παράγει εξωκυτταρικούς μεταβολίτες με αντιβακτηριακή δράση (Εικόνα 13.1.) (Suganya *et al.*, 2016).



**Εικόνα 13.1.** Οι δραστηριότητες της σπιρουλίνας προς τροποποίηση του μικροβιακού πληθυσμού, δύναται να αποτρέψουν τη δυσβίωση. Η αντιβακτηριακή δράση της σπιρουλίνας μπορεί να προστατεύσει τον ξενιστή από μολύνσεις (Πηγή: Finamore *et al.*, 2017)

Από τα αποτελέσματα της διατριβής προκύπτει ότι η ενσωμάτωση σπιρουλίνας στα μείγματα ΣΖ των προβατινών επηρεάζει την αφθονία των βακτηρίων κυρίως μέσω αύξησης των κυτταρολυτικών στο μεγαλύτερο επίπεδο ενσωμάτωσης (SP15) και μείωσης των βακτηριακών

πληθυσμών που εμπλέκονται στην αμυλόλυση και την πρωτεϊνόλυση και στα τρία μελετημένα επίπεδα ενσωμάτωσης, κάτι που αποτελεί σημαντικό εύρημα όσον αφορά τον μεταβολισμό και την πέψη των υδατανθράκων εντός της Μ.Κ. και την περαιτέρω κατανόηση των ανταγωνιστικών σχέσεων μεταξύ των μικροοργανισμών.

## 14. ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Όπως αναφέρθηκε λεπτομερώς και σε προηγούμενα κεφάλαια, τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί εκτενώς η ενσωμάτωση μικροφυκών στα σιτηρέσια όλων των παραγωγικών ζώων. Τα διάφορα μικροφύκη δύνανται ανάλογα με τη βιοδιαθεσιμότητά τους σε βιολειτουργικά συστατικά να βελτιώνουν την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων προς την επιθυμητή κατεύθυνση για τους καταναλωτές και να βελτιώνουν διάφορους δείκτες υγείας των ζώων. Επιπρόσθετα, λόγω των βιολειτουργικών συστατικών τους έχουν συνδεθεί στενά και με την τροποποίηση του του μικροβιώματος της Μ.Κ. των μηρυκαστικών με σκοπό τη βελτίωση τόσο των πεπτικών διεργασιών όσο και των παραγωγικών χαρακτηριστικών και της μείωσης των μεθανοβακτηρίων, υπεύθυνων για την παραγωγή CH<sub>4</sub>. Η σπιρουλίνα, μικροφύκος σπουδαίας σημασίας, χαρακτηρίζεται από τους ειδικούς ως «η τροφή του μέλλοντος». Στην εν λόγω διατριβή, η ενσωμάτωση τριών διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης σπιρουλίνας, ως πρόσθετο στα μείγματα ΣΖ των γαλακτοπαραγωγών προβατινών, δεν επηρέασε το σωματικό βάρος, τη γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του γάλακτος.

Στην εν λόγω διατριβή, το μεγαλύτερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα μείγματα ΣΖ (15 g/προβατίνα/ημερα, SP15), βελτίωσε το προφίλ των λιπαρών οξέων του παραγόμενου γάλακτος, γεγονός που αποδίδεται στη σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των PUFA, των ω-3 και της μείωσης του δείκτη θρομβογένεσης (TI). Επίσης, η οξειδωτική σταθερότητα του γάλακτος των προβατινών που διατρέφονταν με σιτηρέσια που περιείχαν σπιρουλίνα βελτιώθηκε όπως αποδεικνύεται από τις τροποποιήσεις στις δραστηρότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων: SOD, CAT και GSH-Px, καθώς και από τις τροποποιήσεις που αφορούν την αντιοξειδωτική ικανότητα (FRAP, ABTS) και τους δείκτες οξειδωτικού στρες (MDA, PC).

Σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία και τον χαρακτηρισμό της σπιρουλίνας ως ισχυρό αντιοξειδωτικό, η δραστηρότητα των SOD, CAT, και GSH-Px αυξήθηκε σημαντικά στο πλάσμα του αίματος των προβατινών κάτι που υποδεικνύει βελτίωση της οξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού.

Παρόλα αυτά, όπως προκύπτει και από τον σχολιασμό των αποτελεσμάτων της εν λόγω μελέτης, η επίδραση της ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων επί της ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος, παρουσιάζει διφορούμενα συμπεράσματα. Πιο συγκεκριμένα, η αναμενόμενη ανοσοδιεγερτική βελτίωση εμφανίζεται ισχυρότερη στα

μονογαστρικά αλλά όχι και στα μηρυκαστικά, κάτι που αποδεικνύεται και στην παρούσα διατριβή. Οι αυξήσεις στη σχετική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία στο μικρότερο επίπεδο ενσωμάτωσης, είναι σε συμφωνία με μελέτη που ανέφερε προφλεγμονώδη απόκριση στα βοοειδή. Οι διαφορετικές αποκρίσεις σε επίπεδο κυττάρου παρουσιάζονται και σε αυτό τον πειραματισμό όπως και στον πειραματισμό με την ενσωμάτωση καμελίνας στα μείγματα ΣΖ των προβατινών.

Επιπλέον, εφόσον η επίδραση της ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών επί του μικροβιώματός τους δεν έχει διερευνηθεί, τα αποτελέσματα που αφορούν στη σχετική αφθονία μικροοργανισμών κρίνονται σπουδαία και καινοτόμα. Στην ομάδα με το μεγαλύτερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα μείγματα ΣΖ των προβατινών (SP15), η αύξηση στη σχετική αφθονία των βακτηριακών ειδών *Eubacterium ruminantium*, στο Υ.Μ.Κ. και *Ruminococcus albus* στο στερεό περιεχόμενο αποτελεί αξιοσημείωτο εύρημα καθώς από τα κυτταρινολυτικά βακτήρια, τα *Fibrobacter succinogenes* και *Ruminococcus albus* θεωρούνται αυτά με την ισχυρότερη κυτταρινολυτική δράση. Η σημαντική μείωση στη σχετική αφθονία των *Ruminobacter amylophilus*, *Streptococcus bovis* και *Selenomonas ruminantium* θεωρείται επίσης σημαντικό εύρημα καθώς από αυτά το είδος *Streptococcus bovis* συνδέεται με τις ταχείες ζυμώσεις και την παραγωγή γαλακτικού οξέος και την οξέωση στα μηρυκαστικά και το είδος *Selenomonas ruminantium* θεωρείται σημαντικό είδος που συνεργάζεται με τα κυτταρινολυτικά και εμπλέκεται τόσο στην αποδόμηση του αμύλου όσο και των πρωτεϊνών. Επομένως, η ενσωμάτωση σπιρουλίνας στα μείγματα ΣΖ των προβατινών δύναται να μειώσει τη σχετική αφθονία συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών και στο μεγαλύτερο επίπεδο ενσωμάτωσης να αυξήσει τη σχετική αφθονία συγκεκριμένων ειδών με κυτταρινολυτική δράση.

## 15. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το γεγονός ότι η σπιρουλίνα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον καταναλωτή, σε συνδυασμό με το ότι καλλιεργείται και στη χώρα μας, αποκτά ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον, ιδιαίτερα αν συσχετιστεί με τις ανάγκες των καταναλωτών για προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας.

Η χορήγηση σπιρουλίνας ως πρόσθετο στα μείγματα ΣΖ των προβατινών, δεν επηρέασε σημαντικά τη γαλακτοπαραγωγή και τη χημική σύσταση του παραγόμενου γάλακτος, ενώ η χορήγηση 15 g/προβατίνα/ημέρα (SP15) βελτίωσε το προφίλ των ΛΟ του γάλακτος προς την επιθυμητή για τον καταναλωτή κατεύθυνση.

Η οξειδωτική σταθερότητα των προβατινών και του παραγόμενου γάλακτος βελτιώθηκε μέσω της ενσωμάτωσης των τριών επιπέδων σπιρουλίνας στα μείγματα ΣΖ κάτι που αποδεικνύεται από την αύξηση της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων, τη βελτίωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες.

Στην ομάδα που χορηγήθηκαν 5 g/προβατίνα/ημέρα (SP5) εμφανίστηκε χαμηλού μεγέθους προφλεγμονώδη απόκριση όσον αφορά την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία στα μονοκύτταρα των προβατινών. Επιπλέον, υπήρξε διαφορετική έκφραση γονιδίων στα διαφορετικά είδη κυττάρων. Τα αποτελέσματά σχετικά με την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία, αναδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

Η ενσωμάτωση της σπιρουλίνας στα μείγματα ΣΖ των προβατινών δύναται να τροποποιήσει τη σχετική αφθονία συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών στη Μ.Κ., κάτι που μπορεί να αποτελέσει πυλώνα προς περαιτέρω διερεύνηση. Συγκεκριμένα, η μείωση του είδους *Streptococcus bovis* αποτελεί σημαντικό εύρημα καθώς συνδέεται με τις ταχείες ζυμώσεις και την παραγωγή γαλακτικού οξέος και την οξέωση στα μηρυκαστικά. Οι τροποποιήσεις στο μικροβίωμα της Μ.Κ. δεν επηρέασαν αρνητικά τα παραγωγικά χαρακτηριστικά, ούτε την υγεία των προβατινών.

Εν κατακλείδι, το μεγαλύτερο επίπεδο ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα μείγματα ΣΖ των προβατινών (15 g/προβατίνα/ ημέρα, SP15), βελτίωσε την ποιότητα του παραγόμενου γάλακτος διασφαλίζοντας και την υγεία των προβατινών, όπως διαπιστώθηκε από το προφίλ των λιπαρών οξέων και της οξειδωτικής σταθερότητας του γάλακτος, της οξειδωτικής κατάστασης του

οργανισμού, της σχετικής έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία και της σχετικής αφθονίας μικροοργανισμών της Μ.Κ.



## 16. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η εν λόγω διατριβή απάντησε μέσω ολιστικών προσεγγίσεων στην αξιολόγηση τριών διαφορετικών επιπέδων ενσωμάτωσης σπιρουλίνας στα σιτηρέσια των γαλακτοπαραγωγών προβατινών. Η διεξοδική μελέτη διαφορετικών παραγωγικών χαρακτηριστικών και βιοχημικών παραμέτρων οδήγησε σε σημαντικά συμπεράσματα. Αδιαμφισβήτητα τα αποτελέσματα, όσον αφορά την οξειδωτική κατάσταση των προβατινών και του παραγόμενου γάλακτος, ήταν σύμφωνα με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία. Ωστόσο, οι σημαντικές διαφοροποιήσεις στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία, χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Αρχικά, για την πλήρη αξιολόγηση της επίδρασης της σπιρουλίνας, το ερευνητικό ερώτημα που προέκυψε είναι αν η σπιρουλίνα μπορεί να επιδράσει θετικά στο ανοσοποιητικό σύστημα των προβατινών και αν όντως το μικρότερο επίπεδο χορήγησης σπιρουλίνας δύναται να προκαλέσει μικρού βαθμού ανοσοδιέγερση. Επίσης, η διαφορετική απόκριση των διαφορετικών κυττάρων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Αυτά τα ερωτήματα κρίνεται αναγκαίο να επιβεβαιωθούν σε πρωτεϊνικό επίπεδο και υπό στρεσογόνες συνθήκες.

Συμπληρωματικά, όπως και για τον πειραματισμό με την ενσωμάτωση καμελίνας στα σιτηρέσια των προβατινών, η γονιδιωματική ανάλυση στο υγρό και στερεό περιεχόμενο της Μ.Κ. ανέδειξε σημαντικά ευρήματα. Σαφέστερα συμπεράσματα δύναται να αντληθούν μέσω της αλληλούχισης απομονωθέντων RNA και τη μελέτη συγκεκριμένων περιοχών των μελετημένων μικροοργανισμών. Απαιτούνται περισσότερες πληροφορίες με στόχο να κατανοηθεί σε βάθος η επίδραση της σπιρουλίνας στη βιοχημεία της Μ.Κ. ελέγχοντας πολλά taxa.

## 17. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abd El-Baky, H.H.A., Baz, F.K. El, El-Baroty, G.S., 2009. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae.pdf. *African J. Biotechnol.* 8, 7059–7067.
- Abramovič, H., Butinar, B., Nikolič, V., 2007. Changes occurring in phenolic content, tocopherol composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil during storage. *Food Chem.* 104, 903-909.
- Abuelfatah, K., Zuki, A.B., Goh, Y.M., Sazili, A.Q., Abubakr, A., 2016. Effects of feeding whole linseed on ruminal fatty acid composition and microbial population in goats. *Anim. Nutr.* 2, 323-328.
- Acuti, G., Trabalza-Marinucci, M., Cagiola, M., Pela, M., Curina, G., Moscati, L., 2012. Extruded linseed supplementation in the diet of dairy sheep: The effects on immune response and oxidative stress as affected by the physiological state. *Small Rumin. Res.* 106, S21-S28.
- Agarwal, N., Kamra, D.N., Chaudhary, L.C., 2015. Rumen Microbial Ecosystem of Domesticated Ruminants. In: Puniya, A., Singh, R., Kamra, D. (eds) *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer, New Delhi.
- Akin, D.E., Borneman, W.S., Windham, W.R., 1988. Rumen fungi: morphological types from Georgia cattle and the attack on forage cell walls. *Biosystems* 2:385-391.
- Akin, D.E., Borneman, W.S., 1990. Role of rumen fungi in fiber degradation. *J. Dairy Sci.*, 114 (10): 3023–3032.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Amanullah, S.M., Kim, D.H., Paradhita, D.H.V., Lee, H.J., Joo, Y.H., Lee, S.S., Kim, E.T., Kim, S.C., 2021. Effects of Essential Fatty Acid Supplementation on in vitro Fermentation Indices, Greenhouse Gas, Microbes, and Fatty Acid Profiles in the Rumen. *Front. Microbiol.* 12, 1-11.
- Amores, G., Virto, M., Nájera, A.I., Mandaluniz, N., Arranz, J., Bustamante, M.A., Valdivielso, I., Ruiz De Gordo, J.C., García-Rodríguez, A., Barron, L.J.R., De Renobales, M., 2014. Rapeseed and sunflower oilcake as supplements for dairy sheep: Animal performance and milk fatty acid concentrations. *J. Dairy Res.* 81, 410-416.
- AOAC. *Official Methods of Analysis* 1984, 14th (ed. Williams, S., Ed. Association of Official Analytical Chemists), Arlington, VA, USA.
- Asrami, B. M., Sudagar, M., Shahraki, N., Vahdat, S., 2019. Effect of extracted phycocyanin from *Spirulina platensis* on growth parameters, colorations, digestive enzymes and body chemical compositions of Guppy fish (*Poecilia reticulata*), *Survey in Fisheries Sciences.* 6, 1–8.
- Asanuma, N. and Hino, T., 2002. Regulation of fermentation in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*, with special reference to rumen acidosis. *Anim. Sci. J.* 73, 313–325.

- Babadzhanov, A. S., Abdusamatova, N., Yusupova, F. M., Faizullaeva, N., Mezhlumyan, L. G., Malikova, M. K., 2004. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. *Chem. Nat. Compd.* 40, 276-279.
- Babcock, T. A., Helton, W. S., Hong, D., Espot, N. J., 2002. Omega-3 fatty acid lipid emulsion reduces LPS-stimulated macrophage TNF-alpha production. *Surg Infect (Larchmt)*. 3, 145-149.
- Babin, A., Saciat, C., Teixeira, M., Troussard, J. P., Motreuil, S., Moreau, J., Moret, Y., 2015. Limiting immunopathology: interaction between carotenoids and enzymatic antioxidant defences, *Dev. Comp. Immunol.* 49, 278–281.
- Bach, S.J., Mcallister, T.A., Veira, D.M., Gannon, P.J., Holley R.A., 2002. Transmission and control of *Escherichia coli* O157: H7 – a review. *Can J. Anim. Sci.* 82:475-490.
- Barbosa, M.J., Zijffers, J.W., Nisworo, A., Vaes, W., van Schoonhoven, J., Wijffels, R.H., 2005. Optimization of biomass, vitamins, and carotenoid yield on light energy in a flat-panel reactor using the A-stat technique. *Biotech. Bioeng.* 89 (2), 233-242.
- Barkallah, M., Dammak, M., Louati, I., Hentati, F., Hadrach, B., Mechichi, T., Ayadi, M.A., Fendri, I., Attia, H., Abdelkafi, S., 2017. Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. *LWT - Food Sci. Technol.* 84, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.071>.
- Barnes, B.J., Moore, P.A., Pitha, P.M., 2001. Virus-specific Activation of a Novel Interferon Regulatory Factor, IRF-5, Results in the Induction of Distinct Interferon  $\alpha$  Genes. *J. Biol. Chem.* 276, 23382–23390.
- Bayat, A.R., Kairenius, P., Stefański, T., Leskinen, H., Comtet-Marre, S., Forano, E., Chaucheyras-Durand, F., Shingfield, K.J., 2015. Effect of camelina oil or live yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal methane production, Rumen fermentation, And milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage diets. *J. Dairy Sci.* 98, 3166-3181.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Benchaar, C., Holtshausen, L., 2009. Crushed Sunflower, Flax, or Canola Seeds in Lactating Dairy Cow Diets: Effects on Methane Production, Rumen Fermentation, and Milk Production. *J. Dairy Sci.* 92, 2118-2127.
- Becker, E. W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207-210.
- Beheshtipour, H., Mortazavian, A.M., Haratian, P., Khosravi-Darani, K., 2012. Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. *Eur. Food Res. Technol.* 235, 719-728.
- Beheshtipour, H., Mortazavian, A.M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., Khosravi-Darani, K., 2014. Supplementation of *spirulina platensis* and *chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks, *Comprehensive Reviews in Belanche, A., de la Fuente, G., Newbold, C.J. Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 663-677.
- Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., Shimamatsu, H., 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J. Appl. Phycol.* 5, 235-241.

Benzie, I F, and J J Strain, 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* vol. 239, 1:70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292.

Bernard, L., Toral, P.G., Chilliard, Y., 2017. Comparison of mammary lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *J. Dairy Sci.* 100, 9338-9351.

Berti, M., Gesch, R., Eynck, C., Anderson, J., Cermak, S., 2016. Camelina uses, genetics, genomics, production, and management. *Ind. Crops Prod.* 94, 690-710.

Bezerra, L. R., Silva, A. M. A., Azevedo, S. A., Mendes, R. S., Mangueira, J. M., Gomes, A. K. A., 2010. Performance of Santa Ine<sup>s</sup> lambs submitted to the use of artificial milk enriched with *Spirulina platensis*. *Cienc. Anim. Bras.* 11, 258-263.

Bhat, V.B., Madyastha, K., 2001. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 262–266.

Bhowmik D., Dubey J., Mehra S., 2009. Probiotic efficiency of *Spirulina platensis*-stimulating growth of lactic acid bacteria. *World Journal of Dairy & Food Sciences.* 4,160–163.

Bichi, E., Hervas, G., Toral, P.G., Loor, J.J., Frutos, P., 2013. Milk fat depression induced by dietary marine algae in dairy ewes: persistency of milk fatty acid composition and animal performance responses. *J. Dairy Sci.* 96, 524-532.

Blok, W.L., Deslypere, J-P., Demacker, P.N.M., van der Ven- Jongekrijg, J., Hectors, M.P.C., van der Meer, J.M.W., Katan, M.B., 1997. Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Healthy Volunteers Fed Various Doses of Fish Oil for 1 Year, *Eur. J. Clin. Investig.* 27, 1003-1008.

Bo, M.S., Cheah, W.L., Lwin, S., Moe New, T., Win, T.T., Aung, M., 2018. Understanding the relationship between atherogenic index of plasma and cardiovascular disease risk factors among staff of an University in Malaysia. *J. Nutr. Metab.* 3, 1–6.

Boeckaert, C., Fievez, V., Van Hecke, D., Verstraete, W., Boon, N., 2007. Changes in rumen biohydrogenation intermediates and ciliate protozoa diversity after algae supplementation to dairy cattle. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 767-777.

Bondia-Pons, I., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C., 2004. Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *J. Chromatogr. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 809, 339-344.

Booman, M., Xu, Q., Rise, M.L., 2014. Evaluation of the impact of camelina oil-containing diets on the expression of genes involved in the innate anti-viral immune response in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Shellfish Immunol.* 41, 52-63.

Buccioni, A., Decandia, M., Minieri, S., Molle, G., Cabiddu, A., 2012. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174, 1-25.

Budin, J.T., Breene, W.M., Putnam, D.H., 1995. Some compositional properties of camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) seed and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 309-315.

- Cais-Sokolińska, D., Wójtowski, J., Pikul, J., Danków, R., Majcher, M., Teichert, J., Bagnicka, E., 2015. Formation of volatile compounds in kefir made of goat and sheep milk with high polyunsaturated fatty acid content. *J. Dairy Sci.* 98, 6692-6705.
- Calder, P.C., 2001. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids.* 36, 1007-1024.
- Calder, P.C., 2007. Dietary arachidonic acid: Harmful, harmless or helpful? *Br. J. Nutr.* 98, 451-453.
- Cao, S., Zhang, P., Zou, T., Fei, S., Han, D., Jin, J., Liu, H., Yang, Y., Zhu, X., Xie, S., 2018. Replacement of fishmeal by spirulina *Arthrospira platensis* affects growth, immune related-gene expression in gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III), and its challenge against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 79, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.022>.
- Carreño, D., Toral, P.G., Pinloche, E., Belenguer, A., Yáñez-Ruiz, D.R., Hervás, G., McEwan, N.R., Newbold, C.J., Frutos, P., 2019. Rumen bacterial community responses to DPA, EPA and DHA in cattle and sheep: A comparative in vitro study. *Sci. Rep.*, 9, 1–9.
- 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.* 97, 1661-1669.
- Caughey, G.E., Mantzioris, E., Gibson, R.A., Cleland, L.G., James, M.J., 1996. The Effect on Human Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin  $1\beta$  Production of Diets Enriched in n-3 Fatty Acids from Vegetable Oil or Fish Oil, *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 116-122.
- Celi, P., 2011. Oxidative Stress in Ruminants., In *Studies on Veterinary Medicine. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice.* Eds. Mandelker L, Vajdovich P. Humana Press, Totowa, NJ, 191-231.
- Charron, C. S., Allen, F. L., Johnson, R. D., Pantalone, V. R., Sams, C. E., 2005. Correlations of Oil and Protein with Isoflavone Concentration in Soybean [*Glycine Max (L.) Merr.*]. *J. Agric. Food Chem.* 53(18): 7128-7135.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An introduction to free radicals chemistry. *Br Med Bull*; 49:481-93.
- Chen, P., Ji, P., Li, S.L., 2008. Effects of Feeding Extruded Soybean, Ground Canola Seed and Whole Cottonseed on Ruminal Fermentation, Performance and Milk Fatty Acid Profile in Early Lactation Dairy Cows. *Asian Australasian Association of Animal Production Societies. Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21. 204-213.
- Cheng, Y.F., Edwards, J.E., Allison, G.G., Zhu, W.Y., Theodorou, M.K., 2009. Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresour. Technol.* 100, 4821-4828.
- Chethana, S., Nayak, C.A., Madhusudhan, M., Raghavarao, K., 2015. Single step aqueous two-phase extraction for downstream processing of C-phycoyanin from *Spirulina platensis*, *J. Food*

Sci. Technol. 52, 2415-2421.

Chichlowski, M.W., Schroeder, J.W., Park, C.S., Keller, W.L., Schimek, D.E., 2005. Altering the fatty acids in milk fat by including canola seed in dairy cattle diets. *J. Dairy Sci.* 88, 3084-3094.

Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R.M., Doreau, M., 2000. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Anim. Res.* 49, 181-205.

Chilliard, Y., Ferlay, A., 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 467-492.

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, 828-855.

Christaki, E., Karatzia, M., Bonos, E., Florou-Paneri, P., Karatzias, C., 2012. Effect of dietary *Spirulina platensis* on milk fatty acid profile of dairy cows. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7, 597-604.

Choudhury, P.K., Salem, A.Z.M., Kumar, R.J.S., Singh, R., Puniya, A.K., 2015. Rumen Microbiology: An Overview. Chapter 1. In *Rumen microbiology: from evolution to revolution*. Eds.: Puniya, A.K., Singh, R., and Kamra, D.N. New Delhi, India: Springer. Chapter 1, 3-16. ISBN 978-81-322-2400-6.

Chuntrakort, P., Otsuka, M., Hayashi, K., Takenaka, A., Udchachon, S., Sommart, K., 2014. The Effect of Dietary Coconut Kernels, Whole Cottonseeds and Sunflower Seeds on the Intake, Digestibility and Enteric Methane Emissions of Zebu Beef Cattle Fed Rice Straw Based Diets. *Livest. Sci.*, 161, 80-89.

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. *Br. J. Nutr.* 108, 1390-1398.

Cromwell G. L., 2012. Soyabean Meal: An Exceptional Protein Source. Soyabean Meal InfoCenter.

Csala, M., Kardon, T., Legeza, B., Lizak, B., Mandl, J., Margittai, E., Puskas, F., Szaraz, P., Szelenyi, P., Banhegyi, G., 2015. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1852:826-838.

Cuadrado, A., Nebreda, A.R., 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal* 429, 403-417.

Dagar, S.S., Kumar, S., Mudgil, P., Singh, R., Puniya, A.K., 2011. D1/D2 domain of large subunit rDNA for differentiation of *Orpinomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6722-6725.

Dai, X.; Weimer, P.J.; Dill-McFarland, K.A.; Brandao, V.L.; Suen, G.; Faciola, A.P., 2017. Camelina seed supplementation at two dietary fat levels change ruminal bacterial community composition in a dual-flow continuous culture system. *Front. Microbiol.* 8, 2147.

- De Souza, R.J., Mente, A., Maroleanu, A., Cozma, A.I., Ha, V., Kishibe, T., Uleryk, E., Budyłowski, P., Schönemann, H., Beyene, J., Anand, S.S., 2015. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*. 351, 1–16. <https://doi.org/10.1136/bmj.h3978>.
- 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.* 9, 1-14.
- Dewanckele, L., Jeyanathan, J., Vlaeminck, B., Fievez, V., 2020. Identifying and exploring biohydrogenating rumen bacteria with emphasis on pathways including trans-10 intermediates. *BMC Microbiol.* 20, 198.
- Dhiman, T.R., Satter, L.D., Pariza, M.W., Galli, M.P., Albright, K., Tolosa, M.X., 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 83, 1016-1027.
- Diraman, H., Koru, E., Dibeklioglu, H., 2009. Fatty acid profile of *Spirulina platensis* used as a food supplement. *Isr. J. Aquac. Bamid.* 61, 134-142.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M., 2001. Ruminal methanogens is as influenced by individual acids supplemented to complete ruminant diets. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 47-51. doi: 10.1046/j.1472-765x.2001.00863.x\
- Dong, Y.W., Jiang, W.D., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., Feng, L., 2017. Threonine deficiency decreased intestinal immunity and aggravated inflammation associated with NF- $\kappa$ B and target of rapamycin signalling pathways in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after infection with *Aeromonas hydrophila*. *Br. J. Nutr.* 118, 92-108.
- Doreau, M., Ferlay, A., 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: A review. *Livest. Prod. Sci.* 43, 97-110.
- Doreau, M.; Bauchart, D.; Chilliard, Y., 2010. Enhancing fatty acid composition of milk and meat through animal feeding. *Anim. Prod. Sci.* 51, 19-29.
- Dubois, B., Tomkins, N.W., D. Kinley, R., Bai, M., Seymour, S., A. Paul, N., Nys, R. de, 2013. Effect of Tropical Algae as Additives on Rumen in vitro Gas Production and Fermentation Characteristics. *Am. J. Plant Sci.* 04, 34-43.
- Duričić, I., Kotur-Stevuljević, J., Miljković, M., Kerkez, M., Dordević, V., Durašić, L., Šobajić, S., 2015. Effect of nutritionally relevant doses of long-chain N-3 pufa on lipid status, oxidative stress and inflammatory markers in an average middle-aged serbian population. *J. Med. Biochem.* 34, 304–313.
- Ebeid, H.M., Hassan, F., Li, M., Peng, L., Peng, K., Liang, X., Yang, C., 2020. *Camelina sativa* L. Oil Mitigates Enteric invitro Methane Production, Modulates Ruminant Fermentation, and Ruminant Bacterial Diversity in Buffaloes. *Front. Vet. Sci.* 7, 1-15.

- Ebrahimi, M., 2012. Production of Omega-3 polyunsaturated fatty acids enriched choven using treated oil palm (*Elaeis guineensis* jacq) fronds [vol. Ph.D.]. University Putra Malaysia.
- EFSA, 2008. Glucosinolates as undesirable substances in animal feed. Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal. 590, 1-76.
- Eidhin Ní, D., nBurke, J., O'Beirne, D., 2003. Oxidative stability of  $\omega$ 3-rich Camelina oil and camelina oil-based spread compared with plant and fish oils and sunflower spread. J. Food Sci. 68, 345-353.
- EL-Sabagh, M.R., Abd Eldaim, M.A., Mahboub, D.H., Abdel-Daim, M., 2014. Effects of *Spirulina Platensis* Algae on Growth Performance, Antioxidative Status and Blood Metabolites in Fattening Lambs. J. Agric. Sci. 6, 92-98.
- El Sheikh. S.M., Shalaby M.A.M., Hafez, R.A., Metwally W.S.A., El- Ayoty Y., M., 2014. The immunomodulatory effects of probiotic bacteria on peripheral blood mononuclear cells (PBMCS) of allergic patients. Am. J. Immunol. 10, 116-130.
- Elgersma, A., 2015. Grazing increases the unsaturated fatty acid concentration of milk from grass-fed cows: A review of the contributing factors, challenges and future perspectives. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 117, 1345-1369.
- Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V.E., Georgilis, K., Lonnemann, G., van der Meer, J.M.W., Cannon, J.G., Rogers, T.S., Klempner, M.S., Weber, P.C., Schaefer E., J., Wolff, S., M., Dinarello C., A., 1989. The Effect of Dietary Supplementation with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on the Synthesis of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor by Mononuclear Cells, N. Engl. J. Med. 320, 265-271.
- European Commission - Press release, 2019. United States is Europe's main soya beans supplier with imports up by 112%. European Commission, Brussels.
- Eynck, C., Falk, K., 2013. Camelina (*Camelina sativa*). B. Singh (Ed.), Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics, CABI, Fort Valley State Univ., USA, 369.
- Faciola, A.P., Broderick, G.A., 2014. Effects of feeding lauric acid or coconut oil on ruminal protozoa numbers, fermentation pattern, digestion, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows. J. Dairy Sci. 97, 5088–5100. doi:10.3168/jds.2013-7653.
- Fehily, A.M., Pickering, J.E., Yarnell, J.W.G., elwood, P.C., 1994. Dietary indices of atherogenicity and thrombogenicity and ischaemic heart disease risk: the Caerphilly Prospective Study. Br. J. Nutr. 71, 249-257. <https://doi.org/10.1079/bjn19940131>.
- Ferrell, J.E., Bhatt, R.R., 1997. Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 272, 19008-19016.
- Finamore, A., Palmery, M., Bensehaila, S., Peluso, I., 2017. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly *Spirulina*. Oxid. Med. Cell. Longev. 3247528.
- Finlay, B.J., Esteban, G., Clarke, K.J., Williams, A.G., Embley, T.M., Hirt, R.P., 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. FEMS Microbiol. Lett. 117, 157-162.



- Firmal, P., Shah, V.K., Chattopadhyay, S., 2020. Insight Into TLR4-Mediated Immunomodulation in Normal Pregnancy and Related Disorders. *Front. Immunol.* 11, 807.
- Fliegerová K, Mrázek J, Hoffmann K, Záborská J, Voigt K., 2010. Diversity of anaerobic fungi within cow manure determined by ITS1 analysis. *Folia Microbiol (Praha)*, 55, 319-325.
- Fondevila, M. & Dehority, B.A., 1996. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. *J. Anim. Sci.* 74, 678-684
- Foreman, H.C.C., van Scoy, S., Cheng, T.F., Reich, N.C., 2012. Activation of interferon regulatory factor 5 by site specific phosphorylation. *PLoS ONE* 7.
- Forsberg C.W., Cheng K.J., & White B.A., 1997. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. *Gastrointestinal Microbiology*, Vol. 1. Eds: Mackie, R.I., White, B.A., Isaacson, R.E., Chapman and Hall, New York. 319-379.
- Frame, D., Palmer, M., Peterson, B., 2007. Use of *Camelina sativa* in the diets of young turkeys. *J. Appl. Poultry Res.* 16, 381-386.
- Freer, S.N., 1993. Purification and characterization of the extracellular  $\alpha$ -amylase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1398-1402.
- Gallai, V., Sarchielli, P., Trequattrini, A., Franceschini, M., Floridi, A., Firenze, C., Alberti, A., Di Benedetto, D., Stragliotto, E. (1993) Cytokine Secretion and Eicosanoid Production in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of MS Patients Undergoing Dietary Supplementation with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, *J. Neuroimmunol.* 56, 143-153.
- Gao, Z., Zhang, H., Liu, J., Lau, C.W., Liu, P., Chen, Z.Y., Lee, H.K., Tipoe, G.L., Ho, H.M., Yao, X., Huang, Y., 2014. Cyclooxygenase-2-dependent oxidative stress mediates palmitate-induced impairment of endothelium-dependent relaxations in mouse arteries. *Biochem. Pharmacol.* 91, 474-482.
- Garcés, C.N., Vela, D., Mullo, A., Cabezas, V., Alvear, A., Ponce, C.H., 2019. Spirulina supplementation during the transition period by grazing dairy cattle at tropical highland conditions. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 477-480. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1691-7>.
- Gill, H.S., Shu, Q., Leng, R.A., 2000. Immunization with *Streptococcus bovis* protects against lactic acidosis in sheep. *Vaccine* 18, 2541-2548.
- Giordano E, Visioli F. 2014. Long-chain omega 3 fatty acids: molecular bases of potential antioxidant actions. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 90, 1-4.
- Givens, D.I., Kliem, K.E., 2009. Improving the nutritional quality of milk. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Functional and Speciality Beverage Technology*. Ed.: Paquin, P. Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 135-169. ISBN 9781845693428.
- Gonthier, C., Mustafa, A.F., Ouellet, D.R., Chouinard, P.Y., Berthiaume, R., Petit, H.V., 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: Effects on blood parameters and milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* 88, 748-756.

- Goiris, K., Muylaert, K., De Cooman, L., 2015. Microalgae as a Novel Source of Antioxidants for Nutritional Applications. In: Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances. 269-280, ISBN: 978-0-12-800776-1.
- Goiri, I., Zubiria, I., Benhissi, H., Atxaerandio, R., Ruiz, R., Mandaluniz, N., Garcia-Rodriguez, A., 2019. Use of cold-pressed sunflower cake in the concentrate as a low-input local strategy to modify the milk fatty acid profile of dairy cows. *Animals* 9, 803.
- Gouveia, L., Batista, A. P., Sousa, I., Raymundo, A., Bandarra, N. M., 2008. Microalgae in novel food products, In: Food Chemistry Research Developments. Ed.: K. N. Papadopoulos. Nova Science Publishers, New York, 1-37, ISBN 978-1-60456-262-0.
- Grainger, C., Williams, R., Clarke, T., Wright, A-D., Eckard, R., 2010. Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *J Dairy Sci.* 93, 2612-2619.
- Gruby, D., Delafond, H.M.O., 1843. Recherchessur des animalcules se développant en grand nombredansl'estomacetdan les intestins pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 17, 1304-1308.
- Gruninger, R.J., Puniya, A.K., Callaghanc, T.M., Edwardsc, J.E., Youssef, N., Dagar, S.S., Fliegerova, K., Griffith, G.W., Forster, R., Tsang, A., McAllister, T., Elshahed, MS., 2014. Anaerobic fungi (Phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding of their taxonomy, life cycle, ecology, role, and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol.* 90, 1-17.
- Gugel, R.K. and Falk, K.C., 2006. Agronomic and Seed Quality Evaluation of *Camelina sativa* in Western Canada. *Can. J. Plant Sci.* 86, 1047-1058.
- Guldas, M., Ziyank-Demirtas, S., Sahan, Y., Yildiz, E., Gurbuz, O., 2021. Antioxidant and anti-diabetic properties of spirulina platensis produced in Turkey. *Food Sci. Technol.* 41, 615-625. <https://doi.org/10.1590/fst.23920>.
- Gupta, R., Bhadauriya, P., Chauhan, V. S., Bisen, P. S., 2008. Impact of UV-B radiation on thylakoid membrane and fatty acid profile of *Spirulina platensis*. *Curr. Microbiol.* 56, 156-161.
- Guyader, J., Eugene, M., Noziere, P., Morgavi, D.P., Doreau, M., Martin, C., 2014. Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. *Animal* 8, 1816-1825.
- Habte-Tsion, H.M., Ren, M., Liu, B., Xie, J., Ge, X., Chen, R., Zhou, Q., Pan, L. 2015. Threonine affects digestion capacity and hepatopancreatic gene expression of juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Br. J. Nutr.* 114, 533-543.
- Häcker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Häcker, G., Mann, M., Karin, M., 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439, 204-207.
- Hall Clifford, 2001, Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources, Eds: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. In: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Antioxidants in Food, Woodhead Publishing, Chapter 9, 159-209, ISBN 9781855734630,

Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Lampi, A.M., Toivonen, V., Shingfield, K.J., Vanhatalo, A., 2011. Effect of plant oils and camelina expeller on milk fatty acid composition in lactating cows fed diets based on red clover silage. *J. Dairy Sci.* 94, 4413-4430.

Han, P., Li, Jingjing, Zhong, H., Xie, J., Zhang, P., Lu, Q., Li, Jun, Xu, P., Chen, P., Leng, L., Zhou, W., 2021. Anti-oxidation properties and therapeutic potentials of spirulina. *Algal Res.* 55, 102240. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102240>.

Hanisch, U.K., Quirion, R., 1995. Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine In: *Brain Research Reviews.* 21, 3, 246-284.

Harris, I.S., DeNicola, G.M., 2020. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol.* 30, 440-451.

Hassan, A.M., Abdel-Aziem, S.H., Abdel-Wahhab, M.A., 2012. Modulation of DNA damage and alteration of gene expression during aflatoxicosis via dietary supplementation of *Spirulina* (*Arthrospira*) and Whey protein concentrate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 294–300.

Hayashi, N., Tashiro, T., Yamamori, H., Takagi, K., Morishima, Y., Otsubo, Y., Sugiura, T., Furukawa, K., Nitta, H., Nakajima, N., Suzuki, N., 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.

Heath, I.B., Kaminskyj, S.G., Bauchop, T., 1986. Basal body loss during fungal zoospore encystment: evidence against centriole autonomy. *J. Cell Sci.* 83, 135-140.

Hegarty, R.S., 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Aust. J. Agric. Res.* 50, 1321-1327. doi:10.1071/AR99008.

Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Janssen, P.H., Abecia, L., Angarita, E., Aravena, P., Arenas, G.N., Ariza, C., Attwood, G.T., Avila, J.M., Avila-Stagno, J., Bannink, A., Barahona, R., Batistotti, M., Bertelsen, M.F., Brown-Kav, A., Carvajal, A.M., Cersosimo, L., Chaves, A.V., Church, J., Clipson, N., Cobos-Peralta, M.A., Cookson, A.L., Cravero, S., Carballo, O.C., Crosley, K., Cruz, G., Cucchi, M.C., De La Barra, R., De Menezes, A.B., Detmann, E., Dieho, K., Dijkstra, J., Dos Reis, W.L.S., Dugan, M.E.R., Ebrahimi, S.H., Eythórsdóttir, E., Fon, F.N., Fraga, M., Franco F., Friedeman, C., Fukuma, N., Gagić, D., Gangnat, I., Grilli, D.J., Guan, L.L., Miri, V.H., Hernandez-Sanabria, E., Gomez, A.X.I., Isah, O.A., Ishaq, S., Jami, E., Jelincic, J., Kantanen, J., Kelly, W.J., Kim, S.H., Klieve, A., Kobayashi, Y., Koike, S., Kopecny, J., Kristensen, T.N., Krizsan, S.J., LaChance, H., Lachman, M., Lamberson, W.R., Lambie, S., Lassen, J., Leahy, S.C., Lee, S.S., Leiber, F., Lewis, E., Lin, B., Lira, R., Lund, P., Macipe, E., Mamuad, L.L., Mantovani, H.C., Marcoppido, G.A., Márquez, C., Martin, C., Martinez, G., Martinez, M.E., Mayorga, O.L., McAllister, T.A., McSweeney, C., Mestre L, Minnee, E., Mitsumori, M., Mizrahi, I., Molina, I., Muenger, A., Munoz, C., Murovec, B., Newbold, J., Nsereko, V., O'Donovan, M., Okunade, S., O'Neill, B., Ospina, S., Ouwerkerk, D., Parra, D., Pereira, L.G.R., Pinares-Patino, C., Pope, P.B., Poulsen, M., Rodehutsord, M., Rodriguez, T., Saito, K., Sales, F., Sauer, C., Shingfield, K., Shoji, N., Simunek, J., Stojanović-Radić, Z., Stres, B., Sun, X., Swartz, J., Tan, Z.L., Tapio, I., Taxis, T.M., Tomkins, N., Ungerfeld, E., Valizadeh, R., Van Adrichem, P., Van Hamme, J., Van Hoven, W., Waghorn, G., Wallace, R.J., Wang, M., Waters, S.M., Keogh, K., Witzig, M., Wright, A.D.G., Yamano, H., Yan, T., Yanez-Ruiz, D.R., Yeoman, C.J., Zambrano, R., Zeitz, J., Zhou, M., Zhou, H.W., Zou,

C.X., Zunino, P., 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* 5, 14567.

Hermanson, G.T., 2013. The Reactions of Bioconjugation. In: *Bioconjugate Techniques*, Chapter 3, 229-258. ISBN: 978-0-12-382239-0.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Lumbsch, H.T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miądlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J., Standridge, S.M., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111, 509-547.

Hirahashi, T., Matsumoto, M., Hazeki, K., Saeki, Y., Ui, M., Seya, T., 2002. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int Immunopharmacol.* 2, 423-434.

Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., Tsujimoto G., 2005. Free Fatty Acids Regulate Gut Incretin Glucagon-Like Peptide-1 Secretion through GPR120. *Nat. Med.* 11, 90-94.

Holman, B.W.B., Malau-Aduli, A.E.O., 2012a. *Spirulina* as a livestock supplement and animal feed. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97, 615-623.

Holman, B.W.B., Kashani, A., Malau-Aduli, A.E.O., 2012b. Growth and body conformation responses of genetically divergent Australian sheep to *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) supplementation. *Am. J. Exp. Agric.* 2, 160-173.

Hook, S.E., Wright, A.G., McBride, B.W., 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea.* 945785. doi: 10.1155/2010/945785.

Howe, P., Meyer, B., Record, S., Baghurst, K., 2006. Dietary intake of long-chain  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids: Contribution of meat sources. *Nutrition* 22, 47-53.

Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., 2013. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: a review of enteric methane mitigation options. *J. Anim. Sci.* 91, 5045–5069. doi:10.2527/jas.2013-6583.

Hu, G., Barnes, B.J., 2009. IRF-5 is a mediator of the death receptor-induced apoptotic signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 2767–2777.

Hurtaud, C., Peyraud, J.L., 2007. Effects of feeding camelina (seeds or meal) on milk fatty acid composition and butter spreadability. *J. Dairy Sci.* 90, 5134-5145.

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 Microbiol. Ecol.* 73, 396-702.

Huws, S.A., Creevey, C.J., Oyama, L.B., Mizrahi, I., Denman, S.E., Popova, M., Muñoz-Tamayo, R., Forano, E., Waters, S.M., Hess, M., Tapio, I., Smidt, H., Krizsan, S.J., Yáñez-Ruiz, D.R., Belanche, A., Guan, L., Gruninger, R.J., McAllister, T.A., Newbold, C.J., Roehe, R., Dewhurst, R.J., Snelling, T.J., Watson, M., Suen, G., Hart, E.H., Kingston-Smith, A.H., Scollan, N.D., Do Prado, R.M., Pilau, E.J., Mantovani, H.C., Attwood, G.T., Edwards, J.E., McEwan, N.R., Morrisson, S., Mayorga, O.L., Elliott, C., Morgavi, D.P., 2018. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: Past, present, and future. *Front. Microbiol.* 9, 1-33.

Ismail, M., Hossain, M.F., Tanu, A.R., Shekhar, H.U., 2015. Effect of spirulina intervention on oxidative stress, antioxidant status, and lipid profile in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Biomed Res. Int.* 2015, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/486120>.

Ivan, M., Petit, H. V., Chiquette, J., Wright, A.D.G., 2013. Rumen fermentation and microbial population in lactating dairy cows receiving diets containing oilseeds rich in C-18 fatty acids. *Br. J. Nutr.* 109, 1211-1218.

Jakubikova, J., Cervi, D., Ooi, M., Kim, K., Nahar, S., Klippel, S., Cholujova, D., Leiba, M., Daley, J.F., Delmore, J., Negri, J., Blotta, S., Mcmillin, D.W., Hideshima, T., Richardson, P.G., Sedlak, J., Anderson, K.C., Mitsiades, C.S., 2011. Anti-tumor activity and signaling events triggered by the isothiocyanates, sulforaphane and phenethyl isothiocyanate, in multiple myeloma. *Haematologica* 96, 1170-1179.

Jeffery, N.M., Newsholme, E.A., Calder, P.C., 1997. The Level of Polyunsaturated Fatty Acids and the n-6 to n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Ratio in the Rat Diet Both Affect Serum Lipid Levels and Lymphocyte Functions, Prostaglandins *Leukot. Essent. Fatty Acids.* 57, 149-160.

Jenkins, T.C., 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76, 3851-3863.

Jenkins, T.C., Wallace, R.J., Moate, P.J., Mosley, E.E., 2008. Board-invited review: recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86, 397-412.

Jiang, W.D., Deng, Y.P., Zhou, X.Q., Liu, Y., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Tang, W.N., Wu, P., Zhang, Y.A., Feng, L., 2017. Towards the modulation of oxidative damage, apoptosis and tight junction protein in response to dietary leucine deficiency: A likely cause of ROS-induced gill structural integrity impairment. *Fish Shellfish Immunol.* 70, 609-620.

Jin, W., Cheng, Y.F., Mao, S.Y., Zhu, W.Y., 2014. Discovery of a novel rumen methanogen in the anaerobic fungal culture and its distribution in the rumen as revealed by real-time PCR. *BMC Microbiol.* 14, 1-12.

Jolly, C.A., Jiang, Y.-H., Chapkin, R.S., McMurray, D.N., 1997. Dietary (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Suppress Murine Lymphoproliferation, Interleukin-2 Secretion and the Formation of Diacylglycerol and Ceramide, *J. Nutr.* 127, 37-43.

Jouany, J.P., 1996. Effect of rumen protozoa on protein utilization by ruminants. *J. Nutr.* 126, 1335-1346.

- Jordan, E., Lovett, D., Monahan, F., Callan, J., Flynn, B., O' Mara F., 2006. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *J Anim Sci.*, 84, 162-170.
- Jóźwik, A., Strzałkowska, N., Bagnicka, E., Łagodziński, Z., Pyzel, B., Chyliński, W., Czajkowska, A., Grzybek, W., Słoniewska, D., Krzyzewski, J., Horbańczuk, J.O., 2010. The effect of feeding linseed cake on milk yield and milk fatty acid profile in goats. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 28, 245-251.
- Kakani, R., Fowler, J., Haq, A.-U., Murphy, E.J., Rosenberger, T.A., Berhow, M., Bailey, C.A., 2012. Camelina meal increases egg n-3 fatty acid content without altering quality or production in laying hens. *Lipids* 47, 519-526.
- Karlsson, I., Samuelsson, K., Ponting, D.J., Törnqvist, M., Ilag, L.L., Nilsson, U., 2016. Peptide Reactivity of Isothiocyanates-Implications for Skin Allergy. *Sci. Rep.* 6, 1-12.
- Katsuyama, M., 2010. NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: Its transcriptional regulation and physiological roles. *J. Pharmacol. Sci.*, 114, 134-146.
- Kawai, T., Akira, S., 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*. 21, 317-337.
- Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 5, 1-8.
- Keller, M., Manzocchi, E., Rentsch, D., Lugarà, R., Giller, K., 2021. Antioxidant and inflammatory gene expression profiles of bovine peripheral blood mononuclear cells in response to arthropira platensis before and after lps challenge. *Antioxidants*. 10, 814.
- Kent, M., Welladsen, H. M., Mangott, A., Li, Y., 2015. Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements. *PloS one*. 10(2): e0118985.
- Kepler, C.R., Hiron, 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.
- Khafipour, E., Li, S., Plaizier, J.C., Krause, D.O., 2009. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7115-7124.
- Kholif A.E., Morsy T.A., Matloup O.H., Anele U.Y., Mohamed A.G., El-Sayed A.B., 2017. Dietary *Chlorella vulgaris* microalgae improves feed utilization, milk production and concentrations of conjugated linoleic acids in the milk of Damascus goats. *J. Agric. Sci.* 155, 508-518.
- 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, K.J., Kim, H.Y., Son, E.J., Heo, J., Cheong, J.H., 2009. Oleic acid inhibits hepatic insulin signaling through deregulation of STAT3 activation and C/EBP $\alpha$  expression. *Cell. Signal.* 21, 1269-1276.

- Kim, M.Y., Cheong, S.H., Lee, J.H., Kim, M.J., Sok, D.E., Kim, M.R., 2010. Spirulina improves antioxidant status by reducing oxidative stress in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J. Med. Food* 13, 420-426.
- Kim, D.H., Park, M.H., Choi, Y.J., Chung, K.W., Park, C.H., Jang, E.J., An, H.J., Yu, B.P., Chung, H.Y., 2013. Molecular study of dietary heptadecane for the anti-inflammatory modulation of NF- $\kappa$ B in the aged kidney, *PLoS ONE*, 8(3): e59316.
- Kittelmann, S., Naylor, G.E., Koolaard, J.P., Janssen, P.H., 2012. A proposed taxonomy of anaerobic fungi (class neocallimastigomycetes) suitable for large-scale sequence based community structure analysis. *PLoS One*, 7 (5):1–13.
- Kjeldahl, J., 1883. A New Method for the Determination of Nitrogen in Organic Matter. *Z. Anal. Chem.* 22, 366-382.
- Kliem, K.E., Humphries, D.J., Kirton, P., Givens, D.I., Reynolds, C.K., 2019. Differential effects of oilseed supplements on methane production and milk fatty acid concentrations in dairy cows. *Animal*. 13, 309-317.
- Klieve, A.V., Swain, R.A., 1993. Estimating ruminal bacteriophage numbers using pulsed field gel electrophoresis and laser densitometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2299-2303.
- Klieve, A.V., Heck, G.L., Prance, M.A., Shu, Q., 1999. Genetic homogeneity and phage susceptibility of ruminal strains of *Streptococcus bovis* isolated in Australia. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 108-112.
- Kobayashi, Y., Shinkai, T., Koike, S., 2008. Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion - Review. *Folia Microbiol.* 53, 195-200.
- Koike, S., Yoshitani, S., Kobayashi, Y. & Tanaka, K., 2003. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 229, 23-30.
- Kouřimská, L., Vondráčková, E., Fantová, M., Nový, P., Nohejlová, L., Michnová, K., 2014. Effect of feeding with algae on fatty acid profile of goat's milk. *Sci. Agric. Bohem.* 45, 162-169.
- Kranenburg, O., Verlaan, I. Moolenaar, W.H., 1999. Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 35301-35304.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., McSweeney, C., S., 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 663-693.
- Krause, D.O., Nagaraja, T.G., Wright, A.D.G., Callaway, T.R., 2013. Board-invited review: rumen microbiology: leading the way in microbial ecology. *J Anim Sci.* 91, 331-341.
- Krausgruber, T., Saliba, D., Ryzhakov, G., Lanfrancotti, A., Blazek, K. Udalova, I.A., 2010. IRF5 is required for late-phase TNF secretion by human dendritic cells. *Blood.* 115, 4421-4430.

- Ku, C.S., Pham, T.X., Park, Y., Kim, B., Shin, M.S., Kang, I., Lee, J., 2013. Edible blue-green algae reduce the production of pro-inflammatory cytokines by inhibiting NF- $\kappa$ B pathway in macrophages and splenocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830, 2981-2988.
- Kudo, H., Cheng, K.J. & Costerton, J.W., 1987. Interactions between *Treponema bryantii* and cellulolytic bacteria in the in vitro degradation of straw cellulose. *Can. J. Microbiol.* 33, 244-248.
- Kulpys, J., Paulauskas, E., Pilipavicius, V., Stankevicius, R., 2009. Influence of cyanobacteria *Arthrospira (Spirulina) platensis* biomass additives towards the body condition of lactation cows and biochemical milk indexes. *Agron. Res.* 7, 823-835.
- Labrou, N. E., Mello, L.V., Clonis Y.D., 2001. Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase I. *Biochem. J.* 358, 101-110. doi:10.1042/0264-6021:3580101.
- Lal, G., Bromberg, J.S., 2009. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 114, 3727-3735.
- Lazear, H.M., Lancaster, A., Wilkins, C., Suthar, M.S., Huang, A., Vick, S.C., Clepper, L., Thackray, L., Brassil, M.M., Virgin, H.W., Nikolich-Zugich, J., Moses, A.V., Gale, M., Früh, K., Diamond, M.S., 2013. IRF-3, IRF-5, and IRF-7 Coordinately Regulate the Type I IFN Response in Myeloid Dendritic Cells Downstream of MAVS Signaling. *PLoS Pathog.* 9(1): e1003118.
- Lee, A.H., Hiramatsu, N., 2011. Role of n-3 series polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease prevention. *Nutr. Diet. Suppl.* 3, 93-100.
- Lee, G.Y., Han, S.N., 2018. The role of vitamin E in immunity. *Nutrients.* 10, 1-18.
- Lennarz, W.J., 1966. Lipid metabolism in the bacteria. *Adv. Lipid. Res.* 4, 175-225.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Ann. Rev. Physiol.* 68, 253-278.
- Li, X., Wang, X., Chen, D., Chen, S., 2011. Antioxidant activity and mechanism of protocatechuic acid in vitro. *J. funct. food health dis.* 7, 232-244.
- Liang, Y., Bao, Y., Gao, X., Deng, K., An, S., Wang, Z., Huang, X., Liu, D., Liu, Z., Wang, F., Fan, Y., 2020. Effects of spirulina supplementation on lipid metabolism disorder, oxidative stress caused by high-energy dietary in Hu sheep. *Meat Sci.* 164, 108094.
- Liestianty, D., Rodianawati, I., Arfah, R.A., Assa, A., Patimah, Sundari, Muliadi, 2019. Nutritional analysis of spirulina sp to promote as superfood candidate. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 509 012031.
- Lillis, L., Boots, B., Kenny, D., Petrie, K., Boland, T., Clipson, N., Doyle, E.,M., 2011. The effect of dietary concentrate and soya oil inclusion on microbial diversity in the rumen of cattle. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1426-1435.
- Liu, Q., Wang, J., Bu, D., Khas-Erdene, Liu, K., Wei, H., Zhou, L., Beitz, D.C., 2010. Influence of linolenic acid content on the oxidation of milk fat. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3741-3746.



- Liu, S.J., Bu, D., Wang, J.Q., Liu, L., Liang, S., Wei, H.Y., Zhou, L.Y., Li, D., Looor, J.J., 2010. Effect of incremental levels of fish oil supplementation on specific bacterial populations in bovine ruminal fluid. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96, 9-16.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.C., 2017. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2, e17023.
- Løbner, M., Walsted, A., Larsen, R., Bendtzen, K., Nielsen, C.H., 2008. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Med. Food.* 11, 313-322.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4, 118-126.
- Loor, J.J., Bandara, A.B.P.A., Herbein, J.H., 2002. Characterization of C18:1 and C18:2 isomers produced during microbial biohydrogenation of unsaturated fatty acids from canola and soya bean oil in the rumen of lactating cows. *J Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 86, 422-432.
- Lv, X.; Mao, S.; Zhu, W., 2016. A 22:6 n-3 Rich Supplement Affects the Ruminal Microbial Community and Fermentation and Alters Plasma Metabolites. *Ann. Anim. Sci.* 16, 533-550.
- Ma, Q., 2013. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 53, 401-426.
- Machado, L., Magnusson, M., Paul, N.A., De Nys, R., Tomkins, N., 2014. Effects of marine and freshwater macroalgae on in vitro total gas and methane production. *PLoS One.* 9(1): e85289.
- Machmuller, A., Soliva, C.R., Kreuzer, R., 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogens in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 43, 41-55.
- 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. *Livest. Sci.* 205, 111-121.
- Mahmoud, M.M., El-Lamie, M.M., Kilany, O.E., Dessouki, A.A., 2018. Spirulina (*Arthrospira platensis*) supplementation improves growth performance, feed utilization, immune response, and relieves oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Pseudomonas fluorescens*. *Fish Shellfish Immunol.* 72, 291-300.
- Mahmoud, E.A., El-Sayed, B.M., Mahsoub, Y.H., El-Murr, A., elhakeem I., Neamat-Allah, A.N.F., 2020. Effect of *Chlorella vulgaris* enriched diet on growth performance, hemato-immunological responses, antioxidant and transcriptomics profile disorders caused by deltamethrin toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 102, 422-429.
- Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Figueres, L., Wallace, R.J., 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 91, 303-314.
- Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Bestwick, C.S., Richardson, A.J., McKain, N., Larson, T.R., Wallace, R.J., 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiol.* 10, 52.

- 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 Rumen Fermentation and Methane Production. *Sci. Rep.* 6, 32321.
- Manzocchi, E., Guggenbühl, B., Kreuzer, M., Giller, K., 2020. Effects of the substitution of soybean meal by spirulina in a hay-based diet for dairy cows on milk composition and sensory perception. *J. Dairy Sci.* 103, 11349-11362.
- Mao, T.K., Van de Water, J., Gershwin, M.E., 2000. Effect of Spirulina on the secretion of cytokines from peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Food*, 3, 135–141.
- Mao, T.K., Van de Water, J., Gershwin, M.E., 2005. Effects of a Spirulina based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. *J. Med. Food*. 8, 27-30.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351-365.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 217-232.
- Matthäus, B., Zubr, J., 2000. Variability of specific components in *Camelina sativa* oilseed cakes. *Ind. Crops Prod.* 12, 9-18.
- Matthäus, B., Angelini, L.G., 2005. Anti-nutritive constituents in oilseed crops from Italy. *Ind. Crops Prod.* 21, 89-99.
- Matthews, C., Crispie, F., Lewis, E., Reid, M., O’Toole, P.W., Cotter, P.D., 2019. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes.* 10, 115-132.
- Mavis, R. D., Stellwagen, E., 1968. Purification and subunit structure of glutathione reductase from bakers' yeast. *J. Biol. Chem.* 243, 809-814.
- Mavrommatis, A., Chronopoulou, E.G., Sotirakoglou, K., Labrou, N.E., 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. *Livest. Sci.* 218, 37-43.
- Mavrommatis, A., Tsiplakou, E., 2020a. The impact of the dietary supplementation level with *Schizochytrium* sp. on milk chemical composition and fatty acid profile, of both blood plasma and milk of goats. *Small Rumin. Res.* 193, 106252.
- Mavrommatis, A., Mitsiopoulou, C., Christodoulou, C., Karabinas, D., Nenov, V., Zervas, G., Tsiplakou, E., 2020b. Dietary supplementation of a live yeast product on dairy sheep milk performance, oxidative and immune status in peripartum period. *J. Fungi.* 6, 334.
- Mavrommatis, A., Sotirakoglou, K., Kamilaris, C., Tsiplakou, E., 2021a. Effects of Inclusion of *Schizochytrium* spp. and Forage-to-Concentrate Ratios on Goats’ Milk Quality and Oxidative Status. *Foods.* 10, 1322.
- Mavrommatis, A., Theodorou, G., Politis, I., Tsiplakou, E., 2021b. *Schizochytrium* sp. Dietary supplementation modify Toll-like receptor 4 (TLR4) transcriptional regulation in monocytes and neutrophils of dairy goats. *Cytokine.* 148, 155588.

- Mavrommatis, A., Skliros, D., Simoni, M., Righi, F., Fletmetakis, E., Tsiplakou, E., 2021c. Alterations in the rumen particle-associated microbiota of goats in response to dietary supplementation levels of schizochytrium spp. *Sustain.* 13, 1-17.
- Mavrommatis, A., Sotirakoglou, K., Skliros, D., Fletmetakis, E., Tsiplakou, E., 2021d. Dose and time response of dietary supplementation with *Schizochytrium* sp. on the abundances of several microorganisms in the rumen liquid of dairy goats. *Livest. Sci.* 247, 104489.
- Mavrommatis, A., Skliros, D., Sotirakoglou, K., Fletmetakis, E., Tsiplakou, E., 2021e. The effect of forage-to-concentrate ratio on *Schizochytrium* spp.-supplemented goats: Modifying rumen microbiota. *Animals.* 11, 1-27.
- Mavrommatis, A., Skliros, D., Fletmetakis, E., Tsiplakou, E., 2021f. Changes in the rumen bacteriome structure and enzymatic activities of goats in response to dietary supplementation with schizochytrium Spp. *Microorganisms.* 9, 1528.
- Mavrommatis, A.; Mitsiopoulou, C.; Christodoulou, C.; Kariampa, P.; Simoni, M.; Righi, F.; Tsiplakou, E., 2021g. Effects of supplementing rumen-protected methionine and lysine on milk performance and oxidative status of dairy ewes. *Antioxidants.* 10, 654.
- Mansoori, H., Aghazadeh A., Nazeradl, K., 2011. Sunflower Oil Seed (Raw-or Heat-Treated) in Lactating Dairy Cow's Diets: Effects on Milk Fatty Acids Profile and Milk Production. *J. Anim. Vet. Adv.* 10, 470-479.
- McCarty, M.F., 2013. Nutraceutical strategies for ameliorating the toxic effects of alcohol. *Med. Hypotheses.* 80, 456-462.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- 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.
- Meng, H., Shen, Y., Shen, J., Zhou, F., Shen, S., Das, U.N., 2013. Effect of n-3 and n-6 unsaturated fatty acids on prostate cancer (PC-3) and prostate epithelial (RWPE-1) cells in vitro. *Lipids Health Dis.* 12, 1-14.
- Meydani, S.N., Endres, S., Woods, M.M., Goldin, B.R., Soo, C., Morrill-Labrode, A., Dinarello, C., Gorbach, S.L., 1991. Oral (n-3) Fatty Acid Supplementation Suppresses Cytokine Production and Lymphocyte Proliferation: Comparison Between Young and Older Women, *J. Nutr.* 121, 547-555.
- Mierlita, D., Daraban, S., Lup, F., Chereji, A., 2011. The effect of grazing management and camelina seed supplementation in the diet on milk performance and milk fatty acid composition of dairy ewes. *J. Food, Agric. Environ.* 9, 368-373.
- Mierlita, D., Vicas, S., 2015. Dietary effect of silage type and combination with camelina seed on milk fatty acid profile and antioxidant capacity of sheep milk. *South African J. Anim. Sci.* 45, 1-11.

- Mierlita, D., Pop, I.M., Lup, F., Simeanu, D., Vicas, S.I., Simeanu, C., 2018. The fatty acids composition and health lipid indices in the sheep raw milk under a pasture-based dairy system. *Rev. Chim.* 69, 160-165.
- Mitsiopoulou, C., Karaïskou, C., Simoni, M., Righi, F., Pappas, A.C., Sotirakoglou, K., Tsiplakou, E., 2020. Influence of dietary sesame meal, vitamin E and selenium supplementation on milk production, composition, and fatty acid profile in dairy goats. *Livest. Sci.* 244, 104336.
- Mitsiopoulou, C., Sotirakoglou, K., Labrou, N.E., Tsiplakou, E., 2021a. The effect of whole sesame seeds on milk chemical composition, fatty acid profile and antioxidant status in goats. *Livest. Sci.* 245, 104452.
- Mitsiopoulou, C., Sotirakoglou, K., Skliros, D., Fliemetakis, E., Tsiplakou, E., 2021b. The impact of whole sesame seeds on the expression of key-genes involved in the innate immunity of dairy goats. *Animals.* 11, 1-14.
- Moate, P.J., Williams, S.R.O., Hannah, M.C., Eckard, R.J., Auldist, M.J., Ribaux, B.E., Jacobs, J.L., Wales, W.J., 2013. Effects of feeding algal meal high in docosahexaenoic acid on feed intake, milk production, and methane emissions in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96, 3177-3188.
- 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.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C.J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal.* 4, 1024-1036.
- Muhling, M., Belay, A., Whitton, B. A., 2005. Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. *J. Appl. Phycol.* 17, 137-146.
- Murphy, E.J., 2011. Versatile Camelina: the future of biofuel and much more. *INFORM.* 22, 604-608.
- Murphy, E.J., 2016. Camelina (*Camelina sativa*). In: *Industrial Oil Crops*. Eds.: T., A., McKeon, D., G., Hayes, D., F., Hildebrand, R., J., Weselake. AOCS Press. ISBN 9781893997981. 207-230.
- Nagaraja, T.G., Newbold, C.J., VanNevel, C.J., Demeyer, D.I., 1997. Manipulation of ruminal fermentation. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*, Eds.: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (London: Blackie Academic and Professional), 523-632.
- Nagaraja, T.G., 2016. Microbiology of the Rumen. In: Millen, D., De Beni Arrigoni, M., Lauritano Pacheco, R. (eds) *Rumenology*. Springer, Cham.
- Natarajan, S., Luthria, D., Bae, H., Lakshman, D., Mitra, A., 2013. Transgenic Soybeans and Soybean Protein Analysis: An Overview. *J. Agric. Food Chem.* 61, 11736-11743.
- Nam, I.S., Garnsworthy, P.C., 2007. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 103, 551-556.
- Newbold, C.J., Lassalas, B., Jouany, J.P., 1995. The importance of methanogens is associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Letts. Appl. Micro.* 21, 230-234.

- Newbold, C.J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., McEwan, N.R., 2015. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Front. Microbiol.* 6, 1313.
- Nguyen, Q.V.; Malau-Aduli, B.S.; Cavalieri, J.; Malau-Aduli, A.E.; Nichols, P.D., 2019. Enhancing Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content of dairy- derived foods for human consumption. *Nutrients.* 11, 743.
- Nielsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Grandjean, P., 1997. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.* 43, 1209-1214.
- Novak, T.E., Babcock, T.A., Jho, D. H., Helton, W.S., Espat, N.J., 2003. NF-kappa B inhibition by omega-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284, L84-L89.
- Nudda, A., Battacone, G., Usai, M.G., Fancellu, S., Pulina, G., 2006. Supplementation with extruded linseed cake affects concentrations of conjugated linolenic acid and vaccenic acid in goat milk. *J. Dairy Sci.* 89, 277-282.
- Nudda, A., Battacone, G., Boaventura Neto, O., Cannas, A., Francesconi, A.H.D., Atzori, A.S., Pulina, G., 2014. Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. *Rev. Bras. Zootec.* 43, 445-456.
- O'Fallon, J.V., 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.
- Oganesyan, G., Saha, S.K., Guo, B., He, J.Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., Cheng, G., 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature.* 439, 208-211.
- Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., WuQiang Fan, P., Li, W., J., Lu, S.M., Watkins, J.M., Olefsky, 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin sensitizing effects, *Cell.* 142. 687-698.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *J. lab. clin. med.* 70, 158-169.
- Pajor, F., Egerszegi, I., Steiber, O., Bodnár, Á., Póti, P., 2019. Effect of marine algae supplementation on the fatty acid profile of milk of dairy goats kept indoor and on pasture. *J. Anim. Feed Sci.* 28, 169-176.
- Panjaitan, T., Quigley, S. P., McLennan, S. R., Poppi, D. P., 2010. Effect of the concentration of *Spirulina* (*Spirulina platensis*) algae in the drinking water on water intake by cattle and the proportion of algae bypassing the rumen. *Anim. Prod. Sci.* 50, 405-409.
- Panyakaew, P., Boon, N., Goel, G., Yuangklang, C., Schonewille, J.T., Hendriks, W. H., 2013. Effect of supplementing coconut or krabok oil, rich in medium-chain fatty acids on ruminal fermentation, protozoa and archaeal population of bulls. *Animal.* 7, 1950-1958.
- Patra, A.K., 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livest.*

Sci. 155, 244-254.

Patra, A., Yu, Z., 2013. Effects of coconut and fish oils on ruminal methanogenesis, fermentation, and abundance and diversity of microbial populations in vitro. *J. Dairy Sci.* 96, 1782-1792.

Patra, A.K., 2014. A meta-analysis of the effect of dietary fat on enteric methane production, digestibility and rumen fermentation in sheep, and a comparison of these responses between cattle and sheep. *Livest Sci.* 162, 97-103.

Patra, A.K., 2016. Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emissions in ruminants. *Front. Vet. Sci.* 3, 1-17.

Patra, A.K., Park, T., Kim, M.; Yu, Z., 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8, 13.

Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N.T., Georgiou, C.D., Angelatou, F., Matsokis, N.A., 2004. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci. Lett.* 357, 83-86.

Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* 133, 2812-2819.

Peluso, I., Romanelli, L., Palmery, M., 2014. Interactions between prebiotics, probiotics, polyunsaturated fatty acids and polyphenols: diet or supplementation for metabolic syndrome prevention? *Int. J. Food Sci. Nutr.* 65, 259-267.

Petri, L., Szijj, P.A., Kelemen, Á., Imre, T., Gömöry, Á., Lee, M.T.W., Hegedus, K., Ábrányi-Balogh, P., Chudasama, V., Keseru, G.M., 2020. Cysteine specific bioconjugation with benzyl isothiocyanates. *RSC Adv.* 10, 14928-14936.

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509-515.

Pikul, J., Wójtowski, J., Danków, R., Teichert, J., Czyzak-Runowska, G., Cais-Sokolińska, D., Cieślak, A., Szumacher-Strabel, M., Bagnicka, E., 2014. The effect of false flax (*Camelina sativa*) cake dietary supplementation in dairy goats on fatty acid profile of kefir. *Small Rumin. Res.* 122, 44-49.

Piras, V., Selvarajoo, K., 2014. Beyond MyD88 and TRIF pathways in Toll-like receptor signaling. *Front. Immunol.* 5, 1-3.

Plaizier, J.C., Krause, D.O., Gozho, G.N., McBride, B.W., 2009. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176:2131.

Póti, P., Pajor, F., Bodnár, Á., Penksza, K., Köles, P., 2015. Effect of micro-alga supplementation on goat and cow milk fatty acid composition. *Chil. J. Agric. Res.* 75, 259-263.

Prandi B., Zurlini C., Cigognini I.M., Cutroneo S., Di Massimo M., Bondi M., Brutti A., Sforza S., Tedeschi T., 2021. Targeting the Nutritional Value of Proteins From Legumes By-Products Through Mild Extraction Technologies. *Front. Nutr.* 8, 1-10.

- Qi, S., Fu, W., Wang, C., Liu, C., Quan, C., Kourouma, A., Yan, M., Yu, T., Duan, P., Yang, K., 2014. BPA-induced apoptosis of rat Sertoli cells through Fas/FasL and JNKs/p38 MAPK pathways. *Reprod. Toxicol.* 50, 108-116.
- Qian, C., Cao, X., 2013. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1283, 67-74.
- Quigley, S. P., Poppi, D. P., 2009. Strategies to Increase Growth of Weaned Bali Calves. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 1-90.
- Rabben, H.L., Kodama, Y., Nakamura, M., Bones, A.M., Wang, T.C., Chen, D., Zhao, C.M., Øverby, A., 2021. Chemopreventive Effects of Dietary Isothiocyanates in Animal Models of Gastric Cancer and Synergistic Anticancer Effects With Cisplatin in Human Gastric Cancer Cells. *Front. pharmacol.* 12, 1-13.
- Rakariyatham, K., Yang, X., Gao, Z., Song, M., Han, Y., Chen, X., Xiao, H., 2019. Synergistic chemopreventive effect of allyl isothiocyanate and sulforaphane on non-small cell lung carcinoma cells. *Food Funct.* 10, 893-902.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Lekanne Deprez, R.H., Moorman, A.F.M., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339, 62-66.
- Ravi, M., De, S.L., Azharuddin, S., Paul, S.F.D., 2010. The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutr. Diet. Suppl.* 2, 73-83.
- Réb e, C., V egan, F., Berger, H., Ghiringhelli, F., 2013. STAT3 activation. *JAK-STAT.* 2(1): e23010.
- Renier, G., Skamene, E., de Sanctis, J., Radzioch, D., 1993. Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Prevent the Development of Atherosclerotic Lesions in Mice: Modulation of Macrophage Secretory Activities, *Arterioscler. Thomb.* 13, 1515-1524.
- Rezaeian M, Beakes GW, Parker DS, 2004. Distribution and estimation of anaerobic zoosporic fungi along the digestive tracts of sheep. *Mycol. Res.* 108, 1227-1233.
- Rodriguez-Rodriguez, M.F., Sánchez-García, A., Salas, J.J., Garcés, R., Martínez-Force, E., 2013. Characterization of the morphological changes and fatty acid profile of developing *Camelina sativa* seeds. *Ind. Crops Prod.* 50, 673-679.
- Ruiz-Medina, B.E., Ross, J.A., Kirken, R.A., 2015. Interleukin-2 receptor  $\beta$  Thr-450 phosphorylation is a positive regulator for receptor complex stability and activation of signaling molecules. *J. Biol. Chem.* 290, 20972-20983.
- Running, J.A., Severson, D.K., Schneider, K.J., 2002. Extracellular production of L-ascorbic acid by *Chlorella protothecoides*, *Prototheca* species, and mutants of *P. moriformis* during aerobic culturing at low pH. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 93-98.
- Russo, R., Reggiani, R., 2018. Antioxidants in flour of the oilseed crop *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Int. J. Plant Biol.* 9, 7659.

- Ruth, M., Field, C., 2013. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue: Discovery Service for Endeavour College of Natural Health Library. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 1-10.
- Ryu, J.M., Han, H.J., 2011. L-threonine regulates G1/S phase transition of mouse embryonic stem cells via PI3K/Akt, MAPKs, and mTORC pathways. *J. Biol. Chem.* 286, 23667-23678.
- Sadeghi, S., Wallace, F.A., Calder, P.C., 1999. Dietary Lipids Modify the Cytokine Response to Bacterial Lipopolysaccharide in Mice. *Immunology.* 96, 404-410.
- Salehi, R., Colazo, M.G., Gobikrushanth, M., Basu, U., Ambrose, D.J., 2016. Effects of prepartum oilseed supplements on subclinical endometritis, pro-and anti-inflammatory cytokine transcripts in endometrial cells and postpartum ovarian function in dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 747-758.
- Saliba, D.G., Heger, A., Eames, H.L., Oikonomopoulos, S., Teixeira, A., Blazek, K., Androulidaki, A., Wong, D., Goh, F.G., Weiss, M., Byrne, A., Pasparakis, M., Ragoussis, J., Udalova, I.A., 2014. IRF5:RelA interaction targets inflammatory genes in macrophages. *Cell Rep.* 8, 1308-1317.
- Sanderson, P., Yaqoob, P., Calder, P.C., 1995. Effects of Dietary Lipid Manipulation upon Rat Spleen Lymphocyte Functions and the Expression of Lymphocyte Surface Molecules. *J. Nutr. Environ. Med.* 5, 119-132.
- Sanz Sampelayo, M.R., Chilliard, Y., Schmidely, P., Boza, J., 2007. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* 68, 42-63.
- Sawanon, S. & Kobayashi, Y., 2006. Synergistic fibrolysis in the rumen by cellulolytic *Ruminococcus flavefaciens* and non-cellulolytic *Selenomonas ruminantium*: evidence in defined cultures. *Anim. Sci. J.* 77, 208-214.
- Sawanon, S., Koike, S., Kobayashi, Y., 2011. Evidence for the possible involvement of *Selenomonas ruminantium* in rumen fiber digestion. *FEMS Microbiol. Lett.* 325, 170-179.
- Scheifinger, C.C. & Wolin, M.J., 1973. Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogens* and *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Microbiol.* 26, 789-795.
- Scheifinger, C.C., Linehan, B., Wolin, M.J., 1975. H<sub>2</sub> production by *Selenomonas ruminantium* in the presence of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol.* 29, 480-483.
- Schmidt, E.B., Varming, K., Moller, J.M., Bulow Pederson, I., Madsen, P., Dyerberg, J., 1996. No Effect of a Very Low Dose of n-3 Fatty Acids on Monocyte Function in Healthy Humans. *Scand. J. Clin. Investig.* 56, 87-92.
- Schmidt, S., Pokorny, J., Vajdak, M., Sekretar, S., Gordon, M.H., 2003. Oilseeds as a source of antioxidants. *Bull. Potrav. Vysk.* 42, 133-149.
- Schogor, A.L.B., Palin, M.F., Dos Santos, G.T., Benchaar, C., Lacasse, P., Petit, H. V., 2013. Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and oxidative indicators in the blood, milk, mammary tissue and ruminal fluid of dairy cows fed flax meal. *Br. J. Nutr.* 110, 1743-1750.



- Schuster, A., Friedt, W., 1998. Glucosinolate content and composition as parameters of quality of Camelina seed. *Ind. Crops Prod.* 7, 297-302.
- Sereika, M., Kirkegaard, R.H., Karst, S.M., Michaelsen, T.Y., Sørensen, E.A., Wollenberg, R.D., Albertsen, M., 2022. Oxford Nanopore R10.4 long-read sequencing enables the generation of near-finished bacterial genomes from pure cultures and metagenomes without short-read or reference polishing. *Nat. Methods.* 19, 823-826.
- Shahidi, F., 2000. Antioxidant factors in plant foods and selected oilseeds. *BioFactors.* 13, 179-185.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2018. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9, 345-381.
- Sheikhzadeh, N., Mousavi, S., Hamidian, G., Firouzamandi, M., Oushani, A.K. Mardani, K., 2019. Role of dietary *Spirulina platensis* in improving mucosal immune responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 510, 1-8.
- Shimamatsu, H., 2004. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia.* 512, 39-44.
- Shimkiene, A., Bartkeviciute, Z., Chernauskiene, J., Shimkus, A., Chernauskas, A., Ostapchuk, A., Nevitov, M., 2010. The influence of *Spirulina platensis* and concentrates on lambs' growth. *Zhivotnov'dni Nauki.* 47, 9-14.
- Shingfield, K.J., Griinari, J.M., 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 799-816.
- Shingfield, K.J., Chilliard, Y., Toivonen, V., Kairenius, P., Givens, D.I., 2008. Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. In: *Bioactive components of milk*. Ed.: Bösze, Z. *Adv. Exp. Med. Biol.* Springer, New York, US. 606, 3-65. ISBN: 9780387740874.
- Shingfield, K.J., Bonnet, M., Scollan, N.D., 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal.* 7, 132-162.
- Shu, Q., Bird, S.H., Gill, H.S., Rowe, J.B., 1999. Immunological cross-reactivity between the vaccine and other isolates of *Streptococcus bovis* and *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Immunol.* 26, 153-158.
- Shukla, V.K.S., Dutta, P.C., Artz, W.E., 2002. Camelina oil and its unusual cholesterol content. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 965-969.
- Simkus, A., Oberauskas, V., Laugalis, J., Zelvyte, R., Monkeviciene, I., Sedervicius, A., Simkiene, A., Pauliukas, K., 2007. The effect of weed *Spirulina Platensis* on the milk production in cows. *Vet. ir Zootech.* 38, 60.
- Simkus, A., Oberauskas, V., Zelvyte, R., Monkeviciene, I., Laugalis, J., Sederevicius, A., Simkiene, A., Juozaitiene, V., Juozaitis, A., Bartkeviciute, Z., 2008. The effect of the microalga *Spirulina platensis* on milk production and some microbiological and biochemical parameters in dairy cows. *Zhivotnov'dni Nauki.* 45, 42-49.

- Simopoulos, AP., 2002. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 495-505.
- Simopoulos, AP., 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 233, 674-688.
- Siri-Tarino, P.W., Sun, Q., Hu, F.B., Krauss, R.M., 2010. Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 535-546.
- Sirohi, S.K., Chaudhary, P.P., Singh, N., Singh, D., Puniya, A.K., 2013. The 16S rRNA and mcrA gene based comparative diversity of methanogens in cattle fed on high fibre based diet. *Gene.* 523, 161-166.
- Sirohi, S.K., Singh, N., Dagar, S.S., Puniya, A.K., 2012. Molecular tools for deciphering the microbial community structure and diversity in rumen ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1135-1154.
- Soliva, C.R., Meile L., Hindrichsen, I.K., Kreuzer, M., Machmüller, A., 2004. Myristic acid supports the immediate inhibitory effect of lauric acid on ruminal methanogens and methane release. *Anaerobe.* 10, 269-276.
- Song, L., Thornally, P.J., 2007. Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food Chem. Toxicol.* 45, 216-224.
- Sordillo, L.M., 2016. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *J. Dairy Sci.* 99, 4967-4982.
- Soxhlet, F., 1879. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dinglers Polytech. J.* 232, 461-465.
- Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87-96.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H.H., Renganathan, S., 2016. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 55, 909-941.
- Summers, L.K.M., Fielding, B.A., Bradshaw, H.A., Ilic, V., Beysen, C., Clark, M.L., Moore, N.R., Frayn, K.N., 2002. Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. *Diabetologia.* 45, 369-377.
- Sun, X., 2020. Invited Review: Glucosinolates Might Result in Low Methane Emissions From Ruminants Fed Brassica Forages. *Front. Vet. Sci.* 7, 1-10.
- Svihus B., Uhlen, A.K., Harstad, O.M., 2005. Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122, 303-320.
- Szterk, A., Roszko, M., Sosinska, E., Derewiaka, D., Lewicki, P.P., 2010. Chemical composition and oxidative stability of selected plant oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 87, 637-645.

- Szumacher-Strabel, M., Cieślak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., Bielińska, S., Stanisz, M., Wójtowski, J., 2011. Camelina sativa cake improved unsaturated fatty acids in ewe's milk. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2031-2037.
- Tang, Y., Yu, L., Pel, Q., Xu, L., Wang, H., 2014. Extraction of polysaccharides from Spirulina with boiling water. *J. agricultural sci. technol.* 15, 1043-1045.
- Tang, Q., Tan, P., Ma, N., Ma, X., 2021. Physiological functions of threonine in animals: Beyond nutrition metabolism. *Nutrients.* 13, 2592.
- Tanwar, B., Goyal, A., 2021. Oilseeds: Health Attributes and Food Applications. ISBN : 978-981-15-4193-3.
- Tapio, I., Snelling, T.J., Strozzi, F., Wallace, R.J., 2014. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8, 7.
- Tashiro, T., Yamamori, H., Takagi, K., Hayashi, N., Furukawa, K., Nakajima, N., 1998. n-3 Versus n-6 Polyunsaturated Fatty Acids in Critical Illness, *Nutrition.* 14, 551-553.
- Thies, F., Nebe-von-Caron, G., Powell, J.R., Yaqoob, P., Newsholme, E.A., Calder, P.C., 2001a. Dietary Supplementation with Eicosapentaenoic Acid, but Not with Other Long Chain n-3 or n-6 Polyunsaturated Fatty Acids, Decreases Natural Killer Cell Activity in Healthy Subjects Aged >55 y. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 539-548.
- Thies, F., Nebe-von-Caron, G., Powell, J.R., Yaqoob, P., Newsholme, E.A., Calder, P.C., 2001b. Dietary Supplementation with  $\gamma$ -Linolenic Acid or Fish Oil Decreases T Lymphocyte Proliferation in Healthy Older Humans. *J. Nutr.* 131, 1918-1927.
- Tokusoglu, O., Unal, M. K., 2003. Biomass nutrient profiles of three microalgae: Spirulina platensis, Chlorella vulgaris, and Isochrysis galbana. *J. Food Sci.* 68, 1144-1148.
- Toral, P.G., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Juárez, M. de la Fuente, M.A., 2010. Milk fatty acid profile and dairy sheep performance in response to diet supplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *J. Dairy Sci.* 93, 1655-1667.
- Toral, P.G., Hervás, G., Peiró, V. Frutos, P., 2018. Conditions associated with marine lipid-induced milk fat depression in sheep cause shifts in the in vitro ruminal metabolism of 1-13C oleic acid. *Animals.* 8, 1-13.
- Tsiplakou, E., Zervas, G., 2008. Comparative study between sheep and goats on rumenic acid and vaccenic acid in milk fat under the same dietary treatments. *Livest. Sci.* 119, 87-94.
- Tsiplakou, E., Abdullah, M.A.M., Skliros, D., Chatzikonstantinou, M., Fletmetakis, 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. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 101, 275-283.
- Tsiplakou, E., Abdullah, M.A.M., Mavrommatis, A., Chatzikonstantinou, M., Skliros, D., Sotirakoglou, K., Fletmetakis, E., Labrou, N.E., Zervas, G., 2017a. The effect of dietary Chlorella vulgaris inclusion on goat's milk chemical composition, fatty acids profile and enzymes activities related to oxidation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 102, 142-151.

- Tsiplakou, E., Abdullah, M.A.M., Mavrommatis, A., Chatzikonstantinou, M., Skliros, D., Sotirakoglou, K., Flemetakis, E., Labrou, N.E., Zervas, G., 2017b. The effect of dietary *Chlorella pyrenoidosa* inclusion on goats milk chemical composition, fatty acids profile and enzymes activities related to oxidation. *Livest. Sci.* 197, 106-111.
- Tsiplakou, E., Chatzikonstantinou, M., Mitsiopoulou, C., Karaiskou, C., Mavrommatis, A., Sotirakoglou, K., Labrou, N., Zervas, G., 2017c. Effect of soya bean and fish oil inclusion in diets on milk and plasma enzymes from sheep and goat related to oxidation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101, 733-742.
- Tsiplakou, E., Mitsiopoulou, C., Mavrommatis, A., Karaiskou, C., Chronopoulou, E.G., Mavridis, G., Sotirakoglou, K., Labrou, N.E., Zervas, G., 2017d. Effect of under- and over-feeding on sheep and goat milk and plasma enzymes activities related with oxidation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102, 288-298.
- Tsiplakou, E., Mavrommatis, A., Skliros, D., Righi, F., Flemetakis, E., 2020. The impact of rumen-protected amino acids on the expression of key- genes involved in the innate immunity of dairy sheep. *PLoS One.* 15, 1-16.
- Tsiplakou, E., Mitsiopoulou, C., Karaiskou, C., Simoni, M., Pappas, A.C., Righi, F., Sotirakoglou, K., Labrou, N.E., 2021. Sesame meal, vitamin E and selenium influence goats' antioxidant status. *Antioxidants.* 10, 1-10.
- Tullo, E., Finzi, A., Guarino, M., 2019. Review: Environmental impact of livestock farming and Precision Livestock Farming as a mitigation strategy. *Sci. Total Environ.* 650, 2751-2760.
- Tymensen, L.D., Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., 2012. Structures of free-living and protozoa-associated methanogen communities in the bovine rumen differ according to comparative analysis of 16S rRNA and mcrA genes. *Microbiol.* 158, 808-1817.
- Tynan, G.A., McNaughton, A., Jarnicki, A., Tsuji, T., Lavelle, E.C., 2012. Polymyxin B inadequately quenches the effects of contaminating lipopolysaccharide on murine dendritic cells. *PLoS ONE.* 7(5): e37261.
- Uma Suganya, K.S., Govindaraju, K., Ganesh Kumar, V., 2015. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. *Mater. Sci. Eng. C.* 47, 351-356.
- United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2022. World Population Prospects 2022: Summary of Results. Department of Economic and Social Affairs Population Division. United Nations. New York. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3. ISBN: 978-92-1-148373-4.
- Urbaniak, S.D., Caldwell, C.D., Zheljazkov, V.D., Lada, R., Luan, L., 2008. The effect of seeding rate, seeding date and seeder type on the performance of *Camelina sativa* L. in the Maritime Provinces of Canada. *Can. J. Plant Sci.* 88, 501-508.
- 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, 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. *Front. Microbiol.* 8, 1-15.
- Vaughn, S.F., Berhow, M.A., 2005. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Ind. Crops Prod.* 21, 193-202.
- Vaure C.a., Liu Y., A, 2014. Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species, *Front. Immunol.* 5, 316.
- Vaz, B. da S., Moreira, J.B., Morais, M.G. de, Costa, J.A.V., 2016. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Curr. Opin. Food Sci.* 7, 73-77.
- Vollman, J., Moritz, T., Kargl, C., Baumgartner S., Wagentristl, H., 2007. Agronomic evaluation of camelina genotypes selected for seed quality characteristics. *Ind. Crop Prod.* 26, 270-277.
- Vorachek, W., Hujegiletu Bobe, G., & Hall, J., 2013. Reference gene selection for quantitative PCR studies in sheep neutrophils. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11484-11495. <https://doi.org/10.3390/ijms140611484>.
- Virsangbhai, C.K., Goyal, A., Tanwar, B., Sihag, M.K., 2020. Potential Health Benefits of Conjugated Linoleic Acid: An Important Functional Dairy Ingredient. *European J. Nutr. Food Saf.* 11, 200-213.
- Wachtler, P., König, W., Senkal, M., Kemen, M., Koller, M., 1997. Influence of a Total Parenteral Nutrition Enriched with  $\omega$ -3 Fatty Acids on Leukotriene Synthesis of Peripheral Leukocytes and Systemic Cytokine Levels in Patients with Major Surgery, *J. Trauma.* 42, 191-198.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., Hekimi, S., 2018. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 217, 1915-1928.
- Watanabe, S., Hayashi, H., Onozaki, K., Okuyama, H., 1991. Effect of Dietary  $\gamma$ -Linolenate/Linoleate Balance on Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor Production in Mouse Macrophages, *Life Sci.* 48, 2013-2020.
- Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, A.C.M.A., Kato, T., Sakai, M., 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 258, 157–163.
- WHO, 2003. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series No. 916. World Health Organization: Geneva.
- Williams AG, 1979. The selectivity of carbohydrate assimilation in the anaerobic rumen ciliate *Dasytricha ruminantium*. *J. Appl. Bacteriol.* 47, 511-520.
- Williams, A.G., 1989. Metabolic activities of rumen protozoa. In: *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion*. Eds.: Nolan, J.V., Leng, R.A., Demeyer, D.I. Penambul Books, Armidale, Australia. 97-126. ISBN: 0858347830.
- Williams, A.G., Coleman, G.S., 1992. *The Rumen Protozoa*. New York: Springer-Verlag. ISBN: 978-1-4612-7664-7.

- Williams, C.M., 2000. Dietary fatty acids and human health. *Anim. Res.* 49, 165-180.
- Woese, C.R., Fox, G., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5088-5090.
- Wolin, M.J., Miller, T.L., Stewart, C.S., 1997. Microbe - microbe interactions. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*, 2nd edn. Eds.: Hobson, P.N., Stewart, C.S. Blackie Academic and Professional, London. 467-491. ISBN: 978-94-010-7149-9.
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., Kuča, K., 2016. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Arch. Toxicol.* 90, 1817–1840.
- Wullepit, N., Raes, K., Beerda, B., Veerkamp, R.F., Fremaut, D., De Smet, S., 2009. Influence of management and genetic merit for milk yield on the oxidative status of plasma in heifers. *Livest. Sci.* 123, 276-282.
- Wullepit, N., Hostens, M., Ginneberge, C., Fievez, V., Opsomer, G., Fremaut, D., de Smet, S., 2012. Influence of a marine algae supplementation on the oxidative status of plasma in dairy cows during the periparturient period. *Prev. Vet. Med.* 103, 298-303.
- Yaqoob, P., Calder, P.C., 1995. Effects of Dietary Lipid Manipulation Upon Inflammatory Mediator Production by Murine Macrophages, *Cell. Immunol.* 163, 120-128.
- Yaqoob, P., Pala, H.S., Cortina-Borja, M., Newsholme, E.A., and Calder, P.C., 2000. Encapsulated Fish Oil Enriched in  $\alpha$ - Tocopherol Alters Plasma Phospholipid and Mononuclear Cell Fatty Acid Compositions but Not Mononuclear Cell Functions, *Eur. J. Clin. Investig.* 30, 260-274.
- Ye, Z., Wang, S., Zhang, C., Zhao., Y., 2020. Coordinated Modulation of Energy Metabolism and Inflammation by Branched-Chain Amino Acids and Fatty Acids. *Front. Endocrinol.* 11, 5–9.
- Yu, B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74, 139-162.
- Yu, J., Cai, L., Zhang, J., Yang, A., Wang, Y., Zhang, L., Qi, D., 2020. Effects of Thymol Supplementation on Goat Rumen Fermentation and Rumen Microbiota In Vitro. *Microorganisms*, 8, 1160.
- Yue, J., López, J.M., 2020. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2346.
- Zahran, E., Awadin, W., Risha, E., Khaled, A.A., Wang, T., 2019. Dietary supplementation of *Chlorella vulgaris* ameliorates chronic sodium arsenite toxicity in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* as revealed by histopathological, biochemical and immune gene expression analysis. *Fish. Sci.*, 85, 199-215.
- Zanatta, A.L., Miranda, D.T., Dias, B.C., Campos, R.M., Massaro, M.C., Michelotto, P.V., Jr. West, A.L., 2014. Fish oil supplementation decreases oxidative stress but does not affect platelet-activating factor bioactivity in lungs of asthmatic rats. *Lipids.* 49, 665-675.

- Zhang, R.H., Mustafa, A.F., Zhao, X., 2006. Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Anim. Feed Sci. Technol.* 127, 220-233.
- Zhang, C.M., Guo, Y.Q., Yuan, Z.P., Wu, Y.M., Wang, J.K., Liu, J.X., Zhu, W.Y., 2008. Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 146, 259-269.
- Zhang, J., Miao, S., Huang, S., Li, S., Zhang, J. Z., Miao, S. J., Huang, S., Li, S. L., 2010. Effect different levels of Spirulina on ruminal internal environment and degradation of fibre in dairy cows. *China Cattle Science.* 36, 32-36.
- Zhang, R., Zhu, W., Mao, S., 2016. High-concentrate feeding upregulates the expression of inflammation-related genes in the ruminal epithelium of dairy cattle. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 7, 1-13.
- Zhou, X., Meile, L., Kreuzer, M., Zeitz, J.O., 2013. The effect of saturated fatty acids on methanogenesis and cell viability of *Methanobrevibacter ruminantium*. *Archaea.* 2013, 106916.
- Zubr, J., 1997. Oil-seed crop: *Camelina sativa*. *Ind. Crops Prod.* 6, 113-119.
- Zubr, J., Matthaus, B., 2002. Effects of growth conditions on fatty acids and tocopherols in *Camelina sativa* oil. *Ind. Crops Prod.* 15, 155-162.
- Zubr, J., 2003. Dietary fatty acids and amino acids of *Camelina sativa* seed. *J. Food Qual.* 26, 451-462.

## 18. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακας 18.1.** Συσχετίσεις μεταξύ της σχετικής έκφρασης γονιδίων στα μονοκύτταρα και των αμινοξέων των τεσσάρων μεγμάτων συμπυκνωμένων ζωοτροφών (CON, CS6, CS11, CS16)

		GLY	ALA	SER	PRO	VAL	THR	ILE	LEU	ASP	LYS	GLU	HIS	PHE	ARG	TYR	CYS	MET
<b>TLR4</b>	Pearson Correlation	-0,282	0,497	0,130	,989*	0,635	0,239	0,921	0,810	0,511	0,512	0,471	0,048	0,075	-0,389	-0,002	-0,109	0,152
	Sig. (2-tailed)	0,718	0,503	0,870	0,011	0,365	0,761	0,079	0,190	0,489	0,488	0,529	0,952	0,925	0,611	0,998	0,891	0,848
<b>MYD88</b>	Pearson Correlation	-0,920	0,847	-0,687	-0,065	0,119	-0,858	0,410	0,244	0,828	0,640	0,761	-0,822	-0,457	-0,933	-0,576	-0,281	-0,016
	Sig. (2-tailed)	0,080	0,153	0,313	0,935	0,881	0,142	0,590	0,756	0,172	0,360	0,239	0,178	0,543	0,067	0,424	0,719	0,984
<b>TRIF</b>	Pearson Correlation	-0,570	0,527	-0,813	-0,526	-0,041	-,951*	-0,132	-0,326	0,512	0,424	0,519	-0,853	-0,631	-0,595	-0,677	0,037	0,139
	Sig. (2-tailed)	0,430	0,473	0,187	0,474	0,959	0,049	0,868	0,674	0,488	0,576	0,481	0,147	0,369	0,405	0,323	0,963	0,861
<b>TRAF3</b>	Pearson Correlation	-0,430	0,435	-0,836	-0,589	-0,021	-0,938	-0,254	-0,472	0,424	0,386	0,461	-0,841	-0,690	-0,477	-0,712	0,174	0,234
	Sig. (2-tailed)	0,570	0,565	0,164	0,411	0,979	0,062	0,746	0,528	0,576	0,614	0,539	0,159	0,310	0,523	0,288	0,826	0,766
<b>IRF3</b>	Pearson Correlation	-0,570	0,527	-0,813	-0,526	-0,041	-,951*	-0,132	-0,326	0,512	0,424	0,519	-0,853	-0,631	-0,595	-0,677	0,037	0,139
	Sig. (2-tailed)	0,430	0,473	0,187	0,474	0,959	0,049	0,868	0,674	0,488	0,576	0,481	0,147	0,369	0,405	0,323	0,963	0,861
<b>IRF5</b>	Pearson Correlation	-0,363	0,389	-0,840	-0,612	-0,012	-0,924	-0,306	-0,535	0,380	0,366	0,430	-0,829	-0,710	-0,419	-0,721	0,235	0,275
	Sig. (2-tailed)	0,637	0,611	0,160	0,388	0,988	0,076	0,694	0,465	0,620	0,634	0,570	0,171	0,290	0,581	0,279	0,765	0,725
<b>MAPK</b>	Pearson Correlation	-0,544	0,554	-0,862	-0,485	0,043	-,971*	-0,115	-0,349	0,543	0,483	0,565	-0,890	-0,699	-0,597	-0,741	0,118	0,228
	Sig. (2-tailed)	0,456	0,446	0,138	0,515	0,957	0,029	0,885	0,651	0,457	0,517	0,435	0,110	0,301	0,403	0,259	0,882	0,772
<b>CHUK</b>	Pearson Correlation	,951*	-0,664	0,074	-0,225	0,122	0,317	-0,662	-0,760	-0,636	-0,324	-0,467	0,284	-0,176	0,834	-0,023	0,778	0,510
	Sig. (2-tailed)	0,049	0,336	0,926	0,775	0,878	0,683	0,338	0,240	0,364	0,676	0,533	0,716	0,824	0,166	0,977	0,222	0,490
<b>JUND</b>	Pearson Correlation	-0,666	0,934	-0,901	0,221	0,630	-0,879	0,501	0,100	0,938	0,942	,971*	-,955*	-0,813	-0,851	-0,893	0,233	0,526
	Sig. (2-tailed)	0,334	0,066	0,099	0,779	0,370	0,121	0,499	0,900	0,062	0,058	0,029	0,045	0,187	0,149	0,107	0,767	0,474
<b>STAT3</b>	Pearson Correlation	-0,931	0,730	-0,543	-0,184	-0,099	-0,776	0,324	0,266	0,703	0,458	0,603	-0,696	-0,279	-0,875	-0,400	-0,454	-0,227
	Sig. (2-tailed)	0,069	0,270	0,457	0,816	0,901	0,224	0,676	0,734	0,297	0,542	0,397	0,304	0,721	0,125	0,600	0,546	0,773
<b>NFKB</b>	Pearson Correlation	-0,506	0,429	-0,767	-0,618	-0,130	-0,914	-0,237	-0,396	0,413	0,324	0,421	-0,797	-0,586	-0,511	-0,621	0,031	0,094



	Sig. (2-tailed)	0,494	0,571	0,233	0,382	0,870	0,086	0,763	0,604	0,587	0,676	0,579	0,203	0,414	0,489	0,379	0,969	0,906
<b>TNF</b>	Pearson Correlation	0,317	-0,619	0,074	-,977*	-0,770	-0,063	-0,927	-0,717	-0,636	-0,673	-0,624	0,142	0,134	0,476	0,210	-0,037	-0,325
	Sig. (2-tailed)	0,683	0,381	0,926	0,023	0,230	0,937	0,073	0,283	0,364	0,327	0,376	0,858	0,866	0,524	0,790	0,963	0,675
<b>IL1B</b>	Pearson Correlation	0,278	0,276	-0,243	0,741	0,932	0,069	0,435	0,071	0,314	0,587	0,442	-0,156	-0,465	0,000	-0,435	0,690	0,813
	Sig. (2-tailed)	0,722	0,724	0,757	0,259	0,068	0,931	0,565	0,929	0,686	0,413	0,558	0,844	0,535	1,000	0,565	0,310	0,187
<b>IL2</b>	Pearson Correlation	0,310	-0,617	,996**	0,184	-0,496	0,931	0,000	0,425	-0,627	-0,732	-0,732	,957*	,963*	0,511	,973*	-0,544	-0,682
	Sig. (2-tailed)	0,690	0,383	0,004	0,816	0,504	0,069	1,000	0,575	0,373	0,268	0,268	0,043	0,037	0,489	0,027	0,456	0,318
<b>IL6</b>	Pearson Correlation	-0,173	0,320	-0,349	-0,113	0,249	-0,211	0,181	0,046	0,319	0,309	0,272	-0,319	-0,259	-0,135	-0,286	0,206	0,242
	Sig. (2-tailed)	0,363	0,275	0,294	0,348	0,550	0,339	0,375	0,348	0,281	0,361	0,309	0,285	0,337	0,402	0,334	0,685	0,626
<b>IL8</b>	Pearson Correlation	0,007	0,243	0,299	,978*	0,607	0,464	0,767	0,691	0,263	0,330	0,250	0,264	0,173	-0,104	0,135	0,012	0,188
	Sig. (2-tailed)	0,993	0,757	0,701	0,022	0,393	0,536	0,233	0,309	0,737	0,670	0,750	0,736	0,827	0,896	0,865	0,988	0,812
<b>IL10</b>	Pearson Correlation	-0,317	0,619	-0,074	,977*	0,770	0,063	0,927	0,717	0,636	0,673	0,624	-0,142	-0,134	-0,476	-0,210	0,037	0,325
	Sig. (2-tailed)	0,683	0,381	0,926	0,023	0,230	0,937	0,073	0,283	0,364	0,327	0,376	0,858	0,866	0,524	0,790	0,963	0,675
<b>CCL5</b>	Pearson Correlation	-0,640	0,094	0,318	-0,242	-0,705	-0,014	0,142	0,499	0,053	-0,305	-0,141	0,137	0,580	-0,371	0,477	-,963*	-0,907
	Sig. (2-tailed)	0,360	0,906	0,682	0,758	0,295	0,986	0,858	0,501	0,947	0,695	0,859	0,863	0,420	0,629	0,523	0,037	0,093
<b>CXCL16</b>	Pearson Correlation	-0,329	0,119	0,640	0,651	-0,070	0,549	0,688	0,940	0,107	-0,086	-0,045	0,492	0,699	-0,206	0,607	-0,706	-0,562
	Sig. (2-tailed)	0,671	0,881	0,360	0,349	0,930	0,451	0,312	0,060	0,893	0,914	0,955	0,508	0,301	0,794	0,393	0,294	0,438
<b>HMOX1</b>	Pearson Correlation	-,988*	0,829	-0,293	0,298	0,096	-0,485	0,735	0,705	0,807	0,546	0,672	-0,488	-0,063	-0,944	-0,216	-0,597	-0,282
	Sig. (2-tailed)	0,012	0,171	0,707	0,702	0,904	0,515	0,265	0,295	0,193	0,454	0,328	0,512	0,937	0,056	0,784	0,403	0,718

**Πίνακας 18.2.** Συσχετίσεις μεταξύ της σχετικής έκφρασης γονιδίων στα ουδετερόφιλα και των αμινοξέων των τεσσάρων μειγμάτων συμπυκνωμένων ζωοτροφών του πειραματισμού με σπέρματα καμελίνας

		GLY	ALA	SER	PRO	VAL	THR	ILE	LEU	ASP	LYS	GLU	HIS	PHE	ARG	TYR	CYS	MET
<b>TLA</b>	Pearson Correlation	0,303	-0,107	0,548	0,846	0,416	0,727	0,516	0,545	-0,086	0,012	-0,088	0,554	0,374	0,235	0,378	0,035	0,089
	Sig. (2-tailed)	0,697	0,893	0,452	0,154	0,584	0,273	0,484	0,455	0,914	0,988	0,912	0,446	0,626	0,765	0,622	0,965	0,911
<b>MYD88</b>	Pearson Correlation	0,150	-0,475	0,966	0,272	-0,461	0,875	0,151	0,571	-0,488	-0,634	-0,616	0,893	0,966	0,354	0,949	-0,646	-0,726
	Sig. (2-tailed)	0,850	0,525	0,034	0,728	0,539	0,125	0,849	0,429	0,512	0,366	0,384	0,107	0,034	0,646	0,051	0,354	0,274
<b>TRIF</b>	Pearson Correlation	-0,089	0,149	0,112	0,235	0,107	0,049	0,257	0,256	0,149	0,116	0,121	0,012	0,062	-0,145	0,031	-0,113	-0,037
	Sig. (2-tailed)	0,566	0,588	0,525	0,448	0,547	0,469	0,545	0,485	0,584	0,561	0,574	0,522	0,518	0,593	0,524	0,552	0,541
<b>TRAF3</b>	Pearson Correlation	-0,310	0,617	-,996**	-0,184	0,496	-0,931	0,000	-0,425	0,627	0,732	0,732	-0,957	-0,963	-0,511	-0,973	0,544	0,682
	Sig. (2-tailed)	0,690	0,383	0,004	0,816	0,504	0,069	1,000	0,575	0,373	0,268	0,268	0,043	0,037	0,489	0,027	0,456	0,318
<b>IRF3</b>	Pearson Correlation	-0,085	0,206	-0,024	0,207	0,186	-0,062	0,232	0,167	0,162	0,205	0,203	-0,105	-0,079	-0,179	-0,104	-0,002	0,083
	Sig. (2-tailed)	0,519	0,532	0,558	0,451	0,576	0,475	0,488	0,493	0,502	0,519	0,518	0,525	0,573	0,505	0,559	0,585	0,583
<b>IRF5</b>	Pearson Correlation	-,999**	0,805	-0,337	0,168	0,015	-0,554	0,638	0,619	0,780	0,508	0,645	-0,529	-0,087	-0,940	-0,237	-0,604	-0,310
	Sig. (2-tailed)	0,001	0,195	0,663	0,832	0,985	0,446	0,362	0,381	0,220	0,492	0,355	0,471	0,913	0,060	0,763	0,396	0,690
<b>MAPK</b>	Pearson Correlation	-0,428	-0,118	0,617	-0,090	-0,725	0,327	0,158	0,595	-0,154	-0,485	-0,352	0,452	0,818	-0,142	0,733	-0,986	-0,977
	Sig. (2-tailed)	0,572	0,882	0,383	0,910	0,275	0,673	0,842	0,405	0,846	0,515	0,648	0,548	0,182	0,858	0,267	0,014	0,023
<b>CHUK</b>	Pearson Correlation	-0,570	0,527	-0,813	-0,526	-0,041	-0,951	-0,132	-0,326	0,512	0,424	0,519	-0,853	-0,631	-0,595	-0,677	0,037	0,139
	Sig. (2-tailed)	0,430	0,473	0,187	0,474	0,959	0,049	0,868	0,674	0,488	0,576	0,481	0,147	0,369	0,405	0,323	0,963	0,861
<b>JUND</b>	Pearson Correlation	-0,256	0,328	0,381	0,931	0,400	0,432	0,866	0,897	0,335	0,274	0,253	0,277	0,350	-0,282	0,270	-0,325	-0,110
	Sig. (2-tailed)	0,744	0,672	0,619	0,069	0,600	0,568	0,134	0,103	0,665	0,726	0,747	0,723	0,650	0,718	0,730	0,675	0,890
<b>STAT3</b>	Pearson Correlation	-0,831	0,683	-0,676	-0,329	-0,081	-0,881	0,158	0,043	0,660	0,465	0,598	-0,791	-0,432	-0,805	-0,529	-0,280	-0,092
	Sig. (2-tailed)	0,169	0,317	0,324	0,671	0,919	0,119	0,842	0,957	0,340	0,535	0,402	0,209	0,568	0,195	0,471	0,720	0,908
<b>NFKB</b>	Pearson Correlation	-0,069	-0,201	0,850	0,494	-0,266	0,764	0,435	0,785	-0,212	-0,382	-0,356	0,740	0,873	0,098	0,819	-0,690	-0,660
	Sig. (2-tailed)	0,931	0,799	0,150	0,506	0,734	0,236	0,565	0,215	0,788	0,618	0,644	0,260	0,127	0,902	0,181	0,310	0,340
<b>TNF</b>	Pearson Correlation	0,411	-0,806	0,445	-0,835	-0,900	0,293	-0,858	-0,503	-0,826	-0,900	-0,854	0,493	0,488	0,634	0,562	-0,240	-0,558

	Sig. (2-tailed)	0,589	0,194	0,555	0,165	0,100	0,707	0,142	0,497	0,174	0,100	0,146	0,507	0,512	0,366	0,438	0,760	0,442
<b>IL1B</b>	Pearson Correlation	0,445	0,061	-0,012	0,740	0,816	0,307	0,352	0,078	0,099	0,377	0,220	0,089	-0,263	0,205	-0,215	0,642	0,703
	Sig. (2-tailed)	0,555	0,939	0,988	0,260	0,184	0,693	0,648	0,922	0,901	0,623	0,780	0,911	0,737	0,795	0,785	0,358	0,297
<b>IL2</b>	Pearson Correlation	-0,346	0,661	-0,136	0,963	0,794	0,002	0,930	0,695	0,679	0,718	0,671	-0,204	-0,191	-0,515	-0,269	0,061	0,358
	Sig. (2-tailed)	0,654	0,339	0,864	0,037	0,206	0,998	0,070	0,305	0,321	0,282	0,329	0,796	0,809	0,485	0,731	0,939	0,642
<b>IL6</b>	Pearson Correlation	-0,570	0,527	-0,813	-0,526	-0,041	-0,951	-0,132	-0,326	0,512	0,424	0,519	-0,853	-0,631	-0,595	-0,677	0,037	0,139
	Sig. (2-tailed)	0,430	0,473	0,187	0,474	0,959	0,049	0,868	0,674	0,488	0,576	0,481	0,147	0,369	0,405	0,323	0,963	0,861
<b>IL8</b>	Pearson Correlation	0,185	0,258	0,027	0,913	0,833	0,292	0,621	0,379	0,290	0,484	0,359	0,063	-0,169	-0,029	-0,168	0,408	0,560
	Sig. (2-tailed)	0,815	0,742	0,973	0,087	0,167	0,708	0,379	0,621	0,710	0,516	0,641	0,937	0,831	0,971	0,832	0,592	0,440
<b>IL10</b>	Pearson Correlation	0,202	0,270	-0,035	0,887	0,866	0,243	0,591	0,319	0,304	0,516	0,386	0,011	-0,238	-0,028	-0,231	0,472	0,621
	Sig. (2-tailed)	0,798	0,730	0,965	0,113	0,134	0,757	0,409	0,681	0,696	0,484	0,614	0,989	0,762	0,972	0,769	0,528	0,379
<b>CCL5</b>	Pearson Correlation	-0,731	0,223	0,253	-0,133	-0,598	-0,069	0,274	0,588	0,184	-0,177	-0,013	0,059	0,521	-0,486	0,402	-0,962	-0,855
	Sig. (2-tailed)	0,269	0,777	0,747	0,867	0,402	0,931	0,726	0,412	0,816	0,823	0,987	0,941	0,479	0,514	0,598	0,038	0,145
<b>CXCL16</b>	Pearson Correlation	0,951	-0,664	0,074	-0,225	0,122	0,317	-0,662	-0,760	-0,636	-0,324	-0,467	0,284	-0,176	0,834	-0,023	0,778	0,510
	Sig. (2-tailed)	0,049	0,336	0,926	0,775	0,878	0,683	0,338	0,240	0,364	0,676	0,533	0,716	0,824	0,166	0,977	0,222	0,490
<b>HMOX1</b>	Pearson Correlation	-0,049	0,089	0,573	0,873	0,282	0,638	0,718	0,824	0,096	0,058	0,020	0,495	0,505	-0,046	0,452	-0,316	-0,180
	Sig. (2-tailed)	0,951	0,911	0,427	0,127	0,718	0,362	0,282	0,176	0,904	0,942	0,980	0,505	0,495	0,954	0,548	0,684	0,820

Συντομογραφίες: GLY = γλυκίνη, ALA = αλανίνη, SER = σερίνη, PRO = προλίνη, VAL = βαλίνη, THR = θρεονίνη, ILE = ισολευκίνη, LEU= λευκίνη, ASP = ασπαρτικό οξύ, LYS= λυσίνη, GLU = γλουταμινικό οξύ, HIS = ιστιδίνη, PHE = φαινυλαλανίνη, ARG = αργινίνη, TYR = τυροσίνη, CYS = κυστεΐνη, MET = μεθειονίνη.

# Βιογραφικό Σημείωμα

Χριστοδούλου Χρήστος

## Προσωπικές πληροφορίες

---

**Ημ. γεννήσεως:** 19/10/1991

**Εθνικότητα:** Ελληνική, Κυπριακή

**Διεύθυνση:**

Στεννημάχου 33, Γιαννιτσά Ελλάδα, 58100

**Αριθμός κινητού τηλεφώνου:**

+ 30 6978171860







**E-mail:**

[cvchrist7@gmail.com](mailto:cvchrist7@gmail.com)

[c.christodoulou@aua.gr](mailto:c.christodoulou@aua.gr)

## Δεξιότητες Λογισμικού

---

Λογισμικό	Γνώση
Microsoft Office, "ECDL Core Certificate"	 Άριστα
SPSS, IBM	 Άριστα
JMP, SAS	 Πολύ καλή
STATA, SAS	 Μέτρια
R, programming language	 Ικανοποιητικά
VBA, Microsoft, programming language	 Ικανοποιητικά

## Γλώσσες

Μητρική γλώσσα	Ελληνικά				
	ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ		ΟΜΙΛΙΑ		ΓΡΑΦΗ
Λοιπές γλώσσες	Προφορική	Γραπτή (ανάγνωση)	Επικοινωνία	Προφορική έκφραση	
	Αγγλικά	C2	C2	C2	C2
	“Certificate of Proficiency in English ” του Πανεπιστημίου του Michigan C2				
Γερμανικά	Zertifikat Deutsch – Goethe Institut				
	B1	B1	B1	B1	B1
	Επίπεδα: A1/A2: Βασικός χρήστης - B1/B2: Ανεξάρτητος χρήστης - C1/C2: Έμπειρος χρήστης				

## Εκπαίδευση

- 2009-09 - 2014-11**      **BSc, Integrated MSc**  
*Σχολή Γεωπονίας Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας, Τομέας Ζωικής Παραγωγής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα*
- 2014-11 - 2016-07**      **MSc**  
*Σχολή Γεωπονίας Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας, Τομέας Ζωικής Παραγωγής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα*
- 11-2016 - 8-2022**      **Υποψήφιος Διδάκτωρ**  
*Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Σχολή Επιστημών των Ζώων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα*

## Βραβεία

Βραβείο στον διαγωνισμό καινοτομίας «1<sup>st</sup> NOUNOU Ideal Challenge», που διοργανώθηκε από τη Friesland Campina Hellas και το Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο για την πλήρως χρηματοδοτούμενη εφαρμογή έρευνας.

## Εργασιακή εμπειρία/Ερευνητής 2018-Σήμερα

---

- 2022-03 -  
2022-09**                    **Ερευνητής**  
*Agricultural University of Athens, Athens*  
**Industry Project:** Evaluation of the feed additives ActiSaf, SelSaf, and SafMannan on dairy sheep milk performance, colostrums quality, energy status, oxidative and immune status in peripartum period (2022).
- 2021-06 -  
2021-11**                    **Ερευνητής**  
*Agricultural University of Athens, Athens*  
**EU project LIFE15 ENV/GR/000257:** «Food for Feed: An Innovative Process for Transforming Hotels’ Food Wastes into Animal Feed-Food from Food (2021).
- 2018-01 -  
2021-08**                    **Ερευνητής**  
*Agricultural University of Athens, Athens*  
**EU project LIFE15 CCM/IT/0000039:** Forage systems for less GHG emissions and more soil carbon sink in continental and Mediterranean agricultural areas (2018-2021).
- 2021-04 -  
2021-09**                    **Ερευνητής**  
*Agricultural University of Athens, Athens*  
**EU project DISARM H2020:** Disseminating Innovative Solutions for Antibiotic Resistance Management (2021).
- 2020-02 -  
2020-07**                    **Ερευνητής**  
*Hellenic Agricultural Organisation, Giannitsa*  
**EU project Interreg – IPA CBC PAPESHE:** Created and implemented experimental procedures to save, protect and valorise existing populations of the Pelagonia sheep breed in the cross-border area, which are currently in danger of extinction, through coordinated synergies (2019).
- 2018-08 -  
2019-03**                    **Ερευνητής**  
*Wynnstay Agriculture, Agricultural University of Athens, Athens*  
**EU H2020, MSCActions, RISE project “CowficieNcy” (777974):** Upgrading and implementing mathematical models to increase nitrogen use efficiency of lactating dairy cows – University of Aberystwyth (2018-2019).

## **Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά με κρίση**

---

### **1. The amino acids profile of *Camelina sativa* seeds correlates with the strongest immune response in dairy ewes**

**Authors:** C. Christodoulou, A. Mavrommatis, M. Simoni, F. Righi, B. Prandi, T. Tedeschi, S. Sforza, E. Tsiplakou

**Published at:** Animal: An International Journal of Animal Biosciences 16, 9,100621, 2022, DOI: 10.1016/j.animal.2022.100621.

### **2. Carotenoids Extract from *Citrus reticulata* Byproducts Improved Immune-Oxidative Status of Broiler Chickens**

**Authors:** A. Mavrommatis, M.E. Zografaki, S. Marka, E.D. Myrtsi, E. Giamouri, C. Christodoulou, E. Evergetis, V. Iliopoulos, S.D. Koulocher, G. Moschopoulou, P.E. Simitzis, A.C. Pappas, E. Fliemetakis, A. Koutinas, S.A. Haroutounian, E. Tsiplakou

**Published at:** Antioxidants 11, 144, 2022, DOI: 10.3390/antiox11010144.

### **3. Impact of Bioactive Compounds on Animals and the Environment**

**Authors:** A. Georganas, E. Giamouri, C. Christodoulou, A. Mavrommatis, E. Zoidis, G. Papadomichelakis, P. Simitzis, E. Tsiplakou, A. C. Pappas, K. Fegeros

**Published in the book:** Bioactive Compounds and their Importance, **Publisher:** Nova science publisher, 2021, ISBN: 978-1-68507-361-9, DOI: 10.52305/AFDL7660.

### **4. Assessing the Optimum Level of Supplementation with *Camelina* seeds in Ewes' Diets to Improve Milk Quality (Part of Ph.D. Thesis)**

**Authors:** C. Christodoulou, A. Mavrommatis, C. Mitsiopoulou, G. Symeon, V. Dotas, K. Sotirakoglou, B. Kotsambasi, E. Tsiplakou

**Published at:** Foods 10 (2076), 2021, DOI: 10.3390/foods10092076.

### **5. Evaluation of nitrogen excretion equations for ryegrass pasture-fed dairy cows.**

**Authors:** C. Christodoulou, J.M. Moorby, E. Tsiplakou, D. Kantas, A. Foskolos.

**Published at:** Animal: An International Journal of Animal Biosciences 15(9), 100311, 2021, DOI: 10.1016/j.animal.2021.100311.

### **6. Effects of Supplementing Rumen-Protected Methionine and Lysine on Milk Performance and Oxidative Status of Dairy Ewes**

**Authors:** A. Mavrommatis, C. Mitsiopoulou, C. Christodoulou, P. Kariampa, M. Simoni, F. Righi, E. Tsiplakou

**Published at:** Antioxidants 10(5):654, 2021, DOI: 10.3390/antiox10050654.

### **7. Effects of dietary pomegranate seed cake supplementation on performance, carcass characteristics and meat quality of growing lambs.**

**Authors:** B. Kotsampasi, C. Christodoulou, A. Mavrommatis, C. Mitsiopoulou, V. Bampidis, V. Christodoulou, E. Chronopoulou, N. Labrou, E. Tsiplakou.

**Published at:** Animal feed Science and Technology 273(6):114815, 2021,  
DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2021.114815.

**8. Dietary Supplementation of a Live Yeast Product on Dairy Sheep Milk Performance, Oxidative and Immune Status in Peripartum Milk Performance, Oxidative and Immune Status in Peripartum Period.**

**Authors:** A. Mavrommatis, C. Mitsiopoulou, **C. Christodoulou**, D. Karabinas, V. Nenov, G. Zervas, E. Tsiplakou.

**Published at:** Journal of Fungi 6, 334, 2020,  
DOI: 10.3390/jof6040334.

**9. 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.**

**Authors:** B. Kotsampasi, E. Tsiplakou, **C. Christodoulou**, A. Mavrommatis, C. Mitsiopoulou, C. Karaïskou, E. Sossidou, N. Fragioudakis, V.A. Bampidis, V. Christodoulou, G. Zervas.

**Published at:** Animal feed Science and Technology 245, 20-31, 2018,  
DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2018.08.007.

**10. MSc Thesis: Effects of dietary pomegranate pulp silage supplementation on milk yield and composition, milk fatty acid profile and blood plasma antioxidant status of lactating dairy cows.**

**Authors:** Kotsampasi B., **Christodoulou C.**, Tsiplakou E., Mavrommatis A., Mitsiopoulou C., Karaïskou C., Dotas V., Robinson P.H., Bampidis V.A., Christodoulou V., Zervas G.

**Published at:** Animal Feed Science and Technology 234, 228–236. 2017,  
DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.08.017.

**11. Effect of dietary palygorskite on performance on performance of lactating ewes.**

**Published at:** Applied Clay Science 143, 76-79, 2017.

**Authors:** B. Kotsampasi, V.A. Bampidis, **C. Christodoulou**, N. Theophilou, V. Christodoulou,

**Published at:** Applied Clay Science 143, 76-79, 2017,  
DOI: 10.1016/j.clay.2017.03.020.

**12. Effects of dietary partly destoned exhausted olive cake supplementation on performance, carcass characteristics and meat quality of growing lambs.**

**Authors:** Kotsampasi B., Bampidis V.A., Tsiaousi A., Christodoulou C., Petrotos K., Amvrosiadis I., Fragioudakis N., Christodoulou V.

**Published at:** Small Ruminants Research 156, 33–41, 2017,  
DOI: 10.1016/j.smallrumres.2017.08.013.



## Δημοσιεύσεις περιλήψεων και ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

1. **C. Christodoulou**, A. Mavrommatis, B. Kotsampasi, E. Tsiplakou.  
Effect of *Camelina sativa* seeds in ewes milk quality and oxidative status in both organism and milk. EAAP – 73d Annual Meeting, Porto, September 2022. Session 31. Theatre presentation.
2. **C. Christodoulou**, J.M. Moorby, E. Tsiplakou and A. Foskolos.  
Evaluation of nitrogen excretion equations for pasture-fed dairy cows. EAAP – 70th Annual Meeting, Ghent, August 2019. Session 36. Poster No. 12.
3. **Christodoulou, C.**, Kotsambasi, B., Tsiplakou, E., Mavrommatis, A., Mitsiopoulou, C., Karaiskou, C., Dotas, D., Bampidis, V., Christodoulou, V., Zervas, G., 2017. 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.
4. Kotsambasi, B., **Christodoulou, C.**, Bampidis, V., Tsiaousi, A., Petrotos, K., Fragioudakis, N., Christodoulou, V. 2017.  
The use of partly destined exhausted olive cake on growing Florina (Pelagonia) lamb diets. XII Kabrt's Dietetic Days, International Conference. Abstracts p. 188-192. Brno, Czech Republic, 20 April 2017.
5. Kotsambasi, B., **Christodoulou, C.**, Bampidis, V., Theophilou, N., Christodoulou, V.  
The use of palygorskite on lactating ewe's nutrition. XII Kabrt's Dietetic Days International Conference. Abstracts p. 193-197. Brno, Czech Republic, 20 April 2017.
6. Ragkos A., Koutouzidou G., **Christodoulou C.**, Batzios A. Which orientation for strategies and policies for local animal breeds? the role of ICT and novel technologies. CEUR Workshop Proceedings, pp 749-758, 2030, Chania, Crete, Greece, 21-24 September 2017.

## Δημοσιεύσεις περιλήψεων και ανακοινώσεις σε εθνικά συνέδρια

1. **Χριστοδούλου Χ.**, Σκούρτης Α., Κυριακάκη Π., Μαυρομάτης Α., Σατολιάς Φ., Καραμπίνας Δ., Τσιπλάκου Ε., Ζέρβας Γ.  
Επίδραση της προσθήκης προ- και πρεβιοτικού προϊόντος ζύμης και σε στα παραγωγικά χαρακτηριστικά, στο οξειδωτικό σύστημα και στην έμφυτη ανοσία προβατινών. 36<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Αγρίνιο, 5-7 Οκτωβρίου 2022. Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, Ειδική Έκδοση No 51, σελ. 80-81.
2. **Χριστοδούλου Χ.**, Μαυρομάτης Α., Μητσιοπούλου Χ., Συμεών Γ., Ντότας Β., Σωτηράκογλου Κ., Κοτσάμπαση Β., Righi F., Τσιπλάκου Ε.  
Η επίδραση της ενσωμάτωσης *Spirulina* στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος των προβατινών και στην οξειδωτική κατάσταση. 35<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Αθήνα, 6-7 Νοεμβρίου 2022. Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, Ειδική Έκδοση No 50, σελ. 39-40.

3. **Χριστοδούλου Χ.**, Μαυρομμάτης Α., Κοτσάμπαση Β., Ντότας Β., Righi F., Τσιπλάκου Ε. Η επίδραση των σπερμάτων της *Camelina* στα σιτηρέσια των προβατινών επί της οξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού και του γάλακτος. 35<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Αθήνα, 6-7 Νοεμβρίου 2022. Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, Ειδική Έκδοση Νο 50, σελ. 41-42.

4. **Χριστοδούλου Χ.**, Κοτσάμπαση Β., Μητσιοπούλου Χ., Ντότας Β., Χριστοδούλου Β., Ζέρβας Γ., Τσιπλάκου Ε.

Η επίδραση των σπερμάτων *Camelina* στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του πρόβειου γάλακτος. 34<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Βόλος 2019. Ειδική Έκδοση Νο 49, σελ. 64-65.

5. **Χριστοδούλου Χ.**, Moorby J.M., Ζέρβας Γ., Τσιπλάκου Ε., Φώσκολος Α.

Αξιολόγηση εξισώσεων για την πρόβλεψη εκκρίσεων αζώτου σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Λάρισα, 2019.

6. **Χριστοδούλου Χ.**, Κοτσάμπαση, Β., Τσιπλάκου, Ε., Μπαμπίδης, Β., Μαυρομμάτης, Α., Μητσιοπούλου, Χ., Καραϊσκού, Χ., Χριστοδούλου, Β., Ζέρβας, Γ., Ντότας, Δ.

Η επίδραση της ενσιρωμένης πούλπας ροδιού στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. 31<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Σέρρες, 5-7 Οκτωβρίου 2016. Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, Ειδική Έκδοση Νο 44, σελ. 107-108.

7. Κρυσταλλίδου, Ε., Κοτσάμπαση, Β., **Χριστοδούλου Χ.**, Λυμπερόπουλος, Α., Μπαμπίδης, Β., Χριστοδούλου, Β.

Η προσθήκη αρωματικών φυτών και αιθέριων ελαίων στα σιτηρέσια αναπτυσσόμενων αρνιών. 30<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Γιαννιτσά, 14-16 Οκτωβρίου 2015. Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, Ειδική Έκδοση Νο 42, σελ. 87-88.

8. Κοτσάμπαση, Β., **Χριστοδούλου Χ.**, Κρυσταλλίδου, Ε., Μπαμπίδης, Β., Χριστοδούλου, Β.

Η διερεύνηση της δυνατότητας ενσωμάτωσης του ενσιρώματος των υποπροϊόντων της τομάτας στο σιτηρέσιο προβατινών γαλακτοπαραγωγής. 30<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Γιαννιτσά, 14-16 Οκτωβρίου 2015. Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, Ειδική Έκδοση Νο 42, σελ. 75-76.

9. **Χριστοδούλου Χ.**, Κοτσάμπαση, Β., Ντότας, Δ., Παπαδομιχελάκης, Γ., Μπαμπίδης, Β., Χριστοδούλου, Β.

Η αξιοποίηση του ενσιρώματος των υποπροϊόντων του ροδιού στη διατροφή των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. 30<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Γιαννιτσά, 14-16 Οκτωβρίου 2015. Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, Ειδική Έκδοση Νο 42, σελ. 73-74.

10. Κοτσάμπαση, Β., Χριστοδούλου, Β., **Χριστοδούλου Χ.**, Θεοφίλου, Ν., Μπαμπίδης, Β.

Η επίδραση της χορήγησης ατταπουλγίτη στις αποδόσεις των προβατινών γαλακτοπαραγωγής. Πρακτικά 5ου Πανελληνίου Συνεδρίου Τεχνολογίας Ζωικής Παραγωγής, 30 Ιανουαρίου 2015, Θεσσαλονίκη. Σελ. 79-80.

## **Δημοσιεύσεις σε Εθνικά Περιοδικά χωρίς κριτές**

---

1. Κοτσάμπαση, Β., **Χριστοδούλου, Χ.**, Ντότας, Β., Μπόνος, Ε., Χριστοδούλου, Β. Η χρήση των σπερμάτων εγχώριων κτηνοτροφικών ψυχανθών στη διατροφή των παραγωγικών ζώων. ΔΗΜΗΤΡΑ, Τριμηνιαία έκδοση του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού-Δήμητρα (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ), Τεύχος 16, Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2016, σελ. 13-17.
2. Χριστοδούλου, Β., **Χριστοδούλου, Χ.**, « Το πρόβατο της φυλής Φλώρινας (Πελαγονίας)». ΔΗΜΗΤΡΑ, Τριμηνιαία έκδοση του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού-Δήμητρα (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ), Τεύχος 17, Ιανουάριος-Μάρτιος 2017, σελ. 4-7.

## **Μέλος Επιστημονικών συλλόγων**

---

- Ελληνική Ζωοτεχνική Εταιρεία (Ε.Ζ.Ε.)
- Γεωτεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδος (ΓΕΩΤ.Ε.Ε.)
- European Federation of Animal Science (Ε.Α.Α.Ρ.)