

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής  
Διευθυντής Εργαστηρίου: Καθηγητής Γεώργιος Ζέρβας

**Διαιτητική εκτίμηση γλυκερόλης στη διατροφή ορνιθίων  
κρεοπαραγωγής**

Μεταπτυχιακή Διατριβή  
της φοιτήτριας του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής  
και Υδατοκαλλιεργειών  
Αρβανίτη Αικατερίνης

Νοέμβριος 2010

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής

Διευθυντής Εργαστηρίου: Καθηγητής Γεώργιος Ζέρβας

**Διερεύνηση της επίδρασης της ακατέργαστης γλυκερόλης  
στη διατροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγής**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

της φοιτήτριας του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής  
και Υδατοκαλλιεργειών

Αρβανίτη Αικατερίνης

**Εξεταστική Επιτροπή:**

Φεγγερός Κων/νος

Καθηγητής (εισηγητής)

Παπαδομιχελάκης Γεώργιος

Λέκτορας

Μουντζούρης Κων/νος

Επίκουρος Καθηγητής (μέλος)

Νοέμβριος 2010

*στην οικογένεια μου*

## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων Λέκτορα κ. Παπαδομιχελάκη Γεώργιο, τον Λέκτορα κ. Ζωΐδη Ευάγγελο, καθώς και τον Λέκτορα κ. Παππά Αθανάσιο για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση τους, την οποία είχα σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέρη της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής τον Καθηγητή κ. Φεγγερό Κωνσταντίνο και τον Λέκτορα κ. Μουντζούρη Κωνσταντίνο για το χρόνο που διέθεσαν τόσο για να μελετήσουν την εργασία, όσο και να υποβάλλουν τις πολύτιμες και εύστοχες υποδείξεις τους.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια κ. Τσιροπούλου Κωνσταντίνα για την βοήθεια της και την άριστη συνεργασία την οποία είχαμε σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου, χωρίς την υποστήριξη των οποίων η όλη μου προσπάθεια δεν θα καρποφορούσε.

# Περιεχόμενα

<b>Περίληψη.....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>12</b>
1.1 Περὶ βιοκαυσίμων .....	12
1.1.1 Οι χρήσεις της βιομάζας.....	13
1.1.2 Η παραγωγή βιοκαυσίμων παγκοσμίως.....	13
1.1.3 Παραγωγή υγρών καυσίμων από βιομάζα .....	17
1.1.4 Κρίσιμα σημεία παραγωγής βιομάζας για ενέργεια.....	18
1.2 Παραγωγή βιοντίζελ.....	18
1.2.1 Υποπροϊόντα παραγωγής βιοντίζελ στη διατροφή των ζώων.....	21
1.2.2 Διαιτητικά χαρακτηριστικά αλεύρων και πλακούντων από βιομηχανίες παραγωγής βιοντίζελ. ....	21
1.3 Παραγωγή βιοαιθανόλης.....	22
1.3.1 Υποπροϊόντα βιομηχανιών παραγωγής βιοαιθανόλης στη διατροφή των ζώων .....	25
1.3.3 Άλλα παράγωγα από την παραγωγή βιοκαυσίμων .....	27
1.4. Γλυκερόλη .....	28
1.4.1 Αντιδιαιτητικοί παράγοντες της γλυκερόλης.....	32
1.4.2 Επίδραση της χορήγησης γλυκερόλης στις αποδόσεις των ζώων.....	32
1.4.2.1 Μηρυκαστικά .....	33
1.4.2.2 Χοίροι.....	33
1.4.2.3 Ορνίθια .....	35
1.4.3 Επίδραση της χρήσης γλυκερόλης στα λιπαρά οξέα του τελικού προϊόντος .	37
1.4.4 Μεταβολισμός και αξιοποίηση της γλυκερόλης από τον οργανισμό των ζώων .....	38

1.4.5 Γλυκερινική κινάση.....	41
<b>2. Σκοπός του πειράματος.....</b>	<b>44</b>
<b>3. Πειραματική διαδικασία.....</b>	<b>45</b>
3.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	45
3.1.1. Πειραματικό υλικό .....	45
3.1.3 Προσδιορισμός της υγρασίας των περιττωμάτων των ορνιθίων.....	49
3.1.4 Αξιολόγηση της στρωμνής.....	50
3.1.5 Προσδιορισμός της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ.....	51
3.1.5.1 Συλλογή ήπατος από τα ορνίθια.....	51
3.1.5.2.Μοριακές αναλύσεις στο ήπαρ .....	51
3.1.5.2.1 Απομόνωση ολικού RNA.....	51
3.1.5.2.2 Ποιοτικός έλεγχος RNA.....	53
3.1.5.2.3 Ποσοτικός έλεγχος RNA.....	54
3.1.5.3 Αντίστροφη μεταγραφή – Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR).....	54
3.1.5.4 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	57
3.1.5.5 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.....	58
3.1.5.6 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων της PCR.....	59
3.1.6 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο στήθος .....	61
3.1.6.1 Απομόνωση μεθυλεστέρων.....	61
3.1.6.2 Προσδιορισμός μεθυλεστέρων στον αέριο χρωματογράφο (GC).....	62
3.2 Στατιστική επεξεργασία .....	63
3.3 Αποτελέσματα .....	64
3.3.1.Ζωοτεχνικά στοιχεία της εκτροφής.....	64
3.3.2 Χαρακτηριστικά σφάγιου.....	68
3.3.3 Αξιολόγηση στρωμνής .....	70
3.3.3.1 Εκτίμηση στρωμνής .....	70

3.3.3.2 Υγρασία περιττωμάτων στρωμνής και κατανάλωση νερού από τα ορνίθια	71
3.3.4 Γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των ορνιθίων.....	72
3.3.5 Λιπαρά οξέα .....	73
<b>4. Συζήτηση.....</b>	<b>76</b>
<b>5. Συμπεράσματα.....</b>	<b>80</b>
<b>6. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>82</b>

## Περίληψη

Η γλυκερόλη ή γλυκερίνη παράγεται κατά τη διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ, αποτελώντας ένα από τα πιο σημαντικά παραπροϊόντα της βιομηχανίας αυτής. Η γλυκερόλη, η οποία παράγεται κατά τη διαδικασία υδρόλυσης των λιπαρών οξέων, τόσο των ζωικών λιπών, όσο και των φυτικών ελαίων, θεωρείται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική πηγή ενέργειας στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων, σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση της ακατέργαστης (τύπου 80%) γλυκερόλης στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, μέσω κυρίως της αντικατάστασης του καρπού αραβοσίτου. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε εκτροφή 400 ορνιθίων κρεοπαραγωγής, (υβρίδιο Cobb), τα οποία κατανεμήθηκαν σε τέσσερις πειραματικές ομάδες και διατράφηκαν με τέσσερα ισοενεργά και ισοαζωτούχα σιτηρέσια, χωρίς γλυκερόλη (μάρτυρας M) ή με γλυκερόλη σε ποσοστά 7% (G7), 14% (G14) και 21% (G21) αντίστοιχα, σε αντικατάσταση κυρίως του αραβοσίτου.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, η οποία διήρκεσε έξι συνολικά εβδομάδες, μελετήθηκαν η ανάπτυξη των ορνιθίων, η κατανάλωση της τροφής, η κατανάλωση νερού, ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής καθώς και η θνησιμότητα τους. Ακόμη, προσδιορίστηκε η υγρασία των περιττωμάτων και πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της κατάστασης της στρωμνής σε εβδομαδιαία βάση. Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε σφαγή κατά την οποία παραλήφθηκε το ήπαρ των ορνιθίων, το οποίο εμβαπτίστηκε άμεσα σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , για τον προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης της γλυκερινικής κινάσης. Μετά από ψύξη του σφάγιου για 24 ώρες στους  $4^{\circ}\text{C}$ , αφαιρέθηκε το στήθος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη γλυκερόλης στα σιτηρέσια είχε μία τετραγωνική επίδραση στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων ( $P<0.001$ ) καθώς και στην κατανάλωση της τροφής ( $P<0.001$ ), με την επέμβαση G7 να υπερέχει των υπολοίπων. Ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής δεν παρουσίασε



στατιστικώς σημαντικές διαφορές, ενώ αριθμητικά, την υψηλότερη απόδοση σε σφάγιο είχε η επέμβαση του μάρτυρα.

Όσον αφορά την κατανάλωση νερού από τα ορνίθια καθώς και την εκτίμηση της υδαρότητας της στρωμνής παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση ( $P < 0.001$ ), ενώ η προσθήκη γλυκερόλης έδωσε τετραγωνική επίδραση ( $P = 0.044$ ) στην υγρασία των περιττωμάτων της στρωμνής, με την επέμβαση G7 να παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή σε όλες τις παραπάνω παραμέτρους.

Η θνησιμότητα των ορνιθίων ακολούθησε γραμμική άνοδο ( $P < 0.001$ ) καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο των ορνιθίων, με την επέμβαση G21 να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη.

Η γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ομογενοποιημένο ήπαρ των ορνιθίων παρουσίασε μια καμπυλωτή πορεία ( $P_{cubic} = 0.007$ ). Στην επέμβαση G21, παρατηρήθηκε πτώση της έκφρασης του ενζύμου. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στην ανεπάρκεια σύνθεσης του ενζύμου από τον οργανισμό των ορνιθίων, καθώς αυξάνεται η πρόσληψη της γλυκερόλης πάνω από κάποιο ποσοστό, αλλά και η ίδια η ποσότητα της γλυκερόλης ως πιθανώς περιοριστικός παράγοντας στον μεταβολισμό της ίδιας της γλυκερόλης, κάτι το οποίο αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Τέλος, όσον αφορά τη συγκέντρωση των ολικών λιπαρών οξέων στο στήθος των ορνιθίων, παρουσίασε γραμμική μείωση ( $P < 0.001$ ), καθώς αυξανόταν το ποσοστό της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο, όπως και η συγκέντρωση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Αντιθέτως, ο λόγος των ΠΛΟ προς ΚΛΟ ακολούθησε γραμμική άνοδο ( $P < 0,001$ ).

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η προσθήκη γλυκερόλης στο σιτηρέσιο των ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά 7%, δίνει θετικά αποτελέσματα και θα μπορούσε να αντικαταστήσει την επέμβαση του μάρτυρα και σε εμπορική κλίμακα, χωρίς να υπάρχει κάποια αρνητική επίπτωση στην ποιότητα του κρέατος, σε σχέση με τη σύσταση των ολικών λιπαρών οξέων στο ενδομυϊκό λίπος του στήθους.

**Λέξεις κλειδιά:** βιοντίζελ, ακατέργαστη γλυκερόλη, ορνίθια κρεοπαραγωγής, κατάσταση στρωμνής, λιπαρά οξέα, γονιδιακή έκφραση γλυκερινικής κινάσης

## Abstract

Glycerol or glycerol produced during the production process biodiesel, becoming one of the most important offal of this industry. Glycerol, which produced during the process of hydrolysis fatty acids, both of animal fats and of vegetable oils, it is considered that may be used as an alternative energy source in rations of production animals, in low concentrations.

In this work been investigated the impact of the raw glycerol in the feeding of chickens, notably through the productive replacement of the fruit maize. For this purpose, held rearing 400 chickens productive, (hybrid Cobb), which was allocated in four experimental groups and fed with four isocaloric and isoproteic diets, without glycerol (control (C) or with glycerol at rates 7% (G7), 14% (g14) and 21% (G21) respectively, to replace mainly of maize.

During the experimental procedure, which lasted total six weeks, studied the development of chickens, the consumption of food, the water consumption, the operating ratio of the feedstuff and the mortality. Yet, determined the moisture content of excrement and was the assessment of the situation of litter on a weekly basis. At the end of the experimental procedure, conducted slaughter during which was received the liver of chickens, which immersed directly in liquid nitrogen and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , for the determination of gene expression of glycerol kinase. In continue was cooled the carcass for 24 hours at  $4^{\circ}\text{C}$ , was deducted the breast for determining the concentration of fatty acids.

The results showed that the addition glycerol in diets had a square impact on productive characteristics of chickens ( $P<0,001$ ) and on the consumption of food ( $P<0,001$ ), with the intervention G7 to predominates the others. The operating ratio of the feedstuff did not statistically significant differences, while figures, the highest yield in carcass had the intervention of the witness. As regards the consumption of water from the chickens and the litter score observed linear increase ( $P<0,001$ ), while the addendum glycerol gave square impact ( $P=0.044$ ) in the moisture content of excreta litter, with the intervention G7 to show the lowest price in all the above parameters.

The mortality of chickens followed linear rise ( $P < 0.001$ ), while was increased the concentration of glycerol in the diets of the chickens, with intervention of G21 to present the biggest.

The gene expression of glycerol kinase in the liver of chickens presented a curved course ( $P_{\text{public}} = 0.007$ ). In intervention G21, was observed fall of expression of ferment. This make it is probably owed in the insufficiency of composition of ferment from the organism of chickens, while are increased the engagement glycerol above some percentage, but also the amount of glycerol, as probably restrictive factor in the metabolism of glycerol, something which deserves it is investigated further.

Finally, in regard to the stocking of total fatty acids in the breast of chickens, it presented linear reduction ( $P < 0.001$ ), while were increased the percentage of glycerol in the diet, as the stocking of monounsaturated fatty acids. On the contrary, the reason of PUFA: SFA followed linear rise ( $P < 0,001$ ).

Summarizing, the present study showed that the addition of glycerol in diet of the chickens at 7%, gives positive results and could replace the intervention of control in commercial scale, without exists certain negative repercussion in the quality of meat, in combination the constitution of total fatty acids in the intramuscular of breast.

**Key words** : biodiesel, crude glycerol, broiler, litter score, meat fatty acids, glycerol kinase expression

# 1.Εισαγωγή

## 1.1Περί βιοκαυσίμων

Τα τελευταία έτη παρατηρείται παγκοσμίως μία συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για ενέργεια. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις αρνητικές επιπτώσεις από τη χρήση των ορυκτών ενεργειακών πηγών, αλλά και των παραγόμενων αερίων τους, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα το φαινόμενο του θερμοκηπίου αλλά και την αύξηση της ατμοσφαιρικής θερμοκρασίας, οδήγησαν την παγκόσμια κοινότητα (2005 Renewable Fuels Standard, US) στη διερεύνηση νέων μορφών ενέργειας από ανανεώσιμες (αιφορικές) πηγές (Elam, 2008). Έτσι, για τις αναπτυγμένες χώρες η χρήση βιοκαυσίμων ως καύσιμα, τα οποία προέρχονται από βιολογικές πηγές όπως είναι τα φυτικά έλαια, η βιομάζα, το βιοαέριο, τα συνθετικά καύσιμα κ.ά., έχουν αποκτήσει πλέον πρωταρχική σημασία (Barnwal et al, 2004). Βέβαια, η χρήση βιοκαυσίμων από ανανεώσιμες πηγές αποτελεί μόνο μία μορφή εναλλακτική πηγή ενέργειας, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως αντικαθιστώντας τα ορυκτά καύσιμα.

Τα βιοκαύσιμα αριθμούν πολλά σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τα ορυκτά καύσιμα. Κυρίως, αποτελούν μια ανανεώσιμη πηγή ενέργειας, με πολλά περιβαλλοντικά οφέλη, όπως το ότι δεν απελευθερώνουν τον αποθηκευμένο άνθρακα των πετρωμάτων στην ατμόσφαιρα για την παραγωγή τους, αλλά αντίθετα συμβάλλουν στη ρύθμιση του κύκλου του άνθρακα. Επίσης, είναι βιοδιασπώμενα και συμβάλλουν ελάχιστα στο φαινόμενο του θερμοκηπίου. Έχουν καλύτερη λιπαντική ικανότητα σε σύγκριση με τα θειούχα ορυκτά καύσιμα και τέλος, διαθέτουν μεγάλη ενεργειακή πυκνότητα, διότι μία μονάδα βιοκαυσίμου περιέχει τουλάχιστον 2,5 μονάδες ενέργειας προς κατανάλωση (Whittington, 2006).

Συνεπώς, η χρήση βιοκαυσίμων και γενικότερα των εναλλακτικών πηγών ενέργειας, καθίσταται μακροπρόθεσμα αναγκαία. Είναι γνωστό ότι τα συμβατικά καύσιμα χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημερινή ζωή (εμπόριο, βιομηχανία, πρωτογενής τομέας παραγωγής) και η αντικατάσταση έστω και ενός μικρού ποσοστού από τη συνολική κατανάλωση με βιοκαύσιμα, θα αποφέρει θετικές επιπτώσεις στο περιβάλλον.

### **1.1.1 Οι χρήσεις της βιομάζας**

Οι χρήσεις της βιομάζας είναι πρωτίστως ενεργειακής φύσεως. Αποτελεί την πρώτη ύλη για παραγωγή διαφόρων μορφών ενέργειας, όπως η χημική, η θερμική, η ηλεκτρική, αλλά και η ενέργεια κίνησης των οχημάτων μέσω παραγωγής υγρών καυσίμων. Τα υγρά καύσιμα τα οποία παράγονται από βιομάζα, ονομάζονται βιοκαύσιμα. Για την παραγωγή τους χρησιμοποιείται βιομάζα η οποία είναι πλούσια σε έλαια, ευζύμωτους υδατάνθρακες, όπως σάκχαρα και άμυλο, καθώς και σε ινώδεις ουσίες (ημικυτταρίνες, κυτταρίνες).

Κατά τη διαδικασία παραγωγής ενέργειας από βιομάζα, ανάλογα με την πρώτη ύλη και την παραγωγική διαδικασία η οποία θα ακολουθηθεί, μπορεί να παραχθεί είτε θερμική ή ηλεκτρική ενέργεια, είτε ενέργεια αερίων ή και υγρών βιοκαυσίμων. Μέσω μιας απλής καύσης από οποιαδήποτε μορφή βιομάζας μπορεί να παραχθεί είτε απευθείας θερμική ενέργεια (μέσω καυστήρων), είτε εμμέσως, μέσω ατμού, ηλεκτρική ενέργεια (Φεγγερός, 2008).

Όσον αφορά στη βιοαιθανόλη, εκτός από τη χρήση της για διατροφικούς ή βιομηχανικούς σκοπούς, περίπου τα τρία τέταρτα της βιοαιθανόλης χρησιμοποιούνται ως καύσιμα. Ο κανονισμός της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα καύσιμα των αυτοκινήτων, επιτρέπει τη χρήση μέχρι 5% των κανονικών καυσίμων σε όγκο. Επιπλέον, στα λεγόμενα «ελαστικά» καύσιμα είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί αιθανόλη στη βενζίνη με αναλογία της τάξης του 5% έως 85% (Dorpenberg και van Der Aar, 2007).

### **1.1.2 Η παραγωγή βιοκαυσίμων παγκοσμίως**

Η πρώτη μεθυλεστεροποίηση ενός φυτικού ελαίου διεξήχθη το 1853. Ο Rudolf Diesel έθεσε σε λειτουργία τον πρώτο του κινητήρα το 1893, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη φυσικέλαιο.

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1920, οι κατασκευαστές κινητήρων, μετέτρεψαν τους κινητήρες, σε κινητήρες diesel, έτσι ώστε να μπορέσουν να χρησιμοποιήσουν ορυκτά καύσιμα, τα οποία διαθέτουν χαμηλότερο ιξώδες, σε

σύγκριση με τα φυτικά έλαια. Το αποτέλεσμα ήταν η εξάλειψη των υποδομών παραγωγής καυσίμων, που χρησιμοποιούσαν έως τότε, ως πρώτη ύλη τη βιομάζα.

Αρκετά χρόνια μετά τη δημιουργία του πρώτου κινητήρα diesel, άρχισε η αναγέννηση της παραγωγής βιοκαυσίμων, σε φάρμες συνεταιρισμών, στην Αυστρία. Το 1991 η πρώτη ολοκληρωμένη βιομηχανία παραγωγής βιοκαυσίμων τέθηκε σε λειτουργία, με ετήσια απόδοση 10.000 λίτρα. Από τότε, η βιομηχανία παραγωγής βιοκαυσίμων στη γηραιά ήπειρο έχει αναπτυχθεί ραγδαία, με συνολική εξαγωγή των 3 δισεκατομμυρίων λίτρων σε όλων τον κόσμο, αλλά πάντα με κύρια έμφαση την αγορά της Ευρώπης.

Γενικότερα, το βιοντίζελ αποτελεί μόνο το 5% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής βιοκαυσίμων, ενώ το 95% το αποτελεί η παραγωγή αιθανόλης (Whittington, 2006).

Στις Η.Π.Α, η παραγωγή βιοκαυσίμων αυξάνεται εκθετικά την τελευταία δεκαετία από τα 500.000 γαλόνια το χρόνο, το 1999, σε περίπου 500 εκατομμύρια στο τέλος του 2007, παράγοντας επιπλέον και 50 εκατομμύρια γαλόνια χαμηλής αξίας ακατέργαστης γλυκερόλης (Feedstuffs, 2007). Το 2006 στις Η.Π.Α. παράχθηκαν 4.855 δισεκατομμύρια γαλόνια μεθανόλης (RFA, 2007), με ετήσια άνοδο η οποία ξεπέρασε το 20,2% από την παραγωγή του 2000. Επιπλέον, οι Η.Π.Α. υπολογίζεται ότι το 2007 είχαν παράγει 225 εκατομμύρια γαλόνια βιοντίζελ, ποσότητα η οποία αντιστοιχεί σε αύξηση πάνω 200%, σε σύγκριση με την παραγωγή βιοντίζελ το 2005 (Elam, 2008). Επίσης, το National Biodiesel Board, το 2007, είχε υπολογίσει ότι οι Η.Π.Α. έχουν ετήσια ικανότητα παραγωγής 5,26 δισεκατομμυρίων λίτρων βιοκαυσίμων, από τις ήδη υπάρχουσες πηγές, και άλλα 7,15 δισεκατομμύρια λίτρα το χρόνο από επιπρόσθετη παραγωγή λόγω των νέων υποδομών αλλά και της επέκτασης των καλλιεργειών (Dozier, 2008).

Όσον αφορά στην Αυστραλία, υπάρχουν μόνο δέκα πιστοποιημένοι παραγωγοί βιοκαυσίμων, οι οποίοι καλλιεργούν περισσότερα από δεκαπέντε είδη φυτών μεγάλης καλλιέργειας. Η συνολική παραγωγή τους το 2004/05 εκτιμάται ότι ανερχόταν στα 90,7 εκατομμύρια λίτρα. Σχεδόν όλη η παραγωγή τους, από τις καλλιέργειες, χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή λίπους ή μαγειρικού ελαίου. (Whittington, 2006).

Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το 2006 η παραγωγή βιοντίζελ ανήλθε στους 4.890.000 τόνους (στην Ελλάδα περί τους 42.000) με κυρίαρχη πρώτη ύλη τα σπέρματα ελαιοκάμβης, ακολουθούμενα από τα σπέρματα του ηλίανθου. Όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε και στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 1.1), στον οποίο παρατίθενται η παραγωγή βιοντίζελ στα κράτη της ευρωπαϊκής ένωσης, η παραγωγή βιοντίζελ ακολουθεί μία συνεχή ανοδική πορεία.

**Πίνακας 1.1** Παραγωγή βιοντίζελ στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε τόνους, (Bozbas, 2008)

<b>Χώρα/Έτος</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>
Γερμανία	450.000	715.000	1.088.000
Γαλλία	366.000	357.000	502.000
Ιταλία	210.000	273.000	419.000
Τσεχία	68.800	70.000	47.000
Δανία	10.000	41.000	44.000
Αυστρία	25.000	32.000	100.000
Ην. Βασίλειο	3.000	9.000	15.000
Ισπανία	-	6.000	70.000
Σουηδία	1.000	1.000	8.000
Πολωνία	-	-	1.200
Ουγγαρία	-	-	2.000
Σύνολο	1.133.800	1.504.000	2.296.200

Στις μέρες μας, η παγκόσμια κατανάλωση ενέργειας φθάνει περίπου τα 400EJ (Exajoule=1.055\*10<sup>18</sup> joules, 10<sup>15</sup> BTU) και καλύπτεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό από τη χρήση ορυκτών καυσίμων. Βάση των διεθνών οδηγιών και συμφωνιών (Ο.Ε.Ε.Θ., 2003) έχει προταθεί ότι το 5% της ενέργειας των καυσίμων θα πρέπει να αντικατασταθεί από ενέργεια βιοκαυσίμων μέχρι το 2010 (Φεγγερός, 2008), ενώ η πρόσφατη πολιτική των Η.Π.Α υπαγορεύει ότι το 25% των ορυκτών καυσίμων απαιτείται να αντικατασταθεί με βιοκαύσιμα μέχρι το 2050 (Comerford, 2008). Σύμφωνα με τα πιο αισιόδοξα σενάρια, η παραγωγή ενέργειας από βιομάζα υπολογίζεται ότι μπορεί να φτάσει στα 400 EJ, κατά τη διάρκεια του τρέχοντος

αιώνα, δηλαδή στις σημερινές παγκόσμιες απαιτήσεις (Faij, 2006; Junginger et al., 2007). Σύμφωνα με αυτά τα σενάρια, η συμβολή των διαφόρων πηγών βιομάζας μπορεί να διαμορφωθεί ως εξής: 200 EJ από τις εν χρήσει καλλιεργούμενες γεωργικές εκτάσεις με αύξηση παραγωγής μέσω βελτίωσης των καλλιεργητικών τεχνικών, 100 EJ από μη χρησιμοποιούμενες μέχρι τώρα εκτάσεις και τέλος 100 EJ από υπολείμματα γεωργικών και δασικών προϊόντων, οργανικά υπολείμματα κλπ. (Φεγγερός, 2008).

Η μέχρι τώρα εμπειρία έδειξε ότι η ζήτηση, παραδείγματος χάριν των δημητριακών καρπών, ήταν μεγαλύτερη από την παραγωγή με συνέπεια τον περιορισμό των αποθεμάτων και την αύξηση των τιμών. Η χρήση των δημητριακών καρπών, των ελαιούχων σπερμάτων και των σακχαρούχων υλών, όπως τα σακχαρότευτλα, για παραγωγή βιοκαυσίμων συνέλαβε στην κατά 30% παγκόσμια αύξηση των τιμών των τροφίμων (Rosegrant, 2008). Η αναμενόμενη αύξηση της παραγωγής βιοκαυσίμων, σε συνδυασμό με την πρόβλεψη για αύξηση της ζήτησης για παραγωγή ζωικών προϊόντων, που για την επόμενη δεκαετία υπολογίζεται σε 25% με 30% (FAPRI, 2005), θα οδηγήσει σε ανταγωνιστική σχέση μεταξύ των βιομηχανιών τροφίμων και ζωοτροφών, γεγονός που θα διογκώσει ακόμη περισσότερο το πρόβλημα. Κάτι τέτοιο μπορεί όμως να ανατραπεί κυρίως με δύο τρόπους. Ο πρώτος ανευρίσκεται στη βελτίωση των καλλιεργητικών πρακτικών, οι οποίες θα οδηγήσουν μελλοντικά σε αύξηση της παραγωγής πρώτων υλών από τις ήδη καλλιεργούμενες εκτάσεις, ενώ ο δεύτερος αφορά στην προσθήκη νέων εκτάσεων για καλλιέργεια. Στην τελευταία περίπτωση, οι νέες εκτάσεις υπολογίζεται πως θα εξευρεθούν κυρίως στις αναπτυσσόμενες περιοχές της Λατινικής Αμερικής, της Αφρικής, της Ασίας, αλλά και της Ανατολικής Ευρώπης, ενώ θα πρέπει να συνδυάζεται η αειφορική ανάπτυξη με την κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη των πληθυσμών των εκτάσεων ενδιαφέροντος.

Λύση στο παραπάνω πρόβλημα θα μπορούσε να δώσει η παραγωγή βιοκαυσίμων από βιομάζα μη ανταγωνιστική με τη βιομηχανία τροφίμων, όπως είναι τα κутταρινούχα υλικά (Ericson και Nilsson, 2006). Για τα τελευταία έχει ήδη ξεκινήσει η παραγωγική διαδικασία, ως βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς, αλλά με υψηλό κόστος παραγωγής. Υπολογίζεται ότι θα παράγονται σε συμφέρουσα εμπορική κλίμακα περίπου το 2020-2025 (Department for transport of the U.K., 2007).



Έως τώρα έγινε αναφορά στην τιμή των γεωργικών προϊόντων που εν δυνάμει μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για παραγωγή βιοκαυσίμων, αλλά κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων. Όσον όμως αφορά στην τιμή των βιοκαυσίμων, η αύξηση της παραγωγής καθαρής γλυκερόλης παγκοσμίως είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της τιμής αυτής. Βέβαια, το κόστος παραγωγής βιοκαυσίμων εξαρτάται κυρίως από το κόστος παραγωγής της πρώτης ύλης. Ο εξοπλισμός, το κεφάλαιο το οποίο έχει επενδυθεί και η εργασία είναι σχετικά λιγότερο σημαντικά, όσον αφορά στον υπολογισμό του κόστους παραγωγής (Whittington, 2006).

### **1.1.3 Παραγωγή υγρών καυσίμων από βιομάζα**

Τα υγρά καύσιμα τα οποία παράγονται από τη βιομάζα ονομάζονται βιοκαύσιμα. Για την παραγωγή τους χρησιμοποιείται βιομάζα η οποία είναι πρώτον πλούσια σε έλαια, τα οποία, αφού απομονωθούν από την πρώτη ύλη, μετατρέπονται με εστεροποίηση σε βιοντίζελ. Επίσης, η βιομάζα η οποία χρησιμοποιείται, είναι πλούσια σε ευζύμωτους υδατάνθρακες οι οποίοι μετατρέπονται ενζυμικά σε C5 και C6 σάκχαρα, τα οποία ζυμώνονται με τη βοήθεια ειδικών ζυμών για παραγωγή βιοαιθανόλης και τέλος περιέχει μεγάλο ποσοστό ινωδών ουσιών που με την κατάλληλη διεργασία μπορούν να οδηγήσουν σε παραγωγή βιοντίζελ ή βιοαιθανόλης.

Τα βιοκαύσιμα τα οποία προέρχονται από έλαια και ευζύμωτους υδατάνθρακες, αναφέρονται ως βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς, ενώ εκείνα που παράγονται από ινώδεις ουσίες, αναφέρονται ως βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς. Η πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς είναι, για μεν την παραγωγή βιοντίζελ διάφορα ελαιούχα σπέρματα, με κυρίαρχα αυτά της ελαιοκάμβης και της σόγιας, για δε την παραγωγή βιοαιθανόλης οι διάφορες αμυλούχες ύλες όπως οι δημητριακοί καρποί, με κυρίαρχο αυτόν του αραβοσίτου και δευτερευόντως του σίτου, καθώς και ύλες πλούσιες σε σάκχαρα όπως το σακχαροκάλαμο και τα σακχαρότευτλα (Φεγγερός, 2008).

#### **1.1.4 Κρίσιμα σημεία παραγωγής βιομάζας για ενέργεια**

- Ανταγωνισμός στο νερό.
- Διαθεσιμότητα λιπασμάτων και έλεγχος των επιβλαβών φυτών.
- Σχεδιασμός της χρήσης γης λαμβάνοντας υπόψη την βιοποικιλότητα και την ποιότητα του εδάφους.
- Η χρήση και η μετατροπή των βοσκοτόπων.
- Κοινωνικοοικονομικός αντίκτυπος.
- Μακροοικονομικές επιδράσεις των αλλαγών στον τρόπο χρήσης της γης.
- Εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου συμπεριλαμβανόμενων των αποτελεσμάτων από τις έμμεσες χρήσεις της γης (Dorrenberg και van Der Aar, 2007).

#### **1.2 Παραγωγή βιοντίζελ**

Για την παραγωγή βιοντίζελ χρησιμοποιείται φυτική βιομάζα πλούσια σε λίπη και έλαια, όπως τα διάφορα ελαιούχα σπέρματα (πίνακας 1.2), τα ζωικά λίπη, τα χρησιμοποιηθέντα λίπη και έλαια, αλλά και διάφορα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά όπως το άχυρο, το ξύλο, κ.ά.

Η χρήση του βιοντίζελ ως καύσιμο, αριθμεί κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων πηγών ενέργειας. Το βιοντίζελ είναι ένα καθαρό καύσιμο, μη τοξικό και βιοαποικοδομήσιμο. Δεν περιέχει αρωματικές ουσίες. Παρουσιάζει χαμηλές εκπομπές σε οξείδια του θείου και του μονοξειδίου του άνθρακα, και τέλος αυξάνει τη λιπαντική ικανότητα των κινητήρων ντίζελ. Συνεπώς, το βιοντίζελ, ως καύσιμο, αποτελεί μία σημαντική εναλλακτική πηγή ενέργειας.

**Πίνακας 1.2** Ελαιούχα σπέρματα για παραγωγή βιοντίζελ, (Whittington, 2006).

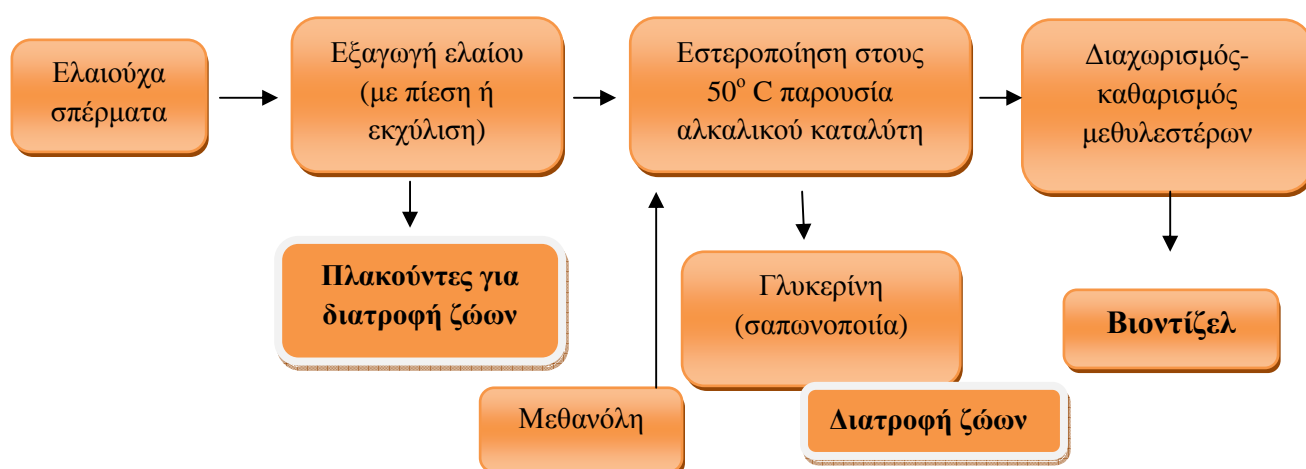
<b>Πηγή βιοκαυσίμου</b>	<b>% περιεκτικότητα σε έλαιο</b>
Πυρήνας βερίκοκου	42%
Καρύδια Βραζιλίας	63%
Ξηρά κοκοκάρυδα	65%
Φύτρα καλαμποκιού	50%
Νυχτολούλουδο	25%
Σταφύλια	12%
Αραχίδα με κέλυφος	47%
Κάναβη	34%
Καρύδια shea	39%
Λιναρόσπορος	38%
Σινάπι	35%
Καρύδια neem	47%
Φοινικοπυρήνες	45%
Πυρήνες πάπρικας	25%
Πυρήνες ροδάκινου	40%
Σπόρος παπαρούνας	45%
Γογγυλόσποροι	42%
Σουσάμι	50%
Σόγια	19%
Σπόρος ηλίανθου	42%

Τα φυτικά έλαια συνήθως περιέχουν ελεύθερα λιπαρά οξέα (πίνακας 1.3), φωσφολιπίδια, στερόλες, νερό, οσμές καθώς και άλλες ακαθαρσίες. Για το λόγο αυτό, τα έλαια δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμα αμέσως, αλλά ύστερα από μία χημική τροποποίηση, όπως η τρανς-εστεροποίηση, η πυρόλυση και η γαλακτωματοποίηση. Η τρανς-εστεροποίηση αποτελεί τη σημαντικότερη διαδικασία για να παραχθεί καθαρότερο αλλά και περιβαλλοντικά ασφαλέστερο καύσιμο από φυτικά έλαια (Meher et al, 2006).

**Πίνακας 1.3** Σύνθεση λιπαρών οξέων (% κατά βάρος), οξύτητα, φώσφορος (P) και αριθμός υπεροξειδίων φυτικών ελαίων (Marchetti et al, 2007).

Φυτικά έλαια	16:1	18:0	20:0	22:0	24:0	18:1	22:1	18:2	18:3	Οξύτητα	P (ppm)	Αρ. Υπεροξειδίων
Αραβόσιτος	11.67	1.85	0.24	0.00	0.00	25.16	0.00	60.60	0.48	0.11	7	18.4
Βαμβακόσπορος	28.33	0.89	0.00	0.00	0.00	13.27	0.00	56.51	0.00	0.07	8	64.8
Κράμβη	20.7	0.70	2.09	0.80	1.12	18.86	58.51	9.00	6.85	0.36	12	26.5
Φιστικιά	11.38	2.39	1.32	2.52	1.23	48.28	0.00	31.95	0.93	0.20	9	82.7
Ελαιοκράμβη	3.49	0.85	0.00	0.00	0.00	64.4	0.00	22.30	8.23	1.14	18	30.2
Σογιάλευρο	11.75	3.15	0.00	0.00	0.00	23.26	0.00	55.53	6.31	0.20	32	44.5
Ηλιάνθος	6.08	3.26	0.00	0.00	0.00	16.93	0.00	73.73	0.00	0.15	15	10.7

Υπάρχουν δύο διαδικασίες, οι οποίες ακολουθούνται για την παραγωγή βιοντίζελ. Η πρώτη, χρησιμοποιεί ως πρώτη ύλη ελαιούχα σπέρματα, ενώ η δεύτερη λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Κατά την παραγωγή βιοντίζελ από ελαιούχα σπέρματα (διάγραμμα 1.1) παράγονται, εκτός από το κύριο προϊόν που είναι το βιοντίζελ, και διάφορα υποπροϊόντα, όπως είναι οι διάφοροι πλακούντες σπερμάτων ή τα άλευρα εκχυλισθέντων σπερμάτων, αλλά και γλυκερόλη μαζί με ένα μεγάλο μέρος μεθανόλης, η οποία προστίθεται για την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων του παραληφθέντος από τα σπέρματα λίπος. Η μεθανόλη, ως τοξική ουσία για τους ζωικούς οργανισμούς, θα πρέπει να απομακρύνεται από τη γλυκερίνη.



**Διάγραμμα 1.1** Παραγωγή βιοντίζελ από ελαιούχα υλικά (εστεροποίηση ελαίων)

Με τη χρήση λιγνινοκυτταρινούχα υλικών για παραγωγή βιοντίζελ, δεν παράγεται κάποιο υποπροϊόν που να ενδιαφέρει τη διατροφή των ζώων (Φεγγερός, 2008).

### **1.2.1 Υποπροϊόντα παραγωγής βιοντίζελ στη διατροφή των ζώων**

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, για την παραγωγή βιοντίζελ πρώτης γενιάς οι βιομηχανίες χρησιμοποιούν ως πρώτη ύλη τα διάφορα ελαιούχα σπέρματα όπως της σόγιας, της ελαιοκράμβης, του ηλίανθου, του βάμβακος, κ.λ.π. Τα υποπροϊόντα που παράγονται και μπορούν να αξιοποιηθούν στη διατροφή των ζώων είναι τα εκχυλισμένα άλευρα ή οι πλακούντες των αντίστοιχων σπερμάτων, ανάλογα με την μέθοδο παραλαβής του ελαίου (εκχύλιση ή πίεση) και γλυκερόλη.

### **1.2.2 Διαιτητικά χαρακτηριστικά αλεύρων και πλακούντων από βιομηχανίες παραγωγής βιοντίζελ.**

Τα άλευρα εκχύλισης, οι πλακούντες και τα αλέσματα πλακούντων έχουν τα ίδια διαιτητικά χαρακτηριστικά με αυτά των υποπροϊόντων της σπορελαιουργίας, τα οποία έχουν διερευνηθεί και είναι γνωστά, για τα διάφορα είδη και ηλικίες ζώων. Γενικώς, χρησιμοποιούνται ως πρωτεϊνικά συμπληρώματα στα σιτηρέσια των ζώων και σε κάθε περίπτωση η ποσοτική τους συμμετοχή καθορίζεται από τους όποιους αντιδιαιτητικούς παράγοντες αυτά περιέχουν και, επιπλέον, στις περιπτώσεις των μονογαστρικών ζώων, από την περιεκτικότητά τους σε ινώδεις ουσίες. Οι τελευταίες εξαρτώνται από το βαθμό απομάκρυνσης των περιβλημάτων από τα χρησιμοποιούμενα σπέρματα.

Στον ελλαδικό χώρο η πλέον χρησιμοποιούμενη πρωτεϊνική πηγή φυτικής προέλευσης είναι το σογιάλευρο, το οποίο είναι αποκλειστικά εισαγόμενο και χρησιμοποιείται στη διατροφή όλων των ειδών των εκτρεφόμενων ζώων και ψαριών, με τους περιορισμούς που υφίσταται λόγω μη θερμοευαίσθητων αντιδιαιτητικών παραγόντων (αιμοσυγκολλητίνες, αλλεργιογόνοι παράγοντες, κ.λ.π.). Επίσης, χρησιμοποιούνται κατά περίπτωση και υποπροϊόντα σπερμάτων βάμβακος με

περιοριστικούς παράγοντες την περιεκτικότητα τους σε ιώδεις ουσίες και σε γκοσυπόλη και υποπροϊόντα σπερμάτων ηλίανθου με περιοριστικό παράγοντα την περιεκτικότητα τους σε ιώδεις ουσίες. Τελευταία, στο πλαίσιο της εξάπλωσης της καλλιέργειας ενεργειακών φυτών γίνεται προσπάθεια εγκατάστασης της καλλιέργειας ελαιοκράμβης. Τα υποπροϊόντα της, από τις βιομηχανίες παραγωγής βιοντίζελ είναι τα άλευρα εκχύλισης ή τα άλευρα πίεσης.

Περιορισμοί στην ποσοτική χρησιμοποίηση αυτών των υποπροϊόντων υφίστανται, ανάλογα με το είδος των υπό διατροφή ζώων, λόγω της παρουσίας θειογλυκοζιτών και ερουσικού οξέος. Το ερουσικό οξύ περιέχεται σε μεγάλο ποσοστό στο έλαιο της ελαιοκάμβης και πολύ λιγότερο στα υποπροϊόντα της μετά την απομάκρυνση του ελαίου. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις έχει αρνητική επίδραση στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων, ενώ σε μικρές συγκεντρώσεις έχει ευεργετική επίδραση (Φεγγερός, 2008).

### **1.3 Παραγωγή βιοαιθανόλης**

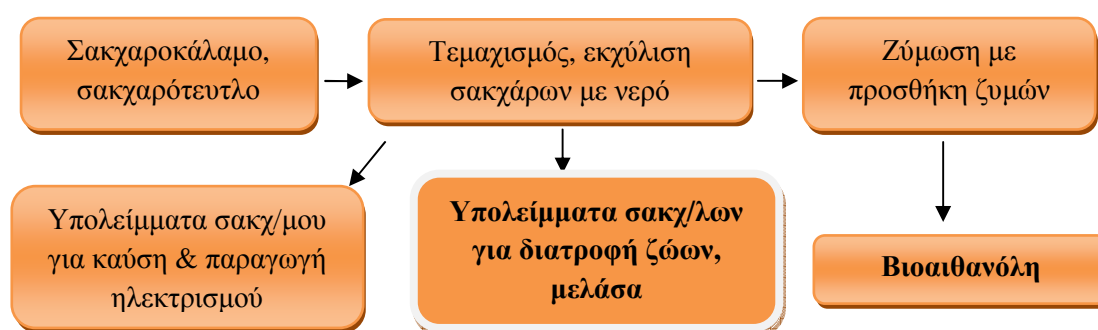
Η βιοαιθανόλη ορίζεται ως η αιθανόλη η οποία παράγεται από βιομάζα που είναι πλούσια σε σάκχαρα (σακχαροκάλαμο και σακχαρότευτλα), ή από βιομάζα η οποία είναι πλούσια σε άμυλο (δημητριακοί καρποί, πατάτα, κ.λ.π.) αφού πρώτα διασπαστεί το άμυλο σε σάκχαρα (Φεγγερός, 2008).

Τα σακχαρότευτλα αποφέρουν υψηλότερη παραγωγή καθώς και υψηλότερη παραγωγή αιθανόλης ανά εκτάριο. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αιθανόλης με την προϋπόθεση ότι προηγουμένως έχουν υποστεί απόσπαση της ζάχαρης. Σε κάθε περίπτωση, τα σάκχαρα υπόκεινται σε ζύμωση παρουσία ζυμών για παραγωγή βιοαιθανόλης.

Η παραγωγική διαδικασία που εφαρμόζεται ανάλογα με το είδος της χρησιμοποιούμενης βιομάζας, παρουσιάζεται στα διαγράμματα που ακολουθούν (1.2 και 1.3), όπου η παραγόμενη βιοαιθανόλη αναφέρεται ως βιοκαύσιμο πρώτης γενιάς. Τελευταία διερευνάται η δυνατότητα παραγωγής βιοαιθανόλης (δεύτερης γενιάς) από κυτταρινούχο βιομάζα (άχυρο, ξύλο, κ.λ.π.), είτε με όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης

είτε με ενζυμική υδρόλυση αυτής με σκοπό την παραγωγή σακχάρων που στη συνέχεια θα ζυμωθούν για παραγωγή βιοαιθανόλης.

Κατά την παραγωγική διαδικασία βιοαιθανόλης από σακχαρούχα υλικά (διάγραμμα 1.2), μόνο όταν χρησιμοποιούνται τα σακχαρότευτλα υπάρχει υποπροϊόν που ενδιαφέρει την διατροφή των ζώων και είναι τα υπολείμματα σακχαρότευτλων ή διαφορετικά τα λεγόμενα στέμφυλα σακχαρότευτλων. Επίσης, μπορεί να παραχθεί και μελάσα.



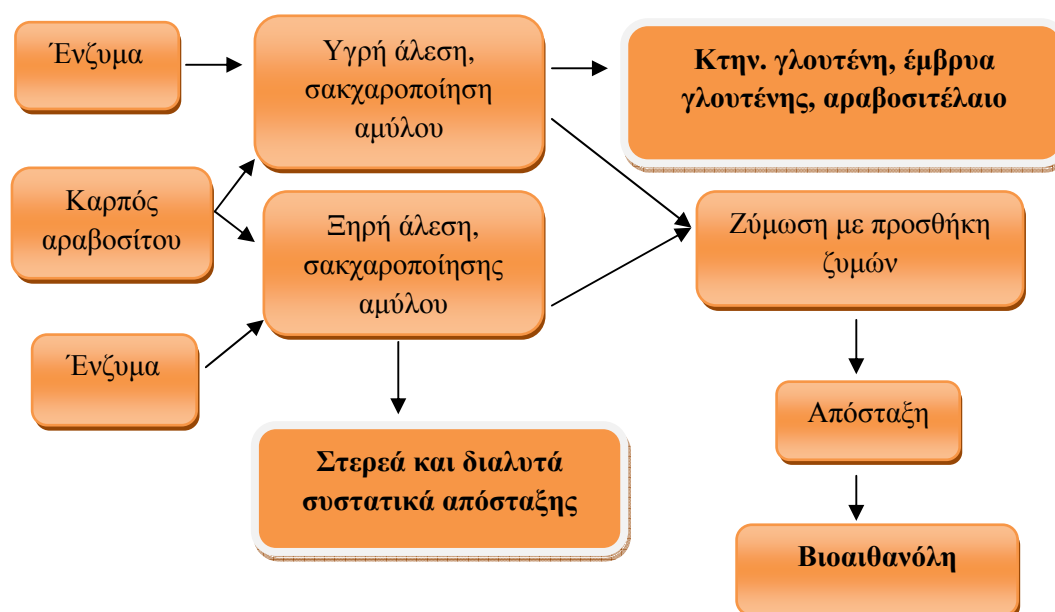
**Διάγραμμα 1.2** Παραγωγή βιοαιθανόλης από σακχαροκάλαμο ή σακχαρότευτλα

Με τη χρησιμοποίηση αμυλούχων πρώτων υλών, όπως είναι οι δημητριακοί καρποί, η παραγωγή βιοαιθανόλης συνεπάγεται και την παραγωγή διαφόρων υποπροϊόντων ανάλογα με τον καρπό που χρησιμοποιείται και την παραγωγική διαδικασία που εφαρμόζεται. Στις Η.Π.Α. χρησιμοποιείται, σχεδόν αποκλειστικά, ο καρπός αραβοσίτου, ενώ στις χώρες της Ευρώπης ο καρπός σίτου. Ως παραγωγική διαδικασία μπορεί να εφαρμοστεί αυτή της υγρής ή της ξηρής άλεσης. Η πρώτη είναι παλιά μέθοδος και αναφέρεται ως μέθοδος οينوπνευματοποίησης δημητριακών καρπών, ενώ η δεύτερη μέθοδος είναι σχετικά πρόσφατη διαδικασία και είναι αυτή που εφαρμόζεται σήμερα από τις περισσότερες βιομηχανίες.

Από την χρησιμοποίηση του καρπού σίτου τα υποπροϊόντα που παράγονται είναι τα διαλυτά και στερεά συστατικά απόσταξης που συνήθως ενοποιούνται σε ένα υποπροϊόν.

Από τη χρησιμοποίηση του καρπού αραβοσίτου και ανάλογα με το αν εφαρμόζεται υγρή ή ξηρή άλεση παράγονται διάφορα υποπροϊόντα (διάγραμμα 1.3).

Με εφαρμογή της υγρής άλεσης τα υποπροϊόντα, τα οποία παράγονται είναι η κτηνοτροφική γλουτένη και τα έμβρυα αραβοσίτου. Στη συνέχεια, από τα έμβρυα μπορεί να εκχυλιστεί το έλαιο (αραβοσιτέλαιο), οπότε στην περίπτωση αυτή ως υποπροϊόν θα είναι τα εκχυλισμένα έμβρυα αραβοσίτου. Με την εφαρμογή της ξηρής άλεσης τα υποπροϊόντα που παράγονται είναι στερεά και διαλυτά συστατικά απόσταξης, όπως στην περίπτωση του καρπού σίτου.



**Διάγραμμα 1.3** Παραγωγή βιοαιθανόλης από καρπό αραβοσίτου

Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται λιγνινοκυτταρινούχα υλικά για παραγωγή βιοαιθανόλης εφαρμόζεται είτε η μέθοδος της όξινης υδρόλυσης (υδρόλυση με προσθήκη οξέων, όπως οξικό οξύ και αρωματική αλδεϋδη), είτε η μέθοδος της ενζυμικής υδρόλυσης, μέσω προσθήκης ενζύμων. Και στις δύο περιπτώσεις δεν παράγονται υποπροϊόντα με ενδιαφέρον για τη διατροφή των ζώων (Φεγγερός, 2008).



### **1.3.1 Υποπροϊόντα βιομηχανιών παραγωγής βιοαιθανόλης στη διατροφή των ζώων.**

Η παραγωγική διαδικασία που εφαρμόζεται για παραγωγή βιοαιθανόλης από αραβόσιτο μπορεί να είναι, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, της υγρής ή της ξηρής άλεσης. Η διαδικασία της υγρής άλεσης είναι πολύ παλιά και αναφέρεται ως παραγωγική διαδικασία οινοπνευματοποίησης για παραγωγή αλκοόλης με παράλληλη παραγωγή πιθανών υποπροϊόντων όπως τα έμβρυα αραβοσίτου, το αραβοσιτέλαιο (αν εκχυλιστούν τα έμβρυα), τα στέμφυλα οινοπνευματοποίησης, η κτηνοτροφική γλουτένη, η γλουτένη και τα στερεά και διαλυτά συστατικά. Όταν εφαρμόζεται η ξηρή άλεση στον αραβόσιτο ή άλλο δημητριακό καρπό, τότε τα υποπροϊόντα που παράγονται είναι τα στερεά και διαλυτά συστατικά, που συνήθως αναμειγνύονται σε ένα υποπροϊόν ως αφυδατωμένα στερεά και διαλυτά συστατικά καρπών (ΑΣΔΣΚ). Σήμερα, τη διαδικασία υγρής άλεσης υπολογίζεται ότι την εφαρμόζει μόνο το 30% των βιομηχανιών παραγωγής βιοαιθανόλης, ενώ το υπόλοιπο 70% εφαρμόζει την ξηρή άλεση.

Τα διαιτητικά χαρακτηριστικά των ΑΣΔΣΚ είναι υπό διερεύνηση. Ακόμη και για τον αραβόσιτο που είναι ο καρπός που χρησιμοποιείται εδώ και αρκετά χρόνια στη βιομηχανία παραγωγής αλκοόλης παρατηρείται διαφοροποίηση στην περιεκτικότητα των υποπροϊόντων του στα διάφορα θρεπτικά συστατικά. Γενικότερα όμως, τα ΑΣΔΣΚ από αραβόσιτο έχουν λιγότερες αζωτούχες ουσίες και περισσότερες λιπαρές ουσίες από τα αντίστοιχα του σίτου, ενώ για τα άλλα συστατικά δεν σημειώνονται ουσιώδεις διαφορές. Συνεπώς, η διακύμανση των τιμών στα συστατικά των ΑΣΔΣΚ οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως είναι η ποιότητα της πρώτης ύλης από την οποία προέρχονται, η βιομηχανία από την οποία παράγονται, ο βαθμός ζύμωσης του αμύλου και οι συνθήκες αφυδάτωσής τους. Η διακύμανση αυτή αντανακλάται και στο ενεργειακό περιεχόμενο των ΑΣΔΣΚ που μπορεί να κυμαίνεται ευρέως για όλα τα είδη των ζώων. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται τιμές για τα μηρυκαστικά ζώα από 6,7 μέχρι 8,4 MJ ΚΕΓ/kg (Berger, 2007), για τους χοίρους από 11,5 μέχρι 15,9 MJ ΠΕ/kg (Patience και συν., 2007), ενώ για τα πτηνά από 10,4 μέχρι 13,3 MJ ΜΕ/kg (Swiatkiewicz και Koreleski, 2008).

Οι συνθήκες αφυδάτωσης των ΑΣΔΣΚ που εφαρμόζονται από την κάθε βιομηχανία παραγωγής βιοαιθανόλης είναι ο κυριότερος παράγοντας που καθορίζει την ποιότητα των πρωτεϊνών τους. Για παράδειγμα, η εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας αφυδάτωσης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση διαθεσιμότητας της λυσίνης (πρώτου οριακού αμινοξέος). Κατά τον Fastinger (2006) τόσο η περιεκτικότητα, όσο και η βιοδιαθεσιμότητα της λυσίνης κυμαίνεται αρκετά (περιεκτικότητα 0,48-0,76%, βιοδιαθεσιμότητα 0,66-0,93%), με τις μικρότερες τιμές να αντιστοιχούν σε δείγματα που υπερθερμάνθηκαν κατά την αφυδάτωση με αποτέλεσμα να αδρανοποιηθεί μέρος της λυσίνης. Για το λόγο αυτό πολλοί θεωρούν, (Batal και Dale, 2006) ότι ένα πολύ καλό εύκολο κριτήριο της ποιότητας των ΑΣΔΣΚ είναι το χρώμα τους. Ανοιχτός χρωματισμός αναφέρεται σε καλή ποιότητα, ενώ σκούρος χρωματισμός σε υποβαθμισμένη ποιότητα.

Τα ΑΣΔΣΚ αποτελούν καλή πηγή φωσφόρου, με βιοδιαθεσιμότητα υψηλότερη από την αντίστοιχη του φωσφόρου των καρπών από τους οποίους προέρχονται. Αυτό μάλλον οφείλεται στο ότι κατά τη ζύμωση του αμύλου εμπλουτίζεται το υπόστρωμα με μικροβιακή φυτάση. Μεταξύ των άλλων ανόργανων στοιχείων, μεγάλη παραλλακτικότητα έχει διαπιστωθεί στην περιεκτικότητα σε νάτριο (0,09-0,44%), χωρίς όμως να έχει διευκρινισθεί μέχρι τώρα η αιτιολογία.

Τέλος, τα ΑΣΔΣΚ, λόγω των υπολειμμάτων των ζυμών που περιέχουν είναι φορείς βιταμινών (θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, κ.λ.π.) και διαφόρων άλλων βιολογικώς ενεργών συστατικών, όπως νουκλεοτιδίων, μαννανολιγোসακχαριτών, ινοσιτόλης, γλουταμινικού οξέως, κ.ά. που έχουν θετική επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα και γενικότερα στην υγεία των ζώων (Swiatkiewicz και Koreleski, 2008).

Τα ΑΣΔΣΚ αποτελούν τον κύριο όγκο των σημερινών παραγόμενων υποπροϊόντων και μάλιστα με συνεχώς αυξανόμενη τάση. Στις Η.Π.Α. την τελευταία δεκαετία σημειώθηκε αύξηση της χρησιμοποιούμενης ποσότητας καρπού αραβοσίτου για παραγωγή βιοαιθανόλης κατά 316% (Cooper, 2007) με αντίστοιχη αύξηση της βιοαιθανόλης (Φεγγερός, 2006).

Επίσης, τα ΑΣΔΣΚ, αντιπροσωπεύουν έως και το 40% του ρυθμού αντικατάστασης του καλαμποκιού στην αγελαδοτροφία, ενώ στην πτηνοτροφία μόνο το 5%. Όμως, εξαιτίας του υψηλού κόστους παραγωγής τους, πιθανώς θα αυξήσουν

και το κόστος διατροφής στην προβατοτροφία, εφόσον χρησιμοποιηθούν (Comerford, 2008).

### **1.3.3 Άλλα παράγωγα από την παραγωγή βιοκαυσίμων**

Στα παράγωγα των βιομηχανιών παραγωγής βιοκαυσίμων πρώτης και δεύτερης γενιάς μπορούν να προσμετρηθούν, εκτός των υποπροϊόντων που ήδη αναφέρθηκαν και διάφορα άλλα παράγωγα γενικότερου ενδιαφέροντος.

Από την παραγωγή βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς αναφέρονται τα υπολείμματα των διάφορων καλλιεργειών όπως είναι τα άχυρα ή τα υπολείμματα του σακχαροκάλαμου. Τα πρώτα είναι γνωστό ότι ανάλογα με την προέλευση τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διατροφή των φυτοφάγων ζώων με ήδη γνωστά τα διαιτητικά τους χαρακτηριστικά. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν όπως και τα υπολείμματα του σακχαροκάλαμου ως πρώτη ύλη για παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς ή ως καύσιμη ύλη για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας.

Από την παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς μπορεί να παράγονται διάφορα χημικά όπως είναι το οξικό οξύ ή και αρωματικές αλδεύδες και η λιγνίνη που ως καύσιμη ύλη στη συνέχεια χρησιμοποιείται για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας.

Στον πίνακα 1.4 δίνονται, ενδεικτικά, διάφορα παράγωγα, από βιομηχανίες παραγωγής βιοκαυσίμων, καθώς και η ποσοτική τους σχέση με το παραγόμενο βιοκαύσιμο ή την χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη.

**Πίνακας 1.4** Παράγωγα από βιομηχανίες παραγωγής βιοκαυσίμων, (Φεγγερός, 2008).

<b>Βιοκαύσιμο</b>	<b>Πρώτη</b>	<b>Παράγωγο</b>	<b>Ποσότητες</b>
<b>Βιοντίζελ</b>	Σπέρματα (π.χ. ελαιοκάμβης)	Άχυρο	2,78 τόνοι/τόνο
		Άλευρο	1,58 τόνοι/τόνο
		Γλυκερίνη	0,1 τόνοι/τόνο
<b>Βιοαιθανόλη</b>	Όξινη υδρόλυση	Ηλεκτρισμός	1,829 GJ/τόνο βιοαιθ.
		Τέφρα	0,384 τόνοι/τόνο
		Όξικό οξύ	0,115 τόνοι/τόνο
<b>Βιοαιθανόλη</b>	Καρπός σίτου	Άχυρο	18,54 τόνοι/τόνο
		Πίτυρα	0,12 τόνοι/τόνο
		Στερεά συστατικά	1,51 τόνοι/τόνο
<b>Βιοαιθανόλη</b>	Καρπός αραβοσίτου (υγρή άλεση)	Αραβοσιτέλαιο	1,89 kg/GJ
		Κτηνοτροφική	12,85 kg/GJ
		Γλουτένη	3,07 kg/GJ
<b>Βιοαιθανόλη</b>	Σακχαροκάλαμο	Ηλεκτρισμός	100 kWh/τόνο
<b>Βιοαιθανόλη</b>	Σακχαροκάλαμο	Στέμφυλα	22,5 τόνοι/τόνο
		Μελάσα	0,75 τόνοι/τόνο

#### 1.4. Γλυκερόλη

Η γλυκερίνη ή γλυκερόλη παράγεται κατά τη διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ από λίπη και έλαια, κατά τη διαδικασία της τρανς-εστεροποίησης. Τα έλαια προέρχονται κυρίως από φυτά όπως η κάνολα, το κάρδαμο, ο ηλίανθος, η σόγια και ο αραβόσιτος. Γλυκερόλη μπορεί, επίσης, να παρασκευαστεί και με άλλους τρόπους, όπως μέσω της διαδικασίας της σαπωνοποίησης των λιπών, μέσω ζύμωσης των σακχαρούχων ουσιών καθώς και μέσω της σύνθεσης της από προπυλένιο.

Η γλυκερόλη είναι ένα άχρωμο, άοσμο και παχύρευστο, με ουδέτερο pH υγρό, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακοβιομηχανία, στη σαπωνοποιία, αλλά και στη διατροφή. Ανήκει στην ομάδα των αλκοολών. Έχει γλυκιά γεύση και χαμηλή τοξικότητα. Ακόμη, η κοινή γλυκερόλη εξαιτίας της υγροσκοπικής της φύσης,

αυξάνει την ικανότητα συγκράτησης του νερού στα σιτηρέσια, τα οποία παράγονται και καταναλώνονται σε περιβάλλον με χαμηλή υγρασία (Dosari, 2007; Donkin, 2008; Elam, 2008).

Η απόδοση σε γλυκερίνη αντιστοιχεί περίπου στο 10% του παραγόμενου βιοντίζελ και υπολογίζεται ότι μέχρι το 2010 η παραγόμενη ποσότητα θα ξεπεράσει το ένα εκατομμύριο τόνους, ως απόρροια της αύξησης της παραγωγής βιοκαυσίμων. Η σύσταση της, σχετίζεται με την καθαρότητα της και ποικίλει ανάλογα με τη βιομηχανία προέλευσης και την προέλευση του χρησιμοποιούμενου λίπους/ελαίου. Γενικώς, είναι φορέας ενέργειας και στα σιτηρέσια των ζώων μπορεί να αντικαταστήσει άλλες ενεργειακές πηγές, όπως οι δημητριακοί καρποί. Στον πίνακα 1.5 που ακολουθεί, δίνεται ενδεικτικά η σύσταση της γλυκερόλης ανάλογα με την προέλευση της πρώτης ύλης. Στον πίνακα διακρίνεται ότι το ενεργειακό περιεχόμενο της γλυκερόλης, η οποία προέρχεται από ανακυκλωμένα λίπη είναι υψηλότερο, λόγω του ότι υπάρχει μεγάλο ποσοστό λίπους στο υποπροϊόν. Στην περίπτωση αυτή όμως τίθεται το ερώτημα κατά πόσο ένα υποπροϊόν με τόσο μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπος (58%) και μόλις 27% γλυκερόλη, μπορεί να θεωρηθεί ως γλυκερόλη.

**Πίνακας 1.5** Χημική ανάλυση γλυκερίνης από βιομηχανίες βιοντίζελ, (Thompson and He, 2006).

<b>Πρώτη ύλη</b>				
<b>Συστατικό</b>	<b>Ελαιοκράμβη</b>	<b>Canola</b>	<b>Σπέρματα σόγιας</b>	<b>Ανακυκλωμένα έλαια</b>
Λίπος (%)	9,74	13,10	7,98	57,98
Υδατάνθρακες	75,50	75,20	76,20	26,90
Πρωτεΐνη (%)	0,07	0,06	0,05	0,23
Τέφρα (%)	0,70	0,65	2,73	5,50
Ca (ppm)	24	20	11	-
K (ppm)	-	-	--	-
P (ppm)	65	59	53	12
Na (%)	1,1	1,1	1,2	1,4
S (ppm)	21	14	-	19
<b>Ενέργεια</b>	<b>16,30</b>	<b>17,50</b>	<b>15,80</b>	<b>27,20</b>

Στις Η.Π.Α., αλλά και στην Ευρώπη (κυρίως στη Γερμανία) επιδιώκεται να τυποποιηθούν οι παραγόμενοι τύποι γλυκερόλης, έτσι ώστε η κοινή (crude) γλυκερόλη να είναι σε ποσοστό τουλάχιστον 80% (τυπικά η ακατέργαστη γλυκερόλη βρίσκεται σε ποσοστό 80% ως 85%, με 12% ως 15% υγρασία, Elam, 2008) και η καθαρή (pure) γλυκερόλη να βρίσκεται σε συγκέντρωση 99%. Σε κάθε περίπτωση το υπόλοιπο ποσοστό μπορεί να αποτελείται από νερό, άλατα, τέφρα και μεθανόλη, με την τελευταία να βρίσκεται το πολύ μέχρι 0,5% στον κοινό τύπο και 0,1% στον καθαρό τύπο (πίνακας 2,1,2) (Φεγγερός, 2008).

Κατά τη διαδικασία παραγωγής της γλυκερόλης, μπορεί να περιέχονται σε αυτήν ολικά λιπαρά οξέα, σε συγκέντρωση η οποία μπορεί να αγγίξει το 40% (Elam, 2008).

Στον πίνακα 1.6, δίνεται η σύσταση του υποπροϊόντος όπως βγαίνει από τη διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ με μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό, μεθανόλη και ανόργανα στοιχεία μεταξύ των οποίων το Κ ή το Να, ανάλογα με τον καταλύτη που χρησιμοποιείται (ΚΟΗ ή ΝαΟΗ). Από το υποπροϊόν αυτό θα πρέπει να απομακρυνθεί σχεδόν το σύνολο της μεθανόλης και το μεγαλύτερο ποσοστό του νερού και όσο ο βαθμός καθαρότητας αυξάνει, απαιτείται απομάκρυνση και της τέφρας. Όλα αυτά συνεπάγονται αύξηση του κόστους παραγωγής και για το λόγο αυτόν ο καθαρός τύπος γλυκερόλης προορίζεται κυρίως για χρήση στην φαρμακοβιομηχανία και στην αρωματοποιία και λιγότερο στη διατροφή των ζώων. Παρόλα αυτά έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες, στις οποίες έχει χρησιμοποιηθεί η καθαρή γλυκερόλη, οι οποίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

**Πίνακας 1.6** Χημική ανάλυση γλυκερόλης από βιομηχανίες βιοντίζελ ανάλογα με το βαθμό καθαρότητας (Πηγή: Sudekum, 2007).

<b>Βαθμός καθαρότητας γλυκερόλης</b>			
<b>Συστατικό (g/kg)</b>	<b>Χαμηλός</b>	<b>Μέσος</b>	<b>Υψηλός</b>
<b>Υγρασία</b>	268	110	25
<b>Γλυκερίνη</b>	633	853	998
<b>Λίπος</b>	7.10	4.4	-
<b>P</b>	10.5	23.6	-
<b>K</b>	22.0	23.3	-
<b>Na</b>	1.1	0.9	-
<b>Μεθανόλη</b>	267	0.4	-

Από διατροφικής άποψης, η γλυκερόλη (1,2,3-προπανοτριόλη) χαρακτηρίζεται από γλυκιά γεύση που την καθιστά ελκυστική και παράγοντα αύξησης της κατανάλωσης τροφής, από ζώα για τα οποία η γεύση επηρεάζει την κατανάλωση. Στο πεπτικό σύστημα απορροφάται εύκολα, όπως επίσης εύκολα και γρήγορα ζυμώνεται στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών ζώων. Η ζύμωσή της οδηγεί κυρίως σε παραγωγή προπιονικού οξέως. Η ταχεία ζύμωσή της δεν την καθιστά ικανή για αντικατάσταση της προπυλενικής γλυκόλης (1,2-προπανοδιόλη), η οποία χρησιμοποιείται όταν επιζητείται μείωση του κινδύνου πρόκλησης κετοναϊμίας. Επίσης, ένα μικρό αλλά σημαντικό μέρος της γλυκερόλης απορροφάται από τη μεγάλη κοιλία και σε επίπεδο μεταβολισμού, όπως και στα μονογαστρικά ζώα, αυτή είτε οξειδώνεται μέσω του κύκλου του Krebs σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O με παράλληλη απόδοση ενέργειας (22 mol ATP/mol γλυκερόλης), είτε παράγει γλυκόζη μέσω της γλυκονεογένεσης. Στα γαλακτοπαραγωγά ζώα η αυξημένη παραγωγή προπιονικού οξέως και η αυξημένη παραγωγή γλυκόζης οδηγούν σε αύξηση της πρωτεΐνης του γάλακτος. Αυτό διαπιστώνεται και από την εργασία των Bodarski et. al., 2005, οι οποίοι χορήγησαν σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες 0,5L γλυκερίνης/ζώο/ημέρα και παρατήρησαν αύξηση στην γαλακτοπαραγωγή και στην πρωτεΐνη του γάλακτος (Φεγγερός, 2008).

Η χρησιμοποίηση της ακατέργαστης γλυκερόλης ως συστατικό στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων δεν έχει πλήρως διερευνηθεί, αν και φαίνεται να μην είναι τοξική. Ωστόσο υπάρχουν θέματα που αφορούν στην απορρόφησή της και πρέπει να διερευνηθούν πριν τεθεί σε εφαρμογή ένα πρόγραμμα διατροφής με γλυκερόλη. Οι Thomson και He (2006), διενέργησαν αναλυτικές εξετάσεις στην ακατέργαστη γλυκερόλη, η οποία παράχθηκε κατά τη διαδικασία παραγωγής βιοκαυσίμων από διάφορες πρώτες ύλες (σόγια, ελαιοκράμβη, κάνολα, φυτικά έλαια κ.ά.). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γλυκερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα για λίπος στα σιτηρέσια παραγωγικών ζώων, εφόσον η πρώτη ύλη από την οποία παράγεται έχει υψηλό περιεχόμενο σε λιπαρές ουσίες.

#### **1.4.1 Αντιδιαιτητικοί παράγοντες της γλυκερόλης**

Σύμφωνα με τους Doppenberg και Van Der Aar (2007), η κύρια ανησυχία από τη χρησιμοποίηση ακατέργαστης γλυκερόλης (τύπου 80%), είναι η περιεκτικότητα της σε μεθανόλη η οποία παραμένει ως κατάλοιπο μετά την επεξεργασία της (έως 0,5 %). Η μεθανόλη έχει χαμηλό βαθμό εξάτμισης (65° C), κατά συνέπεια θα χαθεί κατά τη διάρκεια παραγωγής συμπύκτων και ίσως προκληθεί ατύχημα στο εργοστάσιο.

Η μεθανόλη μπορεί να είναι τοξική, για αυτό το λόγο οι χοιροτρόφοι και οι πτηνοτρόφοι οι οποίοι χρησιμοποιούν τη γλυκερόλη στο πρόγραμμα διατροφής τους, πρέπει να είναι βέβαιοι ότι τα επίπεδα μεθανόλης βρίσκονται κάτω από το ανώτατο όριο, το οποίο έχει θεσπίσει ο παγκόσμιος οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων (150 ppm). Η μεθανόλη όταν βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο σιτηρέσιο, είναι δυνατόν να προκαλέσει τύφλωση στους χοίρους και στις όρνιθες. Όταν όμως είναι στα επιθυμητά επίπεδα δεν φαίνεται να υπάρχουν παρενέργειες στους ζωικούς οργανισμούς (Pluske, 2007).

#### **1.4.2 Επίδραση της χορήγησης γλυκερόλης στις αποδόσεις των ζώων**

Η ποσοτική χρησιμοποίηση της γλυκερόλης στα σιτηρέσια μηρυκαστικών και μονογαστρικών ζώων, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες που σχετίζονται με τα φυσικά χαρακτηριστικά, με τις μεταβολικές της ιδιότητες καθώς και με τη σύνθεση του όλου σιτηρεσίου. Λόγω του μεγάλου της ιξώδους, όταν η γλυκερόλη βρίσκεται σε θερμοκρασία κάτω των 18°C, παρουσιάζει προβλήματα στην ανάμειξη της με τα υπόλοιπα συστατικά του σιτηρεσίου. Εκτός αυτού, η προσθήκη γλυκερόλης, σε μεγάλα ποσοστά δημιουργεί προβλήματα υφής και ροής των σιτηρεσίων. Από πλευράς μεταβολικών ιδιοτήτων, σε συνδυασμό και με τη σύνθεση του σιτηρεσίου, φαίνεται, από σχετικές έρευνες, ότι αυξανόμενου του ποσοστού συμμετοχής χειροτερεύει η εκμετάλλευση της ενέργειας (Φεγγερός, 2008).



### 1.4.2.1 Μηρυκαστικά

Στα παχυνόμενα μηρυκαστικά η γλυκερόλη χρησιμοποιείται αποτελεσματικά λόγω του ότι η ζύμωσή της οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής προπιονικού οξέως, το οποίο έχει την μεγαλύτερη ενεργειακή απόδοση (Καλαϊσιάκης, 1981). Η γλυκερόλη μπορεί να συμπεριληφθεί ως συστατικό των σιτηρεσίων ολικής αναμείξεως ή ως συστατικό των συμπλήκτων με συνέπεια τη βελτίωση της ποιότητάς τους. Επίσης, η γλυκερόλη μπορεί να αντικαταστήσει το ταχέως ζυμούμενο άμυλο στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών σε ποσοστό έως 10%, χωρίς να παρουσιαστούν αρνητικές συνέπειες όσον αφορά στην κατανάλωση του νερού από τα μηρυκαστικά, στην αποδόμηση των συστατικών της τροφής στην μεγάλη κοιλία και τέλος στη φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών (Pluske, 2007).

Σε πείραμα των Ryatt et al., 2007, η συμμετοχή 10% γλυκερόλης στο σιτηρέσιο παχυνόμενων βοοειδών είχε ως αποτέλεσμα την μειωμένη κατανάλωση τροφής, αλλά και τη βελτίωση της μέσης ημερησίας αύξησης του βάρους και του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν περισσότερο εμφανή στην περίπτωση που η γλυκερόλη συμμετείχε σε σιτηρέσιο με υψηλό ποσοστό δημητριακών καρπών (Φεγγερός, 2008).

Ειδικότερα, η επίδραση της γλυκερόλης σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής παρουσιάζει διάφορα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της κατανάλωσης της τροφής των αγελάδων στον οποίον το σιτηρέσιο προστέθηκε γλυκερόλη σε διάφορα ποσοστά, από 0% ως 15% (Donkin and Doane, 2007). Αντίθετα, μείωση της κατανάλωσης τροφής καταγράφηκε κατά την προσθήκη γλυκερόλης (0,25 kg/ημ. γλυκερόλης) στο σιτηρέσιο αγελάδων στο μέσο της γαλακτικής περιόδου (Khalili et al., 1997).

Επίσης, σε μελέτες που έγιναν σε δαμάλες, παρατηρήθηκε βελτίωση της ανάπτυξής τους όταν διατρέφονταν με σιτηρέσιο στο οποίο είχε προστεθεί γλυκερόλη σε ποσοστό 2%, 4% και 8%, για περίοδο δέκα ημερών, ενώ μείωση παρατηρήθηκε σε σιτηρέσια εμπλουτισμένα με 12% και 16% γλυκερόλη. Παρόμοια αποτελέσματα υπήρχαν και στην κατανάλωση της τροφής. Γενικότερα, η προσθήκη γλυκερόλης στο σιτηρέσιο δαμάλων κάτω από 8%, προσδίδει θετικά αποτελέσματα τόσο στην ανάπτυξη του ζώου, όσο και στην ποιότητα του σφάγιου (Parsons et al., 2009). Μία

ακόμη μελέτη που έγινε σε δαμάλες (Donkin και Doane, 2007), έδειξε ότι η προσθήκη γλυκερόλης σε ποσοστό 10% δεν αλλάζει σημαντικά την κατανάλωση τροφής, το σωματικό βάρος των ζώων, αλλά και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σφάγιου και της κατάστασης της στρωμνής, σε σύγκριση με το μάρτυρα. Εκείνο όμως το οποίο παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι η αλλαγή της διατροφικής συμπεριφοράς των ζώων, τα οποία απαιτούν περισσότερο χρόνο για να καταναλώσουν την τροφή τους, σε σχέση με τα ζώα τα οποία δεν κατανάλωσαν σιτηρέσιο με γλυκερόλη.

Σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, οι οποίες κατανάλωσαν σιτηρέσιο με κύριο συστατικό τον αραβόσιτο, αλλά με προσθήκη μικρών ποσοτήτων γλυκερόλης, παρατηρείται σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέος (Remond et al., 1993). Οι Schroder και Sudekum (1999) διαπίστωσαν, τρεις ώρες μετά την κατανάλωση του γεύματος άνοδο της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέως σε αγελάδες οι οποίες διατρέφονταν με σιτηρέσιο στο οποίο είχε προστεθεί 10% γλυκερόλη. Παρόμοιες μελέτες, των Likewise et al. (2004), έδειξαν άνοδο κατά 42% της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέος, αλλά και της συγκέντρωσης του β-υδροξυβουτυρικού (BHBA) στο πλάσμα (DeFrain et al., 2004) σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

#### **1.4.2.2 Χοίροι**

Η συμμετοχή της γλυκερόλης σε διάφορα ποσοστά στα σιτηρέσια των χοίρων διερευνήθηκε κυρίως προς την κατεύθυνση της αντικατάστασης των δημητριακών καρπών. Οι Kijora et al. το 1996 διενήργησαν δύο πειράματα, στα οποία αντικατέστησαν το κριθάρι σε ποσοστό 5% και 10% από γλυκερόλη. Παρατηρήθηκε ότι οι ομάδες οι οποίες διατράφηκαν με γλυκερόλη, παρουσίασαν μεγαλύτερη αύξηση σωματικού βάρους. Αυτό αποδόθηκε κυρίως στη γλυκιά γεύση, την οποία προσδίδει η γλυκερόλη στο σιτηρέσιο, καθώς και στην καλύτερη υφή των σιτηρεσίων. Σε αντίστοιχη ομάδα στην οποία είχε προστεθεί στο σιτηρέσιο 30% γλυκερόλη, παρουσίασε μεν μικρότερη ανάπτυξη, αλλά δεν διαφοροποίησε την απόδοση σε σφάγιο ή την ποιότητα του παραγόμενου κρέατος.

Στη διατροφή των θηλυκών χοίρων αναπαραγωγής θεωρείται ότι η χρήση της γλυκερόλης θα έχει ευνοϊκά αποτελέσματα τόσο κατά την περίοδο της κυοφορίας όσο και κατά την περίοδο της γαλακτοπαραγωγής, (Dorpenberg και Van der Aar, 2007). Στην περίοδο της κυοφορίας και ιδιαίτερος στο τελευταίο στάδιό της, η γλυκερόλη εξαιτίας της ταχείας απορρόφησής της από το πεπτικό σύστημα, και με την προϋπόθεση ότι περνά από τον πλακούντα, θα μπορούσε να αποτελέσει μια άμεση ενεργειακή πηγή για τα κυοφορούμενα έμβρυα. Στην περίοδο της γαλακτοπαραγωγής η γλυκερόλη μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής γάλακτος και επιπλέον, η ιδιότητα της να μεταβολίζεται σε γλυκόζη μειώνει την ανάγκη για καταβολισμό του σωματικού λίπους. Αποτέλεσμα όλων αυτών θα είναι οι αυξημένες πιθανότητες γέννησης και επιβίωσης μεγαλύτερου αριθμού χοιριδίων και μείωσης των απωλειών σωματικού βάρους από τις χοιρομητέρες (Φεγγερός, 2008).

Όσον αφορά στους αναπτυσσόμενους-παχυνόμενους χοίρους έχει διαπιστωθεί ότι η γλυκερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέχρι 10% στο σιτηρέσιο τους χωρίς αρνητικά αποτελέσματα στα παραγωγικά χαρακτηριστικά τους (Groesbeck 2008, Lammers 2008,). Επίσης, η συμμετοχή της στο εναρκτήριο σιτηρέσιο των θηλαζόντων χοιριδίων βελτιώνει την ελκυστικότητά του και μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της κατανάλωσης, που είναι επιθυμητή σε αυτό το στάδιο.

Η προσθήκη ακατέργαστης γλυκερόλης σε ποσοστό πάνω από 10% στο ολικό σιτηρέσιο των χοιριδίων δεν συνίσταται, διότι αυξημένη προσθήκη γλυκερόλης (ως και 30%) είναι δυνατό να προκαλέσει μείωση ρευστότητας του σιτηρεσίου (Shields et al., 2009).

Τέλος, σε εκτροφή χοιριδίων, στην οποία χρησιμοποιήθηκε καθαρή γλυκερόλη σε ποσοστό 5%, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα παραγωγικά χαρακτηριστικά τους. Αντίθετα, προσθήκη στο σιτηρέσιο 10% καθαρής γλυκερόλης, είχε ως συνέπεια τη μείωση της αύξησης σωματικού βάρους και της εκμετάλλευσης της τροφής (Casa et al., 2009).

### 1.4.2.3 Ορνίθια

Ο Cerrate et al. (2006), πρότεινε ότι η γλυκερόλη, η οποία παράγεται ως υποπροϊόν παραγωγής του βιοντίζελ μπορεί να θεωρηθεί ως χρήσιμη πηγή ενέργειας στα σιτηρέσια παχυνόμενων ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Στη συνέχεια, το 2007, ο Pluske, πρότεινε ότι η γλυκερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποσοστό 10% σε ορνίθια ηλικίας έως 16 ημερών, χωρίς να επηρεαστεί η απόδοσή τους, και σε ποσοστό 5% σε ορνίθια τα οποία εκτρέφονται έως να φτάσουν το εμπορεύσιμο σωματικό τους βάρος, χωρίς βέβαια να υπάρχουν παρενέργειες όσον αφορά στην κατανάλωση της τροφής.

Πριν όμως από τις παραπάνω μελέτες, η γλυκερόλη είχε χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή των φωτόκων ορνιθίων και των παχυνόμενων ορνιθίων σε ποσοστά μέχρι και 25% (Simon, 1996) του σιτηρεσίου τους. Φαίνεται όμως ότι τα καλύτερα αποτελέσματα τόσο στην αυγοπαραγωγή όσο και στην πάχυνση επιτυγχάνονται με συμμετοχή γλυκερόλης σε ποσοστά μεταξύ 5% και 10% (Cerrate et al., 2006; Doppenberg και van der Aar, 2007; Shene et al., 2008).

Στα παχυνόμενα ορνίθια, προσθήκη ακατέργαστης γλυκερόλης σε ποσοστό μέχρι 10% βελτιώνει την αύξηση του σωματικού βάρους με σημαντικά υψηλότερη απόδοση του σφαγίου σε στήθος. Ποσοστά υψηλότερα του 10% στις φωτόκες όρνιθες και στα παχυνόμενα ορνίθια φαίνεται να συμβάλλουν σε χειροτέρευση της εκμετάλλευσης της ενέργειας του σιτηρεσίου και οδηγούν σε παραγωγή περισσότερο υδαρών περιττωμάτων (Φεγγερός, 2008).

Όσον αφορά στη φαινομένη μεταβολιστέα ενέργεια της ακατέργαστης γλυκερόλης, για τα κρεοπαραγωγικά ορνίθια, (Dozier et al., 2008) έχει καθοριστεί στα 3,621 kcal/kg, 3,331 kcal/kg και 3,349 kcal/kg για ορνίθια ηλικίας 4-11, 17-25 και 37-45 ημερών αντίστοιχα. Επίσης, σχετικά με την εκμετάλλευση της ενέργειας, φαίνεται ότι αυξανόμενου του ποσοστού συμμετοχής της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο, χειροτερεύει η εκμετάλλευση της ενέργειας από τους ζωικούς οργανισμούς (πίνακας 1.7). Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται σε μεταβολικές ιδιότητες, σε συνδυασμό και με τη σύνθεση του σιτηρεσίου.

**Πίνακας 1.7** Θρεπτική αξία γλυκερόλης για της όρνιθες αυγοπαραγωγής και τα παχυνόμενα ορνίθια κρεοπαραγωγής, (Φεγγερός, 2008).

Γλυκερόλη (% σιτηρεσίου)	Όρνιθες (AME, Mj/kg)		Ορνίθια (AME, Mj/kg)	
	Γλυκερόλη (τύπου 100)	Γλυκερόλη (τύπου 80)	Γλυκερόλη (τύπου 100)	Γλυκερόλη (τύπου 80)
<b>5</b>	18.1	14.4	18.1	14.1
<b>10</b>	17.3	13.8	17.3	13.8
<b>15</b>	14.9	11.9	15.7	12.6

Οι Simon et. al (1996) αντικατέστησαν μέρος του αραβοσίτου, του σιτηρεσίου ορνιθίων κρεοπαραγωγής, με καθαρή γλυκερόλη (5% ως 25%) και συμπέραναν ότι σε συγκεντρώσεις 5% και 10%, η προσθήκη γλυκερόλης δείχνει να είναι ωφέλιμη για τα ορνίθια όσον αφορά στα παραγωγικά χαρακτηριστικά τους, ενώ η προσθήκη καθαρής γλυκερόλης στο σιτηρέσιο σε ποσοστό πάνω από 20% προκαλεί πτώση των παραγωγικών χαρακτηριστικών και πρόκληση παθολογικών διαταραχών στα ορνίθια. Επίσης, δύο ώρες μετά την χορήγηση γλυκερόλης, μέσω σιτηρεσίου στα ορνίθια, σε ποσοστό 5%, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο αίμα, γεγονός που αποδεικνύει την άμεση απορρόφησή της από τον ζωικό οργανισμό. Ακόμη, οι προαναφερθέντες, το 1997 χρησιμοποίησαν 10% καθαρής γλυκερόλης σε εκτροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγής, όπου παρατήρησαν αύξηση της κατανάλωσης τροφής, αλλά και άνοδο της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο αίμα των ορνιθίων. Τέλος, ποσοστά χρησιμοποίησης γλυκερόλης άνω του 10%, φαίνεται ότι μειώνουν της εκμετάλλευση της ενέργειας, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως και οδηγούν σε περιπτώματα αυξημένης υδαρότητας (Doppenberg και Van Der Aar, 2007).

### **1.4.3 Επίδραση της χρήσης γλυκερόλης στα λιπαρά οξέα του τελικού προϊόντος**

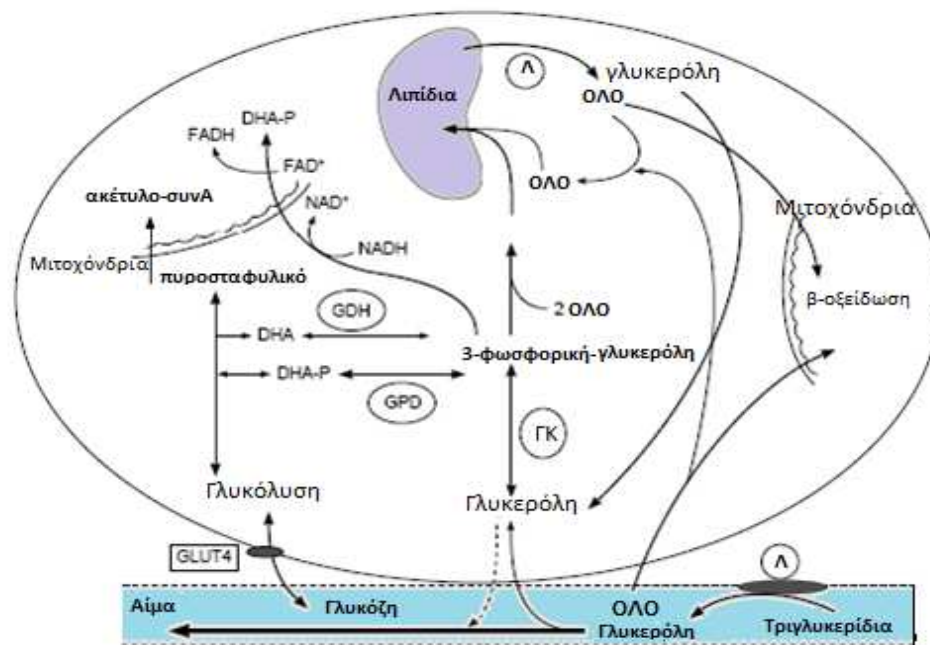
Έως σήμερα ελάχιστες μελέτες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την επίδραση της προσθήκης γλυκερόλης στη σύσταση του τελικού προϊόντος σε λιπαρά οξέα. Όσον αφορά στις όρνιθες αυγοπαραγωγής, ο Yalcin et al (2010), παρατήρησε μείωση του λόγου των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα στον κρόκο του αυγού, σε σχέση με τον μάρτυρα, μετά από προσθήκη γλυκερόλης στο σιτηρέσιο σε ποσοστά 5% και 7.5%, χωρίς να επηρεάζονται η παραγωγή και η ανάπτυξη των ορνίθων, αλλά και διάφοροι αιματολογικοί παράμετροι και χαρακτηριστικά των αυγών.

Σε μελέτη με αναπτυσσόμενα χοιρίδια (Lammers et al, 2008), το προφίλ των λιπαρών οξέων του επιμήκη ραχιαίου μυ, άλλαξε ελαφρώς ύστερα από διατροφή στην οποία είχε προστεθεί ακατέργαστη γλυκερόλη σε ποσοστό 10% στο ολικό σιτηρέσιο των χοιριδίων. Επίσης, στο ίδιο πείραμα τα αναπτυσσόμενα χοιρίδια παρουσίασαν μείωση του λινολενικού οξέος, αλλά αύξηση του εικοσαπενταενοϊκού οξέος, από τα χοιρίδια τα οποία διατράφηκαν με τον μάρτυρα ή και 5% γλυκερόλη στο σιτηρέσιο τους.

### **1.4.4 Μεταβολισμός και αξιοποίηση της γλυκερόλης από τον οργανισμό των ζώων**

Η γλυκερόλη είναι μια ουσία η οποία μετέχει σε σημαντικά μεταβολικά μονοπάτια του ζωικού οργανισμού. Ο οργανισμός προσλαμβάνει τη γλυκερόλη είτε μέσω της τροφής, μέσω της διαδικασίας της πέψης και απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών, είτε την παράγει φυσικά μέσα στο σώμα και την αποθηκεύει, μέσα ή και γύρω από τα κύτταρα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις ( $<0.1\text{mmol/L}$ ) (Robergs and Griffen, 1998). Τα λίπη που λαμβάνονται με την τροφή διασπώνται στο πεπτικό σύστημα σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Η παραγόμενη γλυκερόλη καταβολίζεται στη συνέχεια σε κατώτερα λιπαρά οξέα και ιδίως προπιονικό, ενώ τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μέχρι  $C_{18}$ , υδρογονώνονται κατά μεγάλο ποσοστό και γίνονται περισσότερο κορεσμένα (Ζέρβας, 2005).

Το ήπαρ είναι το βασικό όργανο το οποίο είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό της γλυκερόλης. Τα τρία τέταρτα των αποθεμάτων της γλυκερόλης του σώματος, μεταβολίζονται στο ήπαρ. Οι νεφροί αποτελούν ένα άλλο εξίσου σημαντικό όργανο μεταβολισμού της. Οι τελευταίοι είναι υπεύθυνοι για την χρησιμοποίηση περίπου του ένα πέμπτου των αποθεμάτων της γλυκερόλης του ζωικού οργανισμού. Άλλοι ιστοί οι οποίοι δείχνουν ότι μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη γλυκερόλη είναι τα μαστικά κύτταρα, ο λιπώδης ιστός, τα πνευμονοκύτταρα, η αορτή, η καρδιά, αλλά και οι σκελετικοί μύες (Shields, 2009). Ο μεταβολισμός της γλυκερόλης παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 1.



**Εικόνα 1.** Μεταβολισμός γλυκερόλης (Robergs and Griffin, 1998)

**DHA** = διϋδροξυ-ακετόνη; **DHA-P** = φωσφορική διϋδροξυ-ακετόνη; **FAD<sup>+</sup>** = φλαβίνο αδενίνο δινουκλεοτίδιο; **FADH** = ανηγμένη μορφή του φλαβίνο αδενίνο δινουκλεοτιδίου; **ΟΛΟ** = ολικά λιπαρά οξέα; **ΓΚ** = γλυκερινική κινάση; **GLUT4** = πρωτεΐνη μεταφοράς γλυκόζης; **GDH** = αφυδρογονάση της γλυκερόλης; **GPD** = αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκερόλης; **Λ** = λιπάση; **NAD<sup>+</sup>** = νικοτιναμίδο αδενίνο δινουκλεοτίδιο; **NADH** = ανηγμένη μορφή του νικοτιναμίδο αδενίνο δινουκλεοτιδίου.

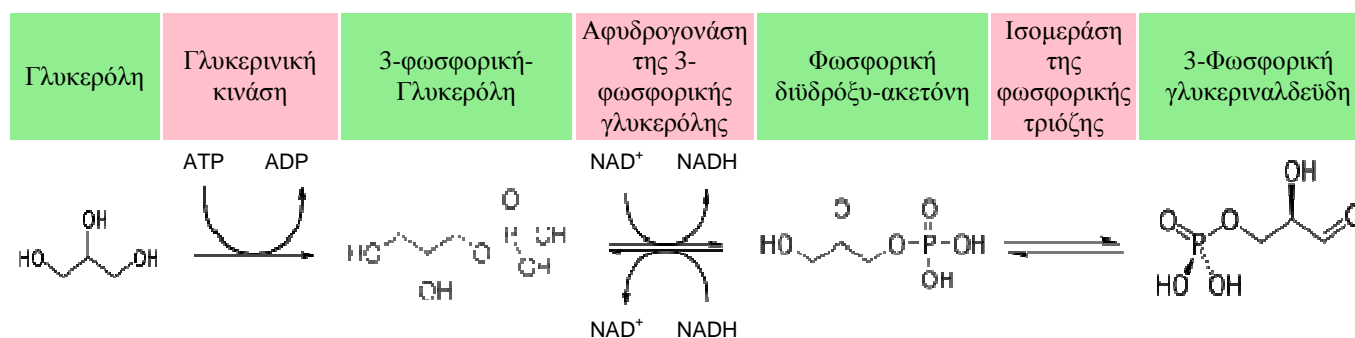
Η γλυκερόλη η οποία καταναλώνεται μέσω του σιτηρεσίου απορροφάται παρακυτταρικά μέσω του μηχανισμού της παθητικής διάχυσης. Πρόσφατα στοιχεία αναφέρουν την παρουσία ενός συστήματος μεταφοράς γλυκερόλης στο λεπτό έντερο

επιμύων, σύστημα το οποίο εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Na. Ανεξαρτήτως πάντως του μηχανισμού, η γλυκερόλη θα εισέλθει στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας και θα αποτελέσει πρόδρομη ένωση της γλυκονεογένεσης. Κατά τον ίδιο τρόπο δρα η ενδογενής γλυκερόλη που απελευθερώνεται από τον καταβολισμό των τριακυλογλυκερολών (Pluske, 2007).

Στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, όπως επίσης και στο ήπαρ, η γλυκόζη μετατρέπεται σε λιπαρά οξέα, τα οποία αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό με τη μορφή των τριγλυκεριδίων. Κατά τη διάρκεια της πέψης, τα λίπη και τα έλαια υδρολύονται με τη βοήθεια της παγκρεατικής λιπάσης σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και σε 2-μονοακυκλογλυκερίδιο. Όλα τα παράγωγα της υδρόλυσης μεταφέρονται στο ήπαρ, όπου εκεί τελικά διασπώνται σε γλυκερόλη και άλλα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Μετά την πέψη, ακολουθεί η εντερική απορρόφηση της γλυκερόλης, της οποίας το εύρος κυμαίνεται από 70-90% στα ποντίκια και σε περισσότερο από 97% στους χοίρους και στις αυγοπαραγωγικές όρνιθες. Η γλυκερόλη είναι μια υδατοδιαλυτή ουσία, η οποία μπορεί να απορροφηθεί στο στομάχι, αλλά ο ρυθμός απορρόφησής της είναι χαμηλότερος σε σύγκριση με την απορρόφησή της στο έντερο (Ζέρβας, 2005).

Ο καταβολισμός της γλυκόζης, δηλαδή η ενζυμική αποικοδόμηση της γλυκόζης (γλυκόλυση), είναι μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες του οργανισμού, διότι συνοδεύεται από απελευθέρωση ενέργειας. Το κύτταρο χρησιμοποιεί τη διαδικασία αυτή για παραγωγή ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη), η οποία είναι η πιο σπουδαία ένωση υψηλής ενέργειας γιατί συμμετέχει σε πολλές χημικές αντιδράσεις και αποτελεί πηγή ενέργειας για ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών δραστηριοτήτων.

#### Διάγραμμα 1.4 Μεταβολικό μονοπάτι της γλυκονεογένεσης





Πριν η γλυκερόλη εισαχθεί στο μεταβολικό μονοπάτι της γλυκονεογένεσης, πρέπει να μετατραπεί μέσω κάποιων ενδιάμεσων σταδίων. Υπάρχουν αρκετά ένζυμα τα οποία σχετίζονται με τον μεταβολισμό της γλυκερόλης. Το ένζυμο που έχει μελετηθεί περισσότερο, είναι η γλυκερινική κινάση, η οποία εμπλέκεται ενεργά στον μεταβολισμό της γλυκερόλης, όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 1.4).

#### 1.4.5 Γλυκερινική κινάση

Η γλυκερινική κινάση είναι ένα ένζυμο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των κινασών. Οι κινάσες αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ενζύμων που ανήκουν στις τρανσφεράσες, δηλαδή σε εκείνη την ομάδα ενζύμων που καταλύουν έναν μεγάλο αριθμό αντιδράσεων του ενδιάμεσου μεταβολισμού. Ειδικότερα, οι τρανσφεράσες, είναι εκείνες οι οποίες βοηθούν στο να μεταφερθεί μια χημική ομάδα (π.χ. ακετυλο-, αμινο- και φωσφορική-) από ένα μόριο σε ένα άλλο και είναι απαραίτητη η συμμετοχή ενός συμπαραγόνα μεταφοράς. Παράδειγμα αποτελεί ο σχηματισμός του κιτρικού οξέος από οξαλοξικό οξύ κατά την απελευθέρωση ενέργειας στον οργανισμό, όπου λαμβάνει χώρα προσθήκη μίας ακετυλο-ομάδας παρουσία της συνθετάσης του κιτρικού. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται οι τρανσαλδολάσες και τρανσκετολάσες, ακετυλο-, γλυκόζυλο-, φωσφορυλο-τρανσφεράσες, κινάσες και φωσφομουτάσες (Ζέρβας, 2005).

Οι κινάσες, με τη σειρά τους, είναι υπεύθυνες για την φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων τους, μέσω της μεταφοράς μιας φωσφορικής ομάδας, συνήθως από το ATP. Η μεταφορά αυτή είναι αντιστρεπτή και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των προηγουμένως ανενεργών μεταβολικά ενώσεων, ώστε να μπορούν να υποστούν περαιτέρω μεταβολές.

Οι κινάσες παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες. Για παράδειγμα, η γλυκόζη, προκειμένου να διασπαστεί μέσω της πορείας της γλυκόλυσης και να απελευθερώσει την ενέργειά της, απαιτεί προηγουμένως τη φωσφορυλίωσή της από ειδική κινάση, τη γλυκοκινάση.

Επίσης, μπορούν να μεταφέρουν φώσφορο σε υδροξυλικές, καρβοξυλικές ή ομάδες γουανιδίνης και απαιτούν, ως συνένζυμα, διάφορα παράγωγα της βιταμίνης B<sub>6</sub>.

Κατά την ενζυμολογία, η γλυκερινική κινάση ανήκει στην οικογένεια των τρανσφερασών και είναι το ένζυμο εκείνο που καταλύει την ακόλουθη χημική αντίδραση:



Η γλυκερινική κινάση είναι ένα ένζυμο το οποίο βρίσκεται κυρίως στο ήπαρ, αλλά και στα νεφρά. Άλλοι ιστοί οι οποίοι έχουν δείξει ότι μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη γλυκερόλη είναι τα κύτταρα του μαστού, ο λιπώδης ιστός, τα πνευμονικά κύτταρα, η αορτή, η καρδιά και οι σκελετικοί μύες. Μία διατροφή πλούσια σε γλυκερόλη αυξάνει τη συγκέντρωση του ενζύμου της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ και στα νεφρά. (Shields, 2009).

Όπως αναφέρει και ο Pluske (2007), η γλυκερόλη γενικότερα απορροφάται σε ικανοποιητικό βαθμό από το ζωικό οργανισμό. Όμως, σε υψηλές συγκεντρώσεις ενδέχεται να μην απορροφάται πλήρως και να απομακρύνεται από τον ζωικό οργανισμό μέσω των ούρων στους χοίρους και μέσω των περιττωμάτων στα ορνίθια. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στην έλλειψη παραγωγής του ενζύμου της γλυκερινικής κινάσης, σε ποσότητες ικανές, για να μπορέσει ο οργανισμός να αξιοποιήσει πλήρως όλη την ποσότητα της χορηγούμενης γλυκερόλης από το σιτηρέσιο.

Μελέτη επί της ενεργότητας του ενζύμου της γλυκερινικής κινάσης, στα πνευμονοκύτταρα επίμυων (Fisher και Chander, 1981), έδειξε ότι η ενεργότητα του ενζύμου ακολουθεί μία ανοδική πορεία, ανάλογη με τη συγκέντρωση της γλυκερόλης, μέχρι μίας συγκεκριμένης ποσότητας (1mM γλυκερόλης). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι ο ζωικός οργανισμός πέραν ενός ποσοστού γλυκερόλης, δεν μπορεί να τη μεταβολίσει περαιτέρω, λόγω ανεπάρκειας του ενζύμου.

Οι Westergaard et al. (1998), παρατήρησαν σε in vitro καλλιέργεια ηπατικών κυττάρων επίμυων, ότι καθοριστικός παράγοντας στο μεταβολισμό της γλυκερόλης είναι ουσιαστικά η ίδια η ποσότητα της γλυκερόλης, η οποία καταναλώνεται-εισέρχεται στο κύτταρο, ενώ είναι ανεξάρτητος από τις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων.

Συνεπώς, η αυξημένη χορήγηση γλυκερόλης στα σιτηρέσια των ορνιθίων, πιθανώς να αποδώσει αρνητικά αποτελέσματα, εξαιτίας όχι μόνο της ανεπάρκειας του ενζύμου της γλυκερινικής κινάσης, που είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση της γλυκερόλης, αλλά και της ίδιας της ποσότητας της γλυκερόλης η οποία εισέρχεται στον οργανισμό.

## 2. Σκοπός του πειράματος

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της ακατέργαστης (τύπου 80%) γλυκερόλης στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Η ποσότητα της γλυκερόλης η οποία προστέθηκε στο σιτηρέσιο, έχει αντικαταστήσει τον καρπό αραβοσίτου κατά κύριο λόγο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (7%, 14% και 21%). Τα σιτηρέσια όλων των επεμβάσεων ήταν ισοενεργειακά και ισοαζωτούχα. Η διάρκεια του πειράματος ήταν 6 εβδομάδες, δηλαδή μέχρι το τέλος της πάχυνσης.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκαν η ανάπτυξη των ορνιθίων, η κατανάλωση της τροφής, η κατανάλωση νερού από τα εκτρεφόμενα ορνίθια, ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής καθώς και η θνησιμότητα των ορνιθίων. Επίσης, προσδιορίστηκε η ξηρά ουσία της κόπρου και πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της κατάστασης της στρωμνής. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων στο κρέας των ορνιθίων καθώς και η γονιδιακή έκφραση του ενζύμου της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των πτηνών.

Για τη διεξαγωγή συγκρίσιμων αποτελεσμάτων, εκτράφηκαν ταυτόχρονα με τα ορνίθια, τα οποία κατανάλωσαν σιτηρέσιο με γλυκερόλη, και μία ομάδα ορνιθίων μάρτυρα, τα οποία κατανάλωσαν μόνο το βασικό σιτηρέσιο. Οι συνθήκες εκτροφής ήταν ακριβώς ίδιες σε όλες τις ομάδες των ορνιθίων.

## 3. Πειραματική Διαδικασία

### 3.1 Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1.1 Πειραματικό υλικό

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συνολικά για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 400 αρσενικά ορνίθια κρεοπαραγωγής (υβρίδια Cobb), ηλικίας μίας ημέρας και μέσου σωματικού βάρους 36 gr.

Τα ορνίθια, από την πρώτη ημέρα της εκτροφής, διαχωρίστηκαν σε 4 ομάδες-επεμβάσεις ως εξής:

- ομάδα μάρτυρα (Control, C) : χωρίς καμία προσθήκη στο βασικό σιτηρέσιο
- ομάδα G7: προσθήκη γλυκερόλης σε συγκέντρωση 7%
- ομάδα G14: προσθήκη γλυκερόλης σε συγκέντρωση 14%
- ομάδα G21: προσθήκη γλυκερόλης σε συγκέντρωση 21%

Κάθε μία επέμβαση περιελάμβανε 5 επαναλήψεις, με 20 ορνίθια ανά επανάληψη. Τα ορνίθια όλων των ομάδων στεγάστηκαν στον ίδιο χώρο, και κάτω από τις ίδιες συνθήκες εκτροφής (θερμοκρασία, υγρασία, φωτισμός, αερισμός), τηρώντας όλους τους κανόνες ευζωίας.

Η εκτροφή των ορνιθίων πραγματοποιήθηκε στο δάπεδο, στο οποίο είχε τοποθετηθεί στρωμένη από άχυρο. Τα ορνίθια κάθε επανάληψης εκτράφηκαν σε κλωβό διαστάσεων 2 x 1 m. Σε κάθε κλωβό υπήρχε ταγίστρα και ποτίστρα για την κατά βούληση κατανάλωση τροφής και νερού. Επίσης, πάνω από κάθε κλωβό είχε τοποθετηθεί λαμπτήρας θέρμανσης (θερμομητέρα), κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της εκτροφής. Ακόμη, ο θάλαμος ήταν εξοπλισμένος με λαμπτήρες τεχνητού φωτισμού καθώς και με τεχνητό σύστημα εξαερισμού. Το σύστημα φωτισμού που ακολουθήθηκε ήταν 23 ώρες φως:1 ώρα σκοτάδι και η εκτροφή διήρκησε συνολικά 42 ημέρες.

Σε όλα τα ορνίθια χορηγήθηκε κοινό σιτηρέσιο, ανά ομάδα, όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες (1α, 1β, 1γ), το οποίο καταρτίστηκε σύμφωνα με τις ανάγκες τους

για τις ακόλουθες περιόδους ανάπτυξης:

1. Εναρκτήριο σιτηρέσιο ( 0 - 14 ημέρες )
2. Σιτηρέσιο ανάπτυξης ( 15 - 28 ημέρες )
3. Σιτηρέσιο πάχυνσης ( 29 - 42 ημέρες )

**Πίνακας 3.1. Σύνθεση σιτηρεσίου στις τρεις περιόδους εκτροφής**

**Πίνακας 3.1α** Σύνθεση (%) πειραματικών σιτηρεσίων (α' ηλικίας 0-14 ημ.)

<b>Ζωοτροφή</b>	<b>Control (C)</b>	<b>G7</b>	<b>G14</b>	<b>G21</b>
Καρπός αραβοσίτου	63,20	54,70	46,00	37,00
Σογιάλευρο	32,40	34,20	36,10	38,1
Γλυκερόλη	-	7,00	14,00	21,00
Αλάτι	0,50	0,20	-	-
Λυσίνη	0,20	0,20	0,15	0,10
Μεθειονίνη	0,30	0,30	0,30	0,30
Μαρμαρόσκονη	1,35	1,30	1,30	1,30
ΚΦΔ	1,65	1,70	1,75	1,80
Ισορροπιστής βιταμινών	0,20	0,20	0,20	0,20
Ισορροπιστής ιχνοστοιχείων	0,20	0,20	0,20	0,20

**Πίνακας 3.1β** Σύνθεση(%) Πειραματικών Σιτηρεσίων (β' ηλικίας 15-28 ημ.)

<b>Ζωοτροφή</b>	<b>Control (C)</b>	<b>G7</b>	<b>G14</b>	<b>G21</b>
Καρπός αραβοσίτου	67,30	58,90	50,40	41,50
Σογιάλευρο	28,00	29,80	31,70	33,60
Γλυκερόλη	-	7,00	14,00	21,00
Αλάτι	0,70	0,36	-	-
Λυσίνη	0,25	0,22	0,16	0,10
Μεθειονίνη	0,30	0,30	0,30	0,30
Μαρμαρόσκονη	1,35	1,32	1,30	1,30
ΚΦΔ	1,70	1,70	1,74	1,80
Ισορροπιστής βιταμινών	0,20	0,20	0,20	0,20
Ισορροπιστής ιχνοστοιχείων	0,20	0,20	0,20	0,20

**Πίνακας 3.1γ** Σύνθεση (%) Πειραματικών Σιτηρεσίων (γ' ηλικίας 29-42 ημ.)

<b>Ζωοτροφή</b>	<b>Control (C)</b>	<b>G7</b>	<b>G14</b>	<b>G21</b>
Καρπός αραβοσίτου	70,00	61,60	53,10	44,20
Σογιάλευρο	25,40	27,20	29,00	31,00
Γλυκερόλη	-	7,00	14,00	21,00
Αλάτι	0,70	0,36	-	-
Λυσίνη	0,24	0,20	0,15	0,10
Μεθειονίνη	0,24	0,24	0,25	0,24
Μαρμαρόσκονη	1,32	1,30	1,30	1,26
ΚΦΔ	1,70	1,70	1,80	1,80
Ισορροπιστής βιταμινών	0,20	0,20	0,20	0,20
Ισορροπιστής ιχθυοστοιχείων	0,20	0,20	0,20	0,20

**Πίνακας 3.2** Εκτιμηθείσα χημική σύσταση του βασικού σιτηρεσίου για τις τρεις περιόδους ανάπτυξης ανά επέμβαση

<b>Control</b>			
<b>Χημική σύσταση Kg/σιτηρέσιο</b>	<b>α' ηλικία</b>	<b>β' ηλικία</b>	<b>γ' ηλικία</b>
<b>ME (Mj)</b>	12,11	12,29	12,43
<b>Αζωτούχες ουσίες (gr)</b>	200,00	185,00	175,00
<b>ΟΛ (gr)</b>	30,44	31,15	31,66
<b>Ινώδεις ουσίες (gr)</b>	0,03	0,03	0,03
<b>Λυσίνη (gr)</b>	13,00	12,00	11,00
<b>Μεθειονίνη + κυστίνη (gr)</b>	9,50	9,00	8,00
<b>Ca (gr)</b>	10,00	10,00	10,00
<b>P (gr)</b>	7,62	7,56	7,53
<b>Na (gr)</b>	2,00	2,80	2,80

<b>G7</b>			
<b>Χημική σύσταση Kg/σιτηρέσιο</b>	<b>α' ηλικία</b>	<b>β' ηλικία</b>	<b>γ' ηλικία</b>
<b>ΜΕ (Mj)</b>	12,05	12,23	12,38
<b>Αζωτούχες ουσίες (gr)</b>	200,00	185,00	175,00
<b>ΟΛ (gr)</b>	27,57	28,28	28,81
<b>Ινώδεις ουσίες (gr)</b>	0,03	0,03	0,03
<b>Λυσίνη (gr)</b>	13,00	12,00	11,00
<b>Μεθειονίνη + κυστίνη (gr)</b>	9,50	9,00	8,00
<b>Ca (gr)</b>	10,00	10,00	10,00
<b>P (gr)</b>	7,46	7,39	7,36
<b>Na (gr)</b>	2,00	2,80	2,80

<b>G14</b>			
<b>Χημική σύσταση Kg/σιτηρέσιο</b>	<b>α' ηλικία</b>	<b>β' ηλικία</b>	<b>γ' ηλικία</b>
<b>ΜΕ (Mj)</b>	11,96	12,17	12,32
<b>Αζωτούχες ουσίες (gr)</b>	200,00	185,00	175,00
<b>ΟΛ (gr)</b>	24,62	25,42	25,32
<b>Ινώδεις ουσίες (gr)</b>	0,03	0,03	0,03
<b>Λυσίνη (gr)</b>	13,00	12,00	11,00
<b>Μεθειονίνη + κυστίνη (gr)</b>	9,50	9,00	8,00
<b>Ca (gr)</b>	10,00	10,00	10,00
<b>P (gr)</b>	7,29	7,23	7,20
<b>Na (gr)</b>	2,80	2,80	2,80



<b>G21</b>			
<b>Χημική σύσταση Kg/σιτηρέσιο</b>	<b>α' ηλικία</b>	<b>β' ηλικία</b>	<b>γ' ηλικία</b>
<b>ME (Mj)</b>	11,84	12,05	12,20
<b>Αζωτούχες ουσίες (gr)</b>	200,00	185,00	175,00
<b>ΟΛ (gr)</b>	21,60	22,40	22,93
<b>Ινώδεις ουσίες (gr)</b>	0,03	0,03	0,03
<b>Λυσίνη (gr)</b>	13,00	12,00	11,00
<b>Μεθειονίνη + κυστίνη (gr)</b>	9,50	9,00	8,00
<b>Ca (gr)</b>	10,00	10,00	10,00
<b>P (gr)</b>	7,12	7,06	7,03
<b>Na (gr)</b>	4,20	4,20	4,20

### **3.1.2 Προσδιορισμός των ζωοτεχνικών παραμέτρων**

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, σε εβδομαδιαία βάση, γίνονταν οι ακόλουθοι χειρισμοί:

1. καταγραφή του σωματικού βάρους
2. καταγραφή και υπολογισμός της κατανάλωσης τροφής και νερού
3. υπολογισμός της αύξησης του σωματικού βάρους
4. υπολογισμός του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής
5. καταγραφή θνησιμότητας ορνιθίων

### **3.1.3 Προσδιορισμός της υγρασίας των περιττωμάτων των ορνιθίων**

Η λήψη των περιττωμάτων πραγματοποιήθηκε απευθείας από τη στρωμνή κάθε ομάδας, σε εβδομαδιαία βάση, ξεκινώντας από την έβδομη ημέρα της εκτροφής. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούταν στους -20° C, μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Για τον προσδιορισμό της υγρασίας, χρησιμοποιήθηκε ζυγός ακριβείας τέταρτου δεκαδικού ψηφίου.

### 3.1.4 Αξιολόγηση της στρωμνής

Ταυτόχρονα με τη συλλογή των περιπτωμάτων, πραγματοποιήθηκε και αξιολόγηση της στρωμνής της εκτροφής. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα για να διερευνηθεί η ποιοτική κατάσταση της στρωμνής με την πάροδο του χρόνου. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε από το ίδιο άτομο καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, για να μπορέσουν να υπάρξουν συγκρίσιμα αποτελέσματα. Αξιολογήθηκαν όλες οι επαναλήψεις των επεμβάσεων, κάθε φορά, σε συγκεκριμένα κυρίως σημεία του χώρου του κλωβού. Αυτές οι περιοχές ήταν γύρω από την ποτίστρα και τη ταγίστρα, αλλά λήφθηκε και μια γενικότερη παρατήρηση του χώρου, για να οριστεί το τελικό αποτέλεσμα. Μετά την αξιολόγηση, νέα στρωμνή τοποθετούνταν για την εκτίμηση της επόμενης εβδομάδας.

Η κατάσταση της στρωμνής αξιολογήθηκε βάση υποκειμενικής κλίμακας, διαβαθμισμένης από το 1 έως το 4. Ως 1 ορίστηκε τη στρωμνή η οποία ήταν στεγνή και σε πολύ καλή κατάσταση, ενώ ως 4 η πλήρως βρεγμένη και σε χειρίστη κατάσταση στρωμνή, με ενδιάμεσες διαβαθμίσεις (Murakami et al, 2000), όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα 3.3.

**Πίνακας 3.3** Αξιολόγηση της υδαρότητας της στρωμνής

<b>Αξιολόγηση στρωμνής</b>	<b>Κατάσταση στρωμνής</b>
<b>1</b>	Στεγνή, καλή κατάσταση
<b>2</b>	Αποδεκτή, καλή κατάσταση
<b>3</b>	Ελαφρώς υδαρής
<b>4</b>	Πλήρως βρεγμένη

Προκειμένου να αποφευχθεί η εσφαλμένη εκτίμηση της κατάστασης της στρωμνής, μετά από κάθε προσδιορισμό (ανά εβδομάδα), η στρωμνή απομακρυνόταν και τοποθετούταν νέα, καθαρή στρωμνή.

### **3.1.5 Προσδιορισμός της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ**

#### **3.1.5.1 Συλλογή ήπατος από τα ορνίθια**

Την τελευταία μέρα της εκτροφής, δηλαδή την 42<sup>η</sup> ημέρα, πραγματοποιήθηκε σφαγή 40 ορνιθίων (10 ορνίθια ανά ομάδα), από τα οποία λήφθηκε ολόκληρο το ήπαρ. Ο ιστός καταψύχθηκε άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκε στους -80° C.

#### **3.1.5.2 Μοριακές αναλύσεις στο ήπαρ**

##### **3.1.5.2.1 Απομόνωση ολικού RNA**

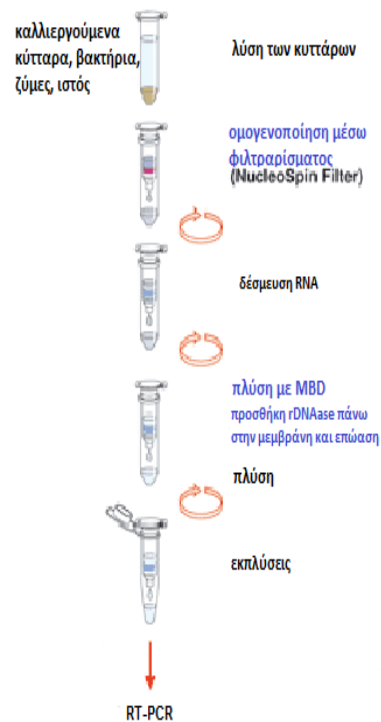
Η απομόνωση του ολικού RNA από το ήπαρ των ορνιθίων κρεοπαραγωγής πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel-10/2007/Rev. 08), MACHEREY-NAGEL GmbH&Co. KG, Germany (εικόνα 2).

Η διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA περιελάμβανε τα εξής στάδια:

1. Προσθήκη 350 μl διαλύματος RA1 και 3,5 μl β-μερκαπτοαιθανόλης (διάλυμα λύσης των κυτταρικών μεμβρανών) σε σωλήνα τύπου Eppendorf.
2. Ομογενοποίηση μέρους ιστού του ήπατος (~50 mg) με τη χρήση γουδιού, αφού το δείγμα είχε μόλις ψυχθεί με υγρό άζωτο. Σε όλη τη διάρκεια της ομογενοποίησης ο ιστός είχε θερμοκρασία υπό των 0°C.
3. Προσθήκη ~30 mg του ομογενοποιημένου ιστού σε σωλήνα τύπου Eppendorf και ανάμειξη σε αυτόματο αναδευτήρα (vortex) μέχρι πλήρους ομογενοποίησης του δείγματος.
4. Μεταφορά του μίγματος σε σωλήνα τύπου Eppendorf εφοδιασμένου με ειδικό φίλτρο και δοχείο συλλογής (Collection tube).
5. Φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1min.

6. Απόρριψη του φίλτρου και προσθήκη 350 μl αιθανόλης 70% στο δοχείο συλλογής και ανάμειξη μέχρι διάλυσης του ιζήματος.
7. Μεταφορά του διαλύματος σε νέο σωλήνα συλλογής και φυγοκέντρωση στα 11.000 g για 30 sec. Πλέον το ολικό RNA δεσμεύεται στη μεμβράνη του φίλτρου του σωλήνα συλλογής.
8. Προσθήκη 350 μl διαλύματος MBD.
9. Φυγοκέντρωση στα 11.000 g για 1min.
10. Προσθήκη 95 μl διαλύματος δεσοξυριβονουκλεάσης (DNase) και απαλή ανάμειξη.
11. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
12. 1<sup>η</sup> πλύση: προσθήκη 200 μl διαλύματος RA2 και φυγοκέντρωση στα 11.000 g για 30 sec και απόρριψη του διαλύματος από το σωλήνα συλλογής.
13. 2<sup>η</sup> πλύση: προσθήκη 600 μl διαλύματος RA3 και φυγοκέντρωση στα 11.000 g για 30 sec.
14. 3<sup>η</sup> πλύση: προσθήκη 250 μl διαλύματος RA3 και φυγοκέντρωση στα 11.000 g για 2 min.
15. Τοποθέτηση του φίλτρου με το ολικό RNA σε νέο ανοιχτό σωλήνα τύπου Eppendorf.
16. Προσθήκη 40 μl υπερκάθαρου, ελεύθερου ριβονουκλεάσης ύδατος (RNase-free water) και φυγοκέντρωση στα 11.000 g για 1min (2 φορές)
17. Παραλαβή διαλύματος και διατήρηση δείγματος στους -80°C.

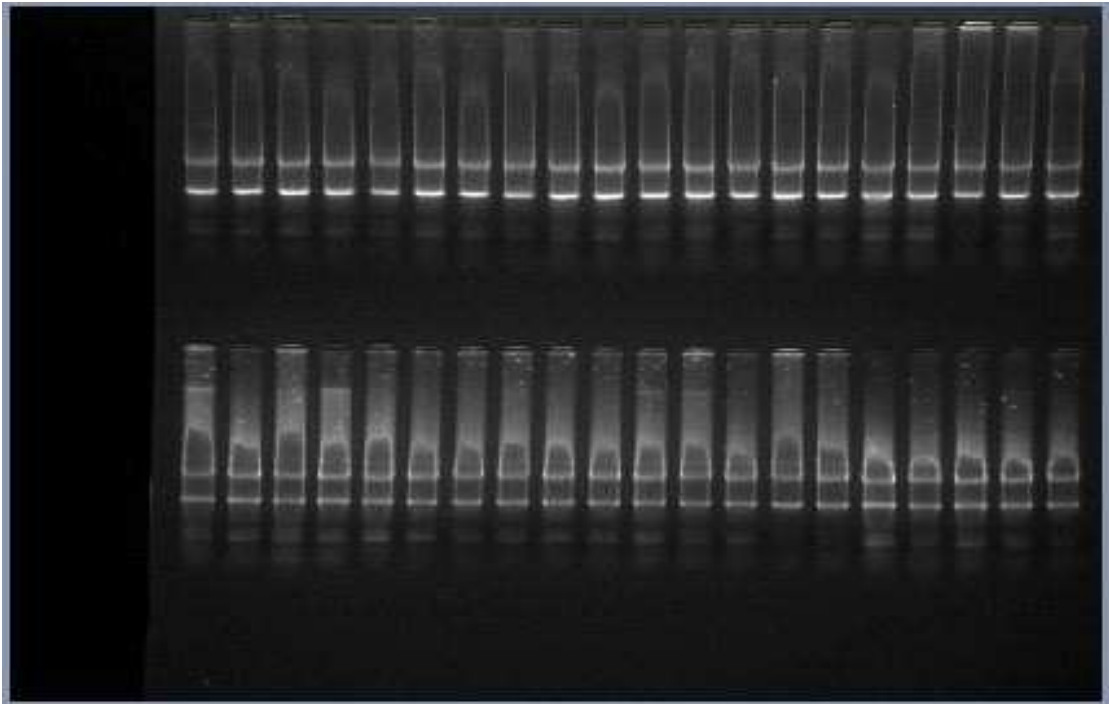
**Εικόνα 2.** Περιληπτικό πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από το ήπαρ



### 3.1.5.2.2 Ποιοτικός έλεγχος RNA

Ο ποιοτικός έλεγχος του RNA πραγματοποιήθηκε με ανάλυση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης και συνίσταται στην απουσία προσμίξεων, φαινόλης ή DNA, καθώς και στην ακεραιότητα του RNA που απομονώθηκε. Η διάκριση χαρακτηριστικής ζώνης, που αντιστοιχεί στη ριβοσωμική υπομονάδα 18S, η απουσία συσσωρευμένου προϊόντος κοντά στην οπή φόρτωσης που θα υποδήλωνε προσμίξεις με γονιδιωματικό DNA, όπως και η απουσία αλλείματος (smear) από το πήκτωμα της αγαρόζης, υποδηλώνουν ότι το απομονωμένο RNA είναι ικανοποιητικής ποιότητας (εικόνα 3).

**Εικόνα 3.** Πήκτωμα (gel) αγαρόζης, με ολικό RNA από το ήπαρ των ορνιθίων μετά από κατάλληλη χρώση με χρωστική GelRed.



### 3.1.5.2.3 Ποσοτικός έλεγχος RNA

Ο ποσοτικός έλεγχος του RNA πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτομέτρηση σε απορρόφηση στα 260nm και 280nm και ο λόγος τους ήταν  $\approx 1.8$ , γεγονός που υποδηλώνει καλής ποιότητας RNA. Χαμηλότερη αναλογία υποδεικνύει επιμόλυνση με πρωτεΐνες. Για κάθε δείγμα έγινε αραίωση 1:200, δηλαδή 5μl ολικό RNA σε 995μl H<sub>2</sub>O σε 1.5ml σωλήνα τύπου Eppendorf. Η ποσοτικοποίηση του RNA έγινε σύμφωνα με τον τύπο  $(A_{260nm}) \cdot (40ng/ml) \cdot (200) =$  συγκέντρωση RNA(μg/μl), όπου ο αριθμός 200 ο δείκτης αραίωσης.

### 3.1.5.3 Αντίστροφη μεταγραφή – Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

Η RT-PCR είναι μία διαδικασία δύο σταδίων, όπου πραγματοποιείται αρχικά μεταγραφή των μορίων RNA, σε μονόκλιωνα μόρια DNA (cDNA) και στη

συνέχεια ακολουθεί ενίσχυση των συντιθέμενων μορίων cDNA, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Η τεχνική της RT-PCR έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα αξιόπιστη για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης.

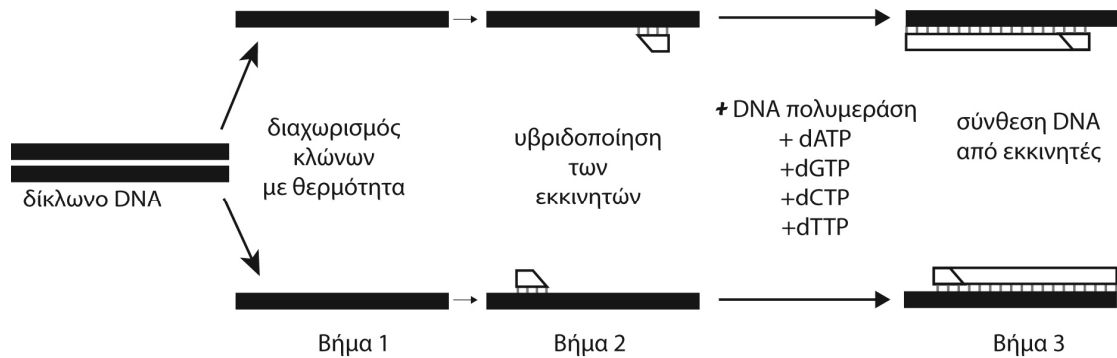
Έτσι σχηματίζονται δυο καινούργιες αλυσίδες ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δυο κλώνων του πρότυπου DNA και το DNA στόχος έχει κατ' αυτόν τον τρόπο διπλασιαστεί. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωσης (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (annealing) και επέκτασης των εκκινητών με την σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension), αποτελούν έναν κύκλο της αντίδρασης PCR. Ο επόμενος κύκλος ξεκινά πάλι από το στάδιο 1 όπου γίνεται μετουσίωση των σχηματιζόμενων μορίων DNA (Εικόνα 4).

Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τα εξής στάδια:

- Αρχικά το DNA-στόχος μετουσιώνεται, με θέρμανση στους 95°C, για 15 sec - 2 min. Στο στάδιο αυτό οι δύο κλώνοι του DNA αποχωρίζονται ο ένας από τον άλλον.
- Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 40-60° C για 30-60 sec. Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές προσδένονται με τους κλώνους του DNA στόχου.
- Τέλος, ξεκινά η σύνθεση του νέου κλώνου του DNA, με την προσθήκη νουκλεοτιδίων, από το ένζυμο DNA πολυμεράση, στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επεκτείνεται. Η διαδικασία της επιμήκυνσης διαρκεί 1-2 min και πραγματοποιείται στους 74° C.

Έτσι σχηματίζονται δυο καινούργιες αλυσίδες ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δυο κλώνων του πρότυπου DNA και το DNA στόχος έχει κατ' αυτόν τον τρόπο διπλασιαστεί. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωσης (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (annealing) και επέκτασης των εκκινητών με την σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension), αποτελούν έναν κύκλο της αντίδρασης PCR. Ο επόμενος κύκλος ξεκινά πάλι από το στάδιο 1 όπου γίνεται μετουσίωση των σχηματιζόμενων μορίων DNA (Εικόνα 4).

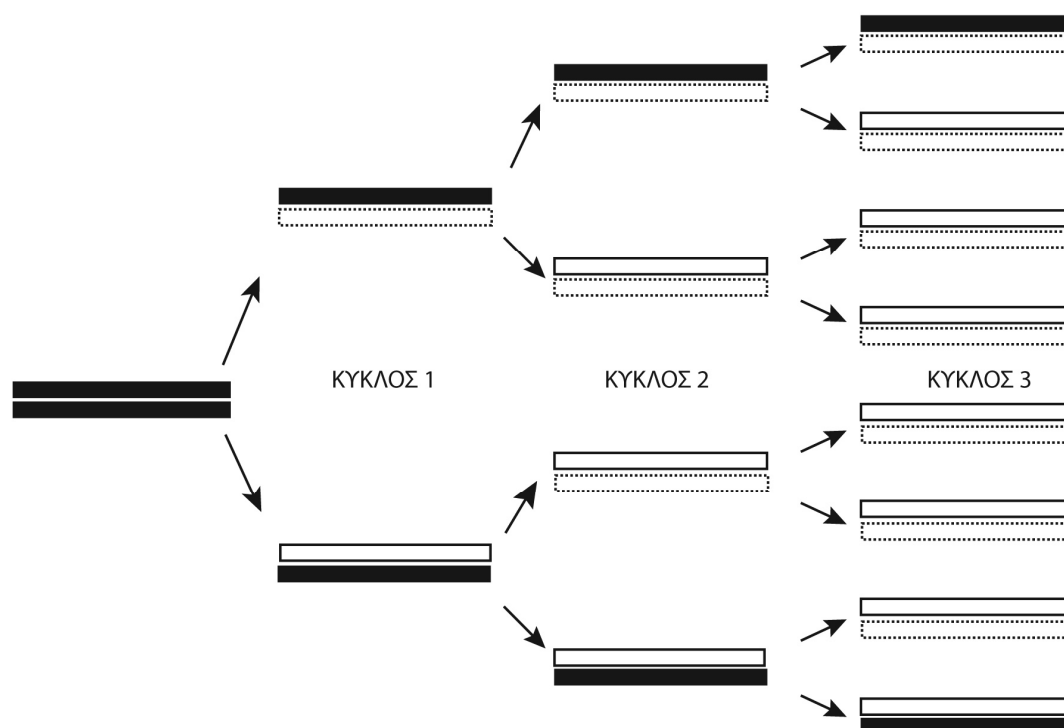
**Εικόνα 4.** Στάδια που ακολουθούνται κατά τη διάρκεια ενός κύκλου αντίδρασης PCR. Στάδιο I: μετουσίωση δίκλωνου DNA. Στάδιο II: Δέσμευση των εκκινητών στους κλώνους του DNA. Στάδιο III: Επιμήκυνση της αλυσίδας κατόπιν προσθήκης βάσεων με την επίδραση της DNA-πολυμεράσης (Πατεράκη Ε., 2006).



Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA στόχου είναι πλέον τέσσερις και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο 2<sup>ο</sup> κύκλο. Στο τέλος του 2<sup>ου</sup> κύκλου οι κλώνοι θα είναι οκτώ και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός ανατύπων του στόχου DNA, επειδή οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός του DNA στόχου, 2<sup>n</sup> όπου n ο αριθμός των κύκλων (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5.** Πολλαπλασιασμός τμημάτων DNA σε PCR αντίδραση. Μετά το τέλος του 1<sup>ου</sup> κύκλου το δίκλωνο DNA έχει διπλασιαστεί, μετά το τέλος του 2<sup>ου</sup> κύκλου έχει τετραπλασιαστεί, μετά το τέλος του 3<sup>ου</sup> κύκλου έχει οκταπλασιαστεί, ακολουθώντας εκθετική αύξηση της μορφής  $2^n$ , όπου n ο αριθμός των κύκλων (Πατεράκη Ε., 2006).



#### 3.1.5.4 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής του RNA σε cDNA ήταν οι ακόλουθες: ρυθμιστικό διάλυμα AMV 10X Reaction buffer (2,5 μl), dNTPs (2,5 μl), τυχαίοι εκκινητές (3 μl), αντίστροφη μεταγραφάση AMV (2 μl) και 2 μg δείγματος RNA ανά δείγμα. Τέλος προστέθηκε νερό απαλλαγμένο από RNA, μέχρι τελικού όγκου 15 μl.

Το πρώτο βήμα της όλης διαδικασίας ήταν η θέρμανση στους 70° C για 10 min του ολικού RNA και των τυχαίων εκκινητών, σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο 20

λίτρων, της εταιρίας GFL (Germany). Ακολούθησε άμεση ψύξη σε πάγο και ελαφρά φυγοκέντρωση. Στη συνέχεια, προστέθηκαν και τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και φυγοκεντρήθηκαν ελαφρώς. Η τελική αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 μl, στον θερμικό κυκλοποιητή της BIO LINE, σε θερμοκρασία 42° C, για 60 min. Μετά την πάροδο των 60 min, τα δείγματα υπέστησαν άμεση ψύξη και ελαφρά φυγοκέντρωση και αποθηκεύτηκαν στους -20° C.

### 3.1.5.5 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Τα αντιδραστήρια για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν στις εξής συγκεντρώσεις: 39.5 μl H<sub>2</sub>O, 1 μl από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο, 0.5 μl EXT DNA πολυμεράση, 5 μl 10XPCR buffer MgCl<sub>2</sub> (15mM) και 1 μl από κάθε εκκινητή γονιδίου στόχου (gallus-GK-1F975 και gallus-GK-3R1029). Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε και ο συνδυασμός θερμοκρασίας- χρόνου που εφαρμόστηκε για την ενίσχυση του γονιδίου της γλυκερινικής κινάσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.4). Το ενδογενές γονίδιο σταθερής έκφρασης 18S rRNA χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας. Σε κάθε σειρά δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς cDNA για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων. Στον πίνακα 3.4 δίνονται η αλληλουχία των εκκινητών και το αναμενόμενο μέγεθος τους.

**Πίνακας 3.4** Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου της γλυκερινικής κινάσης.

<b>Αρχική αποδιάταξη cDNA</b>	95° C για 1 min	1 κύκλος
<b>Αποδιάταξη cDNA</b>	95° C για 30 sec	43 κύκλοι
<b>Υβριδίαση εκκινητών</b>	52° C για 60 sec	
<b>Επιμήκυνση</b>	72° C για 30 sec	
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72° C για 10 min	1 κύκλος
<b>Hold</b>	4° C	

**Πίνακας 3.5** Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου 18S rRNA.

<b>Αρχική αποδιάταξη cDNA</b>	95° C για 1 min	<b>1 κύκλος</b>
<b>Αποδιάταξη cDNA</b>	95° C για 30 sec	<b>35 κύκλοι</b>
<b>Υβριδίσωση εκκινητών</b>	52° C για 60 sec	
<b>Επιμήκυνση</b>	72° C για 30 sec	
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72° C για 10 min	<b>1 κύκλος</b>
<b>Hold</b>	4° C	

**Πίνακας 3.6** Αλληλουχία των εκκινητών και μέγεθος των προϊόντων PCR

<b>Γονίδιο</b>	<b>Εκκινητές</b>	<b>Μέγεθος (bp)</b>	<b>Κωδικός (Batch#)</b>
<b>GK_1F975</b>	5'-TGGCTGAGGGACAATCTAGG-3'	154	XM_416788.2
<b>GK_3R1029</b>	5'-GCTTCACTACTGGAATACAGAG-3'		
<b>c18Sf</b>	5'-CGATGCTCTTAACTGAGTGT-3'	442	AF173612
<b>c18Sr</b>	5'-CAGCTTTGCAACCATACTC-3'		

### 3.1.5.6 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων της PCR

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι ασθενώς αρνητικά φορτισμένα, λόγω ιονισμού των φωσφορικών τους ομάδων. Αν αρνητικά φορτισμένα μόρια τεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο (ηλεκτροφόρηση) σ' ένα πήκτωμα αγαρόζης (φυσικός πολυσακχαρίτης), τότε τα μακρομόρια κινούνται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του

μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πυκνώματος καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση πεδίου (volts/cm πηκτώματος) ρυθμίζονται με βάση τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν.

Ο έλεγχος των προϊόντων της PCR στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε 1.5% πήκτωμα αγαρόζης, για τη διαπίστωση του επιτυχούς πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας στόχου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR είναι η εξής:

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστέθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Η τήξη της αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με θέρμανση μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων, ισχύος 900 Watt.
- Στο διάλυμα αγαρόζης προστέθηκε χρωστική Gel Red 10.000x σε νερό της Biotium.
- Τοποθετήθηκε η κατάλληλη χτένα για το σχηματισμό των οπών φόρτωσης.
- Το διάλυμα της αγαρόζης προστέθηκε στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης, ώστε να σχηματισθεί το πήκτωμα
- Όταν το πήκτωμα σταθεροποιήθηκε, βυθίστηκε σε διάλυμα TAE και αφαιρέθηκε η χτένα.
- Σε κάθε οπή τοποθετήθηκε ποσότητα δείγματος (15  $\mu$ l), που είχε αναμειχθεί με διάλυμα χρωστικής Gel Loading Dye Blue (6X) της BioLabs και γλυκερόλης (3  $\mu$ l) για την καταβύθισή του.
- Συνδέθηκαν τα ηλεκτρόδια στους υποδοχείς της συσκευής και ρυθμίστηκε η τάση στα 100 V για 70 min.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) της BioRad, ώστε να μπορούν να διακριθούν και να φωτογραφηθούν οι ζώνες των τμημάτων που διαχωρίστηκαν. Με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού της BioRad έγινε η ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών που διαχωρίστηκαν.

### 3.1.6 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στο στήθος

#### 3.1.6.1 Απομόνωση μεθυλεστέρων

Τα δείγματα του στήθους των ορνιθίων, λήφθηκαν κατά τη διαδικασία της σφαγής των ορνιθίων, κατά τη λήξη των 42 ημερών εκτροφής. Αμέσως μετά την αφαίρεση του στήθους από το υπόλοιπο σφάγιο, αποθηκεύτηκε και διατηρήθηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Στις συνθήκες αυτές παρέμεινε μέχρι την ανάλυση των λιπαρών οξέων.

Η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την απομόνωση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων από το στήθος των ορνιθίων ήταν η εξής:

- Αφαίρεση κάθε εξωτερικού ορατού λίπους και συνδετικού ιστού από το δείγμα του μύος (στήθος ορνιθίου).
- Ομογενοποίηση του δείγματος με τη χρήση συσκευής blender, ως ότου γίνει μία ομοιόμορφη πάστα.
- Τοποθέτηση 1 gr (με μία επανάληψη) από τον ομογενοποιημένο ιστό σε δοκιμαστικό σωλήνα και προσθέτουμε 24N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- Επώαση σε υδατόλουτρο για 1,5 ώρα, στους  $55^{\circ}\text{C}$ .
- Ανά 15 min ανάδευση του σωλήνα, για την προώθηση της λύσης του ιστού.
- Στη συνέχεια, προσθήκη στο δοκιμαστικό σωλήνα 3 ml εξανίου.
- Ανάμιξη με τη βοήθεια vortex και φυγοκέντρηση για 10 min.
- Το υπερκείμενο στρώμα μετά τη φυγοκέντρηση, περιείχε τους εστέρες των λιπαρών οξέων. Με τη χρήση πιπέτας τύπου Paster, απομονώθηκε αυτή η στοιβάδα σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Εξάτμιση κάτω από άζωτο, στους  $55^{\circ}\text{C}$ .
- Οι μεθυλεστέρες, αραιώθηκαν για δεύτερη φορά με προσθήκη 0,5 ml εξανίου και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια του αέριου χρωματογράφου.
- Αποθήκευση στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

(Papadomichelakis et al., 2010)

### 3.1.6.2 Προσδιορισμός μεθυλεστέρων στον αέριο χρωματογράφο (GC)

Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων αναλύθηκαν με τη βοήθεια αέριου χρωματογράφου (Perkin Elmer Autosystem XL), ο οποίος ήταν εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη, HP-88, διαστάσεων 60 x 0.25mm x 0.20 μm (Agilent Technologies, J&W GC columns) και ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID). Επίσης, ο αέριος χρωματογράφος είχε δυνατότητα προγραμματισμού της κατάλληλης θερμοκρασίας για την καύση των λιπαρών οξέων.

Οι θερμοκρασίες που επικρατούν στον φούρνο είναι οι εξής:

- 140°C για 1 min,
- αύξηση θερμοκρασίας ανά 4°C το λεπτό, μέχρι να φτάσει στους 230°C και
- τέλος, αύξηση της θερμοκρασία ανά με 4°C το λεπτό μέχρι να φτάσει στους 240°C, όπου κρατείται σε αυτή τη θερμοκρασία για 10 min.

Το ήλιο ήταν το αέριο μεταφορέας σε σταθερή πίεση 18psi και η θερμοκρασία των δύο injector FID ήταν οι 250°C.

Τα λιπαρά οξέα ταυτοποιήθηκαν σε σύγκριση με βάση πρότυπο διάλυμα λιπαρών οξέων της Sigma-Aldrich Co, USA (FAME 37 Component, Supelco). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το εσωτερικό πρότυπο, το οποίο είχε προστεθεί πριν την υδρόλυση. Το συνολικό βάρος των λιπαρών οξέων (mg/100g μυϊκού ιστού) υπολογίστηκε ως το άθροισμα των περιοχών για όλες τις κορυφές των λιπαρών οξέων και στη συνέχεια συγκρίνονταν με μία περιοχή 0,5 mg του εσωτερικού στάνταρ, η οποία χρησιμοποιείται για να περιγράψει τα συνολικά λιπίδια, μέσω μίας μεθόδου ακριβείας (O'Fallon et al., 2007). Κάθε ένα λιπαρό οξύ εκφράστηκε επί τις % του συνολικού βάρους των λιπαρών οξέων.

### 3.2 Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα των αναλύσεων επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (17.0). Η κατανάλωση τροφής και νερού, η αύξηση του σωματικού βάρους, η υγρασία των περιττωμάτων και η κατάσταση της στρωμνής αναλύθηκαν σύμφωνα με ένα γενικό γραμμικό πρότυπο (GLM-General Linear Model) για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (Repeated Measures Analysis of Variance), χρησιμοποιώντας την επέμβαση σαν ανεξάρτητη μεταβλητή. Η θνησιμότητα αναλύθηκε με λογιστική παλινδρόμηση, ενώ η σύσταση του ενδομυϊκού λίπους σε λιπαρά οξέα με ανάλυση διασποράς, χρησιμοποιώντας το συνολικό βάρος των λιπαρών οξέων (mg/100 g μυϊκού ιστού) σαν συμμεταβλητή. Επιπλέον εξετάστηκε η γραμμικότητα της επίδρασης του επιπέδου γλυκερόλης στα σιτηρέσια σε όλες τις παραμέτρους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων (least squares means), εκτός εάν δηλώνεται διαφορετικά.

### 3.3 Αποτελέσματα

#### 3.3.1 Ζωοτεχνικά στοιχεία της εκτροφής

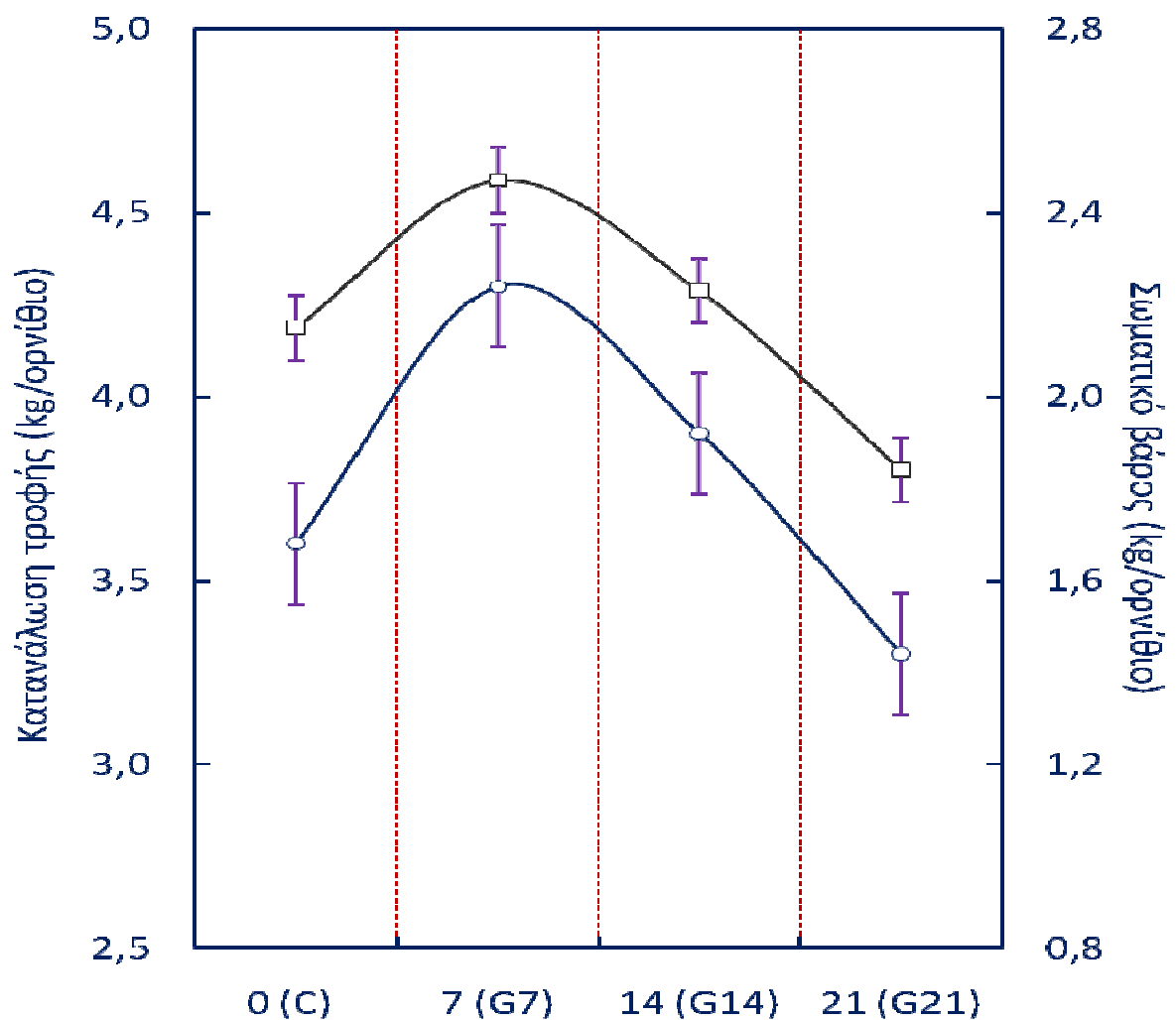
Οι ζωοτεχνικοί παράμετροι οι οποίες μετρήθηκαν ήταν το ζων βάρος των ορνιθίων, η κατανάλωση της τροφής και του νερού, καθώς και ο συντελεστής εκμετάλλευσης του σιτηρεσίου από τα ορνίθια, στις τρεις φάσεις ανάπτυξης. Επίσης, μετρήθηκε και η θνησιμότητα των ορνιθίων σε όλη την περίοδο του πειράματος. Στη συνέχεια, παρατίθενται τα πρωτογενή αποτελέσματα για την κάθε παράμετρο, μέσω παρουσίασης πινάκων, αλλά και διαγραμμάτων, στα οποία απεικονίζεται η μεταβολή της κάθε παραμέτρου ανά επέμβαση και ανά περίοδο ανάπτυξης. (πίνακας 3.7 και 3.8).

**Πίνακας 3.7** Μέσοι όροι κατανάλωσης τροφής και νερού (ΚΤ, ΚΝ: kg/ορνίθιο), αύξησης σωματικού βάρους (ΑΣΒ: kg/ορνίθιο) και συντελεστή εκμετάλλευσης τροφής (ΣΕΤ) ανά επέμβαση και ανά φάση ανάπτυξης.

Φάση	Παράμετρος	Επέμβαση				SEM	P.
		C	G <sub>7</sub>	G <sub>14</sub>	G <sub>21</sub>		
1 <sup>η</sup> 0-14 ημ.	ΚΤ	0,51 <sup>a</sup>	0,58 <sup>ab</sup>	0,51 <sup>ab</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,023	**
	ΚΝ	1,29 <sup>a</sup>	1,61 <sup>b</sup>	1,94 <sup>c</sup>	2,41 <sup>d</sup>	0,920	***
	ΑΣΒ	0,41 <sup>a</sup>	0,45 <sup>b</sup>	0,38 <sup>c</sup>	0,34 <sup>d</sup>	0,011	***
	ΣΕΤ	1,26	1,29	1,33	1,36	0,052	NS
2 <sup>η</sup> 15-28 ημ.	ΚΤ	1,21 <sup>ab</sup>	1,42 <sup>b</sup>	1,38 <sup>b</sup>	1,07 <sup>a</sup>	0,090	**
	ΚΝ	4,06 <sup>a</sup>	4,36 <sup>a</sup>	6,03 <sup>b</sup>	6,83 <sup>c</sup>	0,215	***
	ΑΣΒ	0,87 <sup>a</sup>	0,90 <sup>a</sup>	0,81 <sup>a</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,042	***
	ΣΕΤ	1,38	1,57	1,73	1,68	0,149	NS
3 <sup>η</sup> 29-42 ημ.	ΚΤ	1,89 <sup>ab</sup>	2,28 <sup>b</sup>	2,01 <sup>ab</sup>	1,80 <sup>a</sup>	0,137	*
	ΚΝ	5,91 <sup>a</sup>	7,10 <sup>b</sup>	8,11 <sup>c</sup>	9,09 <sup>c</sup>	0,465	***
	ΑΣΒ	0,86 <sup>a</sup>	1,12 <sup>b</sup>	1,04 <sup>b</sup>	0,87 <sup>a</sup>	0,076	**
	ΣΕΤ	2,19	2,04	1,99	2,09	0,176	NS
Συνολικά 0-42 ημ.	ΚΤ	3,60 <sup>ac</sup>	4,28 <sup>b</sup>	3,91 <sup>ab</sup>	3,33 <sup>c</sup>	0,165	***
	ΚΝ	11,26 <sup>a</sup>	13,07 <sup>b</sup>	16,08 <sup>c</sup>	18,34 <sup>d</sup>	0,591	***
	ΑΣΒ	2,15 <sup>a</sup>	2,47 <sup>b</sup>	2,23 <sup>a</sup>	1,84 <sup>c</sup>	0,071	***
	ΣΕΤ	1,68 <sup>a</sup>	1,73 <sup>ab</sup>	1,75 <sup>ab</sup>	1,81 <sup>b</sup>	0,054	NS



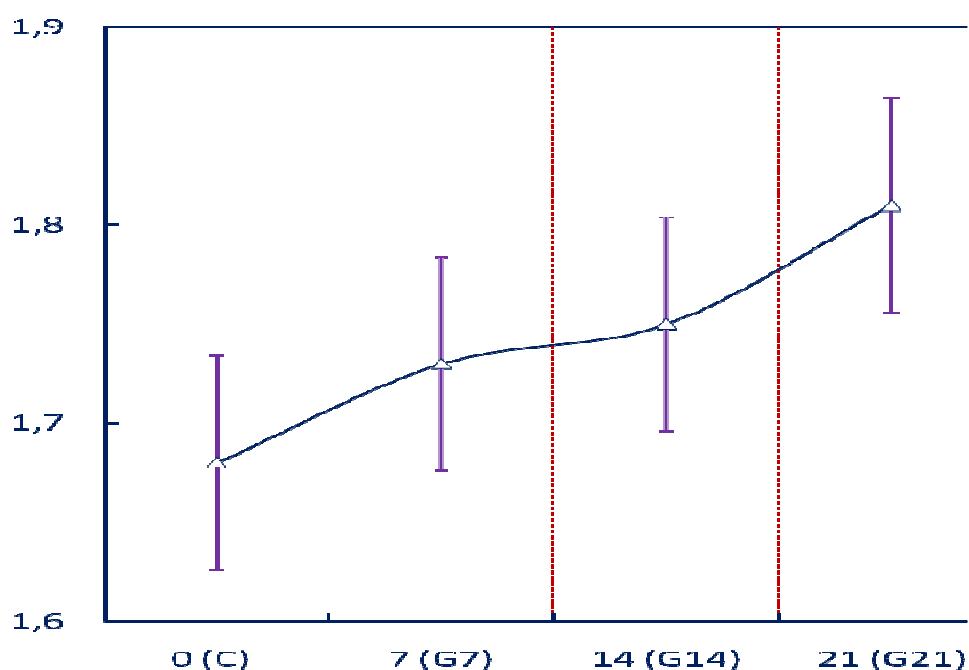
Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τον πίνακα 3.7, αλλά με μεγαλύτερη ευκολία από το διάγραμμα 3.1, η κατανάλωση της τροφής από τα ορνίθια της ομάδας G21 ήταν μικρότερη συγκριτικά με όλες τις επεμβάσεις, ενώ δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά με την ομάδα του μάρτυρα. Αντίθετα, τα ορνίθια της επέμβασης G7 κατανάλωσαν την περισσότερη τροφή χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά με την επέμβαση G14.



**Διάγραμμα 3.1** Κατανάλωση τροφής και αύξηση σωματικού βάρους ορνιθίων στο τέλος της πειραματικής περιόδου

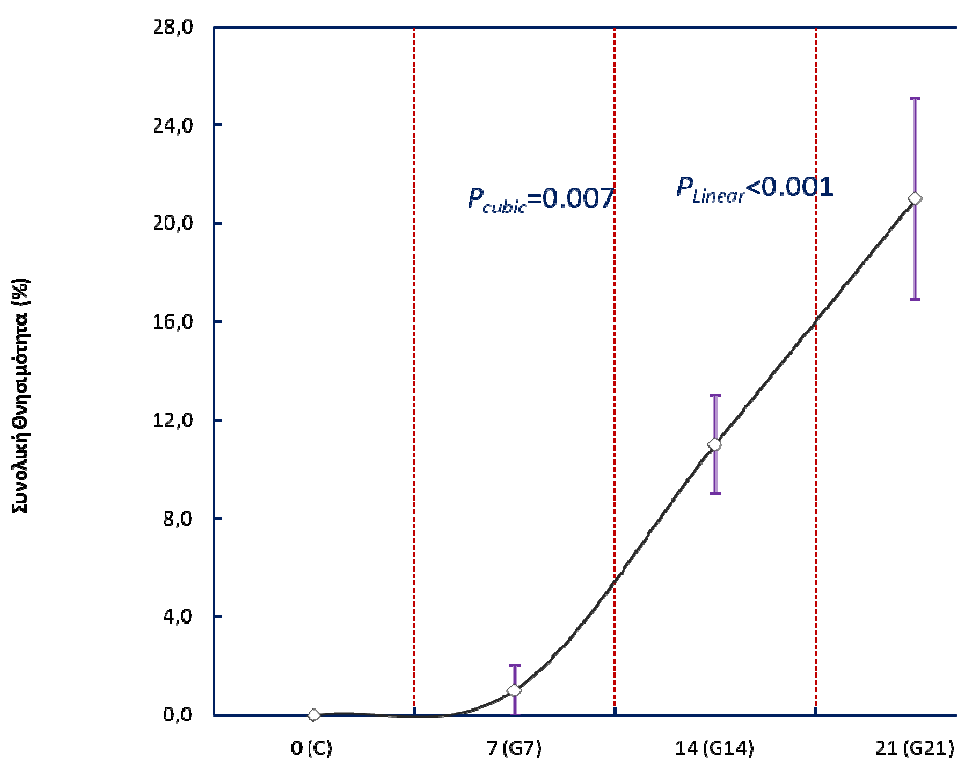
Όσον αφορά στην αύξηση του σωματικού βάρους η επέμβαση G7 έχει την μεγαλύτερη ανάπτυξη, ενώ αντιθέτως η επέμβαση G21 έχει την μικρότερη ανάπτυξη. Οι επεμβάσεις του μάρτυρα και η επέμβαση G14 δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους και κατέλαβαν τιμές μεταξύ των υπολοίπων επεμβάσεων.

Ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής υπολογίζεται από τη διαίρεση της τροφής η οποία καταναλώθηκε από τα ορνίθια με την ποσότητα του προϊόντος που παρήχθη, όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση αντιστοιχεί στην αύξηση του ζώντος βάρους των ορνιθίων. Όπως προκύπτει και από το παρακάτω διάγραμμα (3.2) η επέμβαση C έχει τον καλύτερο συντελεστή εκμετάλλευσης του σιτηρεσίου, ενώ η επέμβαση G21 τον χειρότερο. Όσον αφορά στις επεμβάσεις G7 και G14 δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστικώς διαφορά με τις άλλες δύο επεμβάσεις της εκτροφής. Γενικότερα, παρατηρήθηκε τάση γραμμικής αύξησης του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής, με την αύξηση της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο.



**Διάγραμμα 3.2** Συντελεστής εκμετάλλευσης του σιτηρεσίου

Ως θνησιμότητα ορίζεται η αριθμητική ένδειξη της δύναμης του θανάτου από κάθε αιτία στον πληθυσμό. Ο υπολογισμός της θνησιμότητας πραγματοποιείται με διάφορους συντελεστές. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τον ακόλουθο πίνακα (Διάγραμμα 3.3) η θνησιμότητα των ορνιθίων ήταν μηδενική όσον αφορά στην ομάδα του μάρτυρα, ενώ παρουσίασε μία γραμμική αύξηση καθώς αυξανόταν το επίπεδο προσθήκης της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο, ξεκινώντας από την επέμβαση G7.



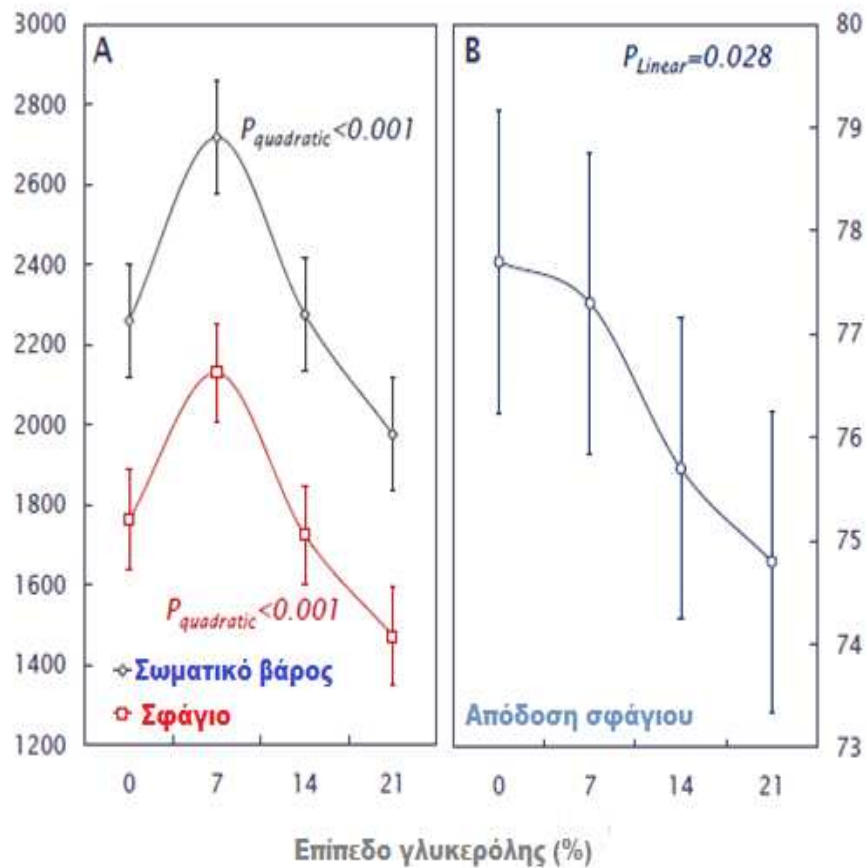
**Διάγραμμα 3.3** Θνησιμότητα ορνιθίων ανά επέμβαση

### 3.3.2 Χαρακτηριστικά σφάγιου

Οι ακόλουθες μετρήσεις λήφθηκαν στο τελευταίο στάδιο της ανάπτυξης των ορνιθίων και συγκεκριμένα την τελευταία ημέρα της πειραματικής διαδικασίας. Η αύξηση του επιπέδου γλυκερόλης στα σιτηρέσια είχε τόσο γραμμική όσο και τετραγωνική επίδραση στο σωματικό βάρος των ορνιθίων πριν τη σφαγή (Πίνακας 3.9; Διάγραμμα 3.4). Ωστόσο, δεν υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων C, G7 και G14. Αντίθετα, η επέμβαση G21 παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τις άλλες τρεις επεμβάσεις. Αριθμητικά το μεγαλύτερο βάρος πριν την σφαγή είχαν τα ορνίθια της επέμβασης G7. Όσον αφορά στο βάρος του σφάγιου, όπως φαίνεται και από διάγραμμα 3.4, διαφαίνεται η τάση γραμμικής μείωσης του βάρους του σφάγιου, καθώς αυξάνεται το ποσοστό προσθήκης της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο των ορνιθίων.

**Πίνακας 3.9** Σωματικό βάρος ορνιθίων ανά επέμβαση στο τέλος της εκτροφής, βάρος και απόδοση σφάγιου.

Επέμβαση	C	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	SEM	<i>P</i> linear	<i>P</i> quadratic
Σωματικό βάρος πριν τη σφαγή (gr)	2259	2717	2275	1974	141,8	0,006	<0,001
Βάρος σφάγιου (gr)	1762	2129	1724	1472	124,2	0,002	0,001
Απόδοση (%)	77,7	77,3	75,7	74,7	1,46	0,028	NS



**Διάγραμμα 3.4** Σωματικό βάρος πριν τη σφαγή, βάρος σφάγιου και απόδοση σφάγιου

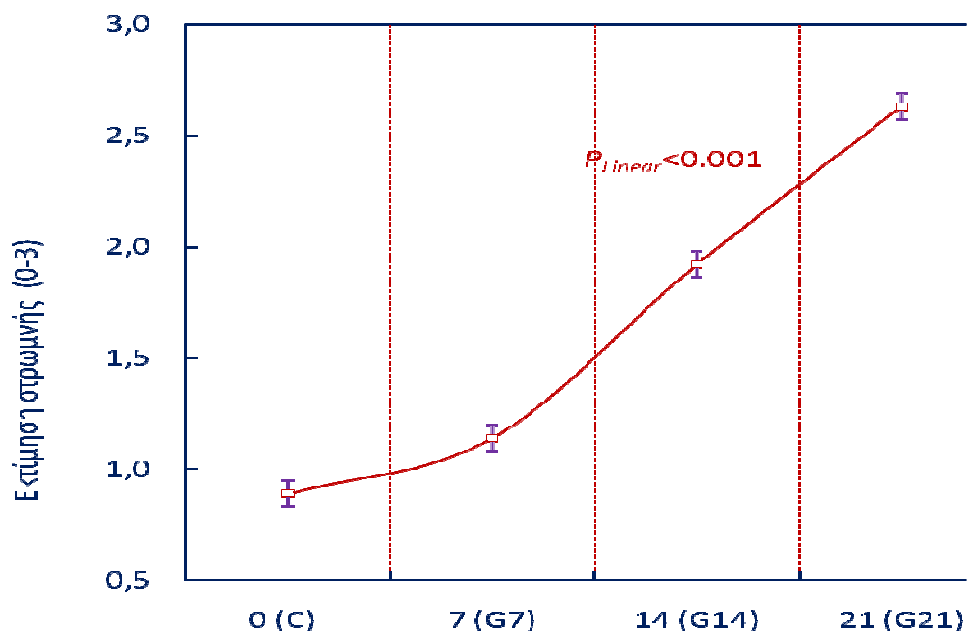
Η απόδοση σε σφάγιο υπολογίστηκε βάσει του ακόλουθου τύπου: (ζων βάρος ορνιθίου/βάρος σφάγιου)×100. Και στις τέσσερις επεμβάσεις δεν υπήρξαν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικές διαφορές, ενώ αριθμητικά, την υψηλότερη απόδοση σε σφάγιο την έδωσε η επέμβαση του μάρτυρα, ακολουθημένη πολύ κοντά από την επέμβαση G7.

### 3.3.3 Αξιολόγηση στρωμνής

#### 3.3.3.1 Εκτίμηση στρωμνής

Όπως έχει αναφερθεί και στην πειραματική διαδικασία της μελέτης, η εκτίμηση της στρωμνής πραγματοποιήθηκε σε εβδομαδιαία κλίμακα, σε όλες τις επαναλήψεις των επεμβάσεων. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των επαναλήψεων ανά επέμβαση και αναλύθηκαν στατιστικά τα αποτελέσματα ανά εβδομάδα.

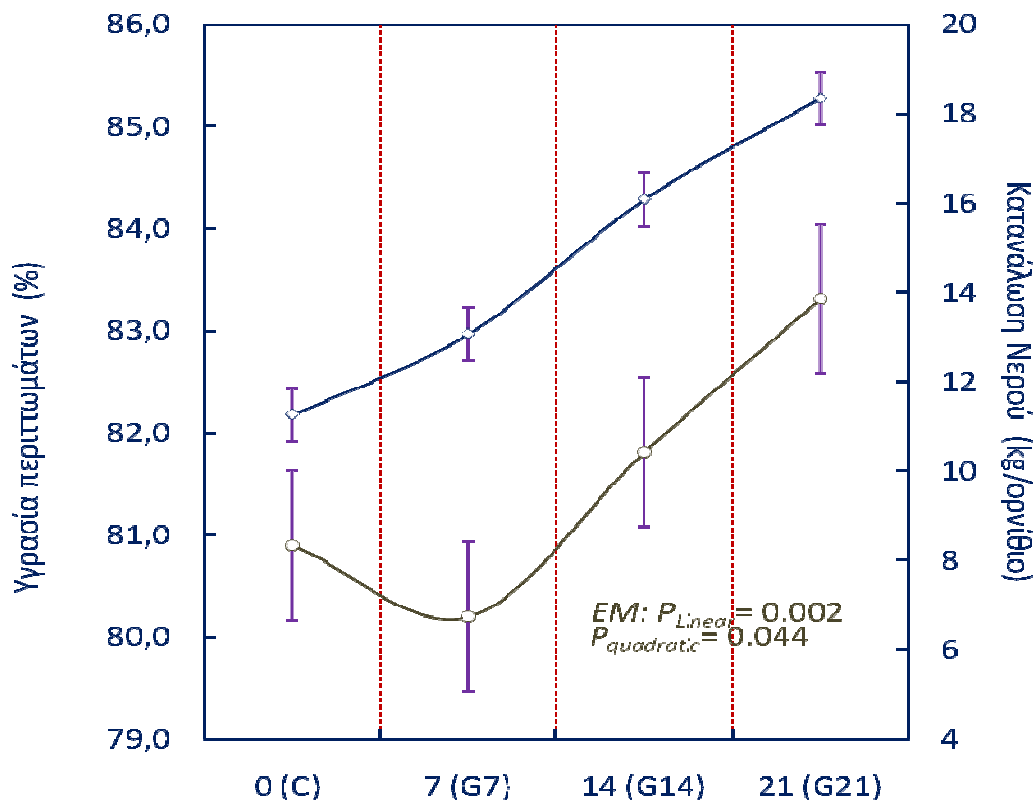
Η ποιότητα της στρωμνής στην επέμβαση του μάρτυρα κατά την πάροδο των εβδομάδων διατηρήθηκε σταθερή, έχοντας σε όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας την τιμή 1 (στεγνή, καλή κατάσταση). Οι υπόλοιπες επεμβάσεις με την προσθήκη γλυκερόλης παρουσίασαν αύξηση της υδαρότητας της στρωμνής, κατά την πάροδο των εβδομάδων. Η G21 επέμβαση είχε την περισσότερο υδαρή στρωμνή σε όλη τη διάρκεια της εκτροφής, ενώ οι επεμβάσεις G7 και του μάρτυρα, διατήρησαν την στρωμνή στεγνή σε ικανοποιητικό επίπεδο.



Διάγραμμα 3.5 Αξιολόγηση στρωμνής ανά επέμβαση

### 3.3.3.2 Υγρασία περιττωμάτων στρωμνής και κατανάλωση νερού από τα ορνίθια

Η υγρασία των περιττωμάτων τις δύο πρώτες εβδομάδες της εκτροφής, δεν παρουσίασαν καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων. Την τρίτη εβδομάδα, η επέμβαση G21 είχε την υψηλότερη υγρασία, ενώ δεν παρουσίασε στατιστική διαφορά με την επέμβαση G14. Την τέταρτη εβδομάδα του πειράματος η επέμβαση του μάρτυρα είχε αριθμητικά την υψηλότερη υγρασία, ενώ γενικότερα δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων. Στην πέμπτη και έκτη εβδομάδα της εκτροφής η ομάδα G21 είχε την μεγαλύτερη υγρασία στα περιττώματα των ορνιθίων. Όμως, στην πέμπτη εβδομάδα οι ομάδες G7 και G14 ήταν στατιστικώς όμοιες με τις ομάδες G21 και C. Όσον αφορά στην κατανάλωση του νερού, από το ακόλουθο διάγραμμα 3.6 φαίνεται καθαρά η ανοδική πορεία από τον μάρτυρα ως την επέμβαση G21, της κατανάλωσης του νερού από τα ορνίθια και στις τρεις φάσεις ανάπτυξης.



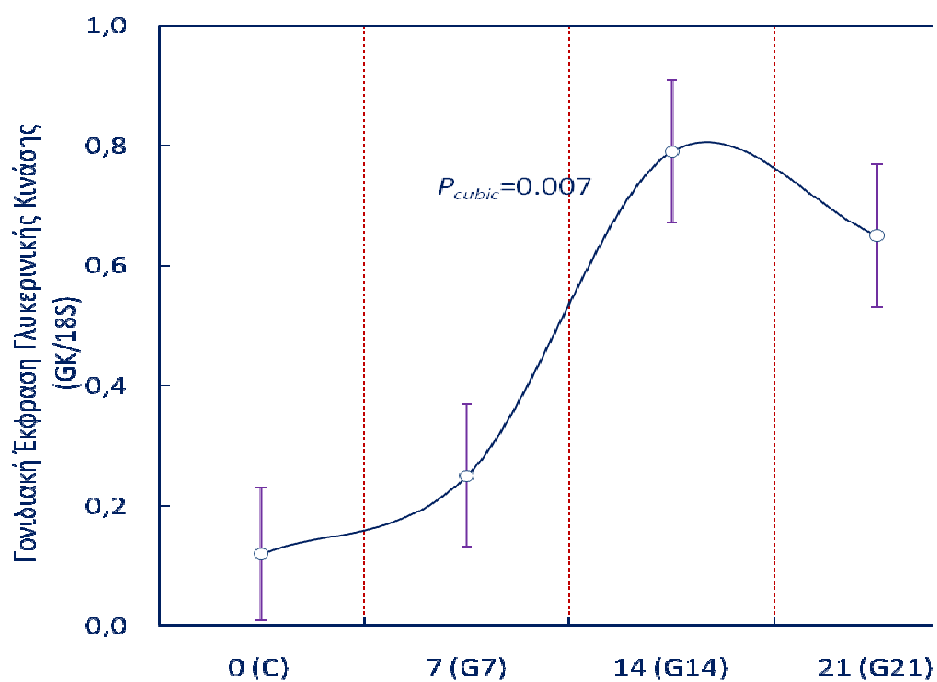
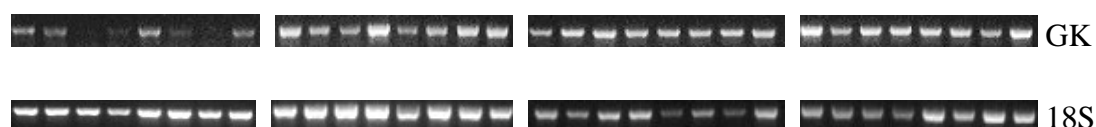
Διάγραμμα 3.6 Υγρασία περιττωμάτων και κατανάλωση νερού από τα ορνίθια

### 3.3.4 Γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των ορνιθίων

Η έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των ορνιθίων, ηλικίας έξι εβδομάδων, αυξήθηκε σημαντικά, όσο αυξανόταν το ποσοστό της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, με μία μικρή πτώση της έκφρασης του ενζύμου στην επέμβαση με 21% γλυκερόλη. Την μεγαλύτερη αύξηση του ενζύμου παρουσίασε η ομάδα με προσθήκη 14% γλυκερόλης, σε σχέση με τον μάρτυρα.

Πίνακας 3.10 Έκφραση γλυκερινικής κινάσης

Επέμβαση	C	G7	G14	G21
Έκφραση	0,1178	0,2534	0,6958	0,6833





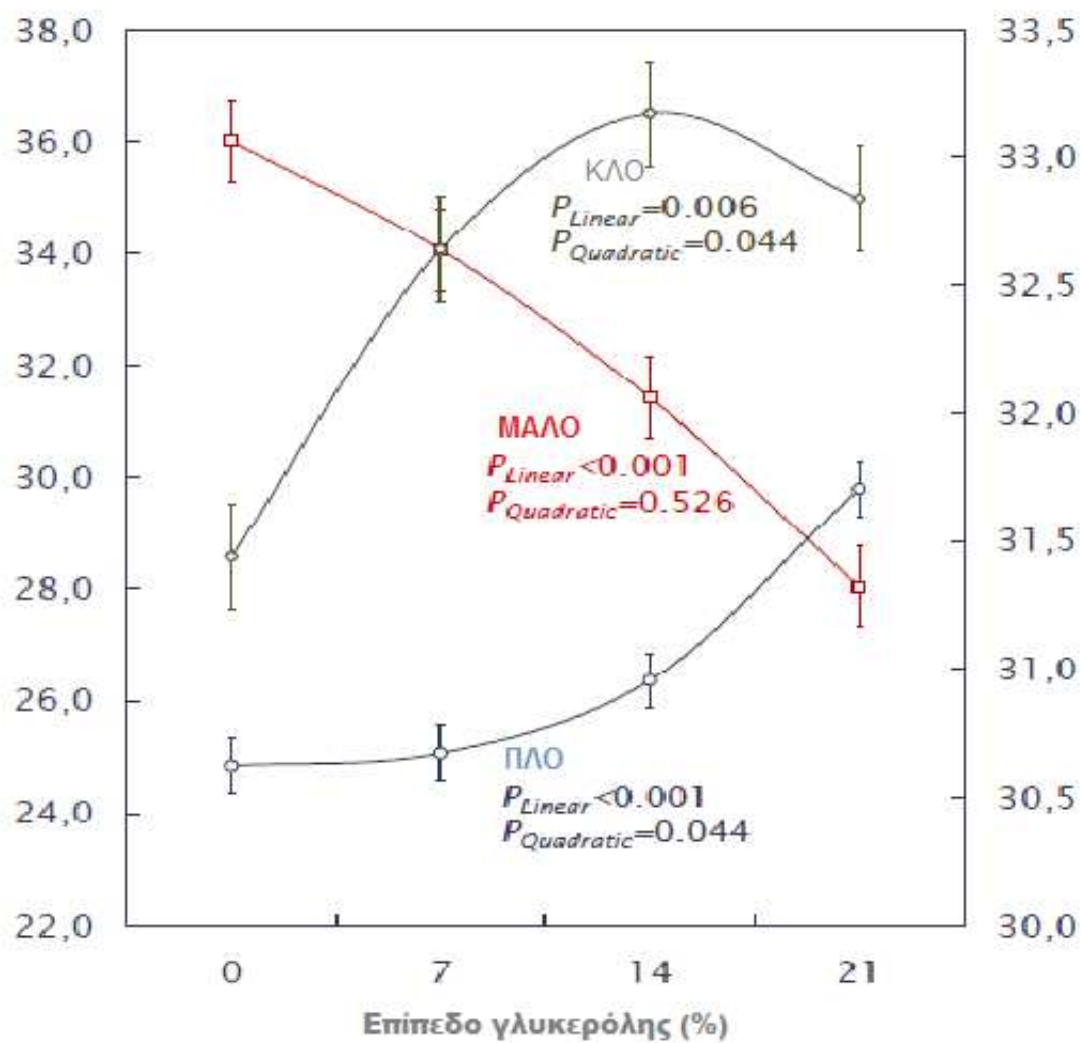
### 3.3.5 Λιπαρά οξέα

Όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε από τον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 3.11), η συγκέντρωση των ολικών λιπαρών οξέων στο ενδομυϊκό λίπος των ορνιθίων, παρουσίασε τάση γραμμικής μείωσης.

Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα C15:0 και C18:0 παρουσίασαν γραμμική αύξηση, ( $P < 0.001$ ) καθώς αυξανόταν το ποσοστό γλυκερόλης στο σιτηρέσιο, ενώ τα C14:0 και C16:0 επηρεάστηκαν τετραγωνικά ( $P = 0.027$  και  $P = 0.004$  αντίστοιχα). Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα δεν έδειξαν να επηρεάζονται μετά την προσθήκη γλυκερόλης στο σιτηρέσιο, εκτός από το 9c18:1 το οποίο παρουσίασε γραμμική πτώση ( $P < 0.001$ ). Αντίθετα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα C20:2, C20:3n3, DHA, C20:4n6, C22:4 και C22:5 παρουσίασαν τάση γραμμικής αύξησης ( $P = 0.001$ ,  $P = 0.005$ ,  $P < 0.001$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.010$  και  $P < 0.001$  αντίστοιχα), με την προσθήκη γλυκερόλης στο σιτηρέσιο των ορνιθίων, εκτός από τα 18:3n3, C20:3n6 και EPA τα οποία παρέμειναν σταθερά στις μεταβολές της γλυκερόλης. Σαν αποτέλεσμα όλων των παραπάνω, το σύνολο των ΚΛΟ παρέμεινε σταθερό ( $P < 0.001$ ), ενώ τα ΠΛΟ ακολούθησαν γραμμική τάση αύξησης ( $P < 0.001$ ). Συνεπώς, ο λόγος ΠΛΟ:ΚΛΟ αυξήθηκε γραμμικά ( $P = 0.001$ ) με την αύξηση της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο (διάγραμμα 3.7).

Πίνακας 3.11 Προφίλ λιπαρών οξέων στο στήθος ορνιθίων ανά επέμβαση.

<b>Επέμβαση</b>							
<b>Λιπαρό οξύ</b>	<b>C</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>Sem</b>	<i>P<sub>linear</sub></i>	<i>P<sub>quadratic</sub></i>
<b>C14:0</b>	0,41	0,45	0,49	0,45	0,010	0,071	0,027
<b>C14:1</b>	0,12	0,12	0,13	0,10	0,005	0,076	0,091
<b>C15:0</b>	0,06	0,07	0,09	0,10	0,006	0,000	0,815
<b>C16:0</b>	22,24	22,84	22,99	21,58	0,180	0,227	0,004
<b>C16:1</b>	4,31	4,08	4,02	2,62	0,161	0,000	0,025
<b>C18:0</b>	8,72	9,26	9,56	10,68	0,158	0,000	0,207
<b>t18:1</b>	0,34	0,28	0,30	0,30	0,006	0,102	0,016
<b>9c18:1</b>	27,44	25,53	22,65	21,24	0,610	0,000	0,802
<b>11c18:1</b>	3,14	3,41	3,60	3,15	0,079	0,750	0,025
<b>18:2 (n-6)</b>	16,39	15,82	16,75	18,15	0,266	0,006	0,043
<b>18:3n-3</b>	0,59	0,54	0,63	0,60	0,019	0,393	0,831
<b>C20:1</b>	0,34	0,29	0,32	0,27	0,011	0,083	0,770
<b>C20:2</b>	0,50	0,46	0,57	0,65	0,022	0,001	0,124
<b>C20:3n6</b>	1,19	1,26	1,31	1,35	0,037	0,119	0,872
<b>C20:3n3</b>	0,03	0,02	0,05	0,06	0,005	0,005	0,237
<b>C20:4n-6</b>	4,19	4,75	4,71	6,01	0,192	0,001	0,273
<b>Epa</b>	0,22	0,26	0,24	0,23	0,008	0,915	0,101
<b>C22:4</b>	1,01	1,11	1,14	1,33	0,044	0,010	0,614
<b>C22:5</b>	0,35	0,37	0,43	0,54	0,019	0,000	0,168
<b>DHA</b>	0,39	0,49	0,52	0,86	0,034	0,000	0,005
<b>Ολικά ΛΟ</b>	987,49	772,97	667,56	623,09	41,106	0,001	0,243
<b>ΚΛΟ</b>	31,44	32,63	33,17	32,84	0,204	0,006	0,044
<b>ΜΑΛΟ</b>	36,00	34,06	31,41	28,04	0,719	0,000	0,526
<b>ΠΛΟ</b>	24,85	25,07	26,37	29,79	0,486	0,000	0,044
<b>ΠΛΟ:ΚΛΟ</b>	0,79	0,77	0,79	0,91	0,015	0,001	0,009



**Διάγραμμα 3.7** Αποτελέσματα της προσθήκης γλυκερόλης στα επίπεδα των ΚΛΟ, ΜΑΛΟ και ΠΛΟ (% των ΟΛΟ) στο στήθος των ορνιθίων

## 4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση της χρησιμοποίησης ακατέργαστης γλυκερόλης στη διατροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγής σε ζωοτεχνικές παραμέτρους, στην απόδοση του σφάγιου, στην κατάσταση της στρωμνής, στη γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των ορνιθίων, καθώς και στην σύσταση του στήθους σε λιπαρά οξέα για την εκτίμηση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Η επέμβαση G7 παρουσίασε την μεγαλύτερη ανάπτυξη και ήταν και εκείνη με την μεγαλύτερη κατανάλωση της τροφής, χωρίς σημαντική διαφοροποίηση στο ΣΕΤ. Η κατανάλωση του νερού αυξήθηκε γραμμικά με την αύξηση του ποσοστού της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα, αλλά και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων ακατέργαστης γλυκερόλης, όπως 2,5% στο σιτηρέσιο των ορνιθίων κρεοπαραγωγής έχει δώσει θετικά αποτελέσματα όσον αφορά στην αύξηση του σωματικού βάρους και στην κατανάλωση της τροφής, ενώ καλή απόδοση σε σφάγιο (ιδιαίτερα στο στήθος των ορνιθίων) έχουν δώσει και οι συγκεντρώσεις 2,5% και 5% γλυκερόλης (Cerrate et al, 2006; Park, 2007). Αντίθετα, συγκεντρώσεις γλυκερόλης πάνω από 10% στο σιτηρέσιο, μπορεί να δείχνουν ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα ορνίθια, αλλά ίσως να προκαλούν προβλήματα στη ροή του σιτηρεσίου στο πεπτικό σύστημα και ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης των ορνιθίων (Park, 2007).

Σε συγκέντρωση 5% ακατέργαστης γλυκερόλης στο σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής δεν έχουν υπάρξει διαφορές στα ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά και στη θνησιμότητα, σε σύγκριση με ορνίθια που κατανάλωσαν ένα σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη γλυκερόλης, ενώ παρατηρήθηκε μείωση του σωματικού βάρους και της πρόσληψης τροφής σε ορνίθια που κατανάλωσαν σιτηρέσιο με προσθήκη 10% γλυκερόλης (Cerrate et al, 2006; Park, 2007). Σε κάποιες άλλες μελέτες, στις οποίες η ηλικία των ορνιθίων ήταν 10 ημερών, προσθήκη 6% ακατέργαστης γλυκερόλης, δεν έδειξε αλλαγή στο βάρος και την κατανάλωση της τροφής, αλλά ούτε και στην απορρόφηση ενέργειας από τα ορνίθια. Όμως, σε μεγαλύτερη ηλικία ορνιθίων (24 και 45 ημερών), προσθήκη 3%, 6% και 9% γλυκερόλης στο σιτηρέσιο, είχε ως

αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της κατανάλωσης τροφής και της μεταβολιστέας ενέργειας από τα ορνίθια, ανάλογη με την αύξηση του ποσοστού της γλυκερόλης (Dozier et al, 2008).

Κάποιες έρευνες έχουν μελετήσει την προσθήκη καθαρής γλυκερόλης, σε διάφορα ποσοστά, στην διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Ο Simon et al (1996), πρόσθεσε στο σιτηρέσιο των ορνιθίων καθαρή γλυκερόλη σε ποσοστά από 5% ως 25%, σε σιτηρέσιο βασιζόμενο σε καλαμπόκι και σόγια. Το υψηλότερο βάρος απέκτησαν τα ορνίθια της ομάδας με 5% και 10% γλυκερόλη, ενώ ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής από τα ορνίθια χειροτέρευσε σε συγκεντρώσεις πάνω από 10% και ιδιαίτερα στη συγκέντρωση 25% καθαρής γλυκερόλης. Γενικότερα, η ύπαρξη γλυκερόλης στη διατροφή ορνιθίων σε συγκέντρωση 25%, προκαλεί μείωση της απόδοσης, αλλά και παθολογικές αλλαγές στο επιθήλιο του εντέρου, στο ήπαρ και στα νεφρά των ορνιθίων. Ο ίδιος ερευνητής το 1997 (Simon et al. 1997) μελέτησε την προσθήκη καθαρής γλυκερόλης σε ποσοστό μόνο 10% στο ολικό σιτηρέσιο, γεγονός όμως που δεν επηρέασε το βάρος και τον συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής σημαντικά σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Παρατηρήθηκε μόνο μία άνοδο της κατανάλωσης της τροφής τις πρώτες μέρες της εκτροφής.

Όσον αφορά στην υδαρότητα της στρωμνής της εκτροφής, αλλά και στην υγρασία των περιττωμάτων των ορνιθίων, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε αυξημένη υδαρότητα στη στρωμνή της επέμβασης G21 και ταυτόχρονα στην ίδια επέμβαση αυξημένη υγρασία των περιττωμάτων, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

Σε μικρότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης, όπως 5% δεν έχει παρατηρηθεί αύξηση της υδαρότητας των περιττωμάτων, κάτι που δεν ισχύει σε σιτηρέσια με 10% γλυκερόλη (Cerrate et al, 2006). Σε σιτηρέσια τα οποία περιέχουν 10% γλυκερόλη, η παρουσία της γλυκερόλης στα περιττώματα των ορνιθίων, μπορεί να προσδώσει στη στρωμνή ορατά υγρή εμφάνιση, διότι η συγκέντρωση της γλυκερόλης στα περιττώματα των ορνιθίων μπορεί να αγγίξει το 25% (Simon et al, 1997; Park, 2007).

Από τις διαθέσιμες δημοσιευμένες μελέτες προκύπτει ότι δεν υπάρχουν στοιχεία τα οποία να αφορούν τη γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των ορνιθίων ή άλλων οργανισμών. Αντιθέτως, έχουν δημοσιευτεί έρευνες οι

οποίες αφορούν την ενεργότητα του ενζύμου της γλυκερινικής κινάσης σε διάφορους οργανισμούς.

Ο Westergaard et al, 1998 ερεύνησε την ενεργότητα του ενζύμου της γλυκερινικής κινάσης στα ηπατοκύτταρα των επίμυων κάτω από διαφορετικές ορμονικές συνθήκες (ινσουλίνης, γλυκαγόνης και δεξαμεθαζόνης) σε συνδυασμό με την αφομοίωση της γλυκερόλης από τα ηπατοκύτταρα. Στην παραπάνω έρευνα παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας της γλυκερινικής κινάσης, όσο αυξανόταν η χρήση της γλυκερόλης από τον οργανισμό.

Οι περισσότερες μελέτες, όμως, αναφέρονται στην ενεργότητα του ενζύμου της γλυκερινικής κινάσης στον λιπώδη ιστό και στα πνευμονοκύτταρα επίμυων (Stern et al, 1983 και Fisher and Chander, 1981 αντίστοιχα). Η ενεργότητα του ενζύμου στο λιπώδη ιστό ήταν υψηλότερη σε ποντίκια τα οποία ήταν παχύσαρκα, αλλά και σε εκείνα που διατρέφονταν με διατροφή πλούσια σε λίπη και όχι σε υδατάνθρακες. Γενικότερα, οι Stern et al, απέδειξαν ότι η ενεργότητα του ενζύμου σχετίζεται περαιτέρω με το βάρος του ζωικού οργανισμού, το μέγεθος των λιπωδών κυττάρων και επηρεάζεται από τη διατροφή. Ο Fisher and Chander, διαπίστωσαν ότι η ενεργότητα της γλυκερινικής κινάσης στα κοκκώδη πνευμονοκύτταρα, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη που βρέθηκε σε όλον τον πνεύμονα. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται η σχέση του pH με την κυτταροπλασματική λειτουργία του ενζύμου (βέλτιστο ουδέτερο pH), αλλά και η σχέση της ενεργότητας της γλυκερινικής κινάσης στα κοκκώδη πνευμονοκύτταρα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Στην τελευταία περίπτωση, παρατηρήθηκε άνοδος της ενεργότητας του ενζύμου, έως 1mM γλυκερόλης, και έπειτα ακολουθεί σταθερή πορεία (πλατό) στην ενεργότητα του ενζύμου, όσο αυξάνεται το ποσοστό της γλυκερόλης.

Τέλος, μελετήθηκε, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως η ποσοτική έκφραση των λιπαρών οξέων στους μύες των ορνιθίων. Το μεγαλύτερο ποσοστό των λιπαρών οξέων είχε την μεγαλύτερή του συγκέντρωση στην επέμβαση στην οποία χορηγήθηκε 21% γλυκερόλη στο σιτηρέσιο και γενικότερα στις ομάδες στις οποίες είχε προστεθεί γλυκερόλη στο σιτηρέσιο τους. Μόνο σε τρία λιπαρά οξέα παρατηρήθηκε πτώση της συγκέντρωσής τους (C16:1, t18:1 και C20:1).

Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν πολλές μελέτες οι οποίες να αναφέρονται στο προφίλ των λιπαρών οξέων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση γλυκερόλης στο σιτηρέσιο, σε ορνίθια κρεοπαραγωγής. Ο Lin et al, (1976) έχει αποδείξει ότι η γλυκερόλη μειώνει το ρυθμό σύνθεσης λιπαρών οξέων και της ενεργότητας των λιπολυτικών ενζύμων, στο ήπαρ των ορνιθίων.

Στον Yalcin et al (2010) αναφέρεται πως, σε όρνιθες αυγοπαραγωγής στις οποίες χορηγήθηκε γλυκερόλη σε ποσοστά 2,5%, 5% και 7,5%, η περιεκτικότητα σε ολικά μονοακόρεστα λιπαρά οξέα στον κρόκο του αυγού της επέμβασης στην οποία είχε χορηγηθεί 7,5% γλυκερόλη, ήταν μικρότερη σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης, οι επεμβάσεις με 5% και 7,5% γλυκερόλη αύξησαν το εκατοστιαίο ποσοστό του παλμιτικού (C16:0), του μυριστικού οξέος (C14:0), του παλμιτελαϊκού (C16:1) και του λινολενικού οξέος (C18:3n-3), ενώ μείωσαν το εκατοστιαίο ποσοστό του ελαϊκού οξέος (c9-C18:1), σε σχέση με τα αυγά του μάρτυρα. Γενικότερα, όμως, η προσθήκη γλυκερόλης δεν είχε καμία επίδραση στα ολικά κορεσμένα και ολικά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως και στο λόγο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα. Αντιθέτως, ο λόγος μονοακόρεστων λιπαρών οξέων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα μειώθηκε σημαντικά στον κρόκο του αυγού, μετά την προσθήκη γλυκερόλης στο σιτηρέσιο των ορνιθίων αυγοπαραγωγής, όπως επίσης και ο λόγος ΜΑΛΟ προς ΚΛΟ.

## 5. Συμπεράσματα

- Όσον αφορά στην απόδοση και γενικότερα σε όλα τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασε η επέμβαση G7. Η επέμβαση G14 δεν παρουσίασε σημαντικές αλλαγές σε σύγκριση με την επέμβαση του μάρτυρα, ενώ αντιθέτως στην επέμβαση G21 παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της απόδοσης των ορνιθίων.
- Μεγαλύτερη θνησιμότητα παρατηρήθηκε στην επέμβαση G21, ενώ μηδενική θνησιμότητα παρουσίασε η επέμβαση του μάρτυρα. Το γεγονός αυτό, πιθανώς οφείλεται στην αλληλεπίδραση πολλών παραγόντων, όπως η παρουσία αυξημένων οσμωτικών φαινομένων, λόγω αύξησης κατανάλωσης του νερού ή και η πιθανή εμφάνιση τοξικότητας εξαιτίας της μεθανόλης, που περιέχεται στη γλυκερόλη, παρόλο που δεν ξεπεράστηκαν τα όρια που ορίζονται από την ΕΕ.
- Η κατανάλωση του νερού ακολούθησε γραμμική αύξηση, γεγονός το οποίο επηρέασε την υδαρότητα της στρωμνής και των περιττωμάτων, καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο.
- Γενικότερα, η επέμβαση G1 παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στις αποδόσεις των ορνιθίων και καθίσταται ικανή να αντικαταστήσει την επέμβαση του μάρτυρα σε εμπορική κλίμακα.
- Η γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των ορνιθίων παρουσίασε ανοδική πορεία ταυτόχρονα με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο, μέχρι και την επέμβαση G14. Στην επέμβαση με 21% συγκέντρωση γλυκερόλης, παρατηρήθηκε πτώση της έκφρασης του ενζύμου. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στην ανεπάρκεια σύνθεσης του ενζύμου από τον οργανισμό των ορνιθίων, όταν αυξάνεται η πρόσληψη της γλυκερόλης πάνω από κάποιο ποσοστό.
- Η συγκέντρωση των ολικών λιπαρών οξέων στο στήθος των ορνιθίων παρουσίασε γραμμική μείωση, καθώς αυξανόταν το ποσοστό της γλυκερόλης.



- ο Ο λόγος των ΠΛΟ προς ΚΛΟ ακολούθησε γραμμική άνοδο, ενώ αντιθέτως η συγκέντρωση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων στο στήθος των ορνιθίων παρουσίασε γραμμική πτώση σε συνάρτηση με την ποσότητα της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο των ορνιθίων.

## 6.Βιβλιογραφία

1. Cerrate S., F. Yan, Z. Wang, C. Coto, P. Sacakli and P.W. Waldroup, 2006. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. *International Journal of Poultry Science* 5 (11): 1001-1007.
2. Comerford JW, 2008. The implications of biodiesel production on intensive livestock production in the United States. *Proceedings of the British Society of Animal Science*, pp 285.
3. Dasari Mohan, 2007. Crude glycerol potential described. *Feedstuffs*, Vol. 79, No. 43.
4. De Frain J.M., A.R. Hippen, K. F. Kalscheur, P.W. Jardon, 2004. Feeding glycerol to transition dairy cows: Effects on blood metabolites and lactation performance. *J. Dairy Sci.* 87(12): 4195-4206.
5. Della Casa G., D. Bochicchio, V. Faeti, G. Marchetto, E. Poletti, A. Rossi, A. Garavaldi, A. Panciroli, N. Brogna, 2009. Use of pure glycerol in fattening heavy pigs. *Meat Science* 81 238-244.
6. Donkin, S.S. and P. Doane, 2007. Glycerol as a feed ingredient in dairy rations. *Tri-State Dairy Nutrition Conference*.
7. Dozier W.A., Kerr B.J., Corzo A., Kidd M.T., Weber T.E. and Bregendahl K., 2008. Apparent metabolizable energy of glycerin for broiler chickens. *Poultry Science* 87:317-322.
8. Elam N.A., Eng K.S., Bechtel B., Harris J.M. and Crocker R, 2008. Glycerol from biodiesel production: Considerations for feedlot diets. *Clayton Livestock Research Center-New Mexico State University*.

9. Fisher A. B. and Chander A., 1981. Glycerol kinase activity and glycerol metabolism of rat granular pneumocytes in primary culture. *Biochimica et Biophysica Acta*, 711: 128-133.
10. Groesbeck C. N., McKinney L. J., DeRouchey J. M., Tokach M. D., Goodband R. D., Dritz S. S., Nelssen J. L., Duttlinger A. W., Fahrenholz A. C., Behnke K. C., 2008. Effect of crude glycerol on pellet mill production and nursery pig growth performance. *J. Anim Sci. Sep*;86(9):2228-36.
11. G. Papadomichelakis, A. Karagianidou, V. Anastasopoulos, 2010. Effect of dietary soybean oil addition on the odd-numbered and branched-chain fatty acids in rabbit meat. *Meat science*.
12. Kerr B. J., Dozier W. A. and Bregendahl K., 2007. Nutrition value of crude glycerin for nonruminants. *Journal of Animal Science* (6-18)
13. Khalili H, T. Varvikko, Toivonen, K. Hissa, M. Suvitie, 1997. The effects of added glycerol or unprotected free fatty acids or a combination of the two on silage intake, milk production, rumen fermentation and diet digestibility in cows given grass silage based diets. *Agri. Food Sci. Finland*. 6(5-6): 349-362.
14. Lammers P. J., B. J. Kerr, T.E. Weber, W.A. Dozier, M.T. Kidd, K. Bregendahl and M.S. Honeyman, 2008. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. *J. Anim Sci* 86: 602-608.
15. Lin C.Y., 1977. Relationship between increased body weight and fat deposition in broilers. Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Ontario, Canada.
16. L.C. Meher, D. Vidya Sagar, S.N. Naik, 2004. Technical aspects of biodiesel production by transesterification a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 10, 248-268.

17. Park W. W., 2007. Glycerine and ddgs: Biofuel by-products for broilers. 15<sup>th</sup> Annual ASAIM Asian Feed Technology and Nutrition Workshop.
18. Parsons G.L., M.K. Shelor, and J.S. Drouillard, 2009. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. *J. Anim. Sci.* 2009. 87:653-657.
19. Pluske J, 2007. Evaluation of glycerine as a co-product of biodiesel production for the pig industry. Report prepared for the pork Co-operative Research Center.
20. Remond B., E. Souday, and J.P. Jouney, 1993. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 41:121-132.
21. Robergs R.A.;Griffin S.E., 1998. Glycerol: Biochemistry, Pharmacokinetics and Clinical and Practical Applications. [Sports Medicine](#), Vol. 26, No. 3, pp. 145-167(23).
22. Robinson J. and Newsholme E.A., 1968. Some properties of hepatic glycerol kinase and their relation to the control of glycerol utilization. *Biochem. J.* 112, 455.
23. Shields M.C., 2009. Evaluation of the nutritional value of glycerol, a byproduct of biodiesel production, for swine. *Animal Science/Nutrition*.
24. Simon A., Bergner H., Schwable M., 1996. Glycerol as a feed ingredient for broiler chickens, *Arch Anim. Nutr.* Vol 49, pp. 103-112.
25. Simon A., Bergner H., Schwable M., 1997. Glycerol supplementation in broiler rations with low crude protein content, 1997. *Arch Anim. Nutr.* Vol 50, pp. 271-282.

26. Stern J. S., Hirsch J., Drewnowski A., Sullivan A. C., Johnson P. R., Cohn C. L., 1983. Glycerol kinase activity in adipose tissue of obese rats and mice: effects of diet composition. *J. Nutr.* 113:714-720.
27. Thompson J.C., and He B. B., 2006. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Appl. Eng. Agric.* 22:261-265.
28. Westergaard N., Madsen P., Lundgren K., 1998. Characterization of glycerol uptake and glycerol kinase activity in rat hepatocytes cultured under different hormonal conditions. *Biochemica et Biophysica Acta* 1402: 261-268.
29. Whittington Trevor, 2006. Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia. Biodiesel production and use by farmers. Is it worth considering?
30. Yalcin S., Erol H., Ozsoy B., Onbasilar I., Yalcin S., Uner A., 2010. Effects of glycerol on performance, egg traits, some blood parameters and antibody production to SRBC of laying hens. *Livestock Science.*
31. Διαμαντίδης Γρ., 1994. Εισαγωγή στη βιοχημεία. Θεσσαλονίκη, εκδόσεις University Studio Press.
32. Ζέρβα Γ., Καλαϊσάκη Π. και Φεγγερού Κ., 2000. Διατροφή αγροτικών ζώων. Αθήνα: εκδόσεις Σταμούλη.
33. Ζέρβας Γ., 2005, Φυσιολογία θρέψης παραγωγικών ζώων. Αθήνα, εκδόσεις Σταμούλη.
34. Καλαϊσάκης, 1981, Εφηρμοσμένη διατροφή αγροτικών ζώων.
35. Φεγγερός Κ., 2008, Επιθεώρηση ζωοτεχνικής επιστήμης.