

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

ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΩΝ ΧΟΙΡΙΔΙΩΝ

ΛΙΠΙΑΣ ΘΕΟΦΑΝΗΣ



ΑΘΗΝΑ 2010

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

Διευθυντής : Καθηγητής Γ. Ζέρβας

**ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ
ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΩΝ ΧΟΙΡΙΔΙΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΟΥ
ΛΙΠΙΑ ΘΕΟΦΑΝΗ

Εξεταστική επιτροπή :

Εισηγητής : Παπαδομιχελάκης Γεώργιος, Λαέκτορας.

Μέλη : Φεγγερός Κων/νος, Καθηγητής.

Ζέρβας Γεώργιος, Καθηγητής.

ΑΘΗΝΑ 2010

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον Λέκτορα κ. Παπαδομιχελάκη Γεώργιο, τον Λέκτορα κ. Μουντζούρη Κωνσταντίνο και τον Λέκτορα κ. Ζωΐδη Ευάγγελο, για την άριστη συνεργασία την οποία είχα μαζί τους και για την επίβλεψη και τη χρήσιμη καθοδήγηση την οποία είχα κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Οι γνώσεις τις οποίες απεκόμισα είναι πολύτιμες και θα με συνοδεύουν πάντα σε όλη τη διάρκεια της επαγγελματικής μου σταδιοδρομίας. Ακόμα ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Φεγγερό Κωνσταντίνο και τον Καθηγητή κ. Ζέρβα Γεώργιο, είναι πολύ μεγάλη τιμή που υπήρξα μαθητής τους διότι οι γνώσεις και οι πολύτιμες συμβουλές τους διαμόρφωσαν τον επαγγελματικό μου χαρακτήρα και θα με συντροφεύουν πάντα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον προπτυχιακό φοιτητή κ. Στεφανάκη Δημήτριο για την άριστη συνεργασία την οποία είχαμε κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, καθώς και τον προπτυχιακό φοιτητή κ. Γεροχρήστο Παναγιώτη για την βοήθεια και την άριστη συνεργασία την οποία είχαμε κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των μικροβιολογικών αναλύσεων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελίδα
Περίληψη	6
Abstract	9
1.ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
1.1 Βιοκαύσιμα	12
1.1.1 Βιομάζα και παραγωγή υγρών καυσίμων	13
1.1.2 Κρίσιμα σημεία παραγωγής βιομάζας για ενέργεια	14
1.2 Βιοντίζελ	14
1.2.1 Τρανς-εστεροποίηση	16
1.2.2 Μεταβλητές που επηρεάζουν την αντίδραση της τρανς-εστεροποίησης.	17
1.2.3 Παραγωγή βιοντίζελ	18
1.2.4 Υποπροϊόντα παραγωγής βιοντίζελ στη διατροφή των ζώων	19
1.2.5 Βιοαιθανόλη	19
1.2.6 Παραγωγή βιοαιθανόλης	21
1.2.7 Υποπροϊόντα παραγωγής βιοαιθανόλης στη διατροφή των ζώων	21
1.2.8 Άλλα παράγωγα από την παραγωγή βιοκαυσίμων	22
1.2.9 Παραγωγή βιοντίζελ στην Ευρωπαϊκή Ένωση	23
1.3 Γλυκερόλη	25
1.3.1 Η γλυκερόλη στη διατροφή αγροτικών ζώων	28
1.3.2 Αντιδιαιτητικοί παράγοντες της γλυκερόλης	29
1.3.3 Η γλυκερόλη στα σιτηρέσια των χοίρων	29
1.3.4 Πιθανές παρενέργειες της χρησιμοποίησης γλυκερόλης στα σιτηρέσια των χοίρων	31

1.3.5 Η γλυκερόλη στα σιτηρέσια των ορνίθων	32
1.3.6 Η γλυκερόλη στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών	33
1.3.7 Άλλες χρήσεις της γλυκερόλης	33
1.3.8 Τιμή πώλησης της γλυκερόλης	34
1.3.9 Μεταβολισμός της γλυκερόλης	35
1.4 Γλυκερινική κινάση	36
1.4.1 Παρουσία γλυκερινικής κινάσης σε ιστούς διαφόρων ζώων	37
1.5 Μικροβιακά γένη και πληθυσμοί στο λεπτό και παχύ έντερο του χοίρου	38
1.5.1 Κυριότερα γένη μικροβιακής χλωρίδας στους χοίρους	40
1.5.2 Ρόλος των μικροοργανισμών στη θρέψη και την υγεία των μονογαστρικών ζώων	42
1.5.3 Μελλοντικά πεδία έρευνας	44
2.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	45
2.1 Σκοπός του Πειράματος	46
2.2 Υλικά και Μέθοδοι	47
2.3 Αποτελέσματα του Πειράματος	64
2.4 Σχολιασμός των Αποτελεσμάτων	75
2.5 Συμπεράσματα	80
3.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	81

ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΩΝ ΧΟΙΡΙΔΙΩΝ

ΛΙΠΙΑΣ ΘΕΟΦΑΝΗΣ

**Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο
Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55.**

Περίληψη

Η γλυκερόλη ή γλυκερίνη είναι ένα υποπροϊόν της βιομηχανίας βιοντίζελ το οποίο παράγεται σε υψηλές ποσότητες κατά την υδρόλυση των λιπαρών οξέων των ζωικών λιπών ή των φυτικής προέλευσης ελαίων, και αποτελεί μία ελκυστική ζωοτροφή για τη διατροφή των ζώων. Ωστόσο, η γλυκερόλη θα πρέπει να ενεργοποιηθεί ενζυμικά πριν από τη μεταβολική χρησιμοποίησή της, και έχει προταθεί ότι η φωσφορυλίωσή της από την γλυκερινική κινάση μπορεί να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα. Προς γνώση μας, βιβλιογραφικά δεδομένα για μία πιθανή επίδραση της μικροβιακής χλωρίδας του πεπτικού συστήματος, η οποία μπορεί να επηρεάσει την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, δεν είναι διαθέσιμα. Επιπροσθέτως, υπάρχουν ασαφή δεδομένα σχετικά με τις επιπτώσεις της γλυκερόλης στην ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος των εκτρεφόμενων ζώων.

Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό να διερευνήσει την επίδραση της προσθήκης ακατέργαστης γλυκερόλης στα σιτηρέσια αναπτυσσόμενων χοίρων (εις βάρος του αραβοσίτου κατά κύριο λόγο) στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ζώων, στην γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης, στη συγκέντρωση της γλυκερόλης στο πλάσμα του αίματος, στη μικροβιακή χλωρίδα του ειλεού και του τυφλού εντέρου και στη σύνθεση των λιπαρών οξέων του ενδομυϊκού λίπους.

Για τους σκοπούς του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν 18 απογαλακτισθέντα χοιρίδια (ηλικίας 30 ημερών και μέσου σωματικού βάρους 8 κιλών), τα οποία κατανεμήθηκαν σε 3 πειραματικές ομάδες-επεμβάσεις και διατράφηκαν με τρία ισοενεργειακά και ισοαζωτούχα σιτηρέσια, χωρίς γλυκερόλη (μάρτυρας M) ή με γλυκερόλη σε ποσοστά 7,5 (G1) και 15 (G2) %, αντίστοιχα, σε βάρος του αραβοσίτου

κατά κύριο λόγο. Η πρόσληψη της τροφής, η αύξηση του σωματικού βάρους και ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής προσδιορίζονταν σε εβδομαδιαία βάση. Στο τέλος του πειράματος τα χοιρίδια (ηλικίας 72 ημερών), σφαγιάστηκαν και συλλέχθηκαν δείγματα αίματος. Τμήματα του ήπατος, του ειλεού και του τυφλού εντέρου του πεπτικού σωλήνα αφαιρέθηκαν, εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C έως ότου αναλυθούν για την γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης και τον προσδιορισμό της σύνθεσης της μικροβιακής χλωρίδας, αντίστοιχα. Μετά την ψύξη στο 4°C για 24 ώρες, ένα τμήμα του μυός της οσφυϊκής χώρας αποκόπηκε για να γίνει ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του ενδομυϊκού λίπους. Η πρόσληψη της τροφής, η αύξηση του σωματικού βάρους και ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη ακατέργαστης γλυκερόλης στο σιτηρέσιο. Παρ' όλα αυτά, τα χοιρίδια της επέμβασης G1 φάνηκε να είναι βαρύτερα (κατά 10 %) σε σύγκριση με τα χοιρίδια της επέμβασης του μάρτυρα, στο τέλος του πειράματος. Η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο πλάσμα του αίματος αυξήθηκε γραμμικά ($P<0,001$), με την αύξηση της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την αποτελεσματική απορρόφησή της από τον πεπτικό σωλήνα. Η γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ομογενοποιημένο ήπαρ αυξήθηκε επίσης γραμμικά ($P<0,001$), με την προσθήκη γλυκερόλης στο σιτηρέσιο. Αυτό το τελευταίο στοιχείο, σε συνδυασμό με τα δεδομένα της απόδοσης, συνεπάγονται ότι τα μέτα-μεταγραφικά αποτελέσματα (σύμφωνα με τον κανονισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της γλυκερινικής κινάσης), θα μπορούσαν κυρίως να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της χρησιμοποίησης της γλυκερόλης. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών των βακτηρίων τα οποία μελετήθηκαν στον ειλεό και το τυφλό έντερο των χοιριδίων και των τριών επεμβάσεων. Το σύνολο των κορεσμένων λιπαρών οξέων (ΚΛΟ), μειώθηκε γραμμικά ($P<0,001$), ενώ τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (ΠΑΚΛΟ), συνολικά παρουσίασαν μία τάση γραμμικής αύξησης ($P=0,097$), με συνέπεια ο λόγος ΠΑΚΛΟ/ΚΛΟ, να αυξηθεί γραμμικά ($P<0,05$), με την αύξηση της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο. Η σύνθεση των λιπαρών οξέων του ενδομυϊκού λίπους φάνηκε να συνδέεται, σε κάποιο βαθμό, με υπολείμματα λιπαρών οξέων τα οποία βρίσκονται στην ακατέργαστη γλυκερόλη. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η γλυκερόλη η οποία συμμετείχε στα σιτηρέσια σε ποσοστά 7,5 και 15 %, χρησιμοποιήθηκε εξίσου, με την πρώτη περίπτωση να δίνει ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα, χωρίς να υπάρχει καμία

αρνητική επίδραση στην ποιότητα του κρέατος, σε σχέση με τη σύνθεση των λιπαρών οξέων του ενδομυϊκού λίπους. Περεταίρω έρευνα είναι αναγκαία για την διελεύκανση της εμπλοκής της γλυκερινικής κινάσης στο μεταβολισμό της γλυκερόλης και συνεπώς στην απόδοση των χοιριδίων.

Λέξεις κλειδιά: Βιοντίζελ, ακατέργαστη γλυκερόλη, χοιρίδια, γονιδιακή έκφραση γλυκερινικής κινάσης, λιπαρά οξέα του κρέατος, μικροχλωρίδα του εντέρου.

NUTRITIVE EVALUATION OF CRUDE GLYCEROL IN GROWING PIGLETS

LIPPAS THEOFANIS

Faculty of Animal Science and Aquaculture, Department of Nutritional Physiology and Feeding, 75 Iera Odos Street, GR-118 55, Athens

Abstract

Glycerol or glycerine is a by-product of biodiesel industry produced in high amounts during the hydrolysis of animal fat or vegetable oils and consists an attractive feedstuff for animal nutrition. However, glycerol must be activated enzymatically prior to metabolic utilization and it has been proposed that its phosphorylation by glycerol kinase may be the limiting step. To our knowledge, no bibliographic data for a potential influence on digestive system microbiota, which may interfere with nutrient absorption, are available. Additionally, there are inconsistent data about glycerol effects on the product quality of meat animals.

The present study aimed to investigate the effect of supplementing pig diets (at the expense of corn mainly) with crude glycerol on performance, glycerol kinase (GK) gene expression, blood plasma glycerol concentration, ileal and caecal microbiota and intramuscular fatty acid (FA) composition.

Eighteen Large White × Pietrain weaned piglets (aged 30 days with an average body weight of 8 kg) were allotted in 3 groups and were fed 3 isocaloric and isoproteic diets without glycerol (control; M) or with glycerol at 7.5 (G1) and 15 (G2) %, respectively, at the expense of corn mainly. Feed intake, weight gain and feed conversion were recorded weekly. At the end of the experiment (72 days of age) piglets were slaughtered and blood samples were collected. The liver and the ileal and caecal segments of the digestive tract were removed, blast frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until analyzed for GK gene expression and microbiota composition determinations, respectively. After chilling at 4°C for 24 h, a chop of the loin muscle was excised for FA determination. Feed intake, body weight gain and feed conversion ratio were not affected by crude glycerol addition. Nevertheless, G1 appeared to be

heavier (by 10%) at the end of the experiment compared to M piglets. Plasma glycerol concentration increased linearly ($P<0.001$) with dietary glycerol increment, suggesting an efficient absorption by the digestive tract. Glycerol kinase gene expression in liver homogenates also increased linearly ($P<0.001$) with dietary glycerol. This latter evidence, in regard to performance data implied that post-translational effects (i.e. regulation of GK enzymatic activity) could primarily affect the efficiency of glycerol utilization. No effect of dietary glycerol on the gut microbiota composition at the ileal and caecal level was observed. Saturated FA (SFA) decreased linearly ($P<0.001$), whereas polyunsaturated FA (PUFA) tended to increase ($P=0.097$) resulting in a linear increase ($P<0.05$) of PUFA:SFA ratio, with dietary glycerol. Intramuscular FA composition seemed to be associated, to some extent, with FA residues found in crude glycerol. The present study suggested that dietary glycerol was equally utilized at 7.5 and 15%, with the former showing slightly better results, without any negative impact on meat quality, in respect with FA composition. Further study is necessary to elucidate the implication of GK in glycerol utilization and consequently on piglet performances.

Keywords: Biodiesel, crude glycerol, piglets, glycerol kinase gene expression, meat fatty acids, gut microbiota.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Βιοκαύσιμα

Στο πρόσφατο παρελθόν, ο πλανήτης αντιμετώπισε μία ενεργειακή κρίση λόγω του ότι μειώθηκαν οι ενεργειακές πηγές και αυξήθηκαν τα περιβαλλοντολογικά προβλήματα. Αυτή η κατάσταση οδήγησε στην αναζήτηση εναλλακτικών πηγών ενέργειας και καυσίμων, τα οποία δεν θα πρέπει να είναι μόνο σταθερά ως προς την παραγωγή τους, αλλά επίσης και φιλικά ως προς το περιβάλλον. Για τις αναπτυγμένες χώρες, καύσιμα τα οποία προέρχονται από βιολογικές πηγές όπως είναι τα φυτικά έλαια, η βιομάζα, το βιοαέριο, τα συνθετικά καύσιμα κ.α., έχουν αποκτήσει μεγάλη σημασία. Τέτοιου είδους καύσιμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας, ενώ άλλα χρειάζονται μερικές τροποποιήσεις πριν από την χρησιμοποίησή τους ως υποκατάστατο των συμβατικών καυσίμων (Barnwal et al., 2004).

Από την οπτική γωνία της προστασίας του περιβάλλοντος γενικά, καθώς και της κάλυψης των αναγκών μακροπρόθεσμα με συμβατικά καύσιμα, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη εναλλακτικών καυσίμων τα οποία θα μπορούν να συγκριθούν με τα συμβατικά. Τα συμβατικά καύσιμα χρησιμοποιούνται ευρέως στις μεταφορές, στη γεωργία, στην κτηνοτροφία, στο εμπόριο και σε βιομηχανικούς τομείς με τα πλεονεκτήματα τα οποία προσδίδουν να είναι δεδομένα. Επομένως γίνεται αντιληπτό ότι η υποκατάσταση ενός μικρού κλάσματος από την συνολική κατανάλωση με εναλλακτικής μορφής καύσιμα (βιοκαύσιμα), θα έχει σημαντικό αντίκτυπο στην οικονομία και στο περιβάλλον (Barnwal et al., 2004).

Η χρήση των βιοκαυσίμων για την παραγωγή ενέργειας είναι μόνο μία μορφή ανανεώσιμης πηγής ενέργειας, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μειωθούν τα ορυκτά καύσιμα. Όπως με κάθε άλλη μορφή ενέργειας υπάρχουν και εδώ περιορισμοί στη χρήση και στην εφαρμοσιμότητα των βιοκαυσίμων τα οποία πρέπει να ανταγωνιστούν όχι μόνο τα ορυκτά καύσιμα, αλλά και άλλες ανανεώσιμες πηγές ενέργειας όπως είναι η αιολική, η ηλιακή και η υδροηλεκτρική (McKendry, 2002).

Σήμερα η παγκόσμια κατανάλωση ενέργειας φθάνει περίπου τα 400 EJ (Exajoule= 1.055×10^{18} joules ή 10^{15} BTU) και καλύπτεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό από τη χρήση ορυκτών καυσίμων. Βάση διεθνών συμφωνιών και οδηγιών προτείνεται όπως μέχρι το 2010 το 5 % της ενέργειας καυσίμων να αντικατασταθεί από ενέργεια βιοκαυσίμων, ενώ μέχρι το 2025 το ποσοστό αυτό πρέπει να φθάσει στο

25 %. Με τα πιο αισιόδοξα σενάρια για παραγωγή ενέργειας από βιομάζα υπολογίζεται ότι κατά τη διάρκεια του τρέχοντος αιώνα αυτή μπορεί να φθάσει στα 400 EJ, δηλαδή στις σημερινές παγκόσμιες απαιτήσεις. Σύμφωνα με αυτά τα σενάρια, η συμβολή των διαφόρων πηγών βιομάζας μπορεί να είναι: 200 EJ από τις εν χρήσει καλλιεργούμενες γεωργικές εκτάσεις με αύξηση της παραγωγής μέσω βελτίωσης των καλλιεργητικών τεχνικών, από μη χρησιμοποιούμενες μέχρι τώρα εκτάσεις (100 EJ) και από υπολείμματα γεωργικών και δασικών προϊόντων, οργανικά υπολείμματα κ.α., (100EJ) (Φεγγερός, 2008).

Η υλοποίηση ενός τέτοιου σεναρίου προϋποθέτει ότι θα ξεπεραστούν πολλά προβλήματα που ανακύπτουν από πολλούς και αλληλοεξαρτώμενους παράγοντες όπως ο διαφαινόμενος ανταγωνισμός μεταξύ βιομηχανιών τροφίμων, ζωοτροφών και βιοκαυσίμων ή και άλλων βιομηχανιών που χρησιμοποιούν γεωργικά και δασικά προϊόντα ή υποπροϊόντα. Η μέχρι τώρα εμπειρία έδειξε ότι η ζήτηση π.χ. δημητριακών καρπών ήταν μεγαλύτερη από την παραγωγή με συνέπεια των περιορισμό των αποθεμάτων και την αύξηση των τιμών. Κατά τον Rosegrant (2008) η χρήση των δημητριακών καρπών, των ελαιούχων σπερμάτων και των σακχαρούχων υλών (π.χ. σακχαρότευτλα) για παραγωγή βιοκαυσίμων συνέβαλε κατά 30 % στην παγκόσμια αύξηση των τιμών των τροφίμων. 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 %, θα διογκώσει το πρόβλημα εκτός αν εν τω μεταξύ βελτιωθούν οι καλλιεργητικές πρακτικές και οδηγήσουν σε αύξηση της παραγωγής πρώτων υλών από τις ήδη καλλιεργούμενες εκτάσεις ή αν προστεθούν νέες εκτάσεις για καλλιέργεια. Στην τελευταία περίπτωση, οι νέες εκτάσεις υπολογίζεται πως θα εξευρεθούν κυρίως σε αναπτυσσόμενες περιοχές της Λατινικής Αμερικής, της Αφρικής, της Ασίας και της Ανατολικής Ευρώπης, ενώ θα πρέπει να συνδυάζεται η αειφορική ανάπτυξη με την κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη των πληθυσμών των εκτάσεων ενδιαφέροντος (Φεγγερός, 2008).

1.1.1 Βιομάζα και παραγωγή υγρών καυσίμων

Τα υγρά καύσιμα τα οποία παράγονται από την βιομάζα ονομάζονται βιοκαύσιμα. Για την παραγωγή τους χρησιμοποιείται βιομάζα που είναι 1) πλούσια σε έλαια τα οποία, αφού απομονωθούν από την πρώτη ύλη, μετατρέπονται με

εστεροποίηση σε βιοντίζελ, 2) πλούσια σε ευζύμωτους υδατάνθρακες (σάκχαρα-άμυλο) οι οποίοι μετατρέπονται ενζυμικά σε C5 ή C6 σάκχαρα και τα τελευταία ζυμώνονται με τη βοήθεια ειδικών ζυμών για παραγωγή βιοαιθανόλης και 3) πλούσια σε ινώδεις ουσίες (ημικυτταρίνες, κυτταρίνες) που με κατάλληλη διεργασία μπορούν να οδηγήσουν σε παραγωγή είτε βιοντίζελ, είτε βιοαιθανόλης. Τα βιοκαύσιμα των περιπτώσεων 1 και 2 αναφέρονται ως βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς, ενώ αυτά της περίπτωσης 3 ως βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς. Η πρώτη ύλη για την παραγωγή των βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς είναι, για μεν την παραγωγή βιοντίζελ τα διάφορα ελαιούχα σπέρματα, με κυρίαρχα αυτά της ελαιοκράμβης 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).

1.1.2 Κρίσιμα σημεία παραγωγής βιομάζας για ενέργεια

- Ανταγωνισμός για 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 συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων από τις έμμεσες χρήσεις της γης (Dorpenberg και van Der Aar, 2007).

1.2 Βιοντίζελ

Τα φυτικά έλαια συνήθως περιέχουν ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, στερόλες, νερό, οσμές και άλλες ακαθαρσίες. Λόγω των παραπάνω, τα έλαια δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμα αμέσως. Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα τα έλαια χρειάζονται μία μικρή χημική τροποποίηση, κυρίως τρανς-εστεροποίηση, πυρόλυση και γαλακτωματοποίηση. Ανάμεσα σε αυτές τις τρεις μεθόδους, η τρανς-εστεροποίηση αποτελεί το κλειδί και το πλέον σημαντικό βήμα για

να παραχθεί καθαρότερο αλλά και περιβαλλοντολογικά ασφαλέστερο καύσιμο από τα φυτικά έλαια (Meher et al., 2006).

Το βιοντίζελ, το οποίο θεωρείται ως ένα πιθανό υποκατάστατο των συμβατικών καυσίμων συνήθως αποτελείται από μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, οι οποίοι μπορούν να παραχθούν από τα τριγλυκερίδια των φυτικών ελαίων μέσω της διαδικασίας της τρανς-εστεροποίησης με μεθανόλη. Ως αποτέλεσμα το βιοντίζελ το οποίο παράγεται έχει πάρα πολλές ομοιότητες με τα συμβατικά καύσιμα όσο αφορά τα κυριότερα χαρακτηριστικά του (Meher et al., 2006).

Ένα αιώνα πριν, ο Rudolf Diesel έθεσε υπό δοκιμασία τα φυτικά έλαια ως καύσιμα για τον κινητήρα του. Με το πλεονέκτημα των φθηνών ορυκτών καυσίμων και την ανάπτυξη της χημικής βιομηχανίας, οι μηχανές εσωτερικής καύσης καθώς και τα καύσιμα τα οποία χρησιμοποιούσαν αναπτύχθηκαν παράλληλα. Κατά τις δεκαετίες 1930 και 1940 τα φυτικά έλαια χρησιμοποιούνταν ως καύσιμα για κινητήρες κατά διαστήματα, συνήθως μόνο σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης. Στη σημερινή εποχή λόγω της συνεχώς αυξανόμενης τιμής των ορυκτών καυσίμων, την εξάντληση των αποθεμάτων τους, καθώς και το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για το περιβάλλον έφεραν ξανά στο προσκήνιο τα φυτικά έλαια και τα ζωικά λίπη για την παραγωγή βιοντίζελ (Fangrui et al., 1999).

Τα λίπη και τα έλαια είναι κατά κύριο λόγο αδιάλυτα στο νερό, υδρόφοβες ουσίες στο βασίλειο των φυτών και των ζώων τα οποία αποτελούνται από ένα μόριο γλυκερόλης και τρία μόρια λιπαρών οξέων και συνήθως αναφέρονται ως τριγλυκερίδια. Τα λιπαρά οξέα διαφέρουν ως προς το μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας καθώς και στον αριθμό των διπλών δεσμών που περιέχουν. Τα λιπαρά οξέα τα οποία βρίσκονται στα φυτικά έλαια συνοψίζονται στον πίνακα 1.1 (Fangrui et al., 1999).

Πίνακας 1.1 Σύνθεση λιπαρών οξέων (% κατά βάρος), οξύτητα, φωσφόρος (P) και αριθμός υπεροξειδίων διαφόρων φυτικών ελαίων.

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	57.51	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
Φυστίκια	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
Ηλίανθος	6.08	3.26	0.00	0.00	0.00	16.93	0.00	73.73	0.00	0.15	15	10.7

Πηγή: (Marchetti et al., 2007)

Παρόλο που το βιοντίζελ δεν μπορεί εξ' ολοκλήρου να αντικαταστήσει τα ορυκτά καύσιμα, υπάρχουν τουλάχιστον πέντε λόγοι οι οποίοι αιτιολογούν την ανάπτυξή του:

- I. Παρέχει μία αγορά ικανή να απορροφήσει την παραγωγή των φυτικών ελαίων και των ζωικών λιπών.
- II. Μειώνει, μολονότι δεν εξαλείφει την εξάρτηση των χωρών από τα ορυκτά καύσιμα.
- III. Το βιοντίζελ είναι ανανεώσιμο και δεν συνεισφέρει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου λόγω του κλειστού κύκλου του άνθρακα.
- IV. Οι εκπομπές μονοξειδίου του άνθρακα, άκαυστων υδρογονανθράκων και ξεχωριστών σωματιδίων από το βιοντίζελ είναι χαμηλότερες σε σχέση με τα συμβατικά καύσιμα. Δυστυχώς οι περισσότερες δοκιμές εκπομπών έδειξαν μία μικρή αύξηση στα οξείδια του αζώτου (NO_x).
- V. Όταν προστίθεται σε ένα κανονικό καύσιμο κινητήρα σε ποσότητα ίση με 1 έως 2 %, μπορεί να μετατρέψει ένα καύσιμο με χαμηλές λιπαντικές ιδιότητες, σε ένα αποδεκτό καύσιμο (Van Gerpen, 2005).

1.2.1 Τρανς-εστεροποίηση

Η τρανς-εστεροποίηση ή αλκοόλιση είναι ο εκτοπισμός μίας αλκοόλης από ένα εστέρα με μία διαδικασία η οποία είναι όμοια με αυτή της υδρόλυσης, με τη μόνη

διαφορά ότι χρησιμοποιείται μία αλκοόλη αντί για νερό. Αυτή η διαδικασία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για να μειωθεί ο υψηλός συντελεστής ιξώδους των γλυκεριδίων. Εάν χρησιμοποιείται μεθανόλη σε αυτή τη διαδικασία τότε αυτή ονομάζεται μεθανόλυση (Meher et al., 2006).

Η τρανς-εστεροποίηση είναι μία αμφίδρομη αντίδραση και προχωρά ουσιαστικά αναμιγνύοντας τα χημικά αντιδραστήρια. Παρόλα αυτά, η παρουσία ενός καταλύτη (μίας ισχυρής βάσης ή οξέως, λιπάσης) επιταχύνει την μετατροπή (Meher et al., 2006).

Μία σύνοψη των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων των χρησιμοποιούμενων τεχνολογιών για την παραγωγή βιοντίζελ παραθέτονται στον πίνακα 1.2 (Meher et al., 2006).

Πίνακας 1.2 Σύγκριση των διάφορων τεχνολογιών για την παραγωγή βιοντίζελ.

Μεταβλητή	Κατάλυση με βάση	Κατάλυση με λιπάση	Υπερκρίσιμη αλκοόλη	Κατάλυση με οξύ
Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	60 - 70	30 - 40	239 - 385	55 – 80
Ελεύθερα λιπαρά οξέα στις πρώτες ύλες	Προϊόντα σαπωνοποίησης	Μεθυλεστέρες	Εστέρες	Εστέρες
Νερό στις πρώτες ύλες	Ανάμειξη στην αντίδραση	Καμία επίδραση	-	Ανάμειξη στην αντίδραση
Απόδοση των μεθυλεστέρων	Κανονική	Υψηλή	Καλή	Κανονική
Ανάκτηση της γλυκερόλης	Δύσκολη	Εύκολη	-	Δύσκολη
Κάθαρση των μεθυλεστέρων	Επαναλαμβανόμενες πλύσεις	Καμία	-	Επαναλαμβανόμενες πλύσεις
Κόστος παραγωγής του καταλύτη	Φθηνό	Σχετικά ακριβό	Ενδιάμεσο	Φθηνό

Πηγή: (Marchetti et al., 2007)

1.2.2 Μεταβλητές που επηρεάζουν την αντίδραση της τρανς-εστεροποίησης.

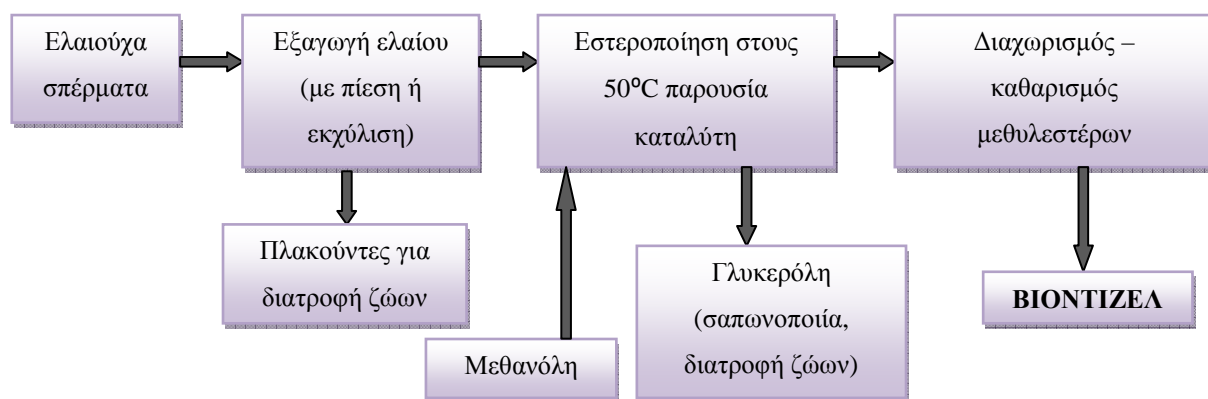
- Επίδραση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και τις υγρασίας.
- Τύπος καταλύτη που θα χρησιμοποιηθεί και συγκέντρωση.
- Μοριακή αναλογία αλκοόλης προς έλαιο και τύπος της αλκοόλης.
- Επίδραση του χρόνου της αντίδρασης και της θερμοκρασίας.

- Ένταση της διαδικασίας ανάμιξης.
- Επίδραση της χρησιμοποίησης οργανικών συν-διαλυτών (Meher et al., 2006).

1.2.3 Παραγωγή βιοντίζελ

Για την παραγωγή βιοντίζελ όπως έχει αναφερθεί, χρησιμοποιείται βιομάζα πλούσια σε λίπη και έλαια όπως είναι τα διάφορα ελαιούχα σπέρματα, τα ζωικά λίπη ή τα χρησιμοποιηθέντα λίπη και έλαια ή διάφορα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά όπως είναι το άχυρο, το ξύλο, κ.α.. Στην πρώτη περίπτωση το παραγόμενο βιοντίζελ ονομάζεται βιοντίζελ πρώτης γενιάς και στη δεύτερη, δεύτερης γενιάς. Συνοπτικά, η παραγωγική διαδικασία σε κάθε περίπτωση δίνεται στα διαγράμματα 1 και 2. Από τα στοιχεία του διαγράμματος 1 διαπιστώνεται ότι κατά την παραγωγή βιοντίζελ από ελαιούχα σπέρματα παράγονται, εκτός από το κύριο προϊόν που είναι το βιοντίζελ, διάφορα υποπροϊόντα όπως είναι οι διάφοροι πλακούντες σπερμάτων ή άλευρα εκχυλισθέντων σπερμάτων και η γλυκερόλη μαζί με ένα μεγάλο μέρος της μεθανόλης που προστίθεται για την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων του παραληφθέντος από τα σπέρματα λίπος (Φεγγερός, 2008).

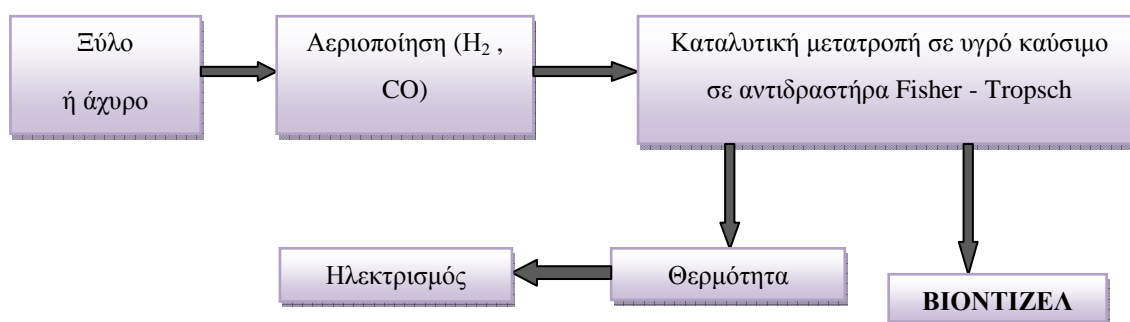
Η μεθανόλη, ως τοξική ουσία για τους ζωικούς οργανισμούς, θα πρέπει να απομακρύνεται από τη γλυκερόλη (Φεγγερός, 2008).



Διάγραμμα 1. Παραγωγή βιοντίζελ από ελαιούχα υλικά (με εστεροποίηση των ελαίων) (Φεγγερός, 2008).

Από τα στοιχεία του διαγράμματος 2 διαπιστώνεται ότι με χρήση λιγνινοκυτταρινούχων υλικών για παραγωγή βιοντίζελ δεν παράγεται κάποιο

υποπροϊόν που να ενδιαφέρει την διατροφή των ζώων (Φεγγερός, 2008).



Διάγραμμα 2. Παραγωγή βιοντίζελ από κυτταρινούχο βιομάζα με διαδικασία Fisher – Tropsch (Φεγγερός, 2008).

1.2.4 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, κλπ. Τα υποπροϊόντα που παράγονται και μπορούν να αξιοποιηθούν στη διατροφή των ζώων είναι τα εκχυλισθέντα άλευρα ή οι πλακούντες των αντίστοιχων σπερμάτων, ανάλογα με την μέθοδο παραλαβής του ελαίου (εκχύλιση ή πίεση) και η γλυκερόλη. Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 2006 η παραγωγή βιοντίζελ ανήλθε στους 4.890.000 τόνους (στην Ελλάδα στους 42.000 τόνους) με κυρίαρχη πρώτη ύλη τα σπέρματα ελαιοκράμβης, ακολουθούμενη από αυτή του ηλίανθου (Φεγγερός, 2008).

1.2.5 Βιοαιθανόλη

Η χρήση της βιοαιθανόλης στην Ευρωπαϊκή Ένωση θα γνωρίσει αξιοσημείωτη αύξηση. Η ευρωπαϊκή παραγωγή βιοαιθανόλης, θα χρειαστεί να καλύψει τη ζήτηση αυτή για να αποφευχθεί η μη πραγματοποίηση των στόχων και η εξάρτηση της Ευρώπης από τις εισαγωγές. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση τα δημητριακά θα χρησιμοποιηθούν ως η κύρια πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης, όπως ακόμα και η ζάχαρη ή ουσίες που περιέχουν ζάχαρη. Ως αποτέλεσμα, τα υποπροϊόντα αραβοσίτου από τη διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης με ξηρή άλεση θα διατεθούν στην αγορά σε αξιοσημείωτες ποσότητες. Ειδικά τα υποπροϊόντα αραβοσίτου από τη διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης με ξηρή άλεση αποκτούν ενδιαφέρον ως πηγή πρωτεΐνης. Σε παγκόσμια κλίμακα αναμένεται μία μεγάλη αύξηση στην παραγωγή

ζωικών προϊόντων για να καλυφθεί η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για πρωτεΐνη από τον ανθρώπινο πληθυσμό ο οποίος αναμένεται να αυξηθεί με μεγαλύτερο ρυθμό (Dorpenberg και van Der Aar, 2007).

Η βιοαιθανόλη ορίζεται ως η αιθανόλη η οποία παράγεται από τη βιολογική ζύμωση της βιομάζας (σιτηρά, σακχαροκάλαμο κ.α.). Εκτός από τη χρήση για διατροφικούς ή βιομηχανικούς σκοπούς, περίπου τα τρία τέταρτα της βιοαιθανόλης χρησιμοποιούνται ως καύσιμα. Τα κύρια πλεονεκτήματα της βιοαιθανόλης ως καύσιμο είναι η μείωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα, μειωμένες εκπομπές υδρογονανθράκων και μονοξειδίου του άνθρακα (Dorpenberg και van Der Aar, 2007).

Η βιοαιθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας ως πρόσθετο καυσίμων. Ο κανονισμός της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα καύσιμα αυτοκινήτων επιτρέπει τη χρήση μέχρι 5 % των κανονικών καυσίμων κατά όγκο. Επιπλέον, στα λεγόμενα «ελαστικά» καύσιμα είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί αιθανόλη στη βενζίνη με αναλογία της τάξης του 5 % έως 85 % κ.ό. (Dorpenberg και van Der Aar, 2007).

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. Φαίνεται ότι η χρήση των δημητριακών είναι πιο ανταγωνιστική από τη χρήση σακχαροτεύτλων στην Ευρωπαϊκή Ένωση, όμως οι περιβαλλοντολογικές συνθήκες κάθε περιοχής καθώς και η διαθεσιμότητα πρώτων υλών θα παίξουν πολύ σημαντικό ρόλο στο μέλλον (Dorpenberg και van Der Aar, 2007).

Το 2005 περίπου 36 εκατομμύρια τόνοι βιοαιθανόλης παράχθηκαν παγκοσμίως. Σε σύγκριση με τα παραπάνω, η ετήσια παραγωγή της Ευρωπαϊκής Ένωσης 0.4 εκατομμύρια τόνοι περίπου το 2004 και 0.7 εκατομμύρια τόνοι το 2005 είναι πολλή μικρή. Παρόλα αυτά προβλέπεται αξιοσημείωτη αύξηση. Βασιζόμενη στους στόχους της Ευρωπαϊκής οδηγίας για την παραγωγή βιοενεργών καυσίμων σε ποσοστό 5,75 % το 2010, καθώς και την πρόβλεψη για την κατανάλωση καυσίμων για εκείνη την περίοδο, οι αντίστοιχες ανάγκες για αιθανόλη υπολογίζονται περίπου σε λίγο παραπάνω από 8 εκατομμύρια τόνους. Λαμβάνοντας υπόψη ότι για να παραχθεί ένας τόνος αιθανόλης χρειάζονται περίπου τρεις τόνοι σιτηρών, οι απαιτήσεις για την παραγωγή βιοαιθανόλης θα χρειαστούν περίπου 24 εκατομμύρια τόνους σιτηρών κάθε χρόνο, δηλαδή περίπου το 8 έως 10 % της συνολικής παραγωγής σιτηρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Dorpenberg και van Der Aar, 2007).

1.2.6 Παραγωγή βιοαιθανόλης

Η βιοαιθανόλη όπως έχει αναφερθεί, μπορεί να παραχθεί από βιομάζα που είναι πλούσια σε σάκχαρα, όπως είναι το σακχαροκάλαμο και τα σακχαρότευτλα ή από βιομάζα που είναι πλούσια σε άμυλο (δημητριακοί καρποί, πατάτα, κλπ.) αφού πρώτα διασπασθεί το άμυλο σε σάκχαρα (Φεγγερός, 2008).

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, και η παραγόμενη βιοαιθανόλη αναφέρεται ως βιοκαύσιμο πρώτης γενιάς. Τελευταία διερευνάται η δυνατότητα παραγωγής βιοαιθανόλης (δεύτερης γενιάς) από κυτταρινούχο βιομάζα (άχυρο, ξύλο, κλπ.), είτε με όξινη υδρόλυση της κυτταρίνης είτε με ενζυμική υδρόλυση αυτής με σκοπό την παραγωγή σακχάρων που στη συνέχεια θα ζυμωθούν για παραγωγή βιοαιθανόλης (Φεγγερός, 2008).

Με 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 Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής χρησιμοποιείται, σχεδόν αποκλειστικά, ο καρπός αραβοσίτου, ενώ στις χώρες της Ευρώπης ο καρπός σίτου. Ως παραγωγική διαδικασία μπορεί να εφαρμόζεται αυτή της υγρής ή της ξηρής άλεσης. Η πρώτη είναι παλαιά μέθοδος και αναφερόταν ως μέθοδος οινοπνευματοποιίας δημητριακών καρπών. Η δεύτερη είναι σχετικά πρόσφατη διαδικασία και είναι αυτή που εφαρμόζεται σήμερα από τις περισσότερες βιομηχανίες (Φεγγερός, 2008).

1.2.7 Υποπροϊόντα παραγωγής βιοαιθανόλης στη διατροφή των ζώων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η βιοαιθανόλη πρώτης γενιάς παράγεται από σακχαρούχα ή αμυλούχα υλικά. Στην πρώτη περίπτωση, ως κύρια σακχαρούχα υλικά χρησιμοποιούνται το σακχαροκάλαμο και τα σακχαρότευτλα και μόνο όταν χρησιμοποιούνται τα σακχαρότευτλα παράγονται ως υποπροϊόν, τα στέμφυλα σακχαροτεύτων με ενδιαφέρον για τη διατροφή των ζώων. Στη δεύτερη περίπτωση, ως κύρια αμυλούχα υλικά χρησιμοποιούνται οι δημητριακοί καρποί, με κυρίαρχο τον καρπό αραβοσίτου. Η παραγωγική διαδικασία που εφαρμόζεται για παραγωγή βιοαιθανόλης από αραβόσιτο είναι αυτή της υγρής ή ξηρής άλεσης. Η διαδικασία της

υγρής άλεσης είναι πολύ παλιά και αναφέρεται ως παραγωγική διαδικασία οينوπνευματοποιίας για παραγωγή αλκοόλης με παράλληλη παραγωγή πιθανών υποπροϊόντων όπως τα έμβρυα αραβοσίτου, το αραβοσιτέλαιο (αν εκχυλισθούν τα έμβρυα), στέμφυλα οينوπνευματοποιίας, 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 (ΑΔΣΚ), (Φεγγερός, 2008).

1.2.8 Άλλα παράγωγα από την παραγωγή βιοκαυσίμων

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 προέλευσή 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 κρίσιμη ύλη για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Από την παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς μπορεί να παράγονται διάφορα χημικά όπως είναι το οξικό οξύ ή και αρωματικές αλδεΐδες και η λιγνίνη που ως καύσιμη ύλη στη συνέχεια χρησιμοποιείται για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Στον πίνακα 1.3 δίνονται, ενδεικτικά, διάφορα παράγωγα, από βιομηχανίες παραγωγής βιοκαυσίμων καθώς και η ποσοτική τους σχέση με το παραγόμενο βιοκαύσιμο ή την χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη (Φεγγερός, 2008).

Πίνακας 1.3 Παράγωγα βιομηχανιών βιοκαυσίμων.

Βιοκαύσιμο	Πρώτη ύλη / διαδικασία	Παραγόμενο υποπροϊόν	Ποσότητες
Βιοντίζελ	Σπέρματα π.χ. ελαιοκράμβης (με εστεροποίηση)	Άχυρο Άλευρο Γλυκερόλη	2,78 τόνοι/τόνο βιοντίζελ 1,58 τόνοι/τόνο βιοντίζελ 0,1 τόνοι/τόνο βιοντίζελ
Βιοιθανόλη	Όξινη υδρόλυση αχύρου	Ηλεκρισμός Τέφρα Οξικό οξύ	1,829 GJ/τόνο βιοιθανόλης 0,384 τόνοι/τόνο βιοιθανόλης 0,115 τόνοι/τόνο βιοιθανόλης
Βιοιθανόλη	Καρπός σίτου	Άχυρο Πίτυρα Στερεά συστατικά	18,54 τόνοι/τόνο βιοιθανόλης 0,12 τόνοι/τόνο βιοιθανόλης 1,51 τόνοι/τόνο βιοιθανόλης
Βιοιθανόλη	Καρπός αραβοσίτου (υγρή άλεση)	Αραβοσιτέλαιο Κτην/κή γλουτένη Γλουτένη	1,89 Kg/GJ αραβοσίτου 12,85 Kg/GJ αραβοσίτου 3,07 Kg/GJ αραβοσίτου
Βιοιθανόλη	Σακχαροκάλαμο	Ηλεκτρισμός	100 kWh/τόνο σακχ/μου
Βιοιθανόλη	Σακχαρότευτλα	Στέμφυλα Μελάσα	22,5 τόνοι/τόνο σακχ/των 0,75 τόνοι/τόνο σακχ/των

Πηγή:(Φεγγερός, 2008)

1.2.9 Παραγωγή βιοντίζελ στην Ευρωπαϊκή Ένωση

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση το βιοντίζελ είναι μέχρι τώρα το πιο σημαντικό βιοκαύσιμο και αντιπροσωπεύει το 82 % της συνολικής παραγωγής βιοκαυσίμων. Η παραγωγή του το 2003, στην Ευρωπαϊκή Ένωση των 25 μελών κρατών, ανήλθε σε 1.504.000 τόνους από εννέα χώρες όπως φαίνεται και στον πίνακα 1.4. Η Γερμανία ηγείται της παραγωγής του, ακολουθούμενη από την Γαλλία και την Ιταλία. Όλες αυτές οι χώρες αύξησαν την παραγωγή κατά τη διάρκεια του 2003, ποιο συγκεκριμένα στη Γερμανία και την Ιταλία η νομοθεσία είχε θετικό αντίκτυπο και ενθάρρυνε την παραγωγή βιοντίζελ. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, η Γερμανία παρήγαγε περίπου 715.000 τόνους το 2003, η Γαλλία 357.000 τόνους και η Ιταλία 273.000 τόνους. Η Ισπανία ηγείται της παραγωγής βιοιθανόλης στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Bozbas, 2008).

Η παραγωγή βιοντίζελ απαιτεί περίπου 1,4 εκατομμύρια εκτάρια καλλιεργήσιμης γης στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Υπάρχουν περίπου σαράντα φυτά στην Ευρωπαϊκή Ένωση για παραγωγή βιοντίζελ, ωστόσο, ο αριθμός τους καθώς και η

τεχνολογία που απαιτείται για την εκμετάλλευσή τους, θα αναπτυχθούν με ταχείς ρυθμούς. Τα φυτά τα οποία χρησιμοποιούνται βρίσκονται κυρίως στη Γερμανία, Ιταλία, Αυστρία, Τσεχία, Γαλλία και στη Σουηδία (Bozbas, 2008).

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, τα τελευταία χρόνια εστίασε την προσοχή της στην ανάπτυξη του τομέα των βιοκαυσίμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Τρεις νομοθετικές εντολές-οδηγίες εκδόθηκαν το 2003, οι οποίες αφορούσαν τη χρήση των βιοκαυσίμων, την φορολόγησή τους και την ποιότητά τους, και πρόσφατα έχουν γίνει αντικείμενο συζήτησης από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, για να κατευθύνουν τη γεωργία των κρατών-μελών προς ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (Schneper, 2006).

Πίνακας 1.4 Παραγωγή βιοντίζελ στην Ευρωπαϊκή Ένωση των 25 κρατών μελών (σε τόνους).

Χώρα	2002	2003	2004
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
Ηνωμένο 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 (25 κράτη μέλη)	1.133.800	1.504.000	2.296.200

Πηγή:(Bozbas, 2008)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι χώρες της Ανατολικής Ευρώπης εκφράζουν ένα ειδικό ενδιαφέρον όσο αναφορά τα βιοκαύσιμα, λόγω κυρίως της διαθεσιμότητάς τους σε γη, της υπάρχουσας γεωργικής παραγωγικής εμπειρίας και της παράδοσής τους. Οι χώρες αυτές διαθέτουν όλες τις δυνατότητες για να παράγουν βιοκαύσιμα και να συνεισφέρουν στην συνολική παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοντίζελ της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στον πίνακα 1.5 παρουσιάζονται οι ελάχιστοι στόχοι

παραγωγής βιοκαυσίμων των χωρών αυτών για το έτος 2005 (Kondili et al., 2007).

Πίνακας 1.5 Στόχος παραγωγής βιοκαυσίμων των κρατών μελών της Ανατολικής Ευρώπης για το 2005.

Χώρα	Παραγωγή βιοκαυσίμων για το 2005
Τσεχία	3.7 (2006)
Εσθονία	0
Ουγγαρία	0.4 – 0.6
Λεττονία	2
Λιθουανία	2
Πολωνία	0.5
Σλοβακία	2
Σλοβενία	3

Πηγή:(Kondili et al., 2007)

Το κόστος παραγωγής των βιοκαυσίμων διαφέρει και εξαρτάται από τις τιμές των πρώτων υλών, τη μέθοδο παραγωγής, το βαθμό ραφινάρισματος που έχει γίνει και τη συμπληρωματική χρήση των υποπροϊόντων και των αποβλήτων. Τα κόστη ποικίλουν και εξαρτώνται από τους διαφορετικούς συνδυασμούς των πρώτων υλών τροφοδοσίας και τη χώρα παραγωγής. Για να είναι κερδοφόρα τα βιοκαύσιμα, πρέπει η τιμή τους να καλύπτει την παραγωγή καθώς και το κόστος διανομής τους. Ακόμα πρέπει η τιμή τους να είναι ανταγωνιστική ως προς την τιμή των συμβατικών καυσίμων (Ryan et al., 2006).

1.3 Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη ή γλυκερίνη παράγεται κατά τη διαδικασία της τρανς-εστεροποίησης, από έλαια ή ζωικά λίπη τα οποία μετατρέπονται σε βιοντίζελ. Τα έλαια, προέρχονται κυρίως από φυτά όπως είναι η κανόλα, ο ηλίανθος, το κάρδαμο, η σόγια και ο αραβόσιτος. Η απόδοση σε γλυκερόλη αντιστοιχεί περίπου στο 10 % του παραγόμενου βιοντίζελ. Δηλαδή εκατό λίτρα ελαίων ή λιπών παράγουν κατά προσέγγιση εκατό λίτρα βιοντίζελ και δέκα λίτρα γλυκερόλης. Εναλλακτικά προτείνεται ότι, σύμφωνα με τις δυνατότητες διύλισης των βιομηχανιών παραγωγής βιοντίζελ, για κάθε λίτρο παραγόμενου βιοντίζελ παράγονται 79 γραμμάρια

ακατέργαστης γλυκερόλης ως υποπροϊόν. Υπολογίζεται ότι μέχρι το 2010 η παραγόμενη ποσότητα γλυκερόλης θα ξεπεράσει το ένα εκατομμύριο τόνους, ως απόρροια της αύξησης της παραγωγής βιοκαυσίμων (Pluske, 2007).

Η σύσταση της γλυκερόλης σχετίζεται με την καθαρότητά της και ποικίλει ανάλογα με τη βιομηχανία προέλευσης και την προέλευση του χρησιμοποιούμενου λίπους ή ελαίου. Στον πίνακα 1.6 δίνεται ενδεικτικά η σύσταση ανάλογα με την προέλευση της πρώτης ύλης, από την οποία φαίνεται ότι το ενεργειακό περιεχόμενο από ανακυκλωμένα λίπη είναι πολύ υψηλότερο λόγω του ότι υπάρχει μεγάλο ποσοστό λίπους στο υποπροϊόν (Φεγγερός, 2008).

Η ακατέργαστη γλυκερόλη περιέχει ένα ποσοστό γλυκερόλης το οποίο βρίσκεται μεταξύ του 75 έως 85 % και πρέπει να επεξεργαστεί περαιτέρω για να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων. Η καθαρή μορφή πρέπει να περιέχει γλυκερόλη σε ποσοστό από 95 έως 99 % (Pluske, 2007).

Πίνακας 1.6 Χημική ανάλυση γλυκερόλης από βιομηχανίες βιοντίζελ.

Πρώτη ύλη				
Συστατικό	Ελαιοκράμβη	Κανόλα	Σπέρματα σόγιας	Ανακυκλωμένα έλαια
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 (ppm)	1.1	1.1	1.2	1.4
S (ppm)	21	14	-	19
Ενέργεια (MJ/Kg)	16.30	17.50	15.80	27.20

Πηγή: (Thompson και He, 2006)

Στις Η.Π.Α., αλλά και στην Ευρώπη (κυρίως στη Γερμανία) επιδιώκεται να τυποποιηθούν οι παραγόμενοι τύποι γλυκερόλης σε κοινό με γλυκερόλη τουλάχιστον

80 % και σε καθαρό με γλυκερόλη 99 % όπως φαίνεται και στον πίνακα 1.7. Σε κάθε περίπτωση το υπόλοιπο ποσοστό μπορεί να αποτελείται από νερό, τέφρα, και μεθανόλη, με την τελευταία να βρίσκεται το πολύ μέχρι 0,5 % στον κοινό τύπο και 0,1 % στον καθαρό. Παράδειγμα τέτοιων τύπων γλυκερόλης δίνεται στον πίνακα 1.8. Η σύσταση του υποπροϊόντος όπως βγαίνει από τη διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό, μεθανόλη και ανόργανα στοιχεία μεταξύ των οποίων κυριαρχούν το Κάλιο ή το Νάτριο, 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 (Φεγγερός, 2008).

Πίνακας 1.7 Προδιαγραφές σταθερών τύπων γλυκερόλης στη Γερμανία.

Συστατικό	Γλυκερόλη 100	Γλυκερόλη 80
Γλυκερόλη	Min. 99 %	Min. 80 %
Υγρασία	0.5 – 1.0 %	10 – 15 %
Τέφρα	Max. 1.0 %	Max. 10 %
Μεθανόλη	0 %	Max. 0.5 %
Άλλα	-	NaCl, K, P, S

Πηγή: (Φεγγερός, 2008)

Πίνακας 1.8 Χημική ανάλυση γλυκερόλης από βιομηχανίες βιοντίζελ ανάλογα με το βαθμό καθαρότητας.

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

Πηγή: (Sudekum et al., 2007)

1.3.1 Η γλυκερόλη στη διατροφή αγροτικών ζώων

Διυλίζοντας τη γλυκερόλη σε μία ποιο καθαρή χημική ουσία, ίσως αυξηθεί η χρήση της, όμως το κόστος της θα αυξηθεί και δεν θα συμφέρει η χρησιμοποίησή της από οικονομικής πλευράς στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων. Έχει αναφερθεί ότι η χρησιμοποίηση 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 την απορρόφησή της και πρέπει να διερευνηθούν πριν τεθεί σε εφαρμογή ένα πρόγραμμα διατροφής με γλυκερόλη. Οι Thomson και He (2006), διενήργησαν αναλυτικές εξετάσεις στην ακατέργαστη γλυκερόλη η οποία παράχθηκε κατά τη διαδικασία παραγωγής βιοκαυσίμων από διάφορες πρώτες ύλες (σόγια, ελαιοκράμβη, κανόλα, φυτικά έλαια κ.α.). 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. Επίσης η γλυκερόλη περιέχει διάφορα ιχνοστοιχεία. Η συγκέντρωση των ιχνοστοιχείων εξαρτάται κυρίως από την πρώτη ύλη από την οποία παράγεται (Pluske, 2007).

1.3.2 Αντιδιαιτιτικοί παράγοντες της γλυκερόλης

Σύμφωνα με τους Dorpenberg και Van Der Aar (2007), η κύρια ανησυχία από τη χρησιμοποίηση ακατέργαστης γλυκερόλης (τύπου 80 %), είναι η περιεκτικότητά της σε μεθανόλη η οποία παραμένει ως κατάλοιπο μετά την επεξεργασία της (έως 0,5 %). Η μεθανόλη έχει χαμηλό βαθμό εξάτμισης (65⁰ C), κατά συνέπεια θα χαθεί κατά τη διάρκεια παραγωγής συμπύκτων και ίσως προκληθεί ατύχημα στο εργοστάσιο (Dorpenberg και Van Der Aar, 2007).

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

1.3.3 Η γλυκερόλη στα σιτηρέσια των χοίρων

Στα μέσα της δεκαετίας του 1990, αρκετές μελέτες ανέφεραν λεπτομερώς τα πλεονεκτήματα από τη χρήση της γλυκερόλης στα σιτηρέσια των χοίρων. Ωστόσο, μετά την πρόσφατη και δραματική αύξηση της παραγωγής βιοντίζελ, αυξήθηκε σημαντικά και η παραγωγή της γλυκερόλης και έτσι άρχισε να ερευνάται περισσότερο η χρήση της και η αποτελεσματικότητά της στη διατροφή των χοίρων.

Η συμμετοχή της γλυκερόλης σε διάφορα ποσοστά στα σιτηρέσια των χοίρων διερευνήθηκε κυρίως προς την κατεύθυνση της αντικατάστασης δημητριακών καρπών. Οι Kijora et al., (1996) διενήργησαν δύο πειράματα. Στο πρώτο πείραμα αντικαταστάθηκε η κριθή σε ποσοστό 5 % και 10 % αντίστοιχα από γλυκερόλη. Στο δεύτερο πείραμα αντικαταστάθηκε η κριθή σε ποσοστό 5, 10, 20 και 30 % αντίστοιχα από γλυκερόλη. Παρατηρήθηκε ότι οι ομάδες που διατράφηκαν με 5 % και 10 % γλυκερόλη, είχαν μεγαλύτερη αύξηση σωματικού βάρους. Αυτό αποδόθηκε κυρίως στη γλυκιά γεύση που προσδίδει η γλυκερόλη στο σιτηρέσιο καθώς και στην καλύτερη υφή την οποία είχαν τα σιτηρέσια αυτά. Κατά συνέπεια, η μεγαλύτερη κατανάλωση τροφής των ομάδων αυτών μπορεί να αποδοθεί κυρίως σε αυτόν τον παράγοντα. Η ομάδα όμως η οποία περιείχε 30 % γλυκερόλη παρουσίασε τη χαμηλότερη ανάπτυξη, όπως φαίνεται και στον πίνακα 1.9. Βρέθηκε επίσης ότι η

συμμετοχή της στα σιτηρέσια δεν διαφοροποίησε την απόδοση σε σφάγιο ή την ποιότητα του παραγόμενου κρέατος. Ακόμη δεν παρατηρήθηκαν παθολογικές αλλοιώσεις στους νεφρούς και στο ήπαρ. Συμπερασματικά αναφέρεται ότι ποσότητες γλυκερόλης έως 10 % συνιστώνται στα σιτηρέσια αναπτυσσόμενων-παχυνόμενων χοίρων (Kijora et al., 1996).

Η γλυκιά γεύση της γλυκερόλης αυξάνει την κατανάλωση τροφής και την ημερήσια αύξηση του σωματικού βάρους στους χοίρους και στις όρνιθες. Οι Dorpenberg και Van Der Aar (2007) πρότειναν ότι η μέγιστη ποσότητα της γλυκερόλης για χοίρους στο τελικό στάδιο πάχυνσης πρέπει να είναι έως 5 %. Άλλες μελέτες κάνουν λόγο για θετικά αποτελέσματα στην αύξηση σωματικού βάρους και σε ποσοστό χρησιμοποίησης 10 % στο τελικό στάδιο πάχυνσης (Dorpenberg και Van Der Aar, 2007).

Πίνακας 1.9 Η κατανάλωση ξηράς ουσίας, η ημερήσια αύξηση του σωματικού βάρους και ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής σε χοίρους οι οποίοι διατράφηκαν με γλυκερόλη σε διάφορα ποσοστά, σε δύο πειράματα.

	Κατανάλωση ξηράς ουσίας (Kg)	Ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους (Kg)	Συντελεστής εκμετάλλευσης τροφής
Πείραμα 1 (μέσο σωματικό βάρος: 32Kg)			
Μάρτυρας	1.98	0.631	3.14
5 % Γλυκερόλη	2.17	0.719	3.02
10 % Γλυκερόλη	2.23	0.745	2.99
Πείραμα 2 (μέσο σωματικό βάρος: 31.2Kg)			
Μάρτυρας	2.26	0.731	3.09
5 % Γλυκερόλη	2.44	0.770	3.17
10 % Γλυκερόλη	2.54	0.819	3.10
20 % Γλυκερόλη	2.32	0.704	3.30
30 % Γλυκερόλη	2.37	0.598	3.96

Πηγή: (Kijora et al., 1995)

Στους αναπτυσσόμενους-παχυνόμενους χοίρους έχει διαπιστωθεί ότι η γλυκερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέχρι 10 % στο σιτηρέσιό τους χωρίς αρνητικά, αλλά μάλλον θετικά, αποτελέσματα στα παραγωγικά χαρακτηριστικά (Groesbeck et al., 2008, Lammers et al., 2008). Ακόμη, 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.

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. Στην περίοδο της κυοφορίας και ιδιαίτερος στο τελευταίο στάδιό της, η γλυκερόλη λόγω της ταχείας απορρόφησής της και με την προϋπόθεση ότι περνά από τον πλακούντα θα μπορούσε να αποτελέσει μία άμεση ενεργειακή πηγή για τα κυοφορούμενα έμβρυα. Στην περίοδο της γαλακτοπαραγωγής η γλυκερόλη μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής γάλακτος και επιπλέον, η ιδιότητά 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. Οι υποθέσεις αυτές θα πρέπει να διερευνηθούν (Φεγγερός, 2008).

1.3.4 Πιθανές παρενέργειες της χρησιμοποίησης γλυκερόλης στα σιτηρέσια των χοίρων

Η γλυκερόλη απορροφάται σε ικανοποιητικό βαθμό από τον οργανισμό των χοίρων, σε υψηλές όμως συγκεντρώσεις ενδέχεται να μην απορροφάται πλήρως και να απομακρύνεται από τον οργανισμό του ζώου μέσω των ούρων. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στην έλλειψη παραγωγής του ενζύμου γλυκερινική κινάση σε ποσότητες ικανές ώστε να αξιοποιηθεί πλήρως όλη η ποσότητα της χορηγούμενης γλυκερόλης (Pluske, 2007).

Η γλυκερόλη λόγω του υψηλού ιξώδους της, το οποίο αυξάνει πολύ σε θερμοκρασίες κάτω των 18⁰ C, παρουσιάζει προβλήματα κατά την ανάμειξή της. Εκτός αυτού, σε μεγάλα ποσοστά συμμετοχής της 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, όπως φαίνεται και

από στοιχεία τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 1.10. Περισσότερο έντονη είναι η διαφοροποίηση που παρατηρείται στους χοίρους (Dorpenberg και Van Der Aar, 2007).

Πίνακας 1.10 Θρεπτική αξία γλυκερόλης για χοίρους, όρνιθες αυγοπαραγωγής και παχυνόμενα ορνίθια κρεατοπαραγωγής

Γλυκερόλη (% σιτηρεσίου)	Χοίροι (ΚΕ, Μj/Kg)		Όρνιθες (ΑΜΕ, Μj/Kg)		Ορνίθια (ΑΜΕ, Μj/Kg)	
	Γλυκερόλη (τύπου 100)	Γλυκερόλη (τύπου 80)	Γλυκερόλη (τύπου 100)	Γλυκερόλη (τύπου 80)	Γλυκερόλη (τύπου 100)	Γλυκερόλη (τύπου 80)
5	14.0	11.2	18.1	14.4	18.1	14.4
10	11.5	9.2	17.3	13.8	17.3	13.8
15	8.5	6.8	14.9	11.9	15.7	12.6

Πηγή: (Φεγγερός, 2008), ΑΜΕ = αληθινή μεταβολιστέα ενέργεια

1.3.5 Η γλυκερόλη στα σιτηρέσια των ορνίθων

Όπως αναφέρει ο Best (2006), η θεωρητική μεταβολιστέα ενέργεια της γλυκερόλης είναι 18,6 MJ/Kg. Όμως ο ίδιος ο συγγραφέας αναφέρει ότι στην πραγματικότητα δεν ξεπερνάει τα 17,5 MJ/Kg. Η γλυκερόλη εάν χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας μπορεί να οξειδωθεί και να αποδώσει ενέργεια (22 mol ATP/mol γλυκερόλης (Dorpenberg και Van Der Aar, 2007)).

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 κρεατοπαραγωγικού τύπου. Προτάθηκε 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 ότου φθάσουν το εμπορεύσιμο σωματικό βάρος, χωρίς να υπάρχουν παρενέργειες όσο αφορά στην κατανάλωση της τροφής (Pluske, 2007).

Στη διατροφή των ωοτόκων ορνιθίων και των παχυνόμενων ορνιθίων η γλυκερόλη έχει χρησιμοποιηθεί σε ποσοστά μέχρι 20 % του σιτηρεσίου τους. Τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνεται να επιτυγχάνονται σε ποσοστά μεταξύ 5 και 10 % τόσο στην αυγοπαραγωγή όσο και στην πάχυνση. Ποσοστά χρησιμοποίησης άνω του 10 % φαίνεται ότι μειώνουν την εκμετάλλευση της ενέργειας του σιτηρεσίου και οδηγούν σε περιττώματα αυξημένης υδαρότητας (Dorpenberg και Van Der Aar, 2007).

1.3.6 Η γλυκερόλη στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών

Έχει ερευνηθεί η πιθανότητα χρήσης της γλυκερόλης στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών ζώων και έχει παρατηρηθεί ότι η γλυκερόλη αποτελεί μία πολύ καλή διατροφική συνιστώσα. Η γλυκερόλη μπορεί να συμπεριληφθεί ως συστατικό των σιτηρεσίων ολικής ανάμειξης ή ως συστατικό των συμπήκτων με συνέπεια τη βελτίωση της ποιότητάς τους. Επίσης η γλυκερόλη μπορεί να αντικαταστήσει το ταχέως ζυμούμενο άμυλο στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών ζώων σε ποσοστό έως 10 % χωρίς αρνητικές συνέπειες στην κατανάλωση τροφής και νερού, στην αποδόμηση των συστατικών στη μεγάλη κοιλία και στη φαινομένη πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών (Pluske, 2007).

Σύμφωνα με τους De Frain et al. (2004), η γλυκερόλη μπορεί να ανακουφίσει τα συμπτώματα της κέτωσης όταν χορηγείται σε υγρή μορφή από του στόματος στις αγελάδες. Επιπλέον, το γλυκονογενετικό υπόστρωμα, περιορίζει τον κίνδυνο εμφάνισης του συνδρόμου λιπώδους ήπατος-κέτωσης, και ενδεχομένως οδηγεί σε βελτίωση της γαλακτοπαραγωγής. Επιπλέον, οι Doppenberg και Van Der Aar (2007) πρότειναν ότι η προπυλενική γλυκόλη (1,2-προπανοδιόλη) μπορεί να αντικατασταθεί από γλυκερόλη (1,2,3-προπανοτριόλη) κατά τη μετάβαση των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων από την ξηρά στη γαλακτική περίοδο αυξάνοντας τη λακτόζη και την παραγωγή γάλακτος.

Ο Pethick et al. (1999), πρότεινε ότι η προσθήκη γλυκερόλης στα σιτηρέσια προβάτων ενδέχεται να βελτιώσει την ποιότητα του κρέατος. Αρχικές παρατηρήσεις από τη μελέτη τους, έδειξαν ότι μίγμα γλυκερόλης και προπυλενικής γλυκόλης (3,5 % και 1,5 % αντίστοιχα), διπλασίασε την κατανάλωση νερού από τους αμνούς. Η δυνατότητα των πηγών υδατανθράκων (είτε μέσα στο σιτηρέσιο είτε απευθείας χορήγηση από του στόματος), που προκαλούν υπεργλυκαιμία, να διεγείρουν την πλήρωση των μυών με γλυκογόνο, απαιτεί περαιτέρω έρευνα.

1.3.7 Άλλες χρήσεις της γλυκερόλης

Η γλυκερόλη η οποία παράγεται ως υποπροϊόν του βιοντίζελ, έχει πάνω από χίλιες πεντακόσιες χρήσεις, με τις κυριότερες να είναι στα γλυκίσματα, στα πρόσθετα για κέικ, στα φάρμακα, στις λοσιόν, στα σαμπουάν και σαπούνια, στα απορρυπαντικά και στα καλλυντικά. Επίσης παρατηρείται μία συνεχώς αυξανόμενη χρήση της γλυκερόλης για βιομηχανικούς σκοπούς όπως είναι τα μαλακτικά, τα λιπαντικά

μηχανών, οι διαλυτικές ουσίες και τα προϊόντα απομάκρυνσης/καθαρισμού χημικών ουσιών (Pluske, 2007).

Οι παραγωγοί βιοντίζελ μεγάλης κλίμακας διωλίζουν την ακατέργαστη γλυκερόλη και την διοχετεύουν στην αγορά για λογαριασμό των βιομηχανιών τροφίμων, φαρμακευτικών ειδών και καλλυντικών. Η ακατέργαστη γλυκερόλη συνήθως προορίζεται για τις βιομηχανίες παραγωγής πλαστικών υλών και διαλυτικών ουσιών. Η γλυκερόλη η οποία χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες αυτές δεν απαιτεί μεγάλο βαθμό διύλισης και πωλείται, όπως είναι αναμενόμενο, σχεδόν στη μισή τιμή από ότι για τις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων (Pluske, 2007).

1.3.8 Τιμή πώλησης της γλυκερόλης

Τα έτη 2004 και 2005, υπήρξε μία πτώση της τιμής της γλυκερόλης κυρίως λόγω της αύξησης της παραγωγής του βιοντίζελ στην Ευρώπη, όπου πάνω από δύο εκατομμύρια τόνοι παράχθηκαν. Η τιμή της γλυκερόλης θα εξαρτηθεί από την παραγόμενη ποσότητά της, από τη ζήτηση της αγοράς καθώς και από τη ζήτηση των κτηνοτρόφων για παραγωγικούς σκοπούς (Pluske, 2007).

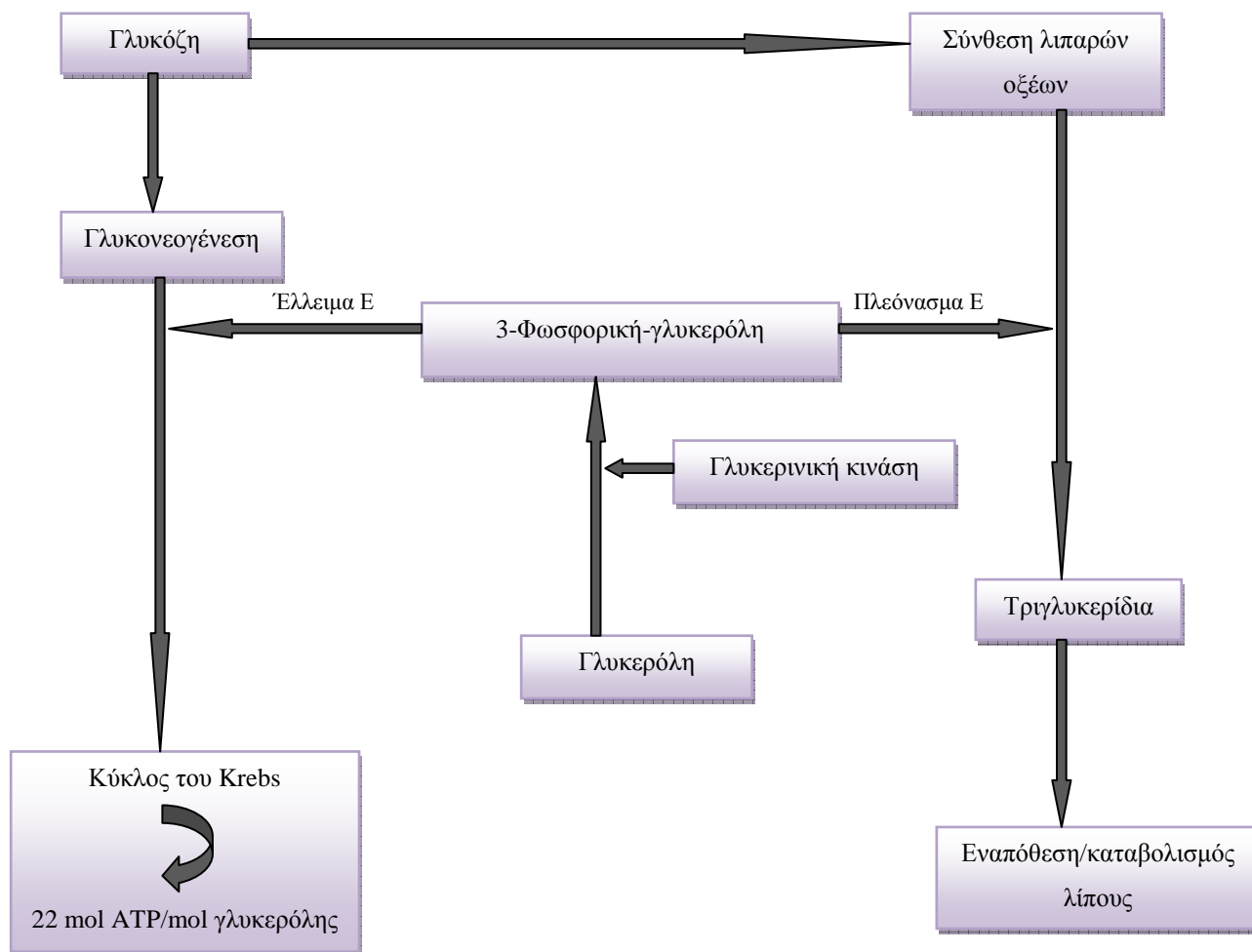
Υπάρχει διαφορά στην τιμή μεταξύ της κατεργασμένης και της ακατέργαστης γλυκερόλης. Η μεγαλύτερη ποσότητα η οποία χρησιμοποιείται σήμερα είναι υψηλής κατεργασίας (τύπου 97 %), με κόστος το οποίο φθάνει τα 400 δολάρια/τόνο. Η ακατέργαστη γλυκερόλη (τύπου 50 έως 90 %), πωλείται σε φθηνότερη τιμή, εξαρτώμενη από την ποσότητα της γλυκερόλης η οποία περιέχεται στο τελικό προϊόν, την περιεκτικότητα αυτής σε ξένα σωματίδια καθώς και την προσφορά και ζήτηση του προϊόντος (Pluske, 2007).

Η τιμή της γλυκερόλης σύμφωνα με το βαθμό καθαρότητάς της έχει σημειώσει πτώση από τη δεκαετία του 1970, όπου πωλούνταν από 0,60 έως 0,80 δολάρια/λίβρα, στα 0,30 έως 0,55 δολάρια/λίβρα το έτος 2005. Στις Η.Π.Α η τιμή της κατεργασμένης γλυκερόλης αναμένεται να είναι περίπου 0,36 δολάρια/λίβρα το 2006, ενώ προβλέπεται στα 0,35 δολάρια/λίβρα το 2007 και 2008. Πιθανολογείται ότι η τιμή της γλυκερόλης (τύπου 80 %), η οποία είναι κατάλληλη για χρήση στην χοιροτροφία κοστολογείται στα 0,14 δολάρια/λίβρα. Οι Haas et al. (2006), αναφέρουν ότι η τιμή της γλυκερόλης (τύπου 80 %), αναμένεται να είναι 0,15 δολάρια/λίβρα (Pluske, 2007).

Λόγω της έλλειψης δεδομένων που να αφορούν την τιμή της γλυκερόλης, τις πάρα πολλές χρήσεις της σε διαφορετικές αγορές και της εξάρτησης της τιμής της από την παραγωγή βιοντίζελ είναι δύσκολο να προβλεφθεί μία ακριβής τιμή πώλησης στο άμεσο μέλλον (Pluske, 2007).

1.3.9 Μεταβολισμός της γλυκερόλης

Η γλυκερόλη απελευθερώνεται κατά τον καταβολισμό των τριακυλογλυκερολών και μετατρέπεται σε γλυκόζη, μέσω της διαδικασίας της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ, αφού έχει προηγηθεί η φωσφορυλίωσή της σε 3-φωσφορική γλυκερόλη κατόπιν ενζυμικής δράσης της γλυκερινικής κινάσης (Mourou et al. 1994). Αυτός ο μηχανισμός παρέχει μία άμεση πηγή διαθέσιμης ενέργειας για τους χοίρους, η οποία θα μπορούσε να είναι ιδιαίτερα επωφελής για τα απογαλακτισθέντα χοιρίδια τα οποία βρίσκονται συνήθως σε κατάσταση ελλείμματος ενέργειας. Η γλυκερόλη η οποία καταναλώνεται μέσω του σιτηρεσίου απορροφάται παρακυτταρικά μέσω του μηχανισμού της παθητικής διάχυσης. Πρόσφατα υπάρχουν στοιχεία για την παρουσία ενός συστήματος μεταφοράς της γλυκερόλης στο λεπτό έντερο επίμυων, το οποίο εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Na (Na^+ -dependent). Ανεξαρτήτως 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. Μία επισκόπηση του μεταβολισμού της γλυκερόλης είναι αυτή που περιγράφεται παρακάτω στο διάγραμμα 3 (Pluske, 2007).



Διάγραμμα 3. Σχηματική παρουσίαση του μεταβολισμού της γλυκερόλης στο σώμα (Best, 2006).

1.4 Γλυκερινική κινάση

Η γλυκερινική κινάση (ATP: γλυκερόλη-3-φωσφοτρανσφεράση EC 2.7.1.30), καταλύει τη φωσφορυλίωση της γλυκερόλης με κατανάλωση ATP σε 3-φωσφορική γλυκερόλη (G-3-P), (Jenkins et al., 1975).

Η αντίδραση η οποία καταλύεται από το ένζυμο γλυκερινική κινάση είναι:



Το ένζυμο ανακαλύφθηκε από τον Kalcar (1939), στους νεφρούς. Οι ιδιότητες του ενζύμου αυτού περιγράφηκαν λεπτομερώς από τους Dublitz και Kennedy (1954), οι οποίοι ήταν οι πρώτοι που το απομόνωσαν από το ήπαρ επίμυων και απέδειξαν τη χρήση της γλυκερόλης, της διυδροξυακετόνης και της γλυκεραλδεΐδης ως υποστρώματά της. Χρησιμοποιώντας μία ενζυμική δοκιμασία, οι Wiel και Suyter (1957), συμπέραναν ότι η γλυκερινική κινάση είναι παρούσα μόνο στο ήπαρ και στους νεφρούς, αλλά όχι σε άλλα όργανα θηλαστικών ζώων. Παρόλα αυτά, μελλοντικές μελέτες οι οποίες χρησιμοποίησαν πιο ευαίσθητες ενζυμικές δοκιμασίες, έδειξαν την παρουσία του ενζύμου αυτού σε περισσότερους ιστούς (Jenkins et al., 1975, Rao et al., 1976).

Η γλυκερινική κινάση είναι επίσης γνωστό ότι καταλύει τη φωσφορυλίωση της διυδροξυακετόνης και της γλυκεραλδεΐδης, παρουσία ATP, για να σχηματιστεί η φωσφορική διυδροξυακετόνη (DHAP) και η 3-φωσφογλυκεραλδεΐδη αντίστοιχα. Η γλυκερινική κινάση από το μύκητα *Candida mycoderma*, χρησιμοποιεί ATP, ITP, GTP και UTP για τη φωσφορυλίωση της γλυκερόλης. Επίσης βρέθηκε ότι η γλυκερινική κινάση από το *E. coli* χρησιμοποιεί αποκλειστικά ATP, ενώ δεν χρησιμοποιεί κανένα άλλο νουκλεοτίδιο (Rao et al., 1976).

Η γλυκερινική κινάση του ήπατος μπορεί να κινήσει τη βιοσύνθεση της γλυκόζης από την γλυκερόλη. Επιπλέον, παίζει καθοριστικό ρόλο στη γλυκονεογένεση και στην λιπογένεση. Σε νεοσσούς, τόσο η ηπατική λιπογένεση όσο και η ηπατική γλυκονεογένεση είναι ενεργές (Rao et al., 1976). Παρόλα αυτά, πολύ λίγα είναι γνωστά για την ενεργότητα και τη γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των ορνίθων.

1.4.1 Παρουσία γλυκερινικής κινάσης σε ιστούς διαφόρων ζώων

Ενεργότητα γλυκερινικής κινάσης έχει ανιχνευθεί σε σκελετικούς μύες ποντικών και ανθρώπων. Η δραστηριότητα είναι υψηλότερη στον ερυθρό παρά στον λευκό μυ ποντικών. Τα επίπεδα δραστηριότητας στον ένα ή στον άλλο τύπο σκελετικών μυϊκών ινών είναι πολύ χαμηλότερα από ότι στο ήπαρ. Τα παραπάνω συνάδουν με την απομόνωση υψηλών επιπέδων mRNA γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ, στους νεφρούς και τον όρχη στους όρχεις σε ανθρώπους και ποντικούς, ενώ έχουν βρεθεί πολύ χαμηλότερα επίπεδα μεταγραφής στους μύς. Με βάση μελέτες επί της ενεργότητας της γλυκερινικής κινάσης σε ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια και

μυϊκή δυστροφία, έχει προταθεί ότι το ήπαρ και οι μυς εκφράζουν διαφορετικά γονίδια γλυκερινικής κινάσης (Montell et al., 2001).

Τα κοκκώδη πνευμονοκύτταρα δεν έχουν αξιολογηθεί στο παρελθόν για την παρουσία γλυκερινικής κινάσης, παρόλα αυτά, χαμηλά επίπεδα ενεργότητας εντοπίστηκαν σε επαγόμενα από ουρεθάνη αδενώματα σε πνεύμονες ποντικού. Ως εκ τούτου, ο ρόλος της γλυκερινικής κινάσης στην χρησιμοποίηση της γλυκερόλης από τον πνεύμονα παραμένει απροσδιόριστος (Fisher et al., 1981).

Επίσης οι Wirthensohn et al. (1981), αναφέρουν ότι μετρήθηκε η ενεργότητα γλυκερινικής κινάσης σε νεφρούς κονίκλου, για να εντοπιστεί η ακριβής τοποθεσία νεφρικής πρόσληψης της γλυκερόλης. Οι Barreta et al. (1978), ανέφεραν ότι τα επίπεδα γλυκερινικής κινάσης είναι αμελητέα στο λευκό λιπώδη ιστό των ζώων και του ανθρώπου. Ακόμη ανέφεραν ότι η ενεργότητα του ενζύμου στον λιπώδη ιστό είναι παρόμοια με αυτή του ενζύμου στο ήπαρ.

1.5 Μικροβιακά γένη και πληθυσμοί στο λεπτό και παχύ έντερο του χοίρου

Ο άνθρωπος, ο χοίρος και τα πτηνά είναι μονογαστρικά ζώα, και ο ρόλος της εντερικής τους μικροχλωρίδας στην πέψη των θρεπτικών συστατικών της τροφής δεν είναι τόσο σημαντικός όσο στα μηρυκαστικά και συνεπώς οι διατροφικές απαιτήσεις των σιτηρεσίων τους είναι αυξημένες (Ewing et al., 1994).

Το λεπτό έντερο αρχίζει από τον πυλωρό και τελειώνει στην ειλεοτυφλική διασταύρωση. Μπορεί να φτάσει τα 20 μέτρα μήκος στους χοίρους και αντιπροσωπεύει το ένα τρίτο του όγκου του γαστρεντερικού σωλήνα. Αποτελείται από τρεις περιοχές, το δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα και τον ειλέο. Η τροφή χωνεύεται εν μέρει από τη στιγμή που φθάνει στο λεπτό έντερο και αναμιγνύεται με τις εκκρίσεις του δωδεκαδακτύλου, του ήπατος και του παγκρέατος. Η μικροβιακή χλωρίδα του λεπτού εντέρου αυξάνει σταδιακά όσο πλησιάζουμε προς το παχύ έντερο. Επίσης το λεπτό έντερο είναι ένα σημαντικό τμήμα απορρόφησης των τελικών προϊόντων της πέψης. Η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών γίνεται ευκολότερη λόγω της αύξησης της επιφάνειας απορρόφησης του λεπτού εντέρου, πράγμα το οποίο γίνεται εφικτό λόγω της ύπαρξης των εντερικών λαχνών του λεπτού εντέρου (Ewing et al., 1994).

Το παχύ έντερο αποτελείται από δύο μέρη, το κόλον και το τυφλό. Τα

περισσότερα θρεπτικά συστατικά τα οποία έχουν υδρολυθεί, έχουν απορροφηθεί την ώρα που ο εντερικός χυμός φθάνει στο παχύ έντερο. Οι κυτταρίνες και οι ημικυτταρίνες θα υποστούν ζύμωση έως ένα βαθμό από τη μικροβιακή χλωρίδα του παχέως εντέρου η οποία αποτελείται κυρίως από *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Coliforms*, *Bacteroides*, *Clostridium* και ζύμες. Τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης είναι το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ (πτητικά λιπαρά οξέα), μαζί με ινδόλες, σκατόλη, φαινόλη, υδρόθειο, αμίνες και αμμωνία. Ο βαθμός στον οποίο τα τελικά προϊόντα της πέψης απορροφώνται είναι θέμα προς συζήτηση. Τα κυριότερα βακτήρια του πεπτικού σωλήνα των χοίρων αναφέρονται στον πίνακα 1.11 (Ewing et al., 1994).

Πίνακας 1.11 Κυριότερα βακτήρια στο γαστρεντερικό σύστημα των χοίρων.

Χοίροι	
<i>Bacteroides ruminicola</i>	<i>Bacteroides uniformis</i>
<i>Bacteroides succinogenes</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Peptostreptococcus productus</i>	<i>Proteus spp</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus equinus</i>
<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Veillonella spp</i>	

Πηγή: (Ewing et al., 1994)

Ο συνολικός αριθμός των μικροοργανισμών του πεπτικού σωλήνα ανά γραμμάριο περιεχομένου αυτού διαφέρει ανάλογα με την περιοχή στην οποία βρισκόμαστε. Ο στόμαχος γενικά περιέχει περίπου $10^6 - 10^7$ αποικίες ανά γραμμάριο στομαχικού περιεχομένου, ενώ το κόλον περιέχει περίπου $10^9 - 10^{10}$ αποικίες ανά γραμμάριο εντερικού περιεχομένου (Ewing et al., 1994).

Στο λεπτό έντερο του χοίρου βρέθηκε ότι τα *Coliforms* και οι *Lactobacilli* ανέρχονταν σε 10^7 και 10^8 αποικίες ανά γραμμάριο εντερικού περιεχομένου, ενώ μικρότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν σε ομογενοποιημένο βλεννογόνο λεπτού εντέρου (10^5 αποικίες ανά γραμμάριο). Στο παχύ έντερο του χοίρου οι συνολικοί

πληθυσμοί βακτηρίων βρέθηκαν ότι είναι 10^{10} - 10^{11} αποικίες ανά γραμμάριο υγρού περιεχομένου. Τα βακτήρια των γενών *Bacteroides*, *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* ήταν τα πιο πολυπληθή, ενώ *Enterococcus* και *Coliforms* μπορεί επίσης να βρεθούν σε υψηλούς αριθμούς (Salminen et al., 2004).

1.5.1 Κυριότερα γένη μικροβιακής χλωρίδας στους χοίρους

1. *Streptococcus*

Τα *Streptococcus*, είναι μία ομάδα μικροβίων τα οποία χρησιμοποιούν προμορφοποιημένες οργανικές ενώσεις ως πηγές ενέργειας, υδρογόνου, ηλεκτρονίων και άνθρακα για βιοσύνθεση. Τα περισσότερα μικρόβια του είδους αυτού είναι προαιρετικά αναερόβια, ενώ ορισμένα απαιτούν επιπλέον CO_2 για την ανάπτυξή τους, ενώ ορισμένα μπορεί να είναι αναερόβια. Η θερμοκρασία για την μέγιστη ανάπτυξή τους είναι συνήθως (37°C), όμως η μέγιστη και ελάχιστη θερμοκρασία ποικίλει ανάμεσα στα είδη. Ουδέτερο pH ή κοντά στο ουδέτερο ευνοεί την ανάπτυξη των μικροβίων αυτών, ενώ χαμηλό pH (< 4.0) ή υψηλό pH (> 9.6) αναστέλλει την ανάπτυξή τους. Κυρίως παράγουν γαλακτικό οξύ, μικρές ποσότητες οξικού και μυρμηγκικού οξέως και CO_2 λόγω της ζύμωσης των υδατανθράκων (Zhu, 2000).

2. *Peptostreptococcus*

Τα *Peptostreptococcus*, είναι μία ομάδα αναερόβιων μικροβίων τα οποία μεταβολίζουν την πεπτόνη και τα αμινοξέα σε οξικό, μυρμηγκικό, προπιονικό, καπρονικό, ισοβουτυρικό, ισοβαλερικό και ισοκαπρονικό οξύ. Πτητικές αμίνες και διάφορες αλκοόλες μπορεί επίσης να παραχθούν. Το pH στο οποίο αναπτύσσονται ποικίλει από 6.0 έως 8.0, ενώ η μέγιστη ανάπτυξη επιτυγχάνεται σε pH 7.0 έως 7.5, η θερμοκρασία κυμαίνεται γενικά από 25 έως 45°C , ενώ στους 35 έως 37°C επιτυγχάνεται η μέγιστη ανάπτυξη (Zhu, 2000).

3. *Eubacteria*

Τα *Eubacteria*, είναι μία ομάδα υποχρεωτικά αναερόβιων μικροβίων τα οποία παράγουν μίγματα οργανικών οξέων από υδατάνθρακες ή πεπτόνη. Η ανάπτυξη συνήθως επιταχύνεται στους 37°C και σε pH κοντά στο 7.0. Τα περισσότερα είδη

των μικροβίων αυτών παράγουν μεγάλες ποσότητες βουτυρικού, οξικού, μυρμηγκικού και γαλακτικού οξέως (Zhu, 2000).

4. *Lactobacillus*

Τα *Lactobacillus*, είναι αυστηρώς ζυμωτικά βακτήρια, ανεκτικά στο οξυγόνο ή αναερόβια. Τα κύρια παράγωγά τους είναι γαλακτικό οξύ, CO₂, αιθανόλη και οξικό οξύ σε ικανοποιητικές ποσότητες. Κυρίως αναπτύσσονται σε pH 4.5 έως 6.4, η μέγιστη ανάπτυξή τους όμως επιτυγχάνεται σε pH 5.5 έως 6.2. Η ανάπτυξή τους σταματάει σε pH 3.6 έως 4.0. Επίσης ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται όταν το περιβάλλον γίνεται ουδέτερο ή αλκαλικό. Η θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται ποικίλει από 2 έως 53° C, ενώ η μέγιστη ανάπτυξη επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες από 30 έως 40° C (Zhu, 2000).

5. *Escherichia*

Το κύριο είδος στο οποίο συμπεριλαμβάνεται το γένος αυτό είναι το *Escherichia coli*, το οποίο είναι αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο. Η γλυκόζη και διάφοροι άλλοι υδατάνθρακες ζυμώνονται από τα βακτήρια αυτά και παράγεται πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο μετατρέπεται περαιτέρω σε γαλακτικό, οξικό και μυρμηγκικό οξύ. Η μέγιστη ανάπτυξη επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 37° C. Τα περισσότερα στελέχη αυτού του είδους παράγουν ινδόλη, μία ένωση με χαρακτηριστική οσμή (Zhu, 2000).

6. *Clostridium*

Τα περισσότερα είδη του γένους *Clostridium*, είναι υποχρεωτικά αναερόβια, παρόλο που ορισμένα είδη αναπτύσσονται αλλά δεν σπορογεννούν στην παρουσία οξυγόνου και ατμοσφαιρικής πίεσης. Για τα περισσότερα είδη η ανάπτυξη επιταχύνεται σε pH 6.5 έως 7.0 και σε θερμοκρασίες 30 έως 37° C, ενώ το εύρος της θερμοκρασίας για την ανάπτυξη των μικροβίων είναι 15 έως 69° C. Τα *Clostridium*, συχνά ζυμώνουν αμινοξέα για την παραγωγή ενέργειας μέσω μίας διαδικασίας η οποία ονομάζεται «αντίδραση stickland». Έτσι έχουμε ως αποτέλεσμα την παραγωγή αμμωνίας, υδρόθειου, λιπαρών οξέων και αμινών κατά τη διάρκεια της αναερόβιας

αποσύνθεσης των πρωτεϊνών (Zhu, 2000).

7. *Propionibacterium*

Τα *Propionibacterium*, περιέχουν γένη τα οποία είναι είτε υποχρεωτικά αναερόβια είτε ανεκτικά στο οξυγόνο. Τα μικρόβια τα οποία περιέχονται στην ομάδα αυτή παράγουν προπιονικό και οξικό οξύ και σε μικρότερες ποσότητες ισοβαλικό, μυρμηγκικό, ηλεκτρικό και γαλακτικό οξύ. Η θερμοκρασία για τη μέγιστη ανάπτυξη είναι από 30 έως 37° C, ενώ το pH κοντά στο ουδέτερο (Zhu, 2000).

8. *Bacteroides*

Τα *Bacteroides*, είναι υποχρεωτικά αναερόβια μικρόβια τα οποία μεταβολίζουν τους υδατάνθρακες ή πεπτόνες. Τα προϊόντα του μεταβολισμού περιέχουν ηλεκτρικό, γαλακτικό, οξικό, μυρμηγκικό ή προπιονικό και βουτυρικό οξύ. Η ανάπτυξή τους συνήθως επιταχύνεται σε θερμοκρασία 37° C και σε pH κοντά στο 7.0 (Zhu, 2000).

9. *Megasphaera*

Τα βακτήρια του γένους αυτού είναι αναερόβια και μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ, για την παραγωγή οξικού, προπιονικού οξέως και πτητικών λιπαρών οξέων με 2 έως 6 άνθρακες στην ανθρακική τους αλυσίδα. Επίσης παράγονται ενώσεις που περιέχουν θείο από τα γένη αυτά. Η θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται κυμαίνεται από 25 έως 40° C, ενώ η καλύτερη τιμή pH που ευνοεί την ανάπτυξη είναι λίγο πάνω από το ουδέτερο (pH≈7.4), (Zhu, 2000).

1.5.2 Ρόλος των μικροοργανισμών στη θρέψη και την υγεία των μονογαστρικών ζώων

Η μικροβιακή χλωρίδα παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ζωική παραγωγή. Τελικά αυτοί οι οργανισμοί μπορούν να επηρεάσουν την υγεία των ζώων, την διαχείριση των αποβλήτων, ακόμη και τον έλεγχο των παθογόνων προερχόμενων από τη διατροφή. Στους χοίρους, ο χαρακτηρισμός της μικροχλωρίδας και των παραπροϊόντων αυτής, έχει ερευνηθεί σε μικρά μόνο τμήματα του γαστρεντερικού τους συστήματος. Έτσι υπάρχει έλλειψη πληροφόρησης όσο αφορά την περίοδο

απογαλακτισμού, το στρες και τις πιθανές θεραπευτικές ιδιότητες που μπορεί να υπάρχουν. Μαζί με την μικροχλωρίδα, τα παραπροϊόντα της μικροβιακής δραστηριότητας, συμπεριλαμβανομένων και των πτητικών λιπαρών οξέων (VFA), έχουν ερευνηθεί από λίγους επιστήμονες και σε περιορισμένες περιοχές του γαστρεντερικού συστήματος των χοίρων. Στους χοίρους αλλαγές στους μικροβιακούς πληθυσμούς έχουν παρατηρηθεί μετά τον απογαλακτισμό. Άλλες εργασίες έχουν επισημάνει επιδράσεις του σιτηρεσίου στα πτητικά λιπαρά οξέα. Είναι λοιπόν λογικό να πιστεύουμε ότι και άλλοι παράγοντες είναι πιθανόν να επηρεάζουν τη μικροχλωρίδα και τα προϊόντα αυτής, έτσι παρέχεται η ευκαιρία να χειραγωγηθούν οι μεταβλητές αυτές για την αύξηση της παραγωγής και τη μείωση ορισμένων αρνητικών πτυχών της ζωικής παραγωγής (Franklin et al., 2002).

Επιπλέον, αρκετές μελέτες οι οποίες αφορούν διάφορα μοντέλα παραγωγικών ζώων επισημαίνουν ότι μέσω του εμπλουτισμού της επωφελούς μικροχλωρίδας, τα πρεβιοτικά μπορούν να ενισχύσουν τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή, να αυξήσουν την αντίσταση αυτού σε ποικίλες προκλήσεις για την υγεία του και να επιταχύνουν την ανάρρωση από διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος. Τα πρεβιοτικά εφόσον συμπεριληφθούν στα σιτηρέσια σε υψηλά επίπεδα, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν σημαντικά τους πληθυσμούς των *Bifidobacterium* και των *Lactobacillus* στο έντερο των χοίρων, αυξάνοντας όμως το κόστος του σιτηρεσίου (Mountzouris et al., 2006).

Η αναλογία *Lactobacillus* : *Enterobacteria*, έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης και η αύξηση της αναλογίας αυτής σχετίζεται με υψηλότερη αντίσταση σε εντερικές διαταραχές. Ειδικότερα στα απογαλακτισθέντα χοιρίδια, οι *Lactobacilli* μπορεί να παίζουν κυρίαρχο ρόλο στον έλεγχο της κολιβακίλωσης, η οποία είναι η πιο συνηθισμένη εντερική διαταραχή κατά τη διάρκεια των πρώτων μηνών της ζωής των χοιριδίων (Castillo et al., 2006).

Στα πουλερικά, ενώ η τυφλική μικροχλωρίδα μπορεί να προστατέψει τα ορνίθια ενάντια σε βακτηριακές μολύνσεις, μία υγιής μικροχλωρίδα η οποία είναι παρούσα στο λεπτό έντερο συνεισφέρει σημαντικά στη λειτουργία του λεπτού εντέρου, συμπεριλαμβανομένου της πέψης και της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών, που είναι ο περιοριστικός παράγοντας ο οποίος καθορίζει το ρυθμό ανάπτυξης (Gong et al., 2002).

Ωστόσο, ένας αριθμός εργασιών αποδεικνύουν ότι η διαχείριση των προβιοτικών μειώνουν τη συγκέντρωση των σιτητικών και δυνητικά παθογονικών

βακτηρίων όπως είναι τα *Clostridia*, οι *Enterococci* και τα *Coliforms* στο γαστρεντερικό σύστημα και τα κόπρανα των θηλαζόντων και των αναπτυσσόμενων χοίρων. Στη διατροφή των χοίρων τα συνηθέστερα γένη βακτηρίων τα οποία χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά είναι: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* και *Saccharomyces*. Συνδυασμοί διαφόρων ειδών και γενών έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί (Mountzouris, 2006).

1.5.3 Μελλοντικά πεδία έρευνας

Σε σχετική εργασία για τη μικροβιακή χλωρίδα των χοίρων στον ειλεό και το παχύ έντερο, οι Leser et al., (2001), αναφέρουν ότι μόνο το 17 % των ειδών και γενών των βακτηρίων αναφέρονται σε γνωστά και αναγνωρισμένα είδη, ενώ το 83 % των περιπτώσεων οι οποίες εξετάστηκαν αναφέρεται ότι ανήκουν σε είδη τα οποία δεν έχουν μελετηθεί και αναγνωρισθεί ακόμη. Επίσης οι Mountzouris et al., (2006), αναφέρουν ότι το άθροισμα όλων των βακτηρίων τα οποία μελετήθηκαν αποτελούσαν ένα μικρό ποσοστό επί των συνολικών κυττάρων, συγκεκριμένα αποτελούσαν το 12,4 % του τυφλού εντέρου, το 21,8 % του ανιόντος κόλου και το 10,3 % του ορθού εντέρου. Παρατηρείται λοιπόν ότι πρέπει να γίνει περαιτέρω έρευνα όσο αφορά τη μικροβιακή χλωρίδα του λεπτού και παχέως εντέρου των χοίρων για να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα τα οποία θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων της διατροφής, της μικροβιακής χλωρίδας και της μέγιστης δυνατής αξιοποίησης των παραπροϊόντων αυτής από τον οργανισμό του ξενιστή.

Όσο αφορά τη χρησιμοποίηση της γλυκερόλης στα σιτηρέσια των χοίρων καθώς και οι επιδράσεις που έχουν τα σιτηρέσια αυτά στη μικροβιακή χλωρίδα του λεπτού και του παχέως εντέρου, πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες και πειράματα επί του θέματος αυτού για να εξαχθούν ασφαλή και τεκμηριωμένα συμπεράσματα. Αποτελέσματα τα οποία αφορούν τον τομέα αυτό θα παρουσιαστούν στη συνέχεια της μελέτης αυτής.

Επίσης απαιτούνται περαιτέρω έρευνες και μελέτες, οι οποίες θα αφορούν την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών των σιτηρεσίων, τα οποία περιέχουν γλυκερόλη.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός του Πειράματος

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα της χρησιμοποίησης γλυκερόλης (τύπου 80 %), στο σιτηρέσιο αναπτυσσόμενων χοίρων, σε αντικατάσταση κυρίως δημητριακών καρπών (σε ποσοστά 7,5 και 15 %, αντίστοιχα). Για τους σκοπούς του πειράματος προσδιορίστηκαν η κατανάλωση της τροφής, η αύξηση του σωματικού βάρους και ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής (ζωοτεχνικές παράμετροι). Επίσης προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλυκερόλης στο αίμα και στα ούρα, η γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ, τα λιπαρά οξέα του ενδομυϊκού λίπους, καθώς και η μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα.

2.2 Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1 Πειραματικό υλικό και πειραματικές επεμβάσεις

Πριν την έναρξη του πειράματος πραγματοποιήθηκαν όλες οι απαραίτητες εργασίες, οι οποίες περιελάμβαναν:

- Την προετοιμασία της πειραματικής εγκατάστασης (καθαρισμός, απολυμάνσεις, έλεγχος καλής λειτουργίας των κλωβών και επισκευές όπου κρίθηκε απαραίτητο).
- Την κατάρτιση των πειραματικών σιτηρεσίων με χρήση γραμμικού προγραμματισμού, την αγορά των πρώτων υλών για την παρασκευή τους και την προετοιμασία τους στο παρασκευαστήριο του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής.
- Την αγορά των ζώων από εμπορική μονάδα. Τα ζώα ήταν του ίδιου γενετικού υλικού (Large White×Pietrain) και επιλέχτηκαν ώστε να έχουν παρόμοιο σωματικό βάρος, κατανεμήθηκαν σε ομοιόμορφες ομάδες και προσαρμόστηκαν στα πειραματικά σιτηρέσια για την έναρξη του πειράματος.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Συνολικά για τις ανάγκες του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν 18 απογαλακτισθέντα χοιρίδια (Large White×Pietrain), ηλικίας 30 ημερών και μέσου σωματικού βάρους 8 Kg. Τα ζώα κατανεμήθηκαν στις ακόλουθες 3 πειραματικές ομάδες - επεμβάσεις:

- Μάρτυρας (M): χορηγήθηκε κοινό σιτηρέσιο ανάπτυξης (NRC, 1998), χωρίς

προσθήκη γλυκερόλης.

- Ομάδα G1: χορηγήθηκε το σιτηρέσιο M, στο οποίο η γλυκερόλη (καθαρότητας 80 %), αντικατέστησε κυρίως τον αραβόσιτο σε ποσοστό 7,5 %.
- Ομάδα G2: χορηγήθηκε το σιτηρέσιο M, στο οποίο η γλυκερόλη (καθαρότητας 80 %), αντικατέστησε κυρίως τον αραβόσιτο σε ποσοστό 15 %.

Οι ομάδες αποτελούνταν από 6 χοιρίδια τα οποία διατηρήθηκαν σε ατομικούς κλωβούς. Τα χοιρίδια όλων των ομάδων στεγάστηκαν στον ίδιο χώρο, κάτω από τις ίδιες συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, φωτισμός και αερισμός). Σε κάθε ατομικό κλωβό υπήρχε ταγίστρα και ποτίστρα για κατά βούληση κατανάλωση τροφής και νερού. Τα σιτηρέσια όλων των επεμβάσεων ήταν ισοενεργειακά και ισοαζωτούχα και προετοιμάστηκαν στο παρασκευαστήριο του Εργαστηρίου. Η διάρκεια του πειράματος ήταν 6 εβδομάδες, δηλαδή μέχρι το τέλος της περιόδου ανάπτυξης, οπότε τα ζώα είχαν σωματικό βάρος 27-30 Kg.

Στους πίνακες 2.1 και 2.2 δίνεται η σύνθεση και η χημική σύσταση των πειραματικών σιτηρεσίων, αντίστοιχα.

Πίνακας 2.1 Σύνθεση (%) πειραματικών σιτηρεσίων (πρώτης ανάπτυξης).

Ζωοτροφή	Μάρτυρας (M)	G1 (7,5%)	G2 (15%)
Καρπός αραβόσιτου	61.00	47.80	38.50
Σογιάλευρο	30.00	31.0	32.90
Γλυκερόλη	-	7.50	15.00
Πίτυρα σίτου	4.90	10.00	10.00
Αλάτι	0.46	0.10	-
Λυσίνη	0.20	0.20	0.15
Μεθειονίνη	0.24	0.25	0.25

Μαρμαρόσκονη	1.24	1.25	1.20
ΚΦΔ	1.56	1.50	1.6
Ισορροπιστής βιταμινών	0.20	0.20	0.20
Ισορροπιστής ιχνοστοιχείων	0.20	0.20	0.20

Πίνακας 2.2 Χημική σύσταση (g/kg) και ενεργειακό περιεχόμενο (MJ/kg) των πειραματικών σιτηρεσίων και της χρησιμοποιηθείσας γλυκερόλης.

	Επεμβάσεις			Γλυκερόλη
	Μάρτυρας (M)	G1 (7,5%)	G2 (15%)	
Ξηρά ουσία	89.4	90.0	90.7	97.7
ΠΕ (MJ/kg)	13.5	13.5	13.6	14.4
ΟΑΟ	19.5	19.5	19.5	-
ΟΛ	3.0	2.7	2.4	0.5
Τέφρα	6.3	6.1	6.1	5.4
Na	0.2	0.2	0.3	2.1
C16:0	14.6	14.9	14.6	13.0
C18:0	2.6	2.6	2.6	2.2
C18:1-cis9	21.8	21.0	20.9	42.6
C18:2n-6	53.8	54.2	54.4	31.6
C18:3n-3	3.7	3.9	4.2	5.9
Άλλα¹	3.5	3.4	3.3	4.7

¹ C14:0, C16:1, C18:1-cis11, C20:0, C20:1, C20:2

2.2.2 Προσδιορισμός των ζωοτεχνικών παραμέτρων

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, σε εβδομαδιαία βάση, γίνονταν οι ακόλουθες διεργασίες:

- Καταγραφή του σωματικού βάρους.
- Καταγραφή και υπολογισμός της κατανάλωσης τροφής.

- Υπολογισμός της αύξησης του σωματικού βάρους και της καταναλωθείσας τροφής.
- Υπολογισμός του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής.

2.2.3 Ανίχνευση της συγκέντρωσης γλυκερόλης στο αίμα

Για να προσδιορισθεί η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο αίμα των χοιριδίων, χρησιμοποιήθηκαν κατεψυγμένα αραιωμένα δείγματα, σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

Η λήψη αίματος έγινε από τη σφαγίτιδα φλέβα την 72^η ημέρα της εκτροφής. Για να γίνει η αιμοληψία από τη φλέβα, ακινητοποιήθηκε το χοιρίδιο και πραγματοποιήθηκε παρακέντηση του αγγείου που κρίθηκε κατάλληλο με τη χρήση σύριγγας. Τόσο στη βελόνα της σύριγγας, όσο και στα σωληνάρια αποθήκευσης του αίματος, είχε προστεθεί η αντιπηκτική ουσία EDTA ηπαρίνη, η οποία διατηρεί τα έμμορφα συστατικά του αίματος, δίχως να τα αλλοιώνει.

Στη συνέχεια, τα δείγματα υπέστησαν φυγοκέντρηση (στις 2.500 στροφές, στους 4° C, για 15 λεπτά) και παραλήφθηκε από αυτά το πλάσμα του αίματος, το οποίο καταψύχθηκε στους -30° C.

Για την ανίχνευση του ποσοστού της γλυκερόλης στο πλάσμα των ορνιθίων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο (Glycerol Assay Kit, Cayman Chemical Company, 2008), σύμφωνα με το οποίο:

- Προστέθηκαν 10 μl διαλύματος standard σε κάθε κελί της μικροπλάκας/πλάκας.
- Προστέθηκαν 10 μl δείγματος (μη αραιωμένο πλάσμα, όπου κάθε δείγμα πλάσματος είχε και την επανάληψή του).
- Ξεκινήσαμε την αντίδραση προσθέτοντας σε κάθε κελί 150 μl αραιωμένου ενζυμικού διαλύματος που περιελάμβανε τα ένζυμα: γλυκερινική κινάση, οξειδάση φωσφορικής γλυκερόλης και υπεροξειδάση.
- Ανακινήθηκε προσεκτικά η πλάκα για λίγα δευτερόλεπτα, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί μίξη του δείγματος πλάσματος με το ένζυμο και το διάλυμα standard.
- Η πλάκα καλύφθηκε και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

- Καταγράφηκε η απορρόφηση στα 530-550 nm (StatFax-2100, Awareness, Technology Inc., Η.Π.Α.).

Προηγήθηκε σχεδιασμός καμπύλης αναφοράς, σύμφωνα με τον τύπο $y=a*x$ (όπου y η απορρόφηση των δειγμάτων, a ο συντελεστής με τιμή 0,0035 mg/dl και x η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο αίμα εκφρασμένη σε mg/dl), με τη βοήθεια τεσσάρων διπλών δειγμάτων. Οι συγκεντρώσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για να πραγματοποιηθεί η καμπύλη αναφοράς είναι 0, 20, 50, 100 %, 2 %, 5 %, 10 % και 200 mg/dl.50 %.

2.2.4 Συλλογή του ήπατος από τα χοιρίδια

Την τελευταία ημέρα της εκτροφής, δηλαδή την 72^η ημέρα, πραγματοποιήθηκε σφαγή των χοιριδίων. Δείγμα από τον δεξιό λοβό του ήπατος καταψύχθηκε άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκε στους -80° C,

2.2.5 Μοριακές αναλύσεις στο ήπαρ

2.2.5.1 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από το ήπαρ των χοιριδίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel-10/2007/Rev. 08, MACHEREY-NAGEL, Germany).. Η διαδικασία της απομόνωσης του ολικού RNA περιελάμβανε τα εξής στάδια:

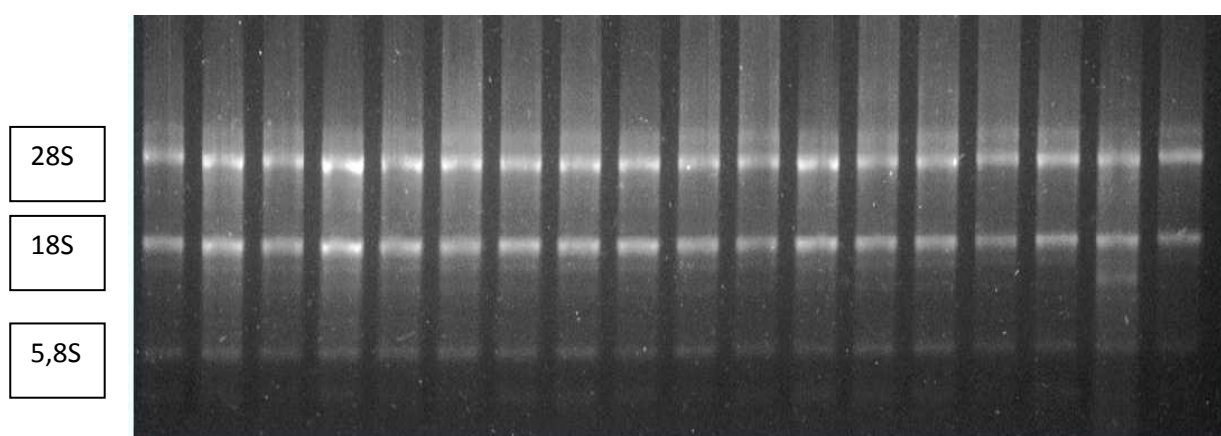
1. Προσθήκη 350 μl διαλύματος RA1 και 3,5 μl β-μερκαπτοαιθανόλης (διάλυμα λύσης των κυτταρικών μεμβρανών) σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Eppendorf.
2. Ομογενοποίηση ~ 150 mg ιστού του ήπατος με τη χρήση γουδιού, αφού το δείγμα είχε μόλις ψυχθεί σε υγρό άζωτο. Σε όλη τη διάρκεια της ομογενοποίησης ο ιστός είχε θερμοκρασία κάτω από 0° C.
3. Προσθήκη 50 mg του ομογενοποιημένου ιστού στο Eppendorf και ανάμειξη με vortex μέχρι πλήρους ομογενοποίησης του δείγματος.
4. Μεταφορά του μίγματος σε ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Eppendorf με φίλτρο και δοχείο συλλογής (collection tube).
5. Φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 λεπτό.
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 δοχείο συλλογής και φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 30 δευτερόλεπτα. Πλέον το ολικό RNA βρίσκεται δεσμευμένο στη μεμβράνη του φίλτρου του δοχείου συλλογής .
 8. Προσθήκη 350 μl διαλύματος MBD για την απομάκρυνση των αλάτων από τη μεμβράνη.
 9. Φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 λεπτό.
 10. Προσθήκη 95 μl διαλύματος εργασίας δεσοξυριβονουκλεάσης (DNase reaction mixture) και ήπια ανάμειξη.
 11. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
 12. 1^η πλύση: προσθήκη 200 μl διαλύματος RA2, φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη του διαλύματος από το δοχείο συλλογής.
 13. 2^η πλύση: προσθήκη 600 μl διαλύματος RA3 και φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 30 δευτερόλεπτα.
 14. 3^η πλύση: προσθήκη 250 μl διαλύματος RA3 και φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 2 λεπτά.
 15. Τοποθέτηση του φίλτρου με το ολικό RNA σε νέο ανοιχτό Eppendorf.
 16. Προσθήκη 40 μl RNase-free H₂O και φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 λεπτό, (2 φορές).
 17. Παραλαβή διαλύματος και διατήρηση του δείγματος στους -80° C.

2.2.5.2 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 τριών χαρακτηριστικών ζωνών, που αντιστοιχούν στις ριβοσωμικές υπομονάδες 28 S, 18 S και 5,8 S, καθώς και 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 1).

Εικόνα 1. Πήκτωμα (gel) αγαρόζης, με καθαρό RNA από το ήπαρ των χοιριδίων ανά επέμβαση.



2.2.5.3 Ποσοτικός έλεγχος RNA

Ο ποσοτικός έλεγχος του RNA πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 260 nm και 280 nm και ο λόγος τους ήταν ≈ 1.8 γεγονός που παραπέμπει σε καλής ποιότητας RNA. Χαμηλότερη αναλογία υποδεικνύει επιμόλυνση με πρωτεΐνες. Για κάθε δείγμα έγινε αραιώση 1 : 200, δηλαδή 5 μ l ολικό RNA σε 995 μ l H₂O σε 1,5 ml Eppendorf. Η ποσοτικοποίηση του RNA έγινε σύμφωνα με τον τύπο $(A_{260 \text{ nm}}) \cdot (40 \mu\text{g/mlng/mL}) \cdot (200) = \text{συγκέντρωση RNA } (\mu\text{g/ml}\mu\text{L})$, όπου ο αριθμός 200 υποδηλώνει το δείκτη αραιώσης.

2.2.5.4 RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR / Αντίστροφη Μεταγραφάση-PCR)

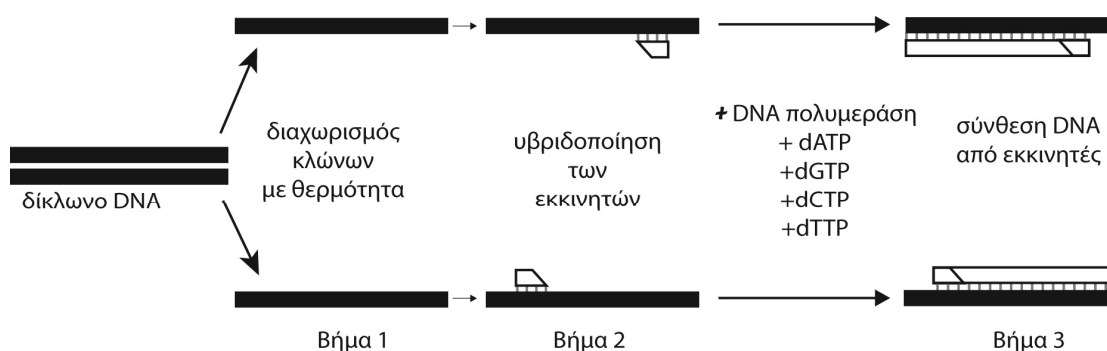
Η RT-PCR είναι μία διαδικασία δύο σταδίων, όπου πραγματοποιείται αρχικά μεταγραφή των μορίων RNA, σε μονόκλιωνα μόρια DNA (cDNA) και στη συνέχεια ακολουθεί ενίσχυση των συντιθέμενων μορίων cDNA, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Η τεχνική της RT-PCR έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα αξιόπιστη για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης.

Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τα εξής στάδια:

- Αρχικά το DNA - στόχος μετουσιώνεται, με θέρμανση στους 95° C, για 15 δευτερόλεπτα έως 2 λεπτά. Στο στάδιο αυτό οι δύο κλώνοι του DNA διαχωρίζονται ο ένας από τον άλλο.
- Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 40 - 60° C για 30 - 60 δευτερόλεπτα. 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 λεπτά και πραγματοποιείται στους 74° C.

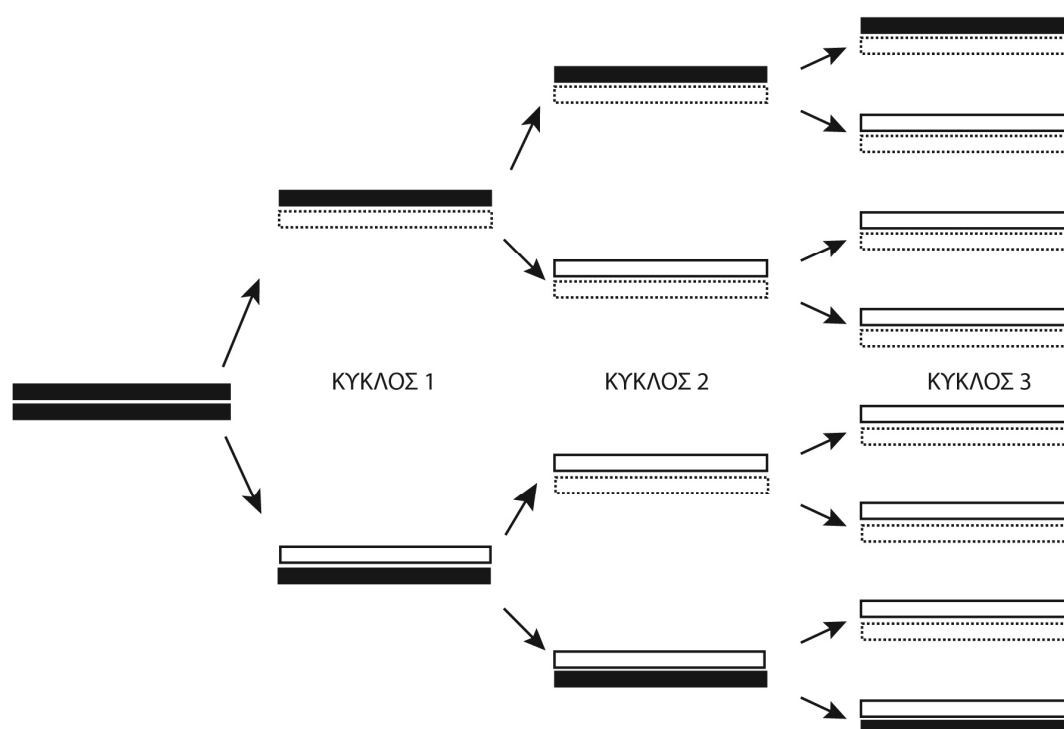
Έτσι σχηματίζονται δυο καινούργιες αλυσίδες ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δυο κλώνων του πρότυπου DNA και το DNA στόχος έχει κατ' αυτόν τον τρόπο διπλασιαστεί. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωσης (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (annealing) και επέκτασης των εκκινητών με την σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension), αποτελούν ένα κύκλο της αντίδρασης PCR. Ο επόμενος κύκλος ξεκινά πάλι από το στάδιο 1 όπου γίνεται μετουσίωση των σχηματιζόμενων μορίων DNA (Εικόνα 2).

Εικόνα 2. Στάδια που ακολουθούνται κατά τη διάρκεια ενός κύκλου αντίδρασης PCR. Στάδιο 1: μετουσίωση δίκλωνου DNA. Στάδιο 2: Δέσμευση των εκκινητών στους κλώνους του DNA. Στάδιο 3: Επιμήκυνση της αλυσίδας κατόπιν προσθήκης βάσεων με την επίδραση της DNA - πολυμεράσης.



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^ο κύκλο. Στο τέλος του 2^ο 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^n όπου n ο αριθμός των κύκλων (Εικόνα 3).

Εικόνα 3. Πολλαπλασιασμός τμημάτων DNA σε PCR αντίδραση. Μετά το τέλος του 1^{ου} κύκλου το δίκλωνο DNA έχει διπλασιαστεί, μετά το τέλος του 2^{ου} κύκλου έχει τετραπλασιαστεί, μετά το τέλος του 3^{ου} κύκλου έχει οκταπλασιαστεί, ακολουθώντας εκθετική αύξηση της μορφής 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων.



2.2.5.5 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής του RNA σε cDNA ήταν τα ακόλουθα: ρυθμιστικό διάλυμα AMV 10X Reaction buffer (2,5 μ l, Finnzymes, Finland), dNTPs (2,5 μ l), τυχαίοι εκκινητές (3 μ l), αντίστροφη μεταγραφάση AMV (2 μ l) και 2 μ g ολικού RNA ανά αντίδραση.

Τέλος προστέθηκε νερό απαλλαγμένο από RNA, μέχρι τελικού όγκου 15 ml.

Το πρώτο βήμα της όλης διαδικασίας ήταν η θέρμανση στους 70° C για 10 λεπτά του ολικού RNA και των τυχαίων εκκινητών σε υδατόλουτρο. Ακολούθησε άμεση ψύξη και ήπια φυγοκέντρωση. Στη συνέχεια, προστέθηκαν και τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και φυγοκεντρήθηκαν. Η τελική αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 μl, σε θερμικό κυκλοποιητή (BioRad), σε θερμοκρασία 42° C, για 60 λεπτά. Μετά την πάροδο των 60 λεπτών, τα δείγματα υπέστησαν άμεση ψύξη και ήπια φυγοκέντρωση και αποθηκεύτηκαν στους -20° C.

2.2.5.6 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Τα αντιδραστήρια για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (DyNzyme EXT, Finnzymes, Finland) χρησιμοποιήθηκαν στους εξής όγκους: 39,5 μl H₂O, 1 μl από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο, 0,5 μl EXT DNA πολυμεράση, 5 μl 10XPCR buffer MgCl₂ (15mM) 1 μl από κάθε δείγμα cDNA (προϊόντα της αντίστροφης μεταγραφής) και 1 μl από κάθε εκκινητή γονιδίου στόχου (sus-GK-1F529 και sus-GK-1R892). Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε και ο συνδυασμός θερμοκρασίας - χρόνου που εφαρμόστηκε για την ενίσχυση του γονιδίου της γλυκερινικής κινάσης φαίνονται στους παρακάτω πίνακες (πίνακες 2.3 και 2.4). Το ενδογενές γονίδιο σταθερής έκφρασης β-ακτίνη (housekeeping gene) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας (πίνακας 2.5). Σε κάθε σειρά δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς cDNA για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων. Στον πίνακα 2.6 δίνονται η αλληλουχία των εκκινητών και το αναμενόμενο μέγεθος τους.

Πίνακας 2.3 Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου της γλυκερινικής κινάσης.

Αρχική αποδιάταξη cDNA	95° C για 1 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη cDNA	95° C για 30 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	55° C για 60 sec	
Επιμήκυνση	72° C για 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72° C για 10 min	1 κύκλος

Hold	4° C	
-------------	------	--

Πίνακας 2.4 Ένα μι προϊόντος της παραπάνω αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω για επαναπολλαπλασιασμό.

Αρχική αποδιάταξη cDNA	95° C για 1 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη cDNA	95° C για 30 sec	20 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	55° C για 60 sec	
Επιμήκυνση	72° C για 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72° C για 10 min	1 κύκλος
Hold	4° C	

Πίνακας 2.5 Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου β-ακτίνη.

Αρχική αποδιάταξη cDNA	95° C για 1 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη cDNA	95° C για 30 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	55° C για 60 sec	
Επιμήκυνση	72° C για 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72° C για 10 min	1 κύκλος
Hold	4° C	

Πίνακας 2.6 Αλληλουχία των εκκινητών και μέγεθος των προϊόντων PCR.

Γονίδιο	Εκκινητές	Μέγεθος (bp)	Κωδικός Gene Bank
susGK_1F529	5'-GACAGGCCTTCCACTTAGCA-3'	363	FJ436399
susGK_1R892	5'-AGACTGGTCACCCAAACACC-3'		
β-ακτίνη1F74	5'-GGGACCTGACCGACTACCTC-3'	180	DQ845171.1

β-ακτίνη1R254	5'-GGCAGCTCGTAGCTCTTCTC-3'		
----------------------	----------------------------	--	--

2.2.5.7 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) σε 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 προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα (TAE). Η τήξη της αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με θέρμανση μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων, ισχύος 900 Watt.
- Στο διάλυμα αγαρόζης προστίθεται χρωστική Gel Red 10.000x σε H₂O (Biotium).
- Τοποθετείται η κατάλληλη χτένα για το σχηματισμό των οπών φόρτωσης.
- Το διάλυμα της αγαρόζης προστίθεται στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης, ώστε να σχηματισθεί το πήκτωμα.
- Όταν το πήκτωμα σταθεροποιηθεί, βυθίζεται σε διάλυμα (TAE) και αφαιρείται η χτένα.
- Σε κάθε οπή τοποθετείται ποσότητα δείγματος (15 μl), που έχει αναμειχθεί με διάλυμα χρωστικής Gel Loading Dye Blue (6X) (BioLabs) και γλυκερόλης (3 μl) για την καταβύθισή του.
- Συνδέονται τα ηλεκτρόδια στους υποδοχείς της συσκευής και ρυθμίζεται η τάση στα 100 Volt για 70 λεπτά.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας και απεικόνισης (BioRad, Universal Hood II, USA), ώστε να μπορούν να διακριθούν και να φωτογραφηθούν οι ζώνες των

τμημάτων που διαχωρίστηκαν. Οι εντάσεις του φθορισμού των προϊόντων της PCR του γονιδίου της γλυκερινικής κινάσης συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες της β-ακτίνης και ο λόγος τους εκφράστηκε ως σχετική γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης.

2.2.6 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στον επιμήκη ραχιαίο (*Longissimus dorsi*)

2.2.6.1 Απομόνωση μεθυλεστέρων

Η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την απομόνωση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων από τον τελευταίο θωρακικό σπόνδυλο των χοιριδίων είναι αυτή η οποία περιγράφεται παρακάτω:

Έγινε αφαίρεση κάθε ορατού εξωτερικού λιπώδους και συνδετικού ιστού από το δείγμα του μυός το οποίο χρησιμοποιήθηκε (τελευταίος θωρακικός σπόνδυλος). Το δείγμα ομογενοποιήθηκε με χρήση κατάλληλης συσκευής έως ότου γίνει μία μαλακή ομοιόμορφη μάζα. Η χρήση της συσκευής έγινε σε μικρές δόσεις, για να διασφαλιστεί η σωστή ομογενοποίηση του ενδομυϊκού λίπους. Τα λιπαρά οξέα των σιτηρεσιών και του ενδομυϊκού λίπους εξάχθηκαν και μεθυλιώθηκαν άμεσα, σύμφωνα με τη μέθοδο O'Fallon et al., (2007). Χρησιμοποιήθηκε 1 gr δείγματος το οποίο υδrolύθηκε για 1,5 ώρα στους 55° C σε διάλυμα 1 N υδροξειδίου του καλίου σε μεθανόλη, το οποίο περιείχε συγκεκριμένη ποσότητα (περίπου 0,5 mg) τριδεκανοϊκό οξύ (13:0) ως εσωτερικό πρότυπο. Το υδροξείδιο του καλίου εξουδετερώθηκε και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μεθυλιώθηκαν μέσω κατάλυσης από το θειικό οξύ (24N H₂SO₄) για 1,5 ώρα στους 55° C. Κάθε 15 λεπτά τα δείγματα ανακινούνταν έντονα, έπειτα αναδεύτηκαν με τη βοήθεια συσκευής vortex, αφού προστέθηκαν 3 ml εξανίου, και τέλος φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο στρώμα που δημιουργήθηκε μετά τη φυγοκέντρωση, περιείχε τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Με τη χρήση πιπέτας Paster, έγινε μεταφορά της στοιβάδας αυτής σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα, έγινε πλήρης εξάτμιση κάτω από N₂ στους 55° C. Οι μεθυλεστέρες, αραιώθηκαν για δεύτερη φορά με προσθήκη 0,5 ml εξανίου και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια αέριου χρωματογράφου. Τα φιαλίδια αυτά αποθηκεύτηκαν στους -20° C έως ότου αναλυθούν (Papadomichelakis et al., 2010).

2.2.6.2 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 πολική 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 επικρατούσαν στον φούρνο ήταν οι εξής:

- 140° C για 1 λεπτό.
- Αύξηση θερμοκρασίας ανά 4° C το λεπτό, μέχρι να φτάσει στους 230° C.
- Αύξηση της θερμοκρασίας ανά 4° C το λεπτό μέχρι να φτάσει στους 240° C, όπου κρατείται σε αυτή τη θερμοκρασία για 10 λεπτά.

Το ήλιο ήταν το αέριο φορέας σε σταθερή πίεση 18 psi και η θερμοκρασία του εισαγωγέα δείγματος και του FID ήταν ρυθμισμένη στους 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 συγκρίθηκε με μία περιοχή 0,5 mg του εσωτερικού πρότυπου, η οποία χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τα συνολικά λιπίδια (το ενδομυϊκό λίπος) του κρέατος (O'Fallon et al., 2007). Κάθε ένα λιπαρό οξύ εκφράστηκε επί τις % του συνολικού βάρους των λιπαρών οξέων.

2.2.7 Μικροβιολογικές αναλύσεις

2.2.7.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών χρησιμοποιήθηκαν φιάλες θέρμανσης των 500 και 1000 ml, καθώς και τρυβλία petri τα οποία πληρώθηκαν με κατάλληλα θρεπτικά υλικά (Oxoid, UK). Για την αποφυγή επιμολύνσεων η πλήρωση των τρυβλίων λάμβανε χώρα μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής.

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των διαφόρων βακτηριακών πληθυσμών ήταν σύμφωνα με τους (Mountzouris *et al.*, 2006) και αναφέρονται στον πίνακα 2.7.

Πίνακας 2.7 Αντιστοιχία βακτηριακών πληθυσμών και θρεπτικών υλικών.

Βακτηριακός πληθυσμός	Θρεπτικό υλικό	Προσθήκες
Ολικά αερόβια	Nutrient Agar	
Ολικά αναερόβια	Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar	
Lactobacillus	Rogosa Agar	Οξικό οξύ
Bifidobacterium	Beerens Agar	Προπιονικό οξύ
Clostridium	Clostridient Agar (RCM)	Polymyxin B Sulfate
Clostridium perfringens	Perfringens Agar Base (PAB)	Perfringens (TSC) selective supplement (SR88), παστεριωμένο αυγό
E. coli και Κολοβακτηρίδια (Coliforms)	Brilliance Agar	
Gram-θετικοί κόκκοι	Bile Esculin Azide Agar	

2.2.7.2 Παρασκευή αραιωτικών

Για την πραγματοποίηση διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα πεπτόνης στο οποίο είχε προστεθεί άνυδρη υδροχλωρική κυστεΐνη. Το διάλυμα πεπτόνης αποστειρώνονταν για 15 λεπτά στους 121° C.

2.2.7.3 Διαδικασία παρασκευής δειγμάτων

Τα κατεψυγμένα σε βαθιά κατάψυξη δείγματα τυφλών εντέρων και ειλεών των χοιριδίων αποψύχονταν πάνω σε πάγο. Εν συνεχεία γίνονταν ασηπτική λήψη 1 gr περιεχομένου από κάθε τυφλό έντερο και αραιώνονταν κατά 10 φορές με κρύο αποστειρωμένο διάλυμα MRD (maximum recovery diluent). Ύστερα ακολουθούσε ομογενοποίηση των δειγμάτων σε ειδική συσκευή ομογενοποίησης για 3 λεπτά.

2.2.7.4 Διαδικασία καλλιέργειας δειγμάτων

Κάθε ομογενοποιημένο εντερικό περιεχόμενο τυφλού και ειλεού αραιώνονταν σειριακά από την 10^0 έως την 10^{-6} (ανάλογα με το κάθε φορά χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υλικό). Κατόπιν γίνονταν καλλιέργεια της κατάλληλης αραιώσης πάνω σε όλα τα υπό εξέταση θρεπτικά υλικά. Τα τρυβλία για την καλλιέργεια των ολικών αερόβιων και των κολοβακτηρίων και *E. coli* επωάζονταν αερόβια για 24 ώρες. Ενώ τα τρυβλία για την καλλιέργεια των ολικά αναερόβιων, Gram⁺ κόκκων και των γενών *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* και *Clostridium perfringens*, επωάζονταν αναερόβια για τουλάχιστο 48 ώρες. Για την αναερόβια επώαση έγινε χρήση κατάλληλων καταλυτών και δοχείων που εξασφαλίζουν αναερόβιο περιβάλλον.

2.2.8 Ανάλυση χρησιμοποιηθείσας γλυκερόλης

Στον πίνακα 2.8 παρουσιάζεται το δελτίο ανάλυσης της γλυκερόλης η οποία χρησιμοποιήθηκε για την κάλυψη των αναγκών του πειράματος. Η γλυκερόλη που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από μείγμα κραμβελαίου, φοινικελαίου, σογιελαίου και ηλιελαίου, σε άγνωστες αναλογίες.

Πίνακας 2.8 Δελτίο ανάλυσης γλυκερόλης.

ΑΝΑΛΥΣΗ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
Υγρασία, %	2,27
Μεθανόλη, %	0,75
Τέφρα, %	5,44
Άλλες προσμίξεις (Mongs), %	0,52
Σημείο ανάφλεξης, °C	115
Ειδικό Βάρος, Kg/L	1,2801

2.2.9 Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα των αναλύσεων επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (17.0). Η κατανάλωση τροφής, η αύξηση του σωματικού βάρους και ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής 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. Τα δεδομένα της σύστασης του ενδομυϊκού λίπους σε λιπαρά οξέα και των μικροβιολογικών αναλύσεων επεξεργάστηκαν με απλή ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA). Σε όλες τις παραμέτρους η γραμμική ή τετραγωνική επίδραση του επιπέδου γλυκερόλης εξετάστηκε με τη χρήση πολυωνυμικών αντιθέσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων (least squares means), εκτός εάν δηλώνεται διαφορετικά.

2.3 Αποτελέσματα του Πειράματος

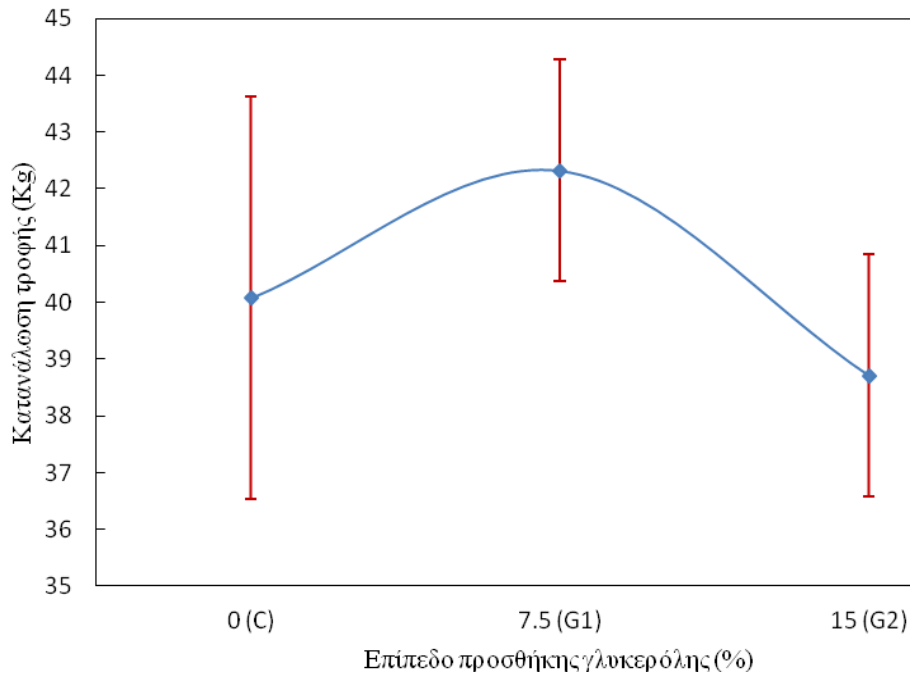
2.3.1 Αποτελέσματα ζωοτεχνικών παραμέτρων

Η κατανάλωση της τροφής, η εξέλιξη του σωματικού βάρους και ο συντελεστής εκμετάλλευσης του σιτηρεσίου από τα χοιρίδια, ήταν οι ζωοτεχνικές παράμετροι οι οποίες μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τα αποτελέσματα, παραθέτονται στον πίνακα 2.9 και στα διαγράμματα 4, 5 και 6.

Πίνακας 2.9 Μέσοι όροι κατανάλωσης τροφής (ΚΤ: kg/χοιρίδιο), αύξησης σωματικού βάρους (ΑΣΒ: kg/χοιρίδιο) και συντελεστή εκμετάλλευσης τροφής (ΣΕΤ) ανά επέμβαση, για όλη τη διάρκεια του πειράματος.

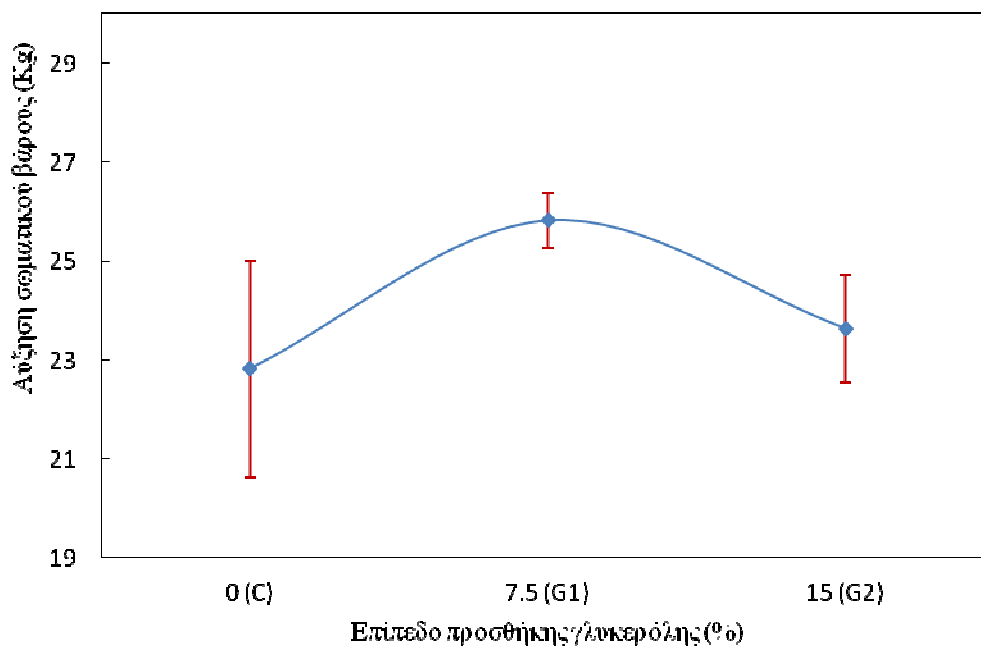
	Επέμβαση			<i>SEM</i>	<i>P Linear</i>	<i>P Quadratic</i>
	C	G1	G2			
ΚΤ	40,08	42,32	38,71	3,732	0,719	0,379
ΑΣΒ	22,82	25,82	23,63	2,038	0,694	0,163
ΣΕΤ	1,77	1,64	1,63	0,070	0,075	0,335

Διάγραμμα 4. Επίδραση του επιπέδου προσθήκης γλυκερόλης στην κατανάλωση τροφής καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.



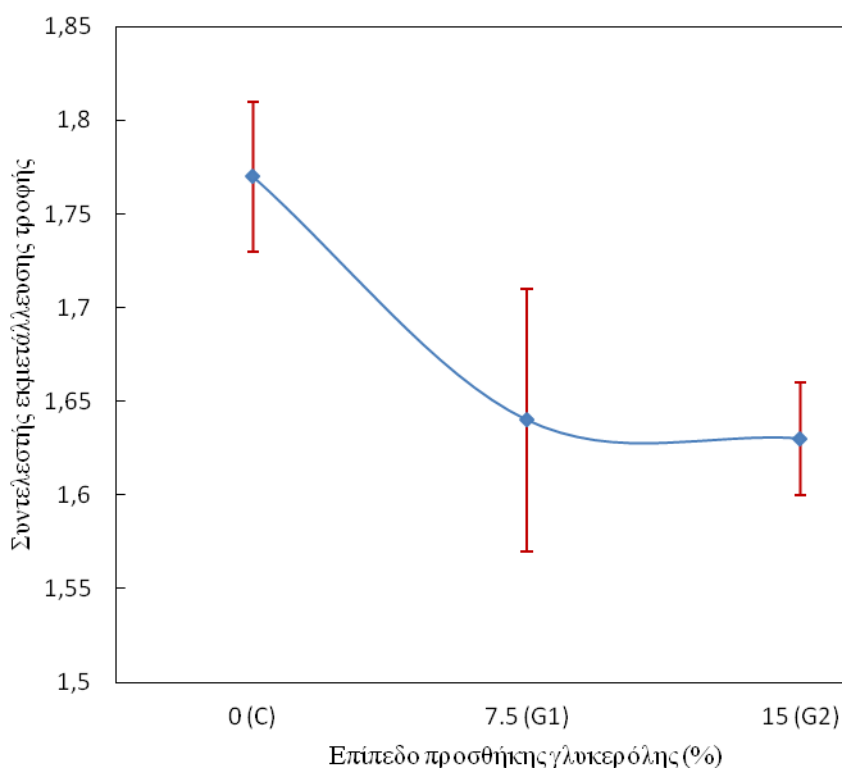
Από το διάγραμμα 4, παρατηρούμε ότι η κατανάλωση της τροφής δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων και κυμάνθηκε σχεδόν στα ίδια επίπεδα. Η επέμβαση G1, εμφάνισε λίγο πιο αυξημένη κατανάλωση τροφής σε σχέση με την επέμβαση G2 και την επέμβαση του μάρτυρα.

Διάγραμμα 5. Επίδραση του επιπέδου προσθήκης γλυκερόλης στην αύξηση του σωματικού βάρους καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.



Από το διάγραμμα 5, παρατηρούμε ότι η αύξηση του σωματικού βάρους των χοιριδίων κατά τη διάρκεια του πειράματος δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων. Παρόλα αυτά βλέπουμε ότι η επέμβαση G1 εμφανίζει λίγο πιο αυξημένο σωματικό βάρος σε σχέση με το μάρτυρα κατά 10 % περίπου.

Διάγραμμα 6. Επίδραση του επιπέδου προσθήκης γλυκερόλης στον συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής καθ' ολη τη διάρκεια του πειράματος.



Από το διάγραμμα 6, παρατηρούμε ότι ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής δεν παρουσίασε σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των επεμβάσεων. παρατηρήθηκε όμως μία τάση γραμμικής μείωσης ($P= 0,075$) του ΣΕΤ με την αύξηση της γλυκερόλης (Πίνακας 2.9).

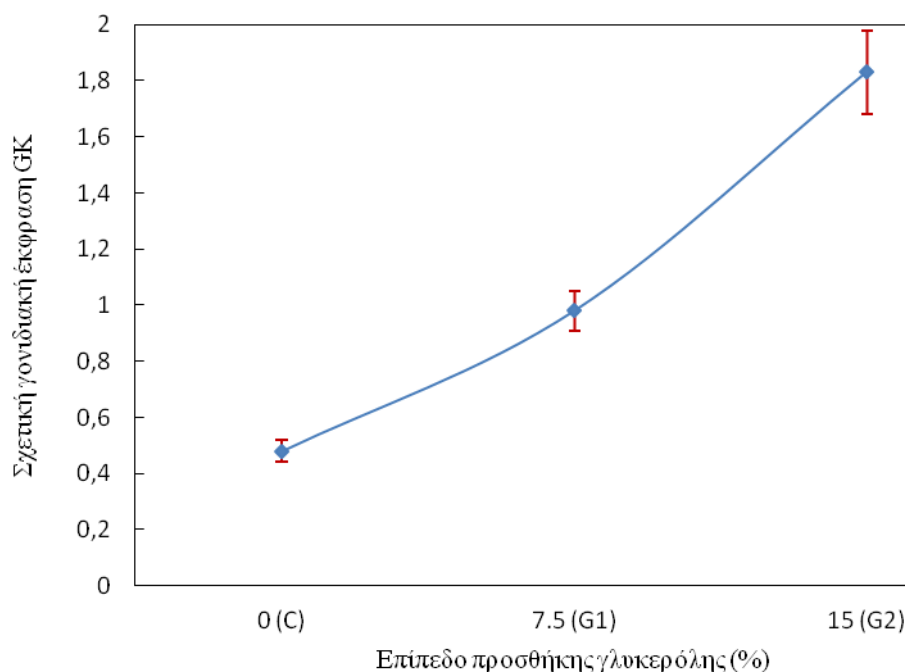
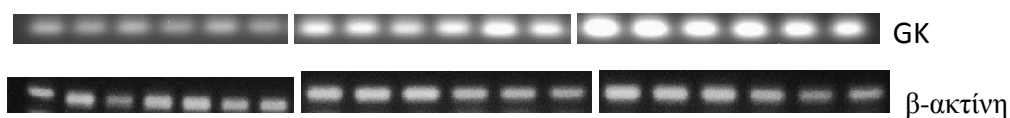
2.3.2 Αποτελέσματα γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των χοιριδίων και γλυκερόλης στο αίμα των χοιριδίων

Στον πίνακα 2.10 και στα διαγράμματα 7 και 8, παραθέτονται τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων παραμέτρων.

Πίνακας 2.10 Έκφραση γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ, γονίδιο Β-ακτίνη, γλυκερινική κινάση/Β-ακτίνη και συγκέντρωση γλυκερόλης στο αίμα των χοιριδίων.

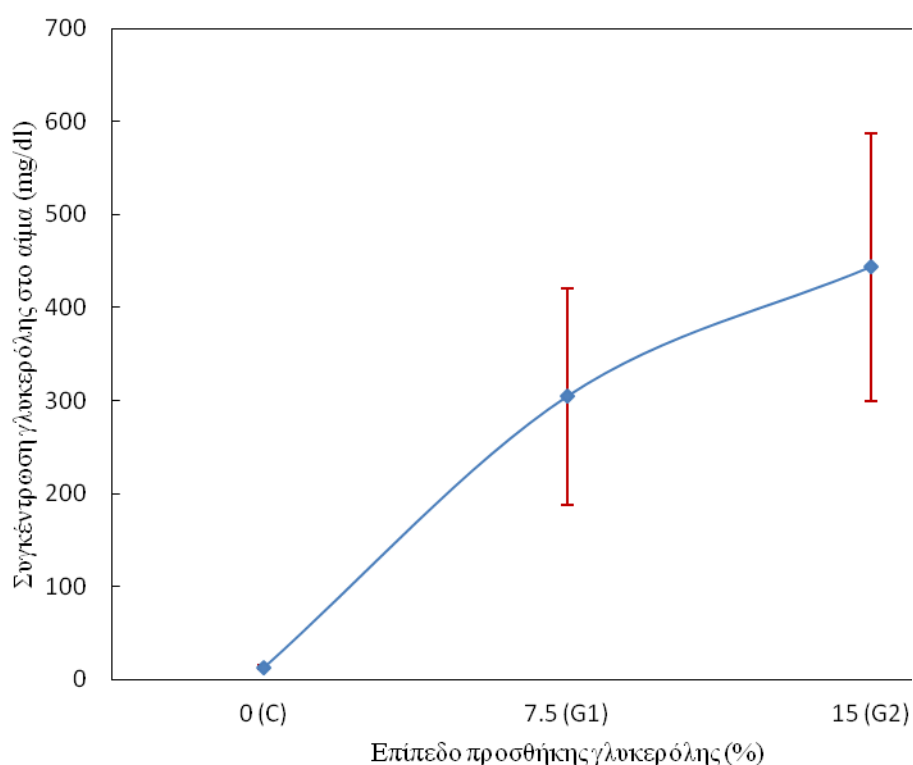
	Επέμβαση			SEM	P _{Linear}	P _{Quadratic}
	C	G1	G2			
Γλυκερινική κινάση	29,49	60,26	108,04	10,954	<0,001	0,384
β-ακτίνη	62,44	62,67	58,37	4,852	0,415	0,598
Γλυκερινική κινάση/Β-ακτίνη	0,48	0,98	1,83	0,141	<0,001	0,174
Γλυκερόλη	13,05±2,05	304,43±116,22	443,29±143,37	-	0,012	0,568

Διάγραμμα 7. Σχετική γονιδιακή έκφραση γλυκερινικής κινάσης (GK) στο ήπαρ χοιριδίων.



Από το διάγραμμα 7, παρατηρούμε ότι η έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των χοιριδίων ακολούθησε γραμμική αύξηση ($P < 0,001$) όσο αυξανόταν το ποσοστό της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο των χοιριδίων. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του ενζύμου σχεδόν διπλασιάζεται από την επέμβαση του μάρτυρα στην επέμβαση G1 και από την επέμβαση G1 στην επέμβαση G2.

Διάγραμμα 8. Συγκέντρωση γλυκερόλης στο αίμα των χοιριδίων.



Από το διάγραμμα 8, παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο αίμα των χοιριδίων αυξήθηκε γραμμικά ($P < 0,001$) με την αύξηση της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο. Ακόμα παρατηρήθηκε ότι υπήρξε μία σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης από την επέμβαση του μάρτυρα στην επέμβαση G1, ενώ παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης από την επέμβαση G1 στην επέμβαση G2 αλλά όχι σε τόσο μεγάλο βαθμό. Ακόμα οι μεγάλες αποκλίσεις οι οποίες παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα τυπικά σφάλματα των επεμβάσεων οφείλονται πιθανώς στην διαφορετική ώρα κατά την οποία τα χοιρίδια κατανάλωσαν το τελευταίο τους γεύμα.

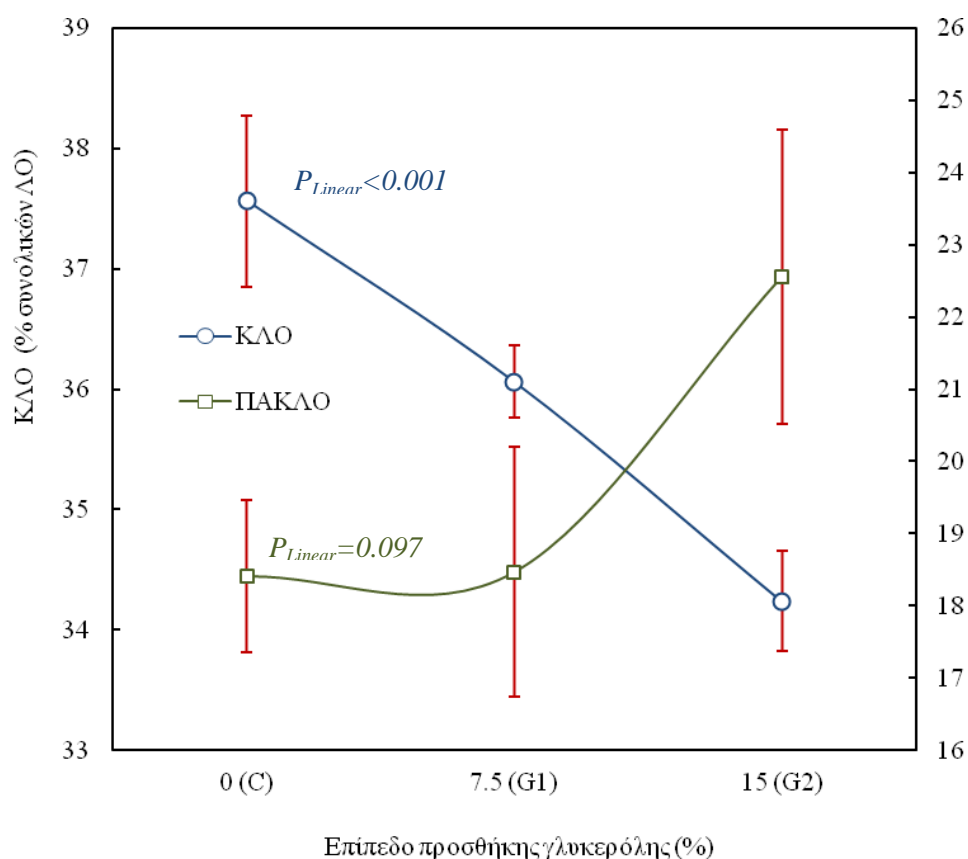
2.3.3 Αποτελέσματα λιπαρών οξέων (ΛΟ) στον επιμήκη ραχιαίο (Longissimus dorsi)

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 2.11 παρατηρήθηκε ότι τα ολικά ΛΟ (ενδομυϊκό λίπος) δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη γλυκερόλης. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα C14:0, C16:0 και C17:0), παρουσίασαν γραμμική μείωση ($P=0,003$, $P<0,001$ και $P=0,026$, αντίστοιχα) καθώς αυξάνονταν το επίπεδο προσθήκης της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο, ενώ αντίθετα τα C18:0 και C20:0 επηρεάστηκαν τετραγωνικά ($P=0,024$ και $P=0,013$, αντίστοιχα). Για το λόγο αυτό το C18:0 ήταν πιο αυξημένο, ενώ αντίθετα το C20:0 πιο μειωμένο για την G1 σε σύγκριση με τις άλλες δύο επεμβάσεις. Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα δεν επηρεάστηκαν με εξαίρεση το t18:1, το οποίο αυξήθηκε γραμμικά ($P=0,019$) με την προσθήκη της γλυκερόλης. Από την άλλη μεριά, τα πολυακόρεστα C18:3n-3, C20:3n-6, EPA, C22:5n-3 και DHA αυξήθηκαν γραμμικά ($P=0,007$, $P=0,037$, $P=0,017$, $P=0,013$ και $P=0,009$, αντίστοιχα) με την αύξηση του επιπέδου γλυκερόλης. Σαν αποτέλεσμα όλων των παραπάνω, το σύνολο των ΚΛΟ μειώθηκε γραμμικά ($P<0,001$) και τα ΠΑΚΛΟ συνολικά παρουσίασαν μία τάση ($P=0,097$) γραμμικής αύξησης, με συνέπεια ο λόγος ΠΑΚΛΟ/ΚΛΟ να αυξηθεί γραμμικά ($P=0,036$) με την αύξηση της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο (Πίνακας 2.11, Διάγραμμα 9).

Πίνακας 2.11 Προφίλ λιπαρών οξέων (% των συνολικών ΛΟ) στον επιμήκη ραχιαίο (Longissimus dorsi).

	Επέμβαση			SEM	P Linear	P Quadratic
	C	G1	G2			
C14:0	1,16	0,99	0,83	0,095	0,003	0,984
C16:0	24,34	22,59	20,96	0,724	<0.001	0,919
C16:1	3,41	3,02	2,87	0,284	0,077	0,647
C17:0	0,27	0,23	0,38	0,445	0,026	0,024
C18:0	11,16	11,69	10,98	0,326	0,600	0,044
t18:1	0,35	0,42	0,46	0,411	0,019	0,765
9c18:1	30,83	33,00	28,96	2,337	0,437	0,146
11c18:1	3,54	3,75	3,71	0,237	0,481	0,545
C18:2	13,48	13,47	15,63	1,528	0,180	0,425
C20:0	0,14	0,08	0,26	0,047	0,024	0,013
C18:3n-3	0,42	0,42	0,58	0,522	0,007	0,097
C20:1	0,38	0,42	0,37	0,081	0,856	0,509
C20:2	0,29	0,30	0,36	0,041	0,092	0,490
C20:3n-6	0,38	0,39	0,59	0,092	0,037	0,258
C20:4n-6	3,30	3,37	4,43	0,591	0,074	0,354
EPA	0,08	0,06	0,18	0,034	0,017	0,024
C22:5n-3	0,30	0,33	0,50	0,072	0,013	0,303
DHA	0,17	0,13	0,30	0,045	0,009	0,019
Ολικά ΛΟ	1076,40	1196,45	963,63	156,619	0,483	0,213
ΜΑΛΟ	38,91	40,98	36,83	2,700	0,453	0,203
ΠΑΚΛΟ/ΚΛΟ	0,49	0,51	0,66	0,073	0,036	0,328

Διάγραμμα 9. Συγκέντρωση λιπαρών οξέων (ΚΛΟ, ΜΑΛΟ και ΠΑΚΛΟ) στον επιμήκη ραχιαίο μυ (Longissimus dorsi).



2.3.4 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων

Στους πίνακες 2.12 και 2.13 καθώς και στα διαγράμματα 10 και 11 παραθέτονται τα στοιχεία των μικροβιολογικών αναλύσεων που έγιναν στο τυφλό έντερο και στον ειλέο των χοιριδίων, σε δείγματα τα οποία λήφθηκαν κατά την σφαγή των ζώων.

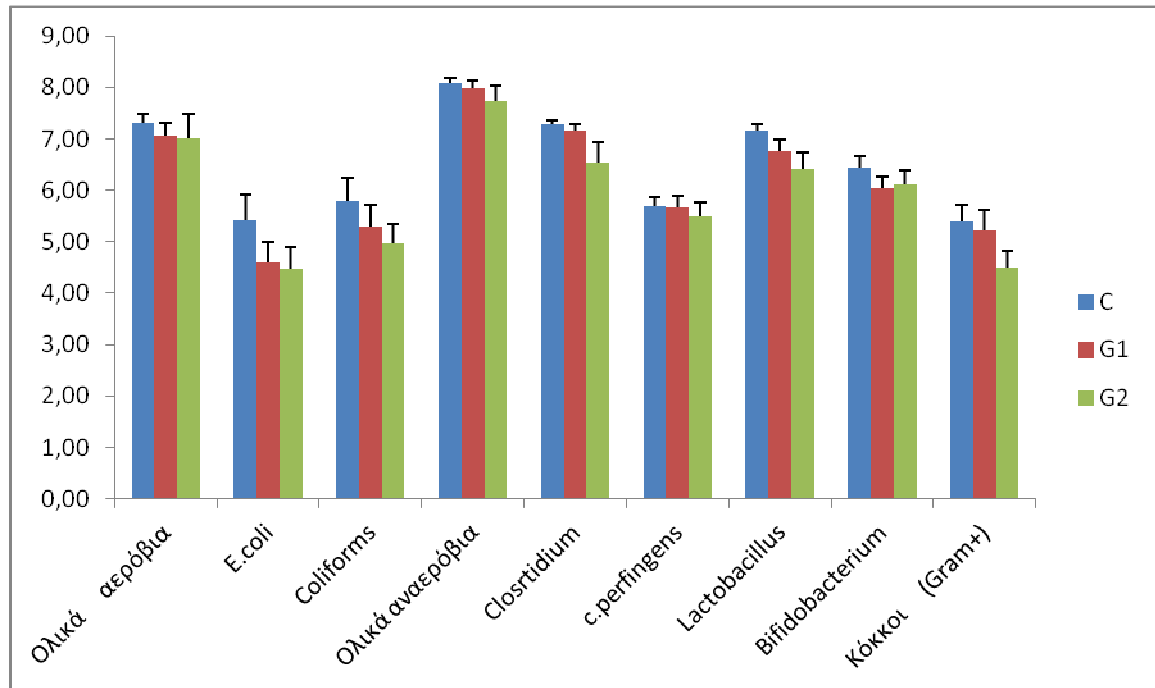
Πίνακας 2.12 Μικροβιακοί πληθυσμοί στο τυφλό έντερο (log cfu / gr εντερικού περιεχομένου).

Βακτήρια	Επέμβαση			P.value
	C	G1	G2	
Ολικά αερόβια	7,3 ± 0,19	7,1 ± 0,25	7,0 ± 0,47	0,790
E. coli	5,4 ± 0,50	4,6 ± 0,40	4,5 ± 0,41	0,288
Coliforms	5,8 ± 0,45	5,3 ± 0,41	5,0 ± 0,37	0,398
Ολικά αναερόβια	8,1 ± 0,098	8,0 ± 0,14	7,7 ± 0,32	0,477
Clostridium	7,3 ± 0,063	7,2 ± 0,11	6,5 ± 0,40	0,092
C. perfringens	5,7 ± 0,18	5,7 ± 0,22	5,5 ± 0,27	0,829
Lactobacillus	7,2 ± 0,13	6,8 ± 0,23	6,4 ± 0,32	0,122
Bifidobacterium	6,4 ± 0,21	6,0 ± 0,21	6,1 ± 0,28	0,475
Κόκκοι (Gram+)	5,4 ± 0,31	5,2 ± 0,39	4,5 ± 0,34	0,177

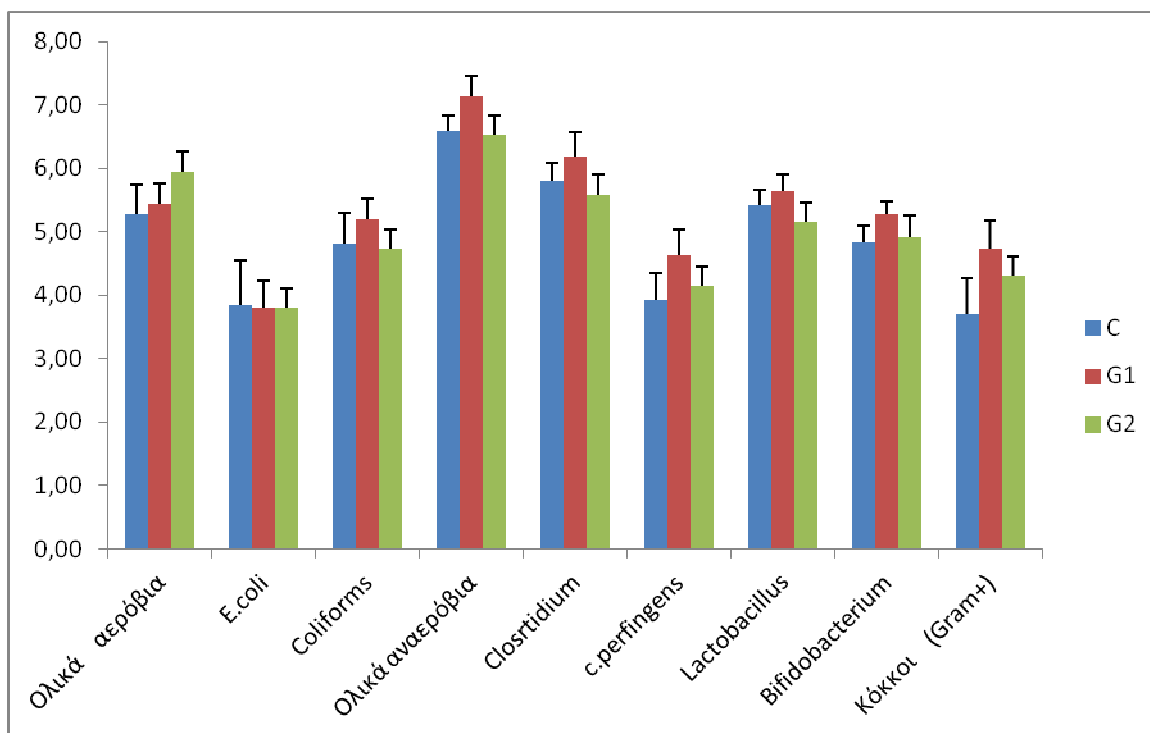
Πίνακας 2.13 Μικροβιακοί πληθυσμοί στον ειλεό (log cfu / gr εντερικού περιεχομένου).

Βακτήρια	Επέμβαση			P.value
	C	G1	G2	
Ολικά αερόβια	5,3 ± 0,47	5,4 ± 0,34	6,0 ± 0,31	0,443
E. coli	3,8 ± 0,70	3,8 ± 0,42	3,8 ± 0,29	0,998
Coliforms	4,8 ± 0,50	5,2 ± 0,34	4,7 ± 0,31	0,677
Ολικά αναερόβια	6,6 ± 0,25	7,1 ± 0,32	6,5 ± 0,30	0,298
Clostridium	5,8 ± 0,28	6,2 ± 0,38	5,6 ± 0,32	0,436
C. perfringens	3,9 ± 0,41	4,6 ± 0,40	4,2 ± 0,30	0,419
Lactobacillus	5,4 ± 0,24	5,6 ± 0,25	5,2 ± 0,29	0,442
Bifidobacterium	4,8 ± 0,26	5,3 ± 0,21	4,9 ± 0,33	0,501
Κόκκοι (Gram+)	3,7 ± 0,55	4,7 ± 0,44	4,3 ± 0,31	0,295

Διάγραμμα 10. Μικροβιακοί πληθυσμοί στο τυφλό έντερο (log cfu / gr εντερικού περιεχομένου).



Διάγραμμα 11. Μικροβιακοί πληθυσμοί στον ειλέο (log cfu / gr εντερικού περιεχομένου).



2.4 Σχολιασμός των Αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος και τη στατιστική τους επεξεργασία, όσο αφορά τις ζωοτεχνικές παραμέτρους, δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Όμως η επέμβαση G1 (7,5 % γλυκερόλη) εμφάνισε λίγο μεγαλύτερη κατανάλωση τροφής από τις δύο άλλες επεμβάσεις καθώς και μεγαλύτερη αύξηση σωματικού βάρους σε σχέση με το μάρτυρα κατά 10 % περίπου (αλλά όχι στατιστικώς σημαντικά). Επίσης οι επεμβάσεις G1 (7,5 % γλυκερόλη) και G2 (15 % γλυκερόλη) εμφάνισαν λίγο καλύτερο συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής, σε σύγκριση με το μάρτυρα.

Όπως προκύπτει από την υπάρχουσα βιβλιογραφία φαίνεται ότι η χρήση γλυκερόλης τύπου 80 % στα σιτηρέσια των χοίρων σε ποσοστό έως 10 % έχει μάλλον θετικά παρά αρνητικά αποτελέσματα στα ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά. Οι Kijora et al. (1996), διεξήγαγαν δύο πειράματα χρησιμοποιώντας γλυκερόλη (τύπου 80 %) στο σιτηρέσιο. Στο πρώτο πείραμα χρησιμοποίησαν γλυκερόλη σε ποσοστά 5 και 10 % αντίστοιχα, ενώ στο δεύτερο πείραμα σε ποσοστά 5, 10, 20 και 30 % αντίστοιχα. Οι χοίροι που στο σιτηρέσιό τους περιέχονταν γλυκερόλη σε ποσοστά 5 και 10 %, εμφάνισαν καλύτερη ημερήσια αύξηση βάρους και κατανάλωση τροφής. Αυτό το αποτέλεσμα αποδόθηκε στην γλυκιά γεύση την οποία προσδίδει στο σιτηρέσιο η γλυκερόλη, καθώς και στην καλύτερη υφή αυτού. Το σιτηρέσιο στο οποίο η γλυκερόλη συμμετείχε σε ποσοστό 30 % εμφάνισε την χαμηλότερη κατανάλωση

τροφής, αύξηση σωματικού βάρους και τον χειρότερο συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής.

Οι Doppenberg και Van Der Aar, (2007), υποστήριξαν ότι η γλυκιά γεύση της γλυκερόλης ευνοεί την κατανάλωση τροφής και την αύξηση του σωματικού βάρους στους χοίρους και στα ορνίθια κρεατοπαραγωγής. Επίσης πρότειναν ότι το καλύτερο ποσοστό χρησιμοποίησης της γλυκερόλης είναι 5 % για τους αναπτυσσόμενους χοίρους.

Οι Lammers et al., (2008) και Groesbeck et al., (2008), διαπίστωσαν ότι η γλυκερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα σιτηρέσια των αναπτυσσόμενων-παχυνόμενων χοίρων σε ποσοστό μέχρι 10 % με μάλλον θετικά αποτελέσματα στα παραγωγικά χαρακτηριστικά. Οι ίδιοι συγγραφείς ανέφεραν ότι η γλυκερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στο εναρκτήριο σιτηρέσιο των θηλαζόντων χοιριδίων και βελτιώνει την ελκυστικότητά του και μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της κατανάλωσης. Αντίθετα, οι Mourot et al., (1994), βρήκαν ότι η προσθήκη γλυκερόλης σε ποσοστό 5 % στο σιτηρέσιο χοίρων δεν επηρέασε το ρυθμό ανάπτυξης σε παχυνόμενους χοίρους από 35 έως 102 κιλά.

Οι Della Casa et al., (2009) ανέφερε ότι η προσθήκη γλυκερόλης στο σιτηρέσιο παχυνόμενων χοίρων σε ποσοστό 5 % δεν επηρέασε το ρυθμό αύξησης του σωματικού βάρους, ενώ σε ποσοστό 10 % προκάλεσε σημαντική μείωση στην κατανάλωση τροφής και στο ρυθμό ανάπτυξης, σε σύγκριση με το μάρτυρα.

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν οι μεταβολές στην έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των χοιριδίων καθώς και η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο αίμα των χοιριδίων μετά από προσθήκη γλυκερόλης στο σιτηρέσιό τους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, προκύπτει ότι η έκφραση της γλυκερινικής κινάσης ακολούθησε γραμμική αύξηση όσο αυξανόταν το ποσοστό της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο των χοιριδίων. Επίσης η έκφραση του ενζύμου σχεδόν διπλασιάστηκε κάθε φορά από την επέμβαση του μάρτυρα στην επέμβαση G1 και στην επέμβαση G2. Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι ο οργανισμός των χοιριδίων έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιήσει τους μηχανισμούς εκείνους που απαιτούνται για την αξιοποίηση της γλυκερόλης, δηλαδή ικανότητα για αύξηση της έκφρασης του mRNA της γλυκερινικής κινάσης, η οποία όπως προαναφέρθηκε αποτελεί το κυριότερο ένζυμο για την ενεργοποίηση του μεταβολισμού της γλυκερόλης. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο αίμα των χοιριδίων αυξήθηκε όσο αυξανόταν το επίπεδο προσθήκης της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο.

Από τα διαθέσιμα στοιχεία προκύπτει ότι δεν υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες όσο αφορά στη γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των χοίρων ή άλλων οργανισμών. Οι Westergaard et al., (1998), ερεύνησαν την ενεργότητα του ενζύμου της γλυκερινικής κινάσης στα ηπατοκύτταρα των επίμυων κάτω από διαφορετικές ορμονικές συνθήκες (ινσουλίνης, γλυκαγόνης, δεξαμεθαζόνη καθώς και συνδυασμούς αυτών) και παρατήρησαν αύξηση της ενεργότητας της γλυκερινικής κινάσης, όσο αυξανόταν η χρήση της γλυκερόλης από τον οργανισμό και στις τρεις διαφορετικές ορμονικές συνθήκες. Οι Wirthensohn et al. (1981), μελέτησαν το μεταβολισμό της γλυκερόλης και την συνεισφορά της γλυκερινικής κινάσης στους νεφρούς κονίκλου. Στην παραπάνω έρευνα παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας της γλυκερινικής κινάσης. Μετά όμως από μία τιμή (πλατό), όσο και αν αυξανόταν η συγκέντρωση της γλυκερόλης η έκφραση του ενζύμου παρέμενε σταθερή ή αυξάνονταν ελάχιστα.

Οι Fisher et al. (1982) μελέτησαν την ενεργότητα της γλυκερινικής κινάσης σε πνευμονοκύτταρα επίμυων και το μεταβολισμό της γλυκερόλης. Ανέφεραν ότι η ενεργότητα του ενζύμου υπήρξε σημαντικά μεγαλύτερη στα κοκκώδη πνευμονοκύτταρα από ότι σε όλο τον πνεύμονα. Ακόμα έδειξαν ότι η έκφραση του ενζύμου αυξάνονταν παράλληλα με τη συγκέντρωση της γλυκερόλης ως ένα σημείο (πλατό), ενώ πέραν του σημείου αυτού όσο αυξάνονταν η συγκέντρωση της γλυκερόλης η ενεργότητα της γλυκερινικής κινάσης παρέμενε σταθερή και ήταν μειούμενη σε ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Η έκφραση του ενζύμου αυξανόταν για συγκεντρώσεις 0,01-1mM, ενώ για συγκεντρώσεις από 1-3mM η έκφραση του ενζύμου παρέμεινε σχεδόν σταθερή. Όταν οι συγκεντρώσεις της γλυκερόλης υπερέβαιναν τα 5mM, η έκφραση του ενζύμου άρχισε να μειώνεται σταδιακά.

Οι Montell et al. (2001), μελέτησαν την ενεργότητα της γλυκερινικής κινάσης στον μεταβολισμό των λιπιδίων και των υδατανθράκων σε ανθρώπινα μυϊκά κύτταρα. Η ενεργότητα του ενζύμου ακολούθησε γραμμική αύξηση όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της γλυκερόλης στα κύτταρα.

Οι Mourot et al. (1994), διαπίστωσαν ότι υπήρξε μία σημαντική αύξηση στα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος στα ζώα τα οποία διατράφηκαν με γλυκερόλη, ενώ τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων και ελεύθερης γλυκερόλης δεν επηρεάστηκαν. Οι Hansen et al. (2009), σε πείραμα στο

οποίο διενήργησαν χρησιμοποίησαν γλυκερόλη στο σιτηρέσιο χοίρων σε ποσοστά 4, 8, 12, και 16 %. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα οποία αφορούσαν στο πλάσμα του αίματος βρέθηκε ότι τα επίπεδα της γλυκερόλης στο πλάσμα του αίματος αυξήθηκαν γραμμικά μία εβδομάδα πριν τη σφαγή των ζώων, ενώ στις πρώτες εβδομάδες του πειράματος δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επίσης οι Kijora et al. (1996), ανέφεραν ότι η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο πλάσμα του αίματος αυξάνεται γραμμικά από την επέμβαση του μάρτυρα, στις επεμβάσεις οι οποίες περιείχαν γλυκερόλη σε ποσοστά 5 και 10 % σε πειραματικά σιτηρέσια χοίρων.

Στη συνέχεια του πειράματος διενεργήθηκαν αναλύσεις οι οποίες αφορούσαν στη μικροβιακή χλωρίδα στον ειλεό και στο τυφλό έντερο των χοίρων και των τριών επεμβάσεων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών των βακτηρίων τα οποία μελετήθηκαν. Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες-έρευνες οι οποίες να περιέχουν μικροβιακούς πληθυσμούς διαφόρων βακτηρίων χοίρων ή άλλων παραγωγικών ζώων που να έχει συμπεριληφθεί στο σιτηρέσιό τους γλυκερόλη σε διάφορα ποσοστά συμμετοχής.

Τέλος, η σύσταση του ενδομυϊκού λίπους του επιμήκη ραχιαίου μυ (Longissimus dorsi) σε λιπαρά οξέα φάνηκε να διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των επεμβάσεων. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συμμετοχής της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο είχε σαν αποτέλεσμα μία τάση γραμμικής αύξησης των ΠΑΚΛΟ, κάτι που μπορεί ενδεχομένως να αποδοθεί στην ελαφρά αύξηση των ΠΑΚΛΟ στο σιτηρέσιο (όπως φάνηκε από την ανάλυση της γλυκερόλης και των σιτηρεσίων για τα ΛΟ) Αντίθετα, τα ΚΛΟ μειώθηκαν γραμμικά με την αύξηση της γλυκερόλης, γεγονός το οποίο δε συνάδει με τα επίπεδά τους στα σιτηρέσια (ήταν ίδια για όλες τις επεμβάσεις).

Οι Della Casa et al. (2009) παρατήρησαν ότι οι χοίροι στους οποίους η γλυκερόλη συμμετείχε σε ποσοστό 10 % εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά στα C18:1n-9 και C18:1n-7), ενώ τα C16:0, C18:0 και C18:2n-6 παρουσίασαν τάση μείωσης σε σύγκριση με το μάρτυρα. Επιλέον τα συνολικά ΚΛΟ και ΠΑΚΛΟ εμφάνισαν μία τάση μείωσης ενώ τα ΜΑΛΟ μία τάση αύξησης από επέμβαση σε επέμβαση (μάρτυρας, 5 % γλυκερόλη και 10 % γλυκερόλη). Επίσης οι Mourot et al. (1994), βρήκαν ότι στην επέμβαση όπου η γλυκερόλη συμμετείχε σε ποσοστό 5 % παρουσιάστηκε αύξηση του C18:1n-9 και μείωση στα C18:2n-6 και C 18:3n-3, στο

ραχιαίο και ενδομυϊκό λίπος, με αποτέλεσμα την αύξηση του δείκτη κορεσμού του.

Φαίνεται από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφόρων ερευνητών. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί σε παράγοντες όπως τα επίπεδα γλυκερόλης που συμμετέχουν στα σιτηρέσια, ο τρόπος προσθήκης της γλυκερόλης (αντικατάσταση άλλων ζωοτροφών, κυρίως δημητριακών καρπών) και στην ενδεχόμενη ύπαρξη υπολειμμάτων ΛΟ στη χρησιμοποιούμενη γλυκερόλη. Ο τελευταίος παράγοντας, ο οποίος αποδείχτηκε στην παρούσα μελέτη, σχετίζεται πιθανότατα με την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των μεθυλεστέρων των ΛΟ κατά τη βιομηχανική παραγωγή του βιοντίζελ. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι οι Lammers et al. (2008), παρατήρησαν ότι η προσθήκη γλυκερόλης, που δεν περιείχε καθόλου ΛΟ στα σιτηρέσια χοίρων προκάλεσε κάποιες μεταβολές στη σύσταση του ενδομυϊκού λίπους (μείωση π.χ. του C14:0), γεγονός που αποδόθηκε στο ότι αντικαταστάθηκε ο αραβόσιτος, όπως προαναφέρθηκε. Στην παρούσα μελέτη όμως, η μείωση των ΚΛΟ στο κρέας δε μπορεί να αποδοθεί σε κάτι τέτοιο. Είναι πιθανόν, η αυξανόμενη γλυκερόλη στο σιτηρέσιο να χρησιμοποιήθηκε για σύνθεση γλυκόζης (μέσω της γλυκονεογένεσης) και όχι για σύνθεση λίπους (*de novo* σύνθεση ΛΟ), καθώς είναι λιγότερο ενεργοβόρα διαδικασία. Βάση του μεταβολισμού της γλυκερόλης όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή, αυτό δείχνει πιθανώς ότι δεν υπήρχε πλεόνασμα ενέργειας στον οργανισμό των χοίρων το οποίο θα οδηγούσε τη χρησιμοποίηση της γλυκερόλης για *de novo* σύνθεση λίπους (και η οποία θα εκφραζόταν με αύξηση των ΚΛΟ ή και των ΜΑΛΟ). Αυτή η υπόθεση αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω για να αξιολογηθεί η επίδραση της γλυκερόλης στην ποιότητα του κρέατος.

2.5 Συμπεράσματα

- Οι αποδόσεις των χοιριδίων δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των επεμβάσεων, όμως τα δεδομένα πρέπει να επαληθευτούν σε μεγαλύτερο αριθμό ζώων. Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι η κατά 10 % περίπου μεγαλύτερη αύξηση σωματικού βάρους στην επέμβαση G1 (7,5 % γλυκερόλη), σε σχέση με το μάρτυρα, μπορεί μεν να μην είναι στατιστικώς σημαντική, σε εμπορικές συνθήκες όμως θα ήταν ένα αξιόλογο πλεονέκτημα.
- Η γονιδιακή έκφραση της γλυκερινικής κινάσης στο ήπαρ των χοιριδίων ακολούθησε γραμμική αύξηση όσο αυξάνονταν τα ποσοστά συμμετοχής της γλυκερόλης στο σιτηρέσιο των χοιριδίων.
- Η συγκέντρωση της γλυκερόλης στο αίμα των χοιριδίων αυξήθηκε όσο αυξάνονταν τα επίπεδα προσθήκης της γλυκερόλης. Επίσης, φαίνεται ότι όσο συνεχίζεται η αύξηση του επιπέδου γραμμικά με το επίπεδο προσθήκης της γλυκερόλης, γεγονός που δείχνει ότι η γλυκερόλη απορροφάται αποτελεσματικά από το πεπτικό σύστημα. Το αν αξιοποιείται το ίδιο αποτελεσματικά πρέπει να διερευνηθεί σύμφωνα με τα προηγούμενα.
- Η συγκέντρωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων ακολούθησε μία γραμμική πτώση με την αύξηση της γλυκερόλης, ενώ η συγκέντρωση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Η συγκέντρωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων παρουσίασε μία τάση αύξησης, με την προσθήκη

3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

γλυκερόλης, η οποία σε συνδυασμό με τη μείωση των ΚΛΟ, οδήγησε σε πιο επιθυμητό λόγο ΠΑΚΛΟ/ΚΛΟ (κυρίως για την G2 επέμβαση).

- Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στους μικροβιακούς πληθυσμούς των χοιριδίων στον ειλεό και στο τυφλό έντερο.

1. Aron B. Fisher and Avinash Chander, 1981. Glycerol Kinase Activity and Glycerol Metabolism of Rat Granular Pneumocytes in Primary Culture. *Biochimica et Biophysica Acta*, 711, 128-133.
2. B.K. Barnwal, M.P. Sharma, 2004. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Science direct*, 9, 363-378.
3. B.T. Jenkins and A.K. Hajra, 1975. Glycerol Kinase and Dihydroxyacetone Kinase in Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, 26, 377-385.
4. Best, P. (2006) Increased biofuel production will grow supplies of by-products: Glycerine gives an energy option. *Feed International*, 20-21.
5. C. F. Hansen, A. Hernandez, B. P. Mullan, K. Moore, M. Trezona-Murray, R. H. King and J. R. Pluske, 2009. A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. *Animal Production Science*, 49, 154-161.
6. C. N. Groesbeck, L. J. McKinney, J. M. DeRouchey, M. D. Tokach, R. D. Goodband, S. S. Dritz, J. L. Nelssen, A. W. Duttlinger, A. C. Fahrenholz and K. C. Behnke, 2008. Effect of crude glycerol on pellet mill production and nursery pig growth performance. *Journal of Animal Science*.
7. Claudia Kijora, Rolf-Denis Kupsch, 1996. Evaluation of technical glycerols from biodiesel production as a feed component in fattening of pigs. *Fett / Lipid*, 98, 240-245.
8. D.R. Rao and Anne Y. Kou, 1976. Partial Purification and Characterization of Glycerol Kinase from Chicken Liver. *International Journal of Biochemistry*, 8, 295-298.
9. E.M. Kondili, J.K. Kaldellis, 2007. Biofuel implementation in East Europe: Current status and future prospects. *Renewable and sustainable energy reviews*, 11, 2137-2151.
10. Eulalia Montell, Carlos Lerin, Cristopher B. Newgard, Anna M. Gomez-Foix, 2001. Effects of Modulation of Glycerol Kinase Expression on Lipid and Carbohydrate Metabolism in Human Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry and Molecular Biology*, 277, 2682-2686.

11. Fangrui Ma, Milford A. Hanna, 1999. Biodiesel production a review. *Bioresource technology*, 70, 1-15.
12. G. Della Casa, 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.
13. 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*.
14. Gabriele Wirthensohn, Alain Vandewalle, Walter G. Guder, 1981. Renal Glycerol Metabolism and the Distribution of Glycerol Kinase in Rabbit Nephron. *Biochemical Journal*, 198, 543-549.
15. J. Mourot, A. Aumaitre a, A. Mounier a, P. Peiniau a, A.C. Franqois, 1994. Nutritional and physiological effects of dietary glycerol in the growing pig. Consequences on fatty tissues and post mortem muscular parameters. *Livestock Production Science*, 38, 237-244.
16. J.C. Thompson, B.B. He, 2006. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture*, 22 (2): 261-265.
17. J.M. DeFrain, A.R. Hippen, K.F. Kalscheur and P.W. Jardon, 2004. Feeding glycerol to transition dairy cows: Effects on Blood Metabolites and Lactation Performance. *Journal of Dairy Science*, 87, 4195-4206.
18. J.M. Marchetti, V.U. Miguel, A.F. Errazu, 2007. Possible methods for biodiesel production. *Renewable and sustainable energy reviews*, 11, 1300-1311.
19. Janes Doppenberg and Piet Van Der Aar 2007, *Biofuels: implications for the feed industry*. ISBN 978-90-8686-043-2.
20. Jianhua Gong, Robert J. Forster, Hai Yu, James R. Chambers, Roger Wheatcroft, Parviz M. Sabour, Shu Chen, 2002. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiology Ecology*, 41, 171-179.
21. Jo Pluske, 2007. Evaluation of glycerine as a co-product of biodiesel production for the pig industry. Report prepared for the pork Co-operative Research Center.

22. Jon Van Gerpen, 2005. Biodiesel processing and production. *Fuel processing technology*, 86, 1097-1107.
23. Jun Zhu, 2000. A review in swine manure odor control. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 78, 93-106.
24. K.-H. Sudecum, A. Schroder, S. Fiebelkorn, R. Schwer and A. Thalmann, 2007. Quality characteristics of pelleted compound feeds under varying storage conditions as influenced by purity and concentration of glycerol from biodiesel production. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17, 120-136.
25. Kahraman Bozbas, 2008. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renewable and sustainable energy reviews*, 12, 542-552.
26. Konstantinos C. Mountzouris, 2006. Assessment of the efficacy of probiotics, prebiotics and synbiotics in swine nutrition: a review. *Food Science and Technology*, 3, 51-71.
27. Konstantinos C. Mountzouris, Christos Balaskas, Francesca, Fava, Kieran M. Tuohy, Glenn R. Gibson, K. Fegeros, 2006. Profiling of Composition and Metabolic Activities of the Colonic Microflora of Growing Pigs Fed Diets Supplemented with Prebiotic Oligosaccharides. *Anaerobe*, 12, 178-185.
28. 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.
29. Lisa Ryan, Frank Convery, Susana Ferreira, 2006. Stimulating the use of Biofuels in the European Union: Implications for climate change policy. *Energy policy*, 34, 3184-3194.
30. Luis A. Barreta and Ren-jye Ho, 1978. Adipose Glycerol Kinase: Low Molecular Weight Protein has two Michaelis Constants for Glycerol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 86, 145-152.
31. M. A. Franklin, A. G. Mathew, J. R. Vickers, and R. A. Clift, 2002. Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. *Journal of Animal Science*, 80, 2904-2910.
32. Marisol Castillo, Susana M. Marti'n-Oru'e, Edgar G. Manzanilla, Ignacio Badiola, Marga Marti'n, Josep Gasa, 2006. Quantification of total bacteria,

- enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*, 114, 165-170.
33. Mark W. Rosegrant, 2008. *Biofuels and Grain Prices: Impacts and Policy Responses*. International food policy research institute.
 34. Michael J. Haas, Andrew J. McAloon, Winnie C. Yee, Thomas A. Foglia, 2006. A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresource Technology*, 97, 671-678.
 35. Niels Westergaard, Peter Madsen, Karsten Lundgren, 1998. Characterization of Glycerol Uptake and Glycerol Kinase Activity in Rat Hepatocytes Cultured Under Different Hormonal Conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1402, 261-268.
 36. *Nutrient Requirements of Swine*, (NRC, 1998), 10th Revised Edition. ISBN 0-309-05993-3
 37. P. J. Lammers, 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. *Journal of Animal Science*.
 38. Peter McKendry, 2002. Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. *Bioresource technology*, 83, 47-54.
 39. Pethick, D.W., Cummins, L., Gardner, G.E., Knee, B.W., McDowell, M., McIntyre, B. L., Tudor, G., Walker, P.J. and Warner, R.D., 1999. The regulation of glycogen level in the muscle of ruminants by nutrition.
 40. Randy Schnepf, 2006. *European Union Biofuels Policy and Agriculture: An Overview*. CRS (Report for Congress), code: RS22404.
 41. S. Cerrate, 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.
 42. Seppo Salminen, Atte Von Wright and Arthur Ouwehand 2004. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects* 3rd Edition. ISBN 0-8247-5332-1.
 43. Thomas D. Leser,* Joanna Z. Amenuvor, Tim K. Jensen, Rikke H. Lindecrona, Mette Boye, and Kristian Møller, 2001. Culture-Independent Analysis of Gut Bacteria: the Pig Gastrointestinal Tract Microbiota Revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, 673-690.

44. W.N. Ewing and D.J.A. Cole 1994. The living gut an introduction to Microorganisms in Nutrition. ISBN 1-899043-00-4.
45. Κ. Φεγγερός 2008. Υποπροϊόντα βιομηχανιών παραγωγής βιοενέργειας στη διατροφή των ζώων. Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, τεύχος 34, σελ 37-53.