

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

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Η ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
(Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥ)**

ΙΩΑΝΝΑ Π. ΠΟΥΛΟΠΟΥΛΟΥ

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Χατζηγεωργίου Ι. Επ. Καθηγητής

Ζέρβας Γ. Καθηγητής

Χαρουτουιάν Σ. Καθηγητής

Αθήνα Ιούλιος 2011

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

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Η ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
(Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥ)**

ΙΩΑΝΝΑ Π. ΠΟΥΛΟΠΟΥΛΟΥ

Εξεταστική Επιτροπή:

Χατζηγεωργίου Ι. Επ. Καθηγητής

Ζέρβας Γ. Καθηγητής

Χαρουτουιάν Σ. Καθηγητής

Δεληγεώργης Σ. Καθηγητής

Ξυλούρη Ε. Αν. Καθηγήτρια

Μασούρας Θ. Επ. Καθηγητής

Μουντζούρης Κ. Επ. Καθηγητής

Αθήνα Ιούλιος 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εισηγητή και Επ. Καθηγητή κ. Χατζηγεωργίου για την πολύτιμη βοήθειά και στήριξή του σε όλα τα στάδια της μελέτης. Χωρίς την παρουσία του θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση αυτής της μελέτης. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Συμβουλευτικής μου Επιτροπής Καθηγητή κ. Ζέρβα και Καθηγητή κ. Χαρουτουριά για την καθοδήγηση τους και της χρήσιμες παρατηρήσεις του σε όλα τα στάδια της μελέτης. Επιπλέον ευχαριστήσεις εκφράζονται στα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής Καθηγητή κ. Δεληγεώργη, Αν. Καθηγήτρια κ. Ξυλούρη, Επ. Καθηγητή κ. Μασούρα και Επ. Καθηγητή κ. Μουντζούρη.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την υποτροφία την οποία έλαβα για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Νιώθω επίσης την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Λέκτορα κ. Ζωΐδη για την βοήθειά και τη στήριξη που μου περείχε. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Λέκτορα κ. Καρακατσούλη για τη βοήθειά της στις αναλύσεις και το Λέκτορα κ. Δεμίρη για τη βοήθειά στη στατιστική επεξεργασία των πειραμάτων της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη των Εργαστηρίων Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής, Υδροβιολογίας και Γαλακτοκομίας για τη βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και των αναλύσεων της παρούσας μελέτης.

Τέλος νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους φίλους μου Μαρκοπούλου Μ., Παπαευσταθίου Σ., Τροπελάκο Α., Κιούλου Α., Ντάφη Β., Λαμπροπούλου Τ., Δημητροπούλου Ε., Λιανδρή Ε., Δημητροπούλου Μ. που μοιράστηκαν τη χαρά μου, τις δυσκολίες μου και χωρίς την στήριξή τους η ολοκλήρωση της μελέτης θα ήταν αδύνατη.

Στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα Πινάκων.....	7
Περιεχόμενα Εικόνων και Διαγραμμάτων.....	9
Αλφαβητικός πίνακας συντομογραφιών.....	11
A. Περίληψη.....	12
B. Abstract.....	14
Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	15
1. Αναγνωρισιμότητα διατροφικών προϊόντων.....	15
1.1 Βιοδείκτες.....	17
1.2 Ανόργανοι βιοδείκτες.....	18
1.2.1 Ισότοπα.....	18
1.2.2 Φυτικοί βιοδείκτες.....	20
1.2.2.1 Καροτενοειδή.....	20
1.2.2.2 Φαινολικές ενώσεις.....	21
1.2.2.3 Πτητικά αρωματικά συστατικά.....	22
1.2.2.3.1 Ανίχνευση και προσδιορισμός πτητικών ενώσεων.....	23
1.2.3 Λιπαρά οξέα και αναγνωρισιμότητα ζωικών προϊόντων.....	26
2. Τερπένια.....	29
2.1 Ρόλος, κατηγορίες και χημική σύσταση τερπενίων.....	30
2.1.1 Μονοτερπένια.....	30
2.1.2 Σεσκιτερπένια.....	32
2.2 Βιοσύνθεση.....	33
3. Τερπένια και φυτικά είδη βοσκοτόπων.....	37
3.1. Συσχέτιση των τερπενίων με τις βοσκές και τα βόσκοντα ζώα.....	39
4. Τα τερπένια στο ζωικό οργανισμό.....	42
4.1. Αποδόμηση.....	42
4.2. Μεταβολισμός.....	45
5. Τερπένια και κτηνοτροφικά προϊόντα.....	48
5.1 Αναγνωρισιμότητα των ζωικών προϊόντων.....	48
5.2. Κρέας και Γαλακτοκομικά προϊόντα.....	49
5.3 Τερπένια και υγεία.....	53
Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	57
1. Σκοπός της μελέτης.....	58
2. Πείραμα 1ο και 2ο.....	59
2.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	59
2.2.1. Αίγες και Πρόβατα.....	59
2.3 Αναλύσεις δειγμάτων γάλακτος.....	60
2.3.1 Προσδιορισμός χημικής σύστασης του γάλακτος.....	60
2.3.2 Προσδιορισμός των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων πήξεως του γάλακτος.....	60
2.3.3 Προσδιορισμός σύνθεσης λιπαρών οξέων του γάλακτος.....	61
2.4. Παρασκευή σκληρού τυριού - Κεφαλοτύρι.....	62
2.4.1 Αναλύσεις στα δείγματα τυριού.....	62
2.4.1.1 Προσδιορισμός της λιποπεριεκτικότητας (Μέθοδος Gerber-Van-Gulik).....	62
2.4.1.2 Προσδιορισμός ολικού, υδατοδιαλυτού αζώτου και πρωτεϊνών.....	63
2.5 Ανίχνευση και προσδιορισμός τερπενίων στο πλάσμα του αίματος και στα ζωικά προϊόντα.....	63
2.5.1 Προσδιορισμός τερπενίων στο πλάσμα αίματος.....	63
2.5.2 Ανίχνευση και προσδιορισμός τερπενίων στο γάλα.....	65
2.5.3 Ανίχνευση και προσδιορισμός τερπενίων στο τυρί.....	68
2.5.4 Στατιστική επεξεργασία.....	68

3 Αποτελέσματα 1ου και 2ου Πειράματος.....	70
3 Αποτελέσματα 1ου και 2ου Πειράματος.....	70
3.1 Αίγες.....	70
3.1.1 Ύψος γαλακτοπαραγωγής και χημική σύσταση αίγειου γάλακτος.....	70
3.1.2 Χαρακτηριστικές ιδιότητες πήξεως του αίγειου γάλακτος.....	71
3.1.3 Σύνθεση λιπαρών οξέων στο λίπος του γάλακτος των αιγών.....	71
3.1.4 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης τερπενίων στο πλάσμα του αίματος των αιγών.....	73
3.1.5 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης τερπενίων στο αίγειο γάλα.....	75
3.1.6 Χημικά χαρακτηριστικά και συγκέντρωση λιπαρών οξέων στο αίγειο τυρί.....	76
3.1.7 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης τερπενίων στο αίγειο τυρί.....	77
3.2 Πρόβατα.....	78
3.2.1 Ύψος γαλακτοπαραγωγής και χημική σύσταση πρόβειου γάλακτος.....	78
3.2.2 Χαρακτηριστικές ιδιότητες πήξεως του πρόβειου γάλακτος.....	79
3.2.3 Σύνθεση λιπαρών οξέων στο λίπος του γάλακτος των προβάτων.....	80
3.2.4 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης τερπενίων στο πλάσμα του αίματος των προβάτων.....	81
3.2.5 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης τερπενίων στο γάλα των προβάτων.....	83
3.2.6 Χημικά χαρακτηριστικά και συγκέντρωση λιπαρών οξέων στο πρόβειο τυρί.....	84
3.2.7 Συγκέντρωση τερπενίων στο πρόβειο τυρί.....	85
3.3. Σχολιασμός αποτελεσμάτων 1ου και 2ου πειράματος.....	86
4. Πείραμα 3ο - Μελέτη του ρυθμού αποδόμησης των τερπενίων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας αιγών και προβάτων.....	95
4.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	95
4.1.1 Προπειραματική διαδικασία.....	95
4.1.2 Πειραματικός σχεδιασμός.....	95
4.1.3 Ανάλυση δειγμάτων υγρού μεγάλης κοιλίας σε τερπένια.....	96
4.1.4 Υπολογισμοί και στατιστική επεξεργασία.....	97
4.2 Αποτελέσματα 3ου πειράματος.....	97
4.2.1 Προσδιορισμός ρυθμού αποδόμησης τερπενίων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας.....	97
4.3 Σχολιασμός των αποτελεσμάτων του 3ου πειράματος.....	100
5. Πείραμα 4ο - Προσδιορισμός της κυτταροστατικής - κυτταροτοξικής δράσης τερπενίων in vitro, στην συνεχή κυτταρική σειρά νεφρού κουνελιού RK13. Αξιολόγηση με την χρωματομετρική μέθοδο MTT [3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.....	106
5.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	106
5.2 Αποτελέσματα 4ου πειράματος.....	107
5.2.1 Αξιολόγηση της κυτταροστατικής-κυτταροτοξικής δράσης τερπενίων in vitro σε κύτταρα νεφρού κουνελιού (RK-13) με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT.....	107
5.3. Σχολιασμός αποτελεσμάτων του 4ου πειράματος.....	109
E. Συμπεράσματα.....	112
Βιβλιογραφία.....	115
Παράρτημα.....	133

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1. Κυριότερες κατηγορίες μονοτερπενίων.....	31
Πίνακας 2. Κυριότερες κατηγορίες σεσκιτερπενίων.....	33
Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις τερπενίων που έχουν προσδιοριστεί σε διάφορα φυτικά είδη	38
Πίνακας 4. Μελέτες ζωικής παραγωγής που διερευνούν τη σχέση κατανάλωσης τερπενίων με ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά της παραγωγής.....	52
Πίνακας 5. Επαναληψιμότητα μεθόδου προσδιορισμού τερπενίων στο αίμα.	64
Πίνακας 6. Επαναληψιμότητα μεθόδου προσδιορισμού τερπενίων στο γάλα.....	68
Πίνακας 7. Εξέλιξη της γαλακτοπαραγωγής αιγών (kg/κεφαλή/ημέρα) για τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος. .	70
Πίνακας 8. Χημική σύσταση αίγειου γάλακτος από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.	70
Πίνακας 9. Μέσοι όροι χαρακτηριστικών ιδιοτήτων πήξεως του γάλακτος των αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	71
Πίνακας 10. Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων λιπαρών οξέων ως ποσοστό επί του συνόλου (%), στο γάλα των αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.	72
Πίνακας 11. Χημική σύσταση αίγειου τυριού που παράχθηκε από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) και στις τρεις τυροκομήσεις (1, 2 και 3) κατά τη διάρκεια του πειράματος.	76
Πίνακας 12. Εξέλιξη της γαλακτοπαραγωγή προβάτων (kg/κεφαλή/ημέρα) για τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	78
Πίνακας 13. Χημική σύσταση πρόβειου γάλακτος από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.	79
Πίνακας 14. Μέσοι όροι χαρακτηριστικών ιδιοτήτων πήξεως του γάλακτος προβάτων από τα δείγματα των ομάδων επέμβασης (T) και μάρτυρα (C) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	79
Πίνακας 15. Μέσοι όροι της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων, ως ποσοστό επί του συνόλου (%), στο γάλα των προβάτων των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T).	80
Πίνακας 16. Χημική σύσταση πρόβειου τυριού που παράχθηκε από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) και στις δύο τυροκομήσεις (1 και 2).	84
Πίνακας 17. Συνολικός μέσος όρος ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) των τερπενίων από ομαδοποίηση των δεδομένων ως προς τα είδη ζώων και τον πειραματικό χρόνο.....	97
Πίνακας 18. Σύγκριση των διαφορών των συνολικών μέσων όρων του ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) του α-πινενίου στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ανεξάρτητα από το είδος του ζώου ανά εβδομάδα.....	98
Πίνακας 19. Σύγκριση των διαφορών των συνολικών μέσων όρων του ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) του λεμονενίου στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ανεξάρτητα από το είδος του ζώου ανά εβδομάδα.....	99
Πίνακας 20. Σύγκριση των διαφορών των μέσων όρων του ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) του β-καρνοφυλλενίου στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ανεξάρτητα από το είδος του ζώου ανά εβδομάδα.....	99
Πίνακας 21. Εξέλιξη της συγκέντρωσης λιπαρών οξέων επί τοις εκατό (%) στο γάλα των αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	133

Πίνακας 22. Εξέλιξη της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων επί τοις εκατό (%) στο γάλα των προβάτων των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T).	134
Πίνακας 23. Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου (μg/ml) κατά τις πρώτες 24 ώρες στο πλάσμα του αίματος των αιγών που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια.....	135
Πίνακας 24 Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου (μg/ml) στο πλάσμα του αίματος των αιγών που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.....	135
Πίνακας 25 Μέσος όρος συγκέντρωσης (μg/ml) α-πινενίου και λεμονενίου στο γάλα των αιγών που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.	135
Πίνακας 26 Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου (μg/ml) κατά τις πρώτες 24 ώρες στο πλάσμα του αίματος των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια	136
Πίνακας 27 Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου (μg/ml) στο πλάσμα του αίματος των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.....	136
Πίνακας 28 Μέσος όρος συγκέντρωσης (μg/ml) α-πινενίου λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου στο γάλα των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.	136

Περιεχόμενα Εικόνων και Διαγραμμάτων

Εικόνα 1. Βελόνα SPME.....	25
Εικόνα 2. Συντακτικός τύπος α-πινενίου (Chemdraw, 2002).....	31
Εικόνα 3. Συντακτικός τύπος λεμονενίου (Chemdraw, 2002).....	32
Εικόνα 4. Συντακτικός τύπος β-καρνοφυλλενίου.....	32
Εικόνα 5. Βιοσύνθεση φωσφορομεβαλονικού οξέος (Ραγκούση, 1985).....	35
Εικόνα 6. Βιοσύνθεση μονοτερπενίων και σεσκιτερπενίων (Ραγκούση, 1985).....	36
Εικόνα 7. Χρωματογραφική απεικόνιση δειγμάτων πλάσματος αίματος από ζώα (α) τα οποία δεν κατανάλωναν τερπένια (β) κατανάλωναν τερπένια (α-πινένιο, λεμονένιο και β-καρνοφυλλένιο).....	65
Εικόνα 8. Διαδικασία εκχύλισης με τη μέθοδο HS-SPME.....	66
Εικόνα 9. Χρωματογραφική απεικόνιση δειγμάτων γάλακτος (α) χωρίς τερπένια (β) με τερπένια α-πινένιο, λεμονένιο και β-καρνοφυλλένιο.....	67
Πίνακας 1. Κυριότερες κατηγορίες μονοτερπενίων.....	31
Πίνακας 2. Κυριότερες κατηγορίες σεσκιτερπενίων.....	33
Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις τερπενίων που έχουν προσδιοριστεί σε διάφορα φυτικά είδη.....	38
Πίνακας 4. Μελέτες ζωικής παραγωγής που διερευνούν τη σχέση κατανάλωσης τερπενίων με ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά της παραγωγής.....	52
Πίνακας 5. Επαναληψιμότητα μεθόδου προσδιορισμού τερπενίων στο αίμα.....	64
Πίνακας 6. Επαναληψιμότητα μεθόδου προσδιορισμού τερπενίων στο γάλα.....	68
Πίνακας 7. Εξέλιξη της γαλακτοπαραγωγής αιγών (kg/κεφαλή/ημέρα) για τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	70
Πίνακας 8. Χημική σύσταση αίγειου γάλακτος από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	70
Πίνακας 9. Μέσοι όροι χαρακτηριστικών ιδιοτήτων πήξεως του γάλακτος των αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	71
Πίνακας 10. Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων λιπαρών οξέων ως ποσοστό επί του συνόλου (%), στο γάλα των αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	72
Πίνακας 11. Χημική σύσταση αίγειου τυριού που παράχθηκε από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) και στις τρεις τυροκομήσεις (1, 2 και 3) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	76
Πίνακας 12. Εξέλιξη της γαλακτοπαραγωγή προβάτων (kg/κεφαλή/ημέρα) για τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	78
Πίνακας 13. Χημική σύσταση πρόβειου γάλακτος από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	79
Πίνακας 14. Μέσοι όροι χαρακτηριστικών ιδιοτήτων πήξεως του γάλακτος προβάτων από τα δείγματα των ομάδων επέμβασης (T) και μάρτυρα (C) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	79
Πίνακας 15. Μέσοι όροι της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων, ως ποσοστό επί του συνόλου (%), στο γάλα των προβάτων των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T).....	80
Πίνακας 16. Χημική σύσταση πρόβειου τυριού που παράχθηκε από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) και στις δύο τυροκομήσεις (1 και 2).....	84
Πίνακας 17. Συνολικός μέσος όρος ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) των τερπενίων από ομαδοποίηση των δεδομένων ως προς τα είδη ζώων και τον πειραματικό χρόνο.....	97

Πίνακας 18. Σύγκριση των διαφορών των συνολικών μέσων όρων του ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) του α-πινενίου στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ανεξάρτητα από το είδος του ζώου ανά εβδομάδα.....	98
Πίνακας 19. Σύγκριση των διαφορών των συνολικών μέσων όρων του ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) του λεμονενίου στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ανεξάρτητα από το είδος του ζώου ανά εβδομάδα.....	99
Πίνακας 20. Σύγκριση των διαφορών των μέσων όρων του ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) του β-καρνοφυλλενίου στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ανεξάρτητα από το είδος του ζώου ανά εβδομάδα.....	99
Πίνακας 21. Εξέλιξη της συγκέντρωσης λιπαρών οξέων επί τοις εκατό (%) στο γάλα των αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	133
Πίνακας 22. Εξέλιξη της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων επί τοις εκατό (%) στο γάλα των προβάτων των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T).	134
Πίνακας 23. Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου ($\mu g/ml$) κατά τις πρώτες 24 ώρες στο πλάσμα του αίματος των αιγών που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια.....	135
Πίνακας 24 Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου ($\mu g/ml$) στο πλάσμα του αίματος των αιγών που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.....	135
Πίνακας 25 Μέσος όρος συγκέντρωσης ($\mu g/ml$) α-πινενίου και λεμονενίου στο γάλα των αιγών που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.....	135
Πίνακας 26 Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου ($\mu g/ml$) κατά τις πρώτες 24 ώρες στο πλάσμα του αίματος των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια.....	136
Πίνακας 27 Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου ($\mu g/ml$) στο πλάσμα του αίματος των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.....	136
Πίνακας 28 Μέσος όρος συγκέντρωσης ($\mu g/ml$) α-πινενίου λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου στο γάλα των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.....	136

Αλφαβητικός πίνακας συντομογραφιών

EFSA (European Food Safety Authority)	Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων
BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)	Σπογγώδη Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών
NMR (Nuclear Magnetic Resonance)	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
IGF – II – Insulin like Growth Factor II	Παρόμοιος με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας II
TGF-β- Transforming Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β
SFA (Saturated Fatty Acids)	Κορεσμένα λιπαρά οξέα
MUFA (Mono Unsaturated Fatty Acids)	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
PUFA (Poly Unsaturated Fatty Acids)	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry)	Φασματοφωτομετρία μάζας λόγου Ισοτόπων
HS-SPME (Headspace Solid Phase Micro Extraction)	Μικροεκχύλιση στερεάς Φάσης
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
GC/MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry)	Αέρια Χρωματογραφία Φασματοφωτομετρία Μάζας
CoA (Coenzyme A)	Ακέτυλο συνένζυμο Α
NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)	Φωσφορικό Νικοτινάμιδο Αδένινο Δινουκλεοσίδιο
PTFE (PolyTetraFluoroEthylene)	(Τεφλόν) Πολυτετραφθοροαιθυλένιο

A. Περίληψη

Η αναγνωρισιμότητα αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες διασφάλισης της ποιότητας των ζωικών προϊόντων και η εργαστηριακή επιβεβαίωσή της είναι απαραίτητο εργαλείο στη διαδικασία. Για την αναγνώριση της προέλευσης έχει προταθεί η χρήση βιοδεικτών δηλαδή ενώσεων που δεν συντίθενται από τον οργανισμό του ζώου και η ανίχνευσή τους στο ζωικό προϊόν οφείλεται αναμφίβολα στο σιτηρέσιο που έχουν καταναλώσει. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της χρήσης των τερπενίων ως βιοδεικτών για το γάλα και τα προϊόντα του. Κατά τον πρώτο πειραματισμό 8 ενήλικες υγείες αίγες και 8 προβατίνες αντίστοιχα, χωρίστηκαν σε δύο ισοδύναμες ομάδες, του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T). Στα ζώα των ομάδων T χορηγήθηκε ημερησίως ποσότητα 1g από κάθε ένα από τα τερπένια: α-πινένιο, λεμονένιο και β-καρυοφυλλένιο, για χρονικό διάστημα 18 ημερών. Διερευνήθηκε η παρουσία τους στο πλάσμα του αίματος, το γάλα και το τυρί των δύο ειδών ζώων. Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών και στη συνέχεια κάθε 2^η ημέρα και από τις δύο ομάδες ζώων τόσο για τις αίγες όσο και για τα πρόβατα. Τα τερπένια εκχυλίστηκαν από το πλάσμα με τη χρήση πετρελαϊκού αιθέρα και προσδιορίστηκαν σε GC/MS. Η παραγωγή γάλακτος και η ποιότητά του, ως προς τις βασικές χημικές παραμέτρους, το προφίλ των λιπαρών οξέων και τις ιδιότητες πήξης, παρακολουθούνταν συστηματικά σε ατομικό επίπεδο στα ζώα. Για τον προσδιορισμό των τερπενίων στο γάλα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) σε συνδυασμό με συσκευή GC/MS. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν περιοδικά τυροκομήσεις και παρασκευάστηκε Κεφαλοτύρι το οποίο αφέθηκε να ωριμάσει πριν προσδιοριστούν τα βασικά χημικά χαρακτηριστικά, το προφίλ των λιπαρών οξέων και οι συγκεντρώσεις των τερπενίων που χρησιμοποιήθηκαν. Τα μονοτερπένια ανιχνεύτηκαν σε όλα τα δείγματα του πλάσματος, στο γάλα και στο τυρί των ομάδων T και στα δύο είδη ζώων, ενώ το β-καρυοφυλλένιο είτε δεν ανιχνεύτηκε καθόλου, είτε προσδιορίστηκε σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Κανένα από τα παραπάνω τερπένια δεν ανιχνεύτηκε στο αίμα και στο γάλα των ζώων της ομάδας C και για τα δύο είδη ζώων. Η γαλακτοπαραγωγή και τα χημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες C και T και για τα δύο είδη ζώων, ενώ παρατηρήθηκαν ορισμένες διαφορές ($P < 0,05$) ως προς τα χαρακτηριστικά πήξεως του γάλακτος. Παρατηρήθηκαν επίσης στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε ορισμένα από τα λιπαρά οξέα (C_{10} ($P < 0,05$) C_{18} ($P < 0,05$) και

CLA ($P < 0,001$) στις αίγες και στο C₁₈ ($P < 0,05$) στα πρόβατα) στο λίπος του γάλακτος μεταξύ των ομάδων C και T.

Κατά το δεύτερο πειραματισμό διερευνήθηκε η δυνατότητα του υγρού της μεγάλης κοιλίας να αποδομεί τα τερπένια *in vitro* κάτω από διαφορετικές συνθήκες (προσαρμογή των ζώων ή όχι). Δύο τράγοι και δύο κριοί διατράφηκαν με συμβατικό σιτηρέσιο επί δύο εβδομάδες. Στη συνέχεια κατά την 3^η και 4^η εβδομάδα τα ζώα ελάμβαναν 1g ημερησίως από κάθε ένα από τα υπό μελέτη τερπένια: α-πινένιο, λεμονένιο και β-καρνοφυλλένιο και τέλος τα ζώα παρέμειναν στο πείραμα για δύο ακόμη εβδομάδες χωρίς τη χορήγηση τερπενίων. Με τη χρήση οισοφαγικού καθετήρα πάρθηκαν δείγματα υγρού μεγάλης κοιλίας στο τέλος κάθε εβδομάδας. Τα δείγματα επωάστηκαν για 24 ώρες *in vitro* με την προσθήκη 100μg/ml των τερπενίων σε αυτά και προσδιορίστηκε ο ρυθμός αποδόμησής τους είτε με την παρουσία υγρού μεγάλης κοιλίας είτε με ρυθμιστικό διάλυμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα τρία τερπένια αποδομούνται *in vitro* στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) περισσότερο από το υγρό της μεγάλης κοιλίας και ότι η προσθήκη εξωγενών τερπενίων στο σιτηρέσιο των ζώων δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά το ρυθμό αποδόμησής τους στο αντίστοιχο υγρό M.K *in vitro*. Τέλος διερευνήθηκε η κυτταροτοξική δράση των υπό μελέτη τερπενίων στη συνεχή κυτταρική σειρά RK-13 με τη χρήση της μεθόδου MTT Η έκθεση των κυττάρων σε συγκεντρώσεις τερπενίων μεγαλύτερες από 50 μg/ml προκάλεσε σημαντική μείωση του αριθμού των μεταβολικά ενεργών κυττάρων. Το γεγονός αυτό παρατηρήθηκε τόσο στην περίπτωση που κάθε τερπένιο εφαρμόστηκε χωριστά όσο και στην περίπτωση της ταυτόχρονης εφαρμογής τους. Συνάγεται ότι τα τερπένια μεταφέρονται αυτούσια στο γάλα και τα προϊόντα του αν και όχι ποσοτικά, ενώ παρατηρούνται διαφορές μεταξύ τους (μονοτερπένια-σεσκιτερπένια) και μεταξύ των ειδών ζώων. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι τα τερπένια είναι βιολογικά δραστικές ενώσεις που παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα και μεταβολίζονται στο περιβάλλον της M.K. Τα μονοτερπένια α-πινένιο και λεμονένιο θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την αναγνωρισιμότητα των ζωικών προϊόντων. Ωστόσο, η χρήση τους θα έδινε πιο ασφαλή συμπεράσματα για το γάλα και τα προϊόντα του στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται συνδυαστικά με άλλα συστατικά όπως για παράδειγμα τα λιπαρά οξέα του λίπους του γάλακτος.

B. Abstract

Recently there has been an increasing consumer's demand for products of specific quality and hence for certification of the origins of the food they consume. Terpenes have been proposed as biomarkers of a grass based diet. In a 20 days experiment, 8 adult sheep and 8 adult goats were divided in two equal groups, representing control (C) and treatment (T) group. In the treatment group oral administration of 1g of each terpene, α -pinene, limonene and β -caryophyllene, were applied daily. Milk production was recorded daily and blood plasma and milk samples were also collected. Blood plasma samples were extracted with organic solvents and the Solid Phase Micro-extraction Method using CAR/PDMS fiber was used for milk samples, before terpenes were identified on a GC-MS. Milk chemical properties and fatty acid profile were also determined. The results indicated terpenes not having an effect on milk production and milk chemical properties. Dosed terpenes were identified in blood plasma, milk and cheese of the treatment (T) group of animals in both species. Fatty acids analysis obtained from goats' milk showed significant differences on C_{10} ($P<0.05$), C_{18} ($P<0.05$) and CLA ($P<0.001$) while sheep fatty acids profile differed significantly for C_{18} ($P<0.05$). Following that, terpenes degradation rates were evaluated *in vitro* in rumen fluid of adapted and non adapted animals in a 6 weeks trial. During the week 1 and 2 animals were receiving diet with no terpenes addition while on weeks 3 and 4 animals were orally dosed with 1g of each of the following terpenes, α -pinene, limonene and β -caryophyllene. Terpenes pooled mean degradation rate of α -pinene in rumen fluid showed a trend for higher degradation rate in the 5th week compared to the 2nd and 3rd week of the experiment, while for limonene degradation rate was significantly ($P=0.032$) higher in week 5 compared to the 1st experimental week. Regarding the degradation rate of β -caryophyllene during the 6 weeks of the experiment there were no significant differences. Finally, the potential cytotoxic effect of all three terpenes, α -pinene, limonene and β -caryophyllene was evaluated using the rabbit kidney cell line RK13. The results indicated that terpenes had a potential cytotoxic effect on concentrations above 50 $\mu\text{g}/\text{m}$. In conclusion, monoterpenes α -pinene and limonene can be integrated in certification schemes as biomarkers in animal products, but always used together with other indicators such as fatty acids.

Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. Αναγνωρισιμότητα διατροφικών προϊόντων

Η αναγνωρισιμότητα αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα χαρακτηρισμού της ποιότητας στα αγροτικά προϊόντα. Ορίζεται από το διεθνές πρότυπο ISO 8402 ως «η ικανότητα αναγνώρισης της προέλευσης και του τρόπου χρήσης ενός προϊόντος με τη βοήθεια ιστορικού αναγνωρισιμότητας» (Prache *et al.*, 2005). Σύμφωνα με τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης με αριθμό 178/2002 για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, προτάθηκε από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) ο ορισμός της αναγνωρισιμότητας. Έτσι, ως αναγνωρισιμότητα ορίζεται: «η ικανότητα ανίχνευσης και παρακολούθησης ενός τροφίμου, τροφής ή ζωικού προϊόντος ή πιθανών παραγώγων τους σε όλα τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης και διάθεσης».

Η αναγνωρισιμότητα συνδέεται στενά τόσο με την ταυτότητα του προϊόντος όσο και με την προέλευση των συστατικών του, την διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τη μεταποίηση και επεξεργασία του καθώς και με την κατανομή σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Παρέχεται δηλαδή η δυνατότητα συνεχούς παρακολούθησης του τροφίμου μέσω ενός συστήματος αναγνωρισιμότητας, που θέτει τις απαιτήσεις και τις προδιαγραφές τόσο στις μονάδες εκτροφής ζώων, όσο και στη βιομηχανία τροφίμων. Η αναγνωρισιμότητα όσον αφορά στη ζωική παραγωγή, αναφέρεται στην πιστοποίηση της ποιότητας ενός προϊόντος και πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες που αφορούν στη γεωγραφική προέλευση του προϊόντος, στην ταυτότητα του ζώου από το οποίο προέρχεται και τη φυλή στην οποία ανήκει (Prache *et al.* 2005).

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει εναποθέσει στην αναγνωρισιμότητα και την σήμανση τη λύση στην ανάγκη που εκφράζουν οι καταναλωτές για την ασφάλεια των αγαθών που καταναλώνουν, ειδικά δε μετά από τις διατροφικές κρίσεις, όπως για παράδειγμα εκείνες από τη Σπογγώδη Εγκεφαλοπάθεια στα Βοοειδή (BSE), τις διοξίνες στα κοτόπουλα και τη διάδοση των γενετικώς τροποποιημένων τροφίμων. Ο γενικός όρος αναγνωρισιμότητα χρονολογείται από το 1986. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 τέθηκε σε ισχύ η Ευρωπαϊκή νομοθεσία που δημιουργεί ένα σύστημα για την προστασία ονομασιών τροφίμων και ποτών με βάση τη γεωγραφική προέλευση ή/και την ‘παραδοσιακή’ τους καταγωγή. Στο σύστημα αυτό ένα τρόφιμο ή ποτό που έχει περάσει από τις απαραίτητες νόμιμες διαδικασίες, ώστε να αποκτήσει τέτοια ονομασία, τίθεται σε καθεστώς προστασίας από τις απομιμήσεις σε όλη την επικράτεια της ΕΕ. Κατ’ αυτή την έννοια επιχειρείται η προστασία της παραγωγής

τροφίμων και ποτών που, σε διαφορετικές συνθήκες, θα κινδύνευαν από εξαφάνιση λόγω των πρακτικών του παγκοσμιοποιημένου εμπορίου. Οι πρώτες σχετικές νομοθεσίες ήταν οι Κανονισμοί 2081/92 και 2082/92 του Συμβουλίου, οι οποίοι καθιέρωναν τις ονομασίες *Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης, ΠΟΠ* (Protected Designation of Origin, PDO) και *Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη, ΠΓΕ* (Protected Geographical Indication, PGI). Αυτές οι ονομασίες αφορούσαν διατροφικά προϊόντα (τρόφιμα ή ποτά), τα οποία αναδεικνύουν κυρίως συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή στην οποία τα εν λόγω προϊόντα παράγονται ή/και μεταποιούνται ή/και παρασκευάζονται. Οι αρχικοί κανονισμοί αντικαταστάθηκαν το 2006 από τους Κανονισμούς 509/2006 και 510/2006 του Συμβουλίου, όπου ο δεύτερος αφορά τις ονομασίες ΠΟΠ και ΠΓΕ, ενώ ο πρώτος την νέα ονομασία *Εγγυημένα Παραδοσιακά Ιδιότυπα Προϊόντα, ΕΠΠ* (Traditional Speciality Guaranteed, TSG). Σχεδόν ταυτόχρονα με τους κανονισμούς ΠΟΠ και ΠΓΕ, καθιερώθηκαν οι προϋποθέσεις παραγωγής *Βιολογικών Προϊόντων* με τους Κανονισμούς του Συμβουλίου ΕΕ 2092/1991 για τη φυτική παραγωγή και 1257/1999 για τη ζωική παραγωγή, που αντικαταστάθηκαν από τον Κανονισμό 834/2007 του Συμβουλίου. Οι ειδικές αυτές ποιοτικές κατηγορίες των τροφίμων επέβαλαν και την ανάγκη δυνατότητας επαλήθευσης της καταγωγής και του τρόπου παραγωγής των προϊόντων.

Η αναγνωρισιμότητα όσον αφορά στη διαδικασία αναφέρεται στα παραγωγικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένου και του συστήματος διατροφής. Αρχικά ήταν υποχρεωτική διαδικασία μόνο για τα προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) αλλά μετά τα κρούσματα Σπογγώδους Εγκεφαλοπάθειας των Βοοειδών, η αναγνωρισιμότητα χρησιμοποιείται και για την πιστοποίηση της ασφάλειας των τροφίμων (Prache *et al.* 2005).

Ειδικά τα τελευταία χρόνια οι εταιρείες παραγωγής τροφίμων αναπτύσσουν και υιοθετούν εσωτερικά συστήματα αναγνωρισιμότητας στην αλυσίδα παραγωγής κυρίως για να προασπίσουν την ασφάλεια των τροφίμων. Η αναγνωρισιμότητα μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα υποσύστημα, η παρουσία του οποίου είναι απαραίτητη στην σωστή διαχείριση της ποιότητας των τροφίμων (Bertolini *et al.*, 2006). Αποτελεί ένα απαραίτητο εργαλείο για τη διασφάλιση τόσο της παραγωγής όσο και της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων (Wall *et al.*, 1994; Becker *et al.*, 2000). Η δυνατότητα της σύνδεσης της αναγνωρισιμότητας με ένα σύστημα ελέγχου της παραγωγής των τροφίμων, αποτελεί ένα αποτελεσματικό μέσο για την ενίσχυση της

άποψης των καταναλωτών για την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων (Moe *et al.*, 1998).

Τα προβλήματα ωστόσο που έχουν ανακύψει από τις διατροφικές κρίσεις στη βιομηχανία της ζωικής παραγωγής συνδέονται κατά βάση με θέματα που αφορούν στη διατροφή των ζώων. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει τους καταναλωτές σε αναζήτηση πληροφοριών σχετικά με τις χρησιμοποιούμενες ζωοτροφές, τη συμμετοχή της βόσκησης στη διατροφή των ζώων και γενικότερα την προέλευση των ζωικών προϊόντων (Prache *et al.*, 2005). Για να ικανοποιηθεί αυτή η επιθυμία των καταναλωτών οι παραγωγοί ζωικών προϊόντων θα πρέπει να επιλέγουν συστήματα εκτροφής και διατροφής των ζώων με βάση τα οποία θα μπορεί να πιστοποιηθεί η προέλευση και πιθανόν η ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων (Morand-Fehr *et al.*, 2007). Στα ζωικά προϊόντα έχουν εφαρμοστεί διάφοροι τρόποι πιστοποίησης, οι οποίοι σχετίζονται τόσο με το προϊόν όσο και με τη νομοθεσία. Κατά κύριο λόγο οι τρόποι πιστοποίησης που εφαρμόζονται περιλαμβάνουν μηχανισμούς διοικητικών ελέγχων οι οποίοι βασίζονται σε επιτόπιους ελέγχους στις κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις από ειδικούς ελεγκτές. Παρόλα αυτά υπάρχει ακόμα η ανάγκη για αναλυτικές τεχνικές οι οποίες θα είναι σε θέση να αποδείξουν ότι οι προϋποθέσεις που έχουν τεθεί ικανοποιούνται πλήρως μέσα από ειδικά συστήματα αναγνώρισης και πιστοποίησης της προέλευσης των τροφίμων (Prache *et al.* 2007).

1.1 Βιοδείκτες

Μια μέθοδος επιβεβαίωσης της προέλευσης των ζωικών προϊόντων αναφέρεται στην ανίχνευση ποικίλων βιοδεικτών. Οι βιοδείκτες είναι ενώσεις που είτε υπάρχουν αυτούσιες στις τροφές, είτε προκύπτουν ως ειδικά προϊόντα μεταβολισμού συστατικών της τροφής, δεν συντίθενται από τον οργανισμό του ζώου και ανιχνεύονται στα ζωικά προϊόντα. Επειδή οι ενώσεις αυτές, εξ ορισμού, δεν συντίθενται από τον οργανισμό του ζώου, η ανίχνευσή τους στα ζωικά προϊόντα ή στους ιστούς δεν αφήνει αμφιβολίες ότι οφείλεται στην τροφή που έχουν καταναλώσει. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να πιστοποιήσουν την ποιότητα και την προέλευση των προϊόντων καθώς και για τον έλεγχο πιθανών κινδύνων που μπορεί να προκύψουν στη δημόσια υγεία από την κατανάλωση τέτοιων τροφίμων (Raspor, 2005).

Τα κριτήρια τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να κατατάξουν μια ένωση στην κατηγορία των βιοδεικτών μπορεί να είναι ποικίλα. Οι Spencer *et al.*

(2008) συνόψισαν τις ιδιότητες που πρέπει να έχουν οι βιοδείκτες ως εξής: α) η δυνατότητα προσδιορισμού τους ακόμη και σε πολύ μικρές ποσότητες, β) ευαισθησία στις μεταβολές της κατανάλωσης του σιτηρεσίου, γ) στενή σχέση με συγκεκριμένο σιτηρέσιο και δ) γραμμική σχέση ανάμεσα στην κατανάλωση του σιτηρεσίου και τη συγκέντρωση του βιοδείκτη στους ιστούς των ζώων, λαμβάνοντας υπόψιν παράγοντες όπως η απορρόφηση, ο μεταβολισμός και η απέκκριση του υπό εξέταση βιοδείκτη.

Έτσι οι προσπάθειες που γίνονται από ερευνητές για την ταυτοποίηση βιοδεικτών που πληρούν τα παραπάνω χαρακτηριστικά έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στην ανεύρεση όχι μόνο αναλυτικών τεχνικών που θα πιστοποιούν την προέλευση του σιτηρεσίου των ζώων και την προέλευση των ζωικών προϊόντων, αλλά και μιας αξιόπιστης διαδικασίας πιστοποίησης, η οποία θα σέβεται τους κανόνες ευζωίας των ζώων διασφαλίζοντας παράλληλα τη δημόσια υγεία. Σήμερα σημαντικό κομμάτι αυτής της έρευνας στα μηρυκαστικά επικεντρώνεται στη διάκριση μεταξύ των ζώων που εκτρέφονται στη βοσκή και αυτών που εκτρέφονται εντός του στάβλου (Prache *et al.*, 2007), με τη χρήση διαφόρων βιοδεικτών οι οποίοι διακρίνονται στις παρακάτω υποκατηγορίες.

1.2 Ανόργανοι βιοδείκτες

1.2.1 Ισότοπα

Το σιτηρέσιο και ο τόπος όπου εκτρέφονται τα ζώα επηρεάζει, μεταξύ άλλων, την συγκέντρωση των ισοτόπων διαφόρων στοιχείων στην υδατική και τη λιπαρή φάση τόσο των ιστών όσο και των παραγόμενων ζωικών προϊόντων (Renou *et al.*, 2004). Η ταυτοποίηση των ζωικών προϊόντων που προέρχονται από τη βόσκηση είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με τη χρήση της μεθόδου του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) (Martin and Martin, 1995). Το λίπος του γάλακτος, το οποίο αποτελεί το 4% του συνόλου του γάλακτος των αγελάδων, αποτελείται κατά 99% από λιπίδια. Η αναλογία των κορεσμένων, μόνο- και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, η αναλογία των οποίων επηρεάζεται από τη διατροφή, μπορεί να προσδιοριστεί με τη χρήση ^{13}C . Έτσι ο ^{13}C έχει χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης, με τη χρήση της μεθόδου του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), για τη διάκριση της προέλευσης του γάλακτος σύμφωνα με το σιτηρέσιο που έχουν καταναλώσει τα ζώα, προσδιορίζοντας τη σχετική αναλογία των πολυακόρεστων (PUFA) μονοακόρεστων (MUFA) και κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) (Renou *et al.*, 2004).

Ο προσδιορισμός της αναλογίας των ισοτόπων είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί και με τη χρήση της φασματοφωτομετρίας μάζας λόγου ισοτόπων (IRMS). Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση τόσο του σιτηρεσίου όσο και της γεωγραφικής περιοχής που παρήχθη το ζωικό προϊόν. Για παράδειγμα η σταθερή αναλογία των ισοτόπων του άνθρακα ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) και του αζώτου ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) στο κρέας αρνιών έχει χρησιμοποιηθεί για την αναγνωρισιμότητα του σιτηρεσίου. Οι Piasentier *et al.*, (2003) ανέλυσαν τον επιμήκη θωρακικό μυ (*Longissimus thoracis*), με τη μέθοδο IRMS, σε αρνιά που λάμβαναν διαφορετικό σιτηρέσιο κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου πάχυνσης και προσδιόρισαν σημαντικά μικρότερες τιμές για το ισότοπο ^{13}C στα ζώα που είχαν καταναλώσει βοσκή σε σχέση με αυτά που είχαν διατραφεί στο στάβλο. Ο προσδιορισμός των ισοτόπων στα ζωικά προϊόντα αντανακλά τη συγκέντρωση των ουσιών αυτών στο σιτηρέσιο, όπως αυτή τροποποιείται από το μεταβολισμό του ζώου. Ο αραβόσιτος για παράδειγμα, που είναι ένα φυτό φωτοσυνθετικού τύπου C-4, έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ^{13}C από ότι τα περισσότερα λειμώνια φυτά των εύκρατων περιοχών (τύπος C-3). Έτσι η χρήση του αραβόσιτου στο σιτηρέσιο έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερες συγκεντρώσεις ^{13}C στους ζωικούς ιστούς, σε σχέση με τα ζωικά προϊόντα που προέρχονται από ζώα που διατρέφονται σε βοσκοτόπους εύκρατων περιοχών και τα οποία έχουν μικρότερη περιεκτικότητα σε ^{13}C (Piasentier *et al.*, 2003). Παρόλα αυτά το αποτύπωμα του ισοτόπου του ^{13}C δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση περιπτώσεων εντατικής πάχυνσης με τη χρήση άλλων δημητριακών καρπών (σίτος, κριθή, κλπ), διότι τα περισσότερα φυτικά είδη των βοσκοτόπων και τα είδη που παράγουν αυτούς τους δημητριακούς καρπούς ακολουθούν τις ίδιες οδούς φωτοσύνθεσης (C-3).

Όσον αφορά στην αναλογία του ισοτόπου ^{15}N στα φυτά των βοσκοτόπων, αυτή επηρεάζεται από την εντατική ή όχι χρησιμοποίηση της γεωργικής έκτασης. Σημαντικό παράγοντα για τη διαμόρφωση της συγκέντρωσης του ^{15}N αποτελεί η λίπανση με άζωτο που αυξάνει την περιεκτικότητα σε ^{15}N των αζωτούχων συστατικών των φυτών. Ωστόσο η παρουσία των ψυχανθών (τα οποία βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία σε μη αζωτο-λιπαινόμενους βοσκοτόπους) έχει το αντίθετο αποτέλεσμα λόγω της χρήσης του αζώτου της ατμόσφαιρας ως πηγής αζώτου (Piasentier *et al.*, 2003).

Ο προσδιορισμός της γεωγραφικής περιοχής έχει γίνει με επιτυχία με το προσδιορισμό της σταθερής αναλογίας του ισοτόπου του οξυγόνου ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) στο

γάλα και των ισοτόπων του αζώτου και του άνθρακα στα διάφορα προϊόντα του γάλακτος (Renou *et al.*, 2004) ή στο κρέας που παράγεται σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές στην Ευρώπη (Piasentier *et al.*, 2003). Οι Renou *et al.*, (2004) υποστήριξαν ότι η περιεκτικότητα του ^{18}O στο γάλα και το κρέας επηρεάζεται από το γεωγραφικό πλάτος και το υψόμετρο. Έτσι προσδιόρισαν υψηλότερη συγκέντρωση ^{18}O στο γάλα και το κρέας βοοειδών που είχαν διατραφεί σε βοσκές σε υψηλό υψόμετρο (850m) σε σχέση με τη χαμηλότερη συγκέντρωση που προσδιορίστηκε στα αντίστοιχα προϊόντα σε βοσκότοπους χαμηλότερων υψομέτρων (250m). Με τον τρόπο αυτό μπόρεσαν να ταυτοποιήσουν την προέλευση του γάλακτος και του κρέατος που προέρχεται από περιοχές που βρίσκονται σε υψηλά ή χαμηλά υψόμετρα.

Συνοπτικά, θα μπορούσε να αναφερθεί ότι ο ^{13}C εξαρτάται από την σύσταση του σιτηρεσίου και επηρεάζεται σημαντικά από φυτά της κατηγορίας C-4 ενώ το ^{18}O μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής περιοχής προέλευσης του προϊόντος. Τέλος η αναλογία ^{15}N επηρεάζεται από τις γεωργικές πρακτικές που εφαρμόζονται σε μια έκταση (Renou *et al.*, 2004).

1.2.2 Φυτικοί βιοδείκτες

Οι φυτικοί βιοδείκτες είναι ενώσεις που βρίσκονται σε φυτικούς ιστούς και δεν συντίθενται από τα ζώα αλλά ανιχνεύονται στα ζωικά προϊόντα ανάλογα με την τροφή που έχουν καταναλώσει. Οι περισσότερες από τις ενώσεις αυτές είναι λιποδιαλυτές, μεταφέρονται στο λίπος του ζώου μετά την απορρόφησή τους και έτσι ανιχνεύονται στο γάλα και το κρέας. Όμως και για τα μόρια όπως οι φαινολικές ενώσεις, αποδείχθηκε πρόσφατα η δυνατότητα χρήσης τους στην ταυτοποίηση του γάλακτος από αγελάδες που διατρέφονταν με σιτηρέσιο που περιείχε φαινολικές ενώσεις σε σχέση με εκείνο που προήλθε από σιτηρέσιο χωρίς αυτές (Besle *et al.*, 2010).

1.2.2.1 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή ανήκουν σε μια μεγάλη ομάδα χρωστικών των φυτών και έχει βρεθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν αξιόπιστους βιοδείκτες στα φυτοφάγα ζώα (Prache *et al.*, 2003; Priolo *et al.*, 2002). Τα μόρια αυτά βρίσκονται κυρίως στα φυλλώδη μέρη των φυτών, αλλά και στους καρπούς (Serrano *et al.*, 2007) και δεν μπορούν να συντεθούν από τα ζώα. Σημαντική ένωση στην κατηγορία αυτή αποτελεί η λουτεΐνη το μόνο καροτενοειδές που ανιχνεύεται στον ορό του αίματος καθώς και

στο λίπος των προβάτων (Prache *et al.*, 2003b; Nozière *et al.*, 2006). Η συγκέντρωσή της στα φυλλώδη τμήματα της βοσκής κυμαίνεται από 9-14 mg/100 g νωπού ιστού ή 430-700 mg/kg ξηράς ουσίας (Prache *et al.*, 2003) και θεωρήθηκε από τους παραπάνω ερευνητές ως ένας δυνητικά εξαιρετικός βιοδείκτης για τα μικρά μηρυκαστικά που διατρέφονται στη βοσκή.

Οι Prache και Theriez (1999) παρατήρησαν ότι η περιεκτικότητα σε καροτενοειδή στο πλάσμα του αίματος ζώων που διατρέφονταν κατά το τελευταίο στάδιο της πάχυνσης εντός του στάβλου ήταν μικρότερη κατά τη σφαγή από ότι στο τέλος της περιόδου βόσκησης. Επιπλέον η περιεκτικότητα των ζωικών ιστών και των ζωικών προϊόντων σε καροτενοειδή διαπιστώθηκε ότι εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το σιτηρέσιο δηλαδή από το είδος και την ποσότητα της τροφής που καταναλώνεται (Nozière *et al.*, 2006). Παρόλα αυτά, παρουσιάζουν ευαισθησία στο φως και η συγκέντρωση τους μειώνεται κατά την έκθεσή τους σ' αυτό. Με τη συντήρηση της χλόης, όπως η ξήρανση ή η ενσίρωση, η περιεκτικότητα σε καροτενοειδή μειώνεται σε σύγκριση με την αρχική συγκέντρωση στο βοσκότοπο. Η μείωση αυτή είναι περίπου 40% για ενσίρωμα χλόης με αρχική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή 280 mg/kg ΞΟ και 70% για ενσίρωμα με περιεκτικότητα σε καροτενοειδή 350 mg/kg ΞΟ (Nozière *et al.*, 2006). Ωστόσο, από την άλλη πλευρά το ενσίρωμα αραβοσίτου είναι φτωχό σε αυτές τις χρωστικές (70-80 mg/kg ΞΟ) και το ίδιο συμβαίνει και με τις περισσότερες συμπυκνωμένες ζωοτροφές. Συνεπώς, σύμφωνα με τα παραπάνω, πολύ δύσκολα τέτοια μόρια στα σιτηρέσια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες.

1.2.2.2 Φαινολικές ενώσεις

Μια ακόμη κατηγορία φυτικών βιοδεικτών αποτελούν οι φαινολικές ενώσεις. Αποτελούν συστατικά των φυτών που κατατάσσονται σε διάφορες ομάδες ανάλογα με τη δομή τους. Έτσι οι κύριες κατηγορίες περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και τις λιγνάνες (Spencer *et al.*, 2008). Ωστόσο, την σημαντικότερη ομάδα αποτελούν τα φλαβονοειδή με κύριο χαρακτηριστικό τους την παρουσία στο μόριό τους ενός αρωματικού δακτυλίου που φέρει τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα. Πρόσφατα έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντικοί βιοδείκτες για την αναγνωρισιμότητα των ζωικών προϊόντων (O'Connell and Fox, 2001). Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι οι ενώσεις αυτές εκτός από την απευθείας μεταφορά από τη βοσκή στα ζωικά προϊόντα μπορούν να εντοπισθούν σε αυτά και «ενδογενώς» αφού

είναι δυνατό να συντίθενται και από τους μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας (Ha and Lindsay, 1991). Ωστόσο, η δημιουργία κοινών μεταβολιτών, όπως για παράδειγμα του ιπουρρικού οξέως τόσο από φαινολικές ενώσεις όσο και από τα αρωματικά αμινοξέα, τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη δημιουργεί ενστάσεις για την χρήση των ενώσεων αυτών ως βιοδείκτες (Spencer et al., 2008).

Οι Besle *et al.*, (2010) συνέκριναν τις συγκεντρώσεις σε φαινολικές ενώσεις έξι διαφορετικών σιτηρεσίων: α) πλούσιο σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές με 35% σανό δακτυλίδας, β) ενσίρωμα αραβοσίτου γ) ενσίρωμα *Lolium* δ) σανό *Lolium*, ε) σανό φυσικού βοσκότοπου και στ) χλόη φυσικής βοσκής. Η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις όπως προσδιορίστηκε με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), ήταν υψηλότερη στη χλόη φυσικής βοσκής (35,3 g/kg ΞΟ) σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα σιτηρέσια και ειδικότερα με εκείνο του ενσιρώματος αραβοσίτου στο οποίο προσδιορίστηκε και η χαμηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις (3,2 g/kg ΞΟ). Επιπλέον, οι ίδιοι ερευνητές στις αγελάδες που διατράφηκαν με τα παραπάνω σιτηρέσια, προσδιόρισαν το συνολικό ποσοστό των φαινολικών ενώσεων στο αντίστοιχα παραγόμενο γάλα και βρήκαν ότι το γάλα που προερχόταν από ζώα που είχαν διατραφεί στη βοσκή, περιείχε την υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων (13,3 mg/l), ειδικά μάλιστα σε σχέση με το γάλα των ζώων που είχαν διατραφεί με πλούσιο σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές σιτηρέσιο (3,3 mg/l).

1.2.2.3 Πτητικά αρωματικά συστατικά

Μια διαφορετική κατηγορία βιοδεικτών είναι τα πτητικά συστατικά. Τα πτητικά συστατικά των ζωικών προϊόντων αποτελούνται από ενώσεις που είτε μεταφέρονται αυτούσια από την τροφή στο γάλα και το κρέας ή προκύπτουν ως προϊόντα του μεταβολισμού κάτω από συγκεκριμένες διατροφικές επεμβάσεις. Σε μελέτη των Vasta & Priolo (2006) η συγκέντρωση στο λίπος συγκεκριμένων πτητικών συστατικών, όπως η 2,3- οκταδιενόνη και το 3-μεθυλο-ινδόλιο, ήταν υψηλή σε βόσκοντα αρνιά σε σύγκριση με αυτά που διατρέφονταν με συμπυκνωμένες ζωοτροφές. Σε συμφωνία με τα παραπάνω είναι και τα αποτελέσματα των Suzuki & Bailey (1985) οι οποίοι βρήκαν ότι το λίπος των αρνιών που είχαν τραφεί με βοσκή είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε 2,3-οκταδιενόνη από ότι το λίπος αρνιών που λάμβαναν σιτηρέσιο με συμπυκνωμένες ζωοτροφές. Ενισχύοντας αυτή την άποψη οι Young *et al.* (1997) υπέθεσαν ότι η υψηλότερη συγκέντρωση της 2,3-οκταδιενόνης

στο λίπος αρνιών που διατρέφονταν στη βοσκή πρέπει πιθανόν να συνδέεται με το ένζυμο της λιποοξυγενάσης, το οποίο βρίσκεται στα φυλλώδη μέρη των φυτών αλλά απουσιάζει από τους καρπούς, εκτός από τον καρπό της σόγιας (Sekiya *et al.*, 1983). Οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν, επίσης, ότι το 3-μεθυλο-ινδόλιο υπήρχε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο λίπος των ζώων που διατρέφονταν στη βοσκή από ότι σε αυτά που λάμβαναν συμπυκνωμένες ζωοτροφές. Αυτό αποδόθηκε στη σημαντική αποδόμηση της τρυπτοφάνης στη μεγάλη κοιλία, εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης αζωτούχων ουσιών και στην υψηλή αναλογία πρωτεΐνης/ινωδών ουσιών στη φυτική ύλη.

1.2.2.3.1 Ανίχνευση και προσδιορισμός πτητικών ενώσεων

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω για την πιστοποίηση της προέλευσης των τροφίμων απαιτείται η χρήση τεχνικών που θα μπορούν να ανιχνεύουν και να προσδιορίζουν τις ενώσεις αυτές με υψηλή ευαισθησία. Για το σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι όπως για παράδειγμα η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στην κίνηση της υγρής φάσης μέσα στη στατική φάση η οποία αποτελείται από ένα στερεό πορώδες υλικό που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη. Η κινητή φάση αποτελείται από το εκλούμενο υγρό που κινείται κατά μήκος της στήλης με τη βοήθεια αντλίας υψηλής πίεσης (Karoui and De Baerdemaeker, 2007). Η τεχνική αυτή αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο προσδιορισμού των πτητικών ενώσεων ωστόσο, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των μορίων παρουσιάζει δυσκολίες εξαιτίας της μεγάλης ποσότητας διαλυτών που απαιτούνται για την εκχύλιση των δειγμάτων καθώς και του χρόνου που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η διαδικασία αυτή (Karoui and De Baerdemaeker, 2007; Rossi and Basilico, 2009). Όμως, οι Pietta *et al.* (1992) κατάφεραν εφαρμόζοντας μια πιο αποτελεσματική μέθοδο εκχύλισης των δειγμάτων να προσδιορίσουν με ικανοποιητική ακρίβεια πτητικά συστατικά. Παρόλα αυτά βέβαια η HPLC παραμένει μια δύσκολη στη χρήση και με αμφίβολα αποτελέσματα μέθοδος προσδιορισμού πτητικών ενώσεων.

Μια άλλη ιδιαίτερα αποτελεσματική αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό των πτητικών συστατικών αποτελεί η αέρια χρωματογραφία (GC-FID) (Huch and Staba, 1993; Yang *et al.*, 2002; Van Beek, 2002). Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα αξιόπιστη με υψηλή ευαισθησία και επαναληψιμότητα. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κίνηση των συστατικών σε στήλη που αποτελείται από αδρανές υλικό.

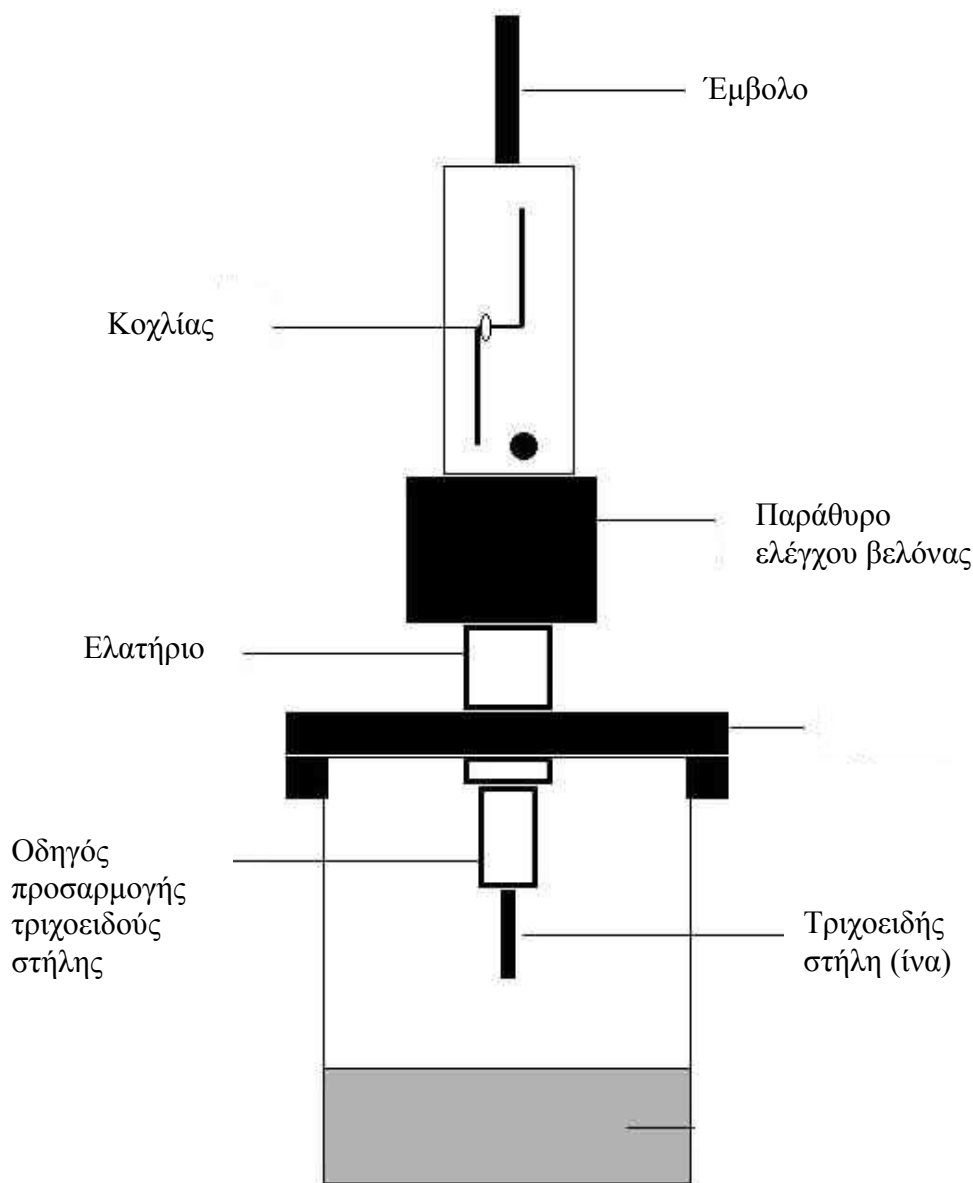
Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιείται με τη χρήση αδρανών αερίων (He, N₂, CO₂, H₂) και τη διαφορετική ταχύτητα με την οποία κινούνται οι ενώσεις μέσα στη στήλη ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους. Ωστόσο το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η συνήθως χρονοβόρα προετοιμασία του δείγματος πριν την ανάλυση.

Πρόσφατα δείχθηκε ότι τα προβλήματα αυτά μπορούν να επιλυθούν με τη χρήση φασματοφωτομετρικών μεθόδων (Karoui and De Baerdemaeker, 2007). Η αρχή των μεθόδων αυτών βασίζεται στο γεγονός ότι κάθε χημική ένωση η οποία εκτίθεται σε μια φωτεινή πηγή θα αντανακλά διαφορετικό φάσμα. Έτσι ο συνδυασμός της αέριας χρωματογραφίας με την χρήση φασματοφωτόμετρου έχει καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την ανάλυση των βιοδεικτών για την αναγνωρισιμότητα των ζωικών προϊόντων. Επιπλέον η υψηλή ικανότητα διαχωρισμού ενώσεων, η μεγάλη ευαισθησία στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολύ μικρών συγκεντρώσεων, ανέδειξε την αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μάζας (GC-MS) ως μια ιδιαίτερα σημαντική αναλυτική μέθοδο προσδιορισμού πτητικών συστατικών (Karoui and De Baerdemaeker, 2007). Ωστόσο, ένα σημαντικό πρόβλημα που υπήρχε ήταν η χρήση οργανικών διαλυτών που σε συνδυασμό με την ευαισθησία των δειγμάτων στους διαφορετικούς χειρισμούς δημιουργούσαν δυσκολίες στον προσδιορισμό τους.

Για τους λόγους που αναφέρθηκαν πιο πάνω στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η μέθοδος μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) η οποία θεωρείται ως η καταλληλότερη για την ανάλυση των πτητικών ενώσεων οι οποίες συνήθως βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα ζωικά προϊόντα (Prache, 2007). Η μέθοδος της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης είναι μια σχετικά νέα μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε από τους Pawliszyn *et al.* (1995) και προτείνει έναν διαφορετικό τρόπο προετοιμασίας του δείγματος με τη χρήση μιας τριχοειδούς στήλης από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου το οποίο εξωτερικά περιβάλλεται από μια στατική φάση (Εικόνα 1). Οι ενώσεις που αναλύονται εκχυλίζονται απευθείας, συμπυκνώνονται και επικάθηνται στην τριχοειδή στήλη. Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι α) απαιτείται μικρότερος χρόνος προετοιμασίας δείγματος και β) επιτυγχάνεται εξοικονόμηση διαλυτών και κατά συνέπεια μικρότερο κόστος. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με αέριο χρωματογράφο (GC) συνδεδεμένο με φασματοφωτόμετρο μαζών (GC/MS) και βρίσκει εφαρμογή σε ένα μεγάλο αριθμό ουσιών ειδικά όσον αφορά στην εκχύλιση πτητικών οργανικών

ενώσεων από περιβαλλοντικά, βιολογικά δείγματα καθώς και δείγματα τροφίμων (Pawliszyn *et al.*, 1995).

Εικόνα 1. Βελόνα SPME.



Ανάμεσα στα πτητικά συστατικά που ανιχνεύονται στα ζωικά προϊόντα, τα **τερπένια** αποτελούν μια από τις πλέον σημαντικές κατηγορίες. Αποτελούν μια μεγάλη ομάδα μορίων που συντίθενται αποκλειστικά από τα φυτά και μεταφέρονται από τη βοσκή στους ζωικούς ιστούς και τα κτηνοτροφικά προϊόντα. Η περιεκτικότητα της φυτικής ύλης σε **τερπένια** ποικίλει ανάλογα με την οικογένεια, το είδος και το φαινολογικό στάδιο. Ωστόσο, γενικά τα δικοτυλήδονα φυτά είναι περισσότερο πλούσια σε τερπένια σε σύγκριση με τα μονοκοτυλήδονα (Mariaca *et al.*, 2001).

Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια η συγκέντρωση των τερπενίων στο παραγόμενο ζωικό προϊόν να ποικίλει και η παρουσία τους σε αυτό να μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αναγνωρισιμότητας. Από πολλούς ερευνητές (Fernandez *et al.*, 2003; Cornu *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005) επισημαίνεται ότι η περιεκτικότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων σε **τερπένια** επηρεάζεται από τη διατροφή, ιδιαίτερα όταν αυτή συμπεριλαμβάνει βόσκηση και κατά συνέπεια η παρουσία τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση της προέλευσης των προϊόντων που προέρχονται από βόσκοντα ή μη ζώα.

1.2.3 Λιπαρά οξέα και αναγνωρισιμότητα ζωικών προϊόντων

Το λίπος του γάλακτος αποτελείται κατά 98% από τριγλυκερίδια και κατά το υπόλοιπο 2% από φωσφολιπίδια, μικρά ποσά χοληστερόλης, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008). Τα λιπαρά οξέα του λίπους του γάλακτος μπορούν να διακριθούν σε μικρής, μεσαίας και μακράς αλύσου λιπαρά οξέα. Τα μικρής και μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα αποτελούν το 40-50% των συνολικών λιπαρών οξέων του λίπους του γάλακτος και συντίθενται αποκλειστικά ενδογενώς (*de novo*) στο μαστικό αδένα από το οξικό και το β-υδροξυβουτυρικό οξύ τα οποία παράγονται στη μεγάλη κοιλία από τη ζύμωση των υδατανθράκων (Chilliard *et al.*, 2003). Από τα μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα μόνο η μισή ποσότητα του C_{16:0} μπορεί να προέρχεται από την τροφή. Τα μακράς αλύσου λιπαρά οξέα (\geq C_{18:0}) προέρχονται από το πλάσμα του αίματος στο οποίο απελευθερώνονται με τη δράση του ενζύμου της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (Barber *et al.*, 1997) από τα τριγλυκερίδια (τα οποία μπορεί να βρίσκονται είτε με τη μορφή των χυλομικρών είτε ως χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες).

Επιπλέον, τα μακράς αλύσου λιπαρά οξέα μπορεί να προέρχονται και από τα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στο πλάσμα του αίματος. Τα μακράς αλύσου λιπαρά οξέα προέρχονται κυρίως από την πέψη των λιπιδίων της τροφής και πιθανόν από καταβολισμό σωματικού λίπους (κυρίως στην αρχή της γαλακτικής περιόδου). Επιπρόσθετα, μπορεί να αφυδρογονώνονται αλλά όχι να επιμηκύνονται στα εκκριτικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένα. Η διατροφή θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν το προφίλ των λιπαρών οξέων στο γάλα και το κρέας των μηρυκαστικών ζώων (Sanz Sampelayo *et al.*, 2006; Chilliard *et al.*, 2007). Η διατροφική διαχείριση με τη βόσκηση επηρεάζει σημαντικά το προφίλ των Λ.Ο. των προϊόντων και έχει συνδεθεί με αυτά (Viallon *et al.*, 1999;

Martin *et al.*, 2005; Tsiplakou *et al.*, 2008). Για παράδειγμα νωρίς την άνοιξη (νεαρό βλαστικό στάδιο) η βοσκή περιέχει λινολενικό οξύ σε ποσοστό πάνω από 40 % των ολικών λιπαρών οξέων, ενώ στο τέλος της άνοιξης (ώριμο βλαστικό στάδιο) το λινολενικό οξύ μειώνεται σημαντικά. Βέβαια, οι μεταβολές του προφίλ των λιπαρών οξέων της βοσκής δεν μπορούν να εξηγήσουν απόλυτα τις μεταβολές που παρατηρούνται στη συγκέντρωση των Λ.Ο. του λίπους του γάλακτος.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ζωικά προϊόντα που προέρχονται από ζώα που κατανάωναν διαφορετικά είδη βοσκήσιμης ύλης ή βρίσκονταν σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές έχουν διαφορετικές οργανοληπτικές ιδιότητες και θρεπτική αξία (Coulon and Priolo, 2002). Οι βοσκές είναι γνωστό ότι εκτός από το ότι προσδίδουν συγκεκριμένες οργανοληπτικές ιδιότητες στα παραγόμενα ζωικά προϊόντα (Cornu *et al.*, 2009) βελτιώνοντας την γευστικότητά τους, δίνουν ζωικά προϊόντα με υψηλότερη περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από εκείνα των ζώων που διατρέφονται εντός του στάβλου. Ωστόσο σημαντικό ρόλο στη ζήτηση των προϊόντων αυτών έχει και η διαμόρφωση της αντίληψης των καταναλωτών για την υψηλότερη διαιτητική αξία των προϊόντων που προέρχονται από ζώα που έχουν τραφεί στη βοσκή, γεγονός που αποφέρει οικονομικό κέρδος στον παραγωγό εξαιτίας της υψηλότερης τιμής των προϊόντων αυτών. Η υψηλότερη διαιτητική αξία και το όφελος που μπορεί να επιφέρει η κατανάλωση των γαλακτοκομικών αυτών προϊόντων στην υγεία του ανθρώπου επισημαίνεται από πολλούς ερευνητές (Hauswirth *et al.*, 2004; Leiber *et al.*, 2005). Εκτός από τους δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες, όπως τα τερπένια, έχει προταθεί και το προφίλ των λιπαρών οξέων ως δείκτης αναγνωρισιμότητας των ζωικών προϊόντων. Έτσι, οι Repou *et al.*, (2004) εξετάζοντας την αναλογία κορεσμένων (SFA), μονο- (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) λιπαρών οξέων, με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και τη χρήση του ¹³C, κατέληξαν ότι σε αγελάδες που έβοσκαν σε ορεινές βοσκές το ποσοστό των PUFA λιπαρών οξέων στο γάλα ήταν μεγαλύτερο από ότι των μονοακόρεστων και των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα των ορεινών βοσκών σε τερπένια θα μπορούσε να αποτελέσει αξιόπιστο μέσο για την αναγνωρισιμότητα των ζωικών προϊόντων. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη οι Revello-Chion *et al.*, (2010) εντόπισαν ότι το γάλα και το τυρί, που προερχόταν από αγελάδες που έβοσκαν σε ορεινούς βοσκότοπους τις περιόδους όπου η συγκέντρωση των τερπενίων στη φυτική ύλη ήταν αυξημένη, είχαν ταυτόχρονα διαφορετικό προφίλ

λιπαρών οξέων (πιο επιθυμητό) από ότι όταν τα προϊόντα προέρχονταν από ζώα που έβοσκαν σε πεδινές περιοχές. Συμπέραναν και αυτοί ότι ο συνδυασμός αυτών των δύο χαρακτηριστικών θα μπορούσε να συμβάλλει στην αναγνωρισιμότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Ταυτόχρονα, εκτίμησαν ότι οι οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες των συγκεκριμένων προϊόντων μπορούν να προσδώσουν μεγαλύτερο οικονομικό όφελος στους παραγωγούς μέσω της αυξημένης τιμής των προϊόντων αυτών. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, έρχονται και οι Collomb *et al.*, (2002) οι οποίοι σε μελέτη που πραγματοποίησαν προσδιορίζοντας την ποσότητα των λιπαρών οξέων στη βοσκήσιμη ύλη που βρίσκονταν σε πεδινές, ενδιάμεσες και ορεινές βοσκές, με υψόμετρο 650m, 1210m και 2120m αντίστοιχα βρήκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων ανάμεσα στις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Σημαντική επίσης διαφορά παρατηρήθηκε στο προφίλ των λιπαρών οξέων γάλακτος αγελάδων από τις ορεινές βοσκές που περιείχαν μικρότερο ποσοστό κορεσμένων μικρής και μεσαίας αλύσου λιπαρών οξέων ενώ η συγκέντρωση των πολυακόρεστων και ειδικά του CLA κυμαινόταν (αντίστοιχα σε 0,87, 1,61 και 2,36 g ανά 100g γάλακτος) σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από ότι στις πεδινές βοσκές. Επισημαίνεται λοιπόν, ότι τα λιπαρά οξέα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες και σε συνδυασμό με την παρουσία δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών όπως για παράδειγμα τα τερπένια, θα μπορούσαν να έχουν καθοριστικό ρόλο στην αναγνωρισιμότητα των ζωικών προϊόντων.

2. Τερπένια

Τα τερπένια ανήκουν σε μια μεγάλη κατηγορία συστατικών που ονομάζονται δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες. Σύμφωνα με τους Bourgaud *et al.*, (2001) ως δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες ορίζονται οι ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από άτομα C ή N που δεν συμμετέχουν στις βασικές διεργασίες του μεταβολισμού και βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα φυτά. Διακρίνονται για την προστασία που παρέχουν στα φυτά από παθογόνους μικροοργανισμούς (φυτοαλεξίνες) και δρουν επίσης ως προστατευτικές ουσίες ενάντια στη βόσκηση από τα φυτοφάγα ζώα εξαιτίας των αντιδισιαιτητικών τους ιδιοτήτων (Acamovic and Brooker, 2005).

Τα τερπένια βρίσκονται σε πόες, θάμνους και δέντρα σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής τους (Langenheilm, 1994). Αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών που συντίθενται στο φυτικό βασίλειο και πολλά από αυτά έχουν χαρακτηριστική γεύση και άρωμα, όπως η μενθόλη, το **πινένιο**, το **λεμονένιο** και η καμφορά (Duncan *et al.*, 1994). Είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους και χαμηλού σημείου ζέσεως (Ραγκούση, 1985).

Η περιεκτικότητα της φυτικής ύλης σε τερπένια είναι ποικίλη, αυξανόμενη κατ' αρχήν με την ηλικία του φυτού (Cornu *et al.*, 2001). Επιπλέον, εξαρτάται και από παράγοντες όπως το έδαφος, οι κλιματικές συνθήκες, η εποχή του έτους (Fernandez-Garcia *et al.*, 2008), η γεωγραφική περιοχή (Coulon and Priolo 2002; Prache *et al.*, 2005a) και οι πρακτικές διαχείρισης της βλάστησης (Mariaca *et al.*, 1997). Στις περιοχές της Μεσογείου και εκείνες της υδρογείου με παρόμοιες κλιματικές συνθήκες και βλάστηση παράγεται το 49% της παγκόσμιας παραγωγής **αιθέριων ελαίων** (από φυτικά είδη κυρίως των οικογενειών Labiatae και Compositae), που αποτελούν την κύρια πηγή τερπενίων παγκοσμίως (Mariaca *et al.*, 1997).

Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο εντοπισμός των τερπενίων σε ζωικά προϊόντα ήταν το στοιχείο που έκανε τις ενώσεις αυτές ενδιαφέρουσες για χρήση ως βιοδείκτες. Τα τερπένια επέτρεψαν τη διάκριση των προϊόντων από ζώα που διατράφηκαν σε βοσκές ή εντός του στάβλου (Moio *et al.*, 1996; Buchin *et al.*, 1998; Viallon *et al.*, 2000; Toso *et al.*, 2002; Fedele *et al.*, 2004; Fedele *et al.*, 2004), καθώς και εκείνων που προέρχονταν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, τόσο για το γάλα (Fernandez *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005) όσο και για το κρέας (Priolo *et al.*, 2004; Cornu *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2011).

Με βάση τα παραπάνω πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι, επειδή τα τερπένια αποτελούν χαρακτηριστικές ουσίες της φυτικής ύλης έχοντας στενή σχέση με συγκεκριμένα σιτηρέσια, η μεταφορά τους από τη φυτική ύλη στο γάλα είναι γρήγορη, συνδέουν άμεσα το σιτηρέσιο με το παραγόμενο προϊόν και παρουσιάζουν ευαισθησία στις αλλαγές του, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνωρισιμότητα των ζωικών προϊόντων (Viallon *et al.*, 1999; Viallon *et al.*, 2000; Cornu *et al.*, 2001; Priolo *et al.*, 2004).

2.1 Ρόλος, κατηγορίες και χημική σύσταση τερπενίων

Στα φυτά τα τερπένια επιτελούν πιο εξειδικευμένη λειτουργία στην άμυνα έναντι των φυτοφάγων ζώων, καθώς και στην αναπαραγωγή με το να προσελκύουν έντομα που θα βοηθήσουν στην επικονίαση (DeMoraes *et al.*, 2001; Dudareva *et al.*, 2004). Αυτές οι λειτουργίες επιτελούνται κυρίως από τις ενώσεις που ανήκουν στις ομάδες των μονοτερπενίων (C_{10}), σεσκιτερπενίων (C_{15}) και διτερπενίων (C_{20}). Συντελούν, επίσης, στην αποτελεσματικότερη λειτουργία της φωτοσύνθεσης σε υψηλές θερμοκρασίες με την σταθεροποίηση των θυλακοειδών μεμβρανών (Sharkey *et al.*, 2001; Dudareva *et al.*, 2004) καθώς και στη δομή (στερόλες) και τη ρύθμιση της ανάπτυξης των κυτταρικών μεμβρανών (Gershenzon 1994). Τα τερπένια ποικίλουν στη δομή τους καθώς περιέχουν διαφορετικούς ανθρακικούς σκελετούς και πολλές λειτουργικές ομάδες (Croteau *et al.*, 2000). Η πλειονότητα ωστόσο των τερπενίων που ανιχνεύονται στα φυτά ανήκουν στις κατηγορίες των μόνο και σεσκιτερπενίων με κύριους εκπρόσωπους τους την καρβακρόλη, τη θυμόλη, το α -πινένιο, λεμονένιο και β -καρυοφυλλένιο (Dumont and Adda, 1978; Mariaca *et al.*, 1997; Tornambe *et al.*, 2006; Malecky *et al.*, 2009a).

2.1.1 Μονοτερπένια

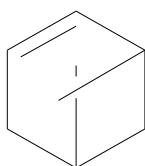
Τα μονοτερπένια είναι άχρωμες, λιπόφιλες ενώσεις (Lücker *et al.*, 2002) που αποτελούνται από δύο μόρια ισοπρενίου δηλαδή έχουν 10 άτομα άνθρακα (Πίνακας 1). Κύρια πηγή τους είναι τα φυτά, παράγονται και ανευρίσκονται όμως και σε εκκρίσεις εντόμων π.χ. φερομόνες, όχι όμως σε άλλα ζώα (Ραγκούση, 1985).

Πίνακας 1. Κυριότερες κατηγορίες μονοτερπενίων

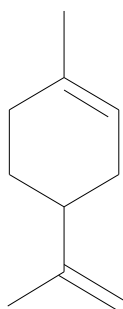
Άκυκλα μονοτερπένια	
Ωκιμένιο	Μυρσένιο
Γερανιόλη	Λιναλοόλη
Μονοκυκλικά μονοτερπένια	
α-Τερπινένιο	Λεμονένιο
α-Φελλανδένιο	β-Φελλανδένιο
π-κυμένιο	Μινθόλη
α-Τερπινεόλη	Καρβακρόλη
Θυμόλη	1,8-Κινεόλη
Δικυκλικά μονοτερπένια	
α-Πινένιο	β-Πινένιο
Σαβινένιο	Δ ₃ -καρενιο
Καμφένιο	Βορνεόλη

Χωρίζονται σε άκυκλα και κυκλικά (μονοκυκλικά και δικυκλικά) με την πλειονότητα όμως αυτών να ανήκουν στα κυκλικά. Στο σύνολό τους οι ενώσεις αυτές προσδίδουν στα φυτά στα οποία περιέχονται χαρακτηριστικό άρωμα.

Το α-πινένιο και το λεμονένιο αποτελούν δύο μονοτερπένια τα οποία απαντώνται συχνά στη φυτική ύλη και διαφέρουν ως προς τη δομή τους η οποία φαίνεται στις Εικόνες 2 και 3. Ειδικά σε ότι αφορά στο α-πινένιο αυτό αποτελεί πρώτη ύλη για την παραγωγή όλης σχεδόν της σειράς των μονοτερπενίων (Ραγκούση, 1985). Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν δύο μονοτερπένια με διαφορετική δομή, το **α-πινένιο** που ανήκει στην ομάδα των δικυκλικών μονοτερπενίων και το **λεμονένιο** που ανήκει στην ομάδα των μονοκυκλικών μονοτερπενίων.



Εικόνα 2. Συντακτικός τύπος α-πινενίου (Chemdraw, 2002)

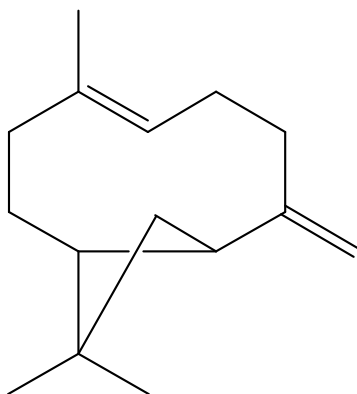


Εικόνα 3. Συντακτικός τύπος λεμονενίου (Chemdraw, 2002).

2.1.2 Σεσκιτερπένια

Τα σεσκιτερπένια (Πίνακας 2) είναι ενώσεις με 15 άτομα άνθρακα, που αποτελούνται από τρία μόρια ισοπρενίου και έχουν σαν πρόδρομη ουσία τον πυροφωσφορικό εστέρα της φαρνεσόλης (Ραγκούση, 1985). Τα σεσκιτερπένια ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των δακτυλίων που έχει ο συντακτικός τους τύπος σε: άκυκλα, μονοκυκλικά, δικυκλικά και τρικυκλικά. Ένας μεγάλος αριθμός σεσκιτερπενίων αποτελούν συστατικά των αιθερίων ελαίων (Ραγκούση, 1985; Croteau *et al.*, 2000).

Από τα σεσκιτερπένια που υπάρχουν στα φυτά στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε το β-καρυοφυλλένιο, το οποίο είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στη φύση (Clericuzio *et al.*, 2000) και η στερεοχημική δομή του φαίνεται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4. Συντακτικός τύπος β-καρυοφυλλενίου.

Πίνακας 2. Κυριότερες κατηγορίες σεσκιτερπενίων.

Μονοκυκλικά-σεσκιτερπένια	
Βισαβολένιο	α-Καρυοφυλλένιο
Α-Κουρκουμένιο	
Δικυκλικά-σεσκιτερπένια	
α-Καδινένιο	β-Καρυοφυλλένιο
Κοπαένιο	
Τρικυκλικά σεσκιτερπένια	
Σαντένιο	Ευγενόλη
Κινεόλη	

2.2 Βιοσύνθεση

Η μεγάλη διασπορά των τερπενίων στη φύση οδήγησε τους επιστήμονες από ωρίς στη διερεύνηση της δομής τους. Έτσι αρχικά ο Wallace το 1887, ο οποίος έκανε πρώτος την υπόθεση ότι τα μονοτερπένια αποτελούνται από μονάδες ισοπρενίου και στη συνέχεια ο Ruzicka το 1939, συνέβαλαν σημαντικά στην εξήγηση της δημιουργίας των τερπενικών σκελετών. Η διαδικασία σύνθεσης των τερπενίων πραγματοποιείται κυρίως στο κυτόπλασμα ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι ένα μέρος αυτής της διαδικασίας πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες και στο ενδοπλασματικό δίκτυο στο οποίο πραγματοποιούνται διεργασίες όπως η υδροξυλίωση (Dudareva *et al.*, 1996; Dudareva and Pichersky, 2000).

Η βασική οδός σύνθεσης των μονάδων ισοπρενίου στη φύση είναι το μεβαλονικό οξύ. Οι μονάδες που προκύπτουν από αυτό πολυμερίζονται παρουσία κατάλληλων ενζύμων για να δώσουν αλυσίδες πολυισοπρενίου, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να κυκλοποιηθούν πάλι ενζυμικά σχηματίζοντας κυκλικά τερπένια. Ο μηχανισμός που ακολουθείται κατά τη βιοσύνθεση των τερπενίων περιλαμβάνει:

α) βιοσύνθεση του φωσφορομεβαλονικού οξέος από θειολεστέρες του οξεικού και του ακετοξεικού οξέος (Εικόνα 5)

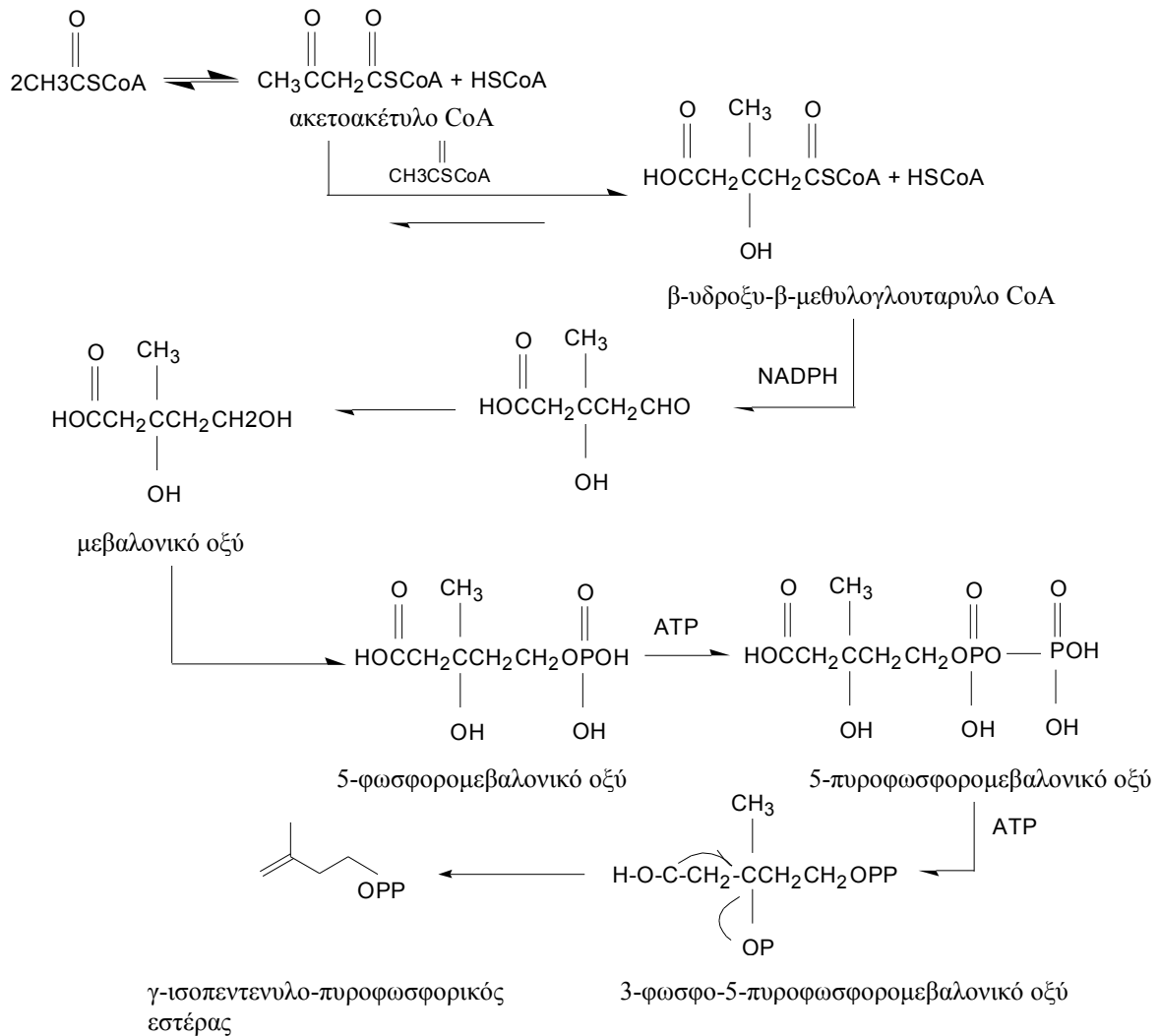
β) σχηματισμό των αλυσίδων πολυισοπρενίου μέσω φωσφορικών μονομερών παραγώγων του μεβαλονικού οξέος και (Εικόνα 6)

γ) κυκλοποίηση προς μόνο- και πολυκυκλικά τερπενοειδή

Πιο αναλυτικά τα στάδια περιγράφονται πιο κάτω:

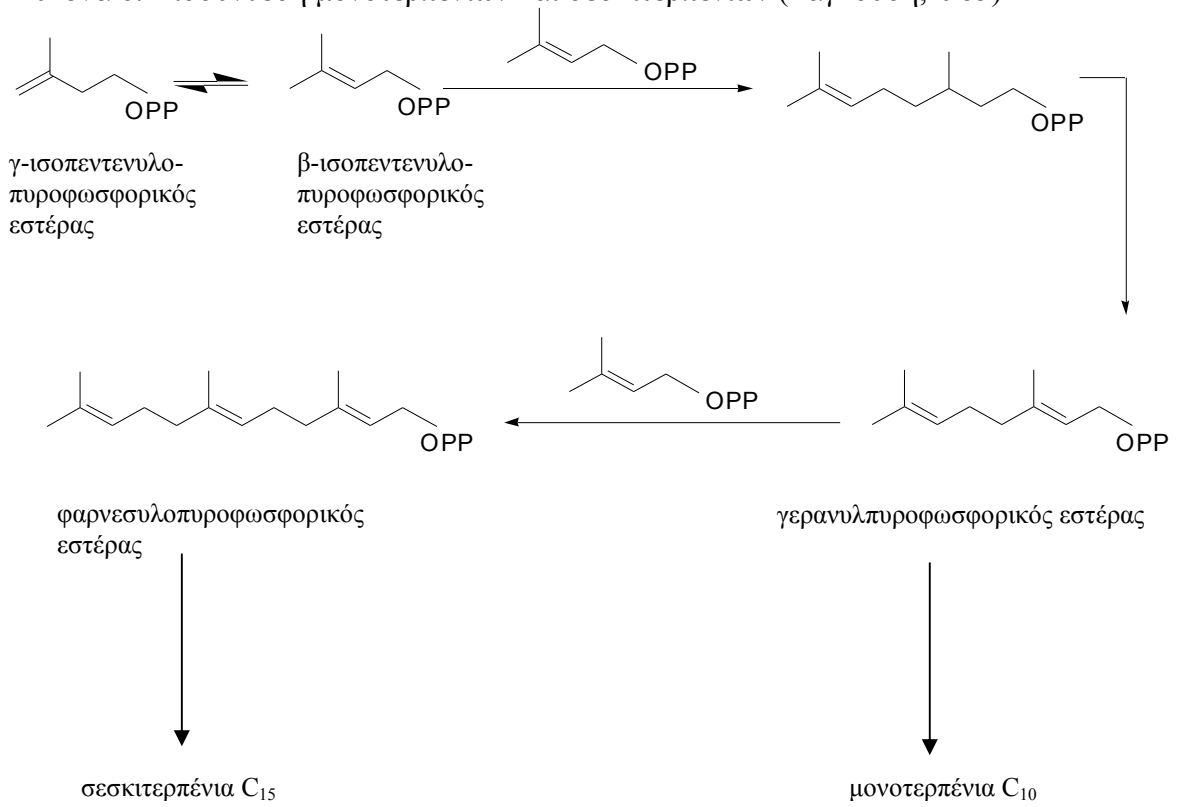
α) Ο σχηματισμός ξεκινάει από το ακέτυλο CoA, το οποίο αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν πολλών φυσικών προϊόντων (Εικόνα 5). Δύο μόρια ακέτυλο CoA ενώνονται για να σχηματίσουν C4- ακέτυλο CoA. Ένα τρίτο μόριο ακέτυλο CoA παράγει τον C6-σκελετό του μεβαλονικού οξέος στη μορφή του πρόδρομου β-υδρόξυ-β-μεθυλογλουτάρυλο-CoA. Η σύνθεση του μεβαλονικού οξέος ελέγχεται από την αναγωγή του β-υδρόξυ-β-μεθυλογλουτάρυλο-CoA. Η αναγωγή αυτή απαιτεί δύο μόρια NADPH για να δώσει το μεβαλονικό οξύ και είναι μη αντιστρεπτή. Τέλος, δύο συνεχείς φωσφορυλιώσεις του μεβαλονικού οξέος οδηγούν στο πυροφωσφορικό του εστέρα, ο οποίος μετά την τρίτη φωσφορυλίωση υφίσταται σύγχρονη αποκαρβοξυλίωση και απόσπαση δημιουργώντας το γ-ισοπεντενυλο-πυροφωσφορικό εστέρα που είναι η ισοπρενοειδής μονάδα η οποία χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση των τερπενίων (Ραγκούση 1985).

Εικόνα 5. Βιοσύνθεση φωσφορομεβαλονικού οξέος (Ραγκούση, 1985)



β) Ο πολυμερισμός των μονάδων ισοπρενίου για τη δημιουργία τερπενικών αλυσίδων φαίνεται στην Εικόνα 6. Με μετάθεση πρωτονίου που πραγματοποιείται ενζυμικά, ο γ-ισοπεντενυλοφωσφορικός εστέρας ισομερίζεται προς το θερμοδυναμικά σταθερότερο β-ισοπεντενυλοφωσφορικό εστέρα που είναι η βιολογική μορφή της ισοπρενοειδούς ομάδας και δρα ως ηλεκτρονιόφιλος αλκυλιωτικός παράγοντας στην ισοπρενοειδή βιοσύνθεση. Στη συνέχεια η πυρηνόφιλη προσβολή των π-ηλεκτρονίων του γ-ισοπεντενυλοφωσφορικού εστέρα στο β-ισοπεντενυλοφωσφορικό εστέρα οδηγεί στο C10-γερανυλοπυροφωσφορικό εστέρα που είναι πρόδρομος των μονοτερπενίων. Αφού ο γερανυλοπυροφωσφορικός εστέρας είναι αλλυλικός εστέρας, η πορεία επαναλαμβάνεται δημιουργώντας τις C15-φαρεσυλο και C20-γερανυλο αλυσίδες, από τις οποίες σχηματίζονται τα σεσκι- και διτερπένια.

Εικόνα 6. Βιοσύνθεση μονοτερπενίων και σεσκιτερπενίων (Ραγκούση, 1985)



3. Τερπένια και φυτικά είδη βοσκοτόπων

Ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την ποσοτική και ποιοτική διασπορά των τερπενίων στη βλάστηση είναι το είδος του φυτού. Οι Cornu *et al.*, (2001) προσδιόρισαν την ύπαρξη ή μη των τερπενίων σε διάφορα είδη φυτών. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη τερπενίων στο μάραθο (*Meum athamanticum*), την πιμπινέλα (*Pimpinella sp.*), την αγριαιθιά (*Achillea sp.*) και το θυμάρι (*Thymus vulgaris*). Αντίθετα, στη δαχτυλίδα (*Dactylis glomerata*), το αγριοράδι (*Taraxacum officinale*), τη γεντιανή (*Gentiana lutea*), το αρνόγλωσσο (*Plantago lanceolata*) και το ανθόξανθο (*Anthoxanthum moderato*) δεν ανιχνεύτηκαν τερπένια από τους παραπάνω ερευνητές. Σε αρκετές βιβλιογραφικές πηγές (Mariaca *et al.*, 1997; Cornu *et al.*, 2001; Prache *et al.*, 2005) αναφέρεται ότι τα φυτά των οικογενειών Apiaceae, Asteraceae και Lamiaceae περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις τερπενίων, ενώ σε φυτά της οικογένειας Poaceae οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τερπενίων είναι σημαντικά μικρότερες (Cornu *et al.*, 2001). Όπως έδειξε η ανάλυση φυτών διαφορετικών ειδών από τους Mariaca *et al.* (1997) τα δικοτυλήδονα, τα οποία επικρατούν στις ορεινές βοσκές, έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε τερπένια. Αντίθετα τα φυτά της οικογένειας Gramineae, που επικρατούν στις βοσκές των πεδινών περιοχών, είναι φτωχά σε τερπένια, οπότε και το προφίλ των τερπενίων της βλάστησης διαφοροποιείται χαρακτηριστικά στις δυο αυτές περιπτώσεις. Φαίνεται δηλαδή ότι η βοτανική σύνθεση της βλάστησης των βοσκοτόπων διαμορφώνει το προφίλ των τερπενίων σ' αυτή και η αντιστοίχιση με το προφίλ των τερπενίων στα ζωικά προϊόντα μπορεί να αποτελέσει σημαντικό στοιχείο για την αναγνωρισιμότητά τους. Ο Πίνακας 3 συνοψίζει τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των συγκεντρώσεων τερπενίων σε διάφορα φυτικά είδη από τους αντίστοιχους ερευνητές.

Ο προσδιορισμός των τερπενίων ωστόσο αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία. Είναι πιθανό ότι για το λόγο αυτό, όσο και από την φυσική παραλλακτικότητα, στη διεθνή βιβλιογραφία να υπάρχουν έρευνες με διαφορετικά ευρήματα όσον αφορά στις συγκεντρώσεις τερπενίων σε διάφορα φυτικά είδη (Fady *et al.*, 1992; Karamanoli *et al.*, 2000; Roussis *et al.*, 2000; Gounaris *et al.*, 2003; Petrakis *et al.*, 2005; Akpulat *et al.*, 2005; Saroglou *et al.*, 2007). Έτσι ενώ οι Tava *et al.*, (1997) προσδιόρισαν μικρές συγκεντρώσεις τερπενίων σε άνθη μηδικής (*Medicago sativa*), οι Buttery *et al.*, (1982) βρήκαν στο ίδιο φυτό ότι τα τερπένια αποτελούσαν το 35% του συνόλου των πτητικών συστατικών του με κύριο εκπρόσωπο το β-οκιμένιο αρωματικό συστατικό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στα άνθη μηδικής. Επιπλέον, ενώ οι Ait Said *et al.*,

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις τερπενίων που έχουν προσδιοριστεί σε διάφορα φυτικά είδη

Βιβλιογραφική αναφορά	Τερπένια	Συγκέντρωση τερπενίων	Είδος φυτού
King <i>et al.</i> , 2004	1,8-κινεόλη, α-πινένιο, β-πινένιο, λεμονένιο, π-κυμένιο	4.53-23.8 mg/g ΞΟ	<i>Eucalyptus polybractea</i>
Tava <i>et al.</i> , 1997	Λεμονένιο	0,01- 3,34 μg/g νωπού βάρους	Μηδική (<i>Medicago sativa</i>)
Hampel <i>et al.</i> , 2005	β-καρυοφυλλένιο	82-168 μg/g ΞΟ	<i>Daucus carota L</i>
Welch and McArthur 1981	Προφίλ τερπενίων	0,9-2,95 % ΞΟ	<i>Artemisia triahtata</i>
Llusia and Penuelas 2000	α-πινένιο, β-πινένιο, λεμονένιο, β-καρυοφυλλένιο, Δ ³ -καρένιο,	4-18 mg/g ΞΟ	<i>Bupleurum fruticosum</i>
Llusia <i>et al.</i> , 2006	Προφίλ τερπενίων	5-20 mg/g ΞΟ	<i>Pinus halepensis</i>
Olivier <i>et al.</i> , 2011	Προφίλ τερπενίων	150-360 μg/g ΞΟ	<i>Cistus sp.</i>
Martin <i>et al.</i> , 2003	Μονοτερπένια	1250-2100 μg/g ΞΟ	<i>Picea abies</i>
Utsumi <i>et al.</i> , 2009	α-πινένιο Λεμονένιο	10 mg/g ΞΟ 1 mg/g ΞΟ	<i>Juniperus phoeniceae</i>
Ormeno <i>et al.</i> , 2007	μονοτερπένια	1,5 mg/g ΞΟ	<i>P. halepensis</i>
Ormeno <i>et al.</i> , 2007	σεσκιτερπένια	1 mg/g ΞΟ	<i>Cistus albidus</i>
Llusia <i>et al.</i> , 2006	Προφίλ τερπενίων	1-5 mg/g ΞΟ	<i>Pistacia lentiscus</i>
Blanch <i>et al.</i> , 2009	α-πινένιο, β-πινένιο, Δ ³ -καρένιο, β-μυρσένιο	0,39 ± 0,06 μg/g 14,866 ± 1,678 μg/g	<i>Quercus ilex</i> <i>P. halepensis</i>

(2011) προσδιόρισαν το προφίλ των τερπενίων σε φυτά του είδους *Pistacia* σε συγκεντρώσεις έως 0,4 mg/g ΞΟ, οι Llusia *et al.* (2006) προσδιόρισαν το συνολικό προφίλ των τερπενίων, σε φυτά του ίδιου είδους, σε συγκεντρώσεις έως και 5 mg/g ΞΟ. Επίσης ενώ οι Zou και Cates (1995) προσδιόρισαν τη συγκέντρωση των τερπενίων του φυτού Douglas fir: *Pseudotsuga menziesii* (έλατο του Όρεγκον) από

0,19 mg/g έως 2,32 mg/g νωπού βάρους ανάλογα με την εποχή του έτους στην οποία είχε συλλεχθεί το δείγμα, οι Gambliel *et al.*, (1995) βρήκαν αντίστοιχα συγκεντρώσεις από 0,19 mg/g έως 1 mg/g νωπού βάρους. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Duncan *et al.*, (1994) η συγκέντρωση των τερπενίων που προσδιορίστηκε στο φυτό ερυθρελάτη (Sitka spruce: *Picea sitchensis*) έφτανε τα 25 mg/g ξηράς ουσίας, ενώ οι ίδιοι ερευνητές σε έρευνα που πραγματοποίησαν μερικά χρόνια αργότερα προσδιόρισαν σε φυτά του ίδιου είδους (Sitka spruce: *Picea sitchensis*) συγκεντρώσεις τερπενίων μέχρι 7 mg/g ξηράς ουσίας (Duncan *et al.*, 2005, unpublished data). Έτσι, όπως παρουσιάζεται τόσο στον Πίνακα 3, όσο και στα παραπάνω δεδομένα οι συγκεντρώσεις των τερπενίων στα φυτά παρουσιάζουν έντονη παραλλακτικότητα.

3.1. Συσχέτιση των τερπενίων με τις βοσκές και τα βόσκοντα ζώα

Σε παγκόσμια κλίμακα οι βοσκότοποι καλύπτουν έκταση 32 δισεκατομμυρίων στρεμμάτων (FAO, 1998), ενώ η αντίστοιχη έκταση στην Μεσογειακή λεκάνη ανέρχεται στα 988 εκατομμύρια στρέμματα (Rogosis *et al.*, 2008). Ένα μεγάλο ποσοστό από τις εκτάσεις αυτές, οι οποίες κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται από φυτοφάγα ζώα, αντιστοιχεί σε δασικούς βοσκότοπους και βοσκότοπους με θαμνώδη βλάστηση, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη παρουσία ξυλωδών και θαμνωδών φυτών σε αυτούς (Hadjigeorgiou *et al.*, 2005). Οι περιοχές αυτές αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό των βοσκήσιμων εκτάσεων σε περιοχές με μακρές περιόδους ξηρασίας και δύσκολες κλιματικές συνθήκες όπως για παράδειγμα οι περιοχές της Μεσογείου. Σε αυτές τις περιοχές ένα μεγάλο ποσοστό της διατροφής των ζώων στις βοσκές καλύπτεται από ξυλώδη φυτά κυρίως σε ότι αφορά τις αίγες και σε λιγότερο βαθμό τα πρόβατα. Σε πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Karmiris and Nastis (2010) και στην οποία μελετήθηκε η επιλογή των φυτικών ειδών σε θαμνώδη βοσκότοπο κατά τη διάρκεια του έτους βρέθηκε ότι οι αίγες σε ποσοστό που ξεπερνάει το 65% καλύπτουν τις διατροφικές τους ανάγκες με θαμνώδη φυτά ενώ στα πρόβατα το αντίστοιχο ποσοστό φτάνει το 30%.

Στην Ελλάδα, από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί (Papachristou and Nastis 1993; Papachristou *et al.*, 1996; Sfougaris *et al.*, 1996; Papachristou *et al.*, 1997; Karmiris and Nastis, 2010) βρέθηκε ότι φυτά όπως τα *Pistacia lentiscus*, *Quercus sp.*, *Colutea arborescens*, *Rubus sp.*, *Cistus sp.*, *Juniperus sp.*, συναντώνται συχνά σε βοσκότοπους, καλύπτοντας τις διατροφικές ανάγκες των ζώων που έβοσκαν

σε αυτούς. Σε κάποια από αυτά τα φυτά οι συγκεντρώσεις τερπενίων που έχουν προσδιοριστεί είναι ιδιαίτερα υψηλές. Έτσι για παράδειγμα σε φυτά του γένους *Pistacia lentiscus* και *Juniperus sp.*, οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν ανέρχονται σε 1-5 mg/g ΞΟ και 12 mg/g αντίστοιχα. Επίσης, στο φυτό *Bupleurum fruticosum*, ενδημικό φυτό στην περιοχή των Κυκλάδων (Μπάζος, 2005) που ανήκει στην κατηγορία των φρυγάνων, οι συγκεντρώσεις τερπενίων προσδιορίστηκαν έως 18 mg/g ΞΟ (Llusia and Penuelas 2000).

Ωστόσο, παρά την σε πολλές περιπτώσεις κοινή εκτροφή τους οι διαφορές αιγών και προβάτων ιδιαίτερα σε ότι αφορά τόσο στη διατροφική τους συμπεριφορά όσο και στην επιλογή της καταναλισκόμενης τροφής και στη φυσιολογία του πεπτικού τους συστήματος είναι σημαντικές (Hofmann, 1989; Animut and Goetsh, 2008). Αίγες και πρόβατα είναι γνωστό ότι ανήκουν σε διαφορετικούς διατροφικούς τύπους που σχετίζονται αρχικά με την επιλογή της τροφής κατατάσσοντας τις μεν αίγες στους ενδιάμεσους καταναλωτές (ποώδη και ξυλώδη βλάστηση) τα δε πρόβατα στους καταναλωτές σχεδόν αποκλειστικά ποώδους βλάστησης (Hofmann, 1989; Gordon, 2003). Επιπλέον στα πρόβατα όσον αφορά στις διατροφικές τους συνήθειες εντάσσεται η περιορισμένη απαίτηση τους σε ότι αφορά την παραλλακτικότητα των φυτικών ειδών στο βοσκότοπο στον οποίο βρίσκονται. Αντίθετα οι αίγες απαιτούν γενικά μεγαλύτερη ποικιλία στην τροφή τους εφόσον υπάρχει βέβαια αυτή η δυνατότητα (Gordon, 2003). Οι αίγες επιλέγουν ποικιλία τροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε κυτταρίνες λιγνίνη, δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες και αζωτούχες ουσίες (Gordon, 1989). Παρουσιάζουν επίσης μεγάλη προσαρμοστικότητα στις αλλαγές, στο είδος και στην ποιότητα της καταναλισκόμενης βλάστησης (Hadjigeorgiou *et al.*, 2003). Χαρακτηριστικό τους αποτελεί ακόμη η ικανότητά τους να καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες τροφής όταν αυτή είναι διαθέσιμη προκειμένου να ανταποκριθούν στις αυξημένες ανάγκες του μεταβολισμού τους όταν αυτό κριθεί απαραίτητο (Hofmann, 1989). Αντίθετα τα πρόβατα επιλέγουν κυρίως ποώδη βλάστηση πλούσια σε κυτταρικά τοιχώματα. Χαρακτηριστικά τους αποτελούν τα λίγα αλλά μεγάλα χρονικά διαστήματα εντός της ημέρας που περνούν βόσκοντας που ακολουθούνται από λίγες αλλά επίσης μεγάλες σε διάρκεια περιόδους μηρυκασμού και ανάπαυσης (Hofmann, 1989). Επειδή όμως τα κυτταρικά τοιχώματα αποτελούν μεγάλο ποσοστό της ξηράς ουσίας στην ποώδη βλάστηση αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη πέψη των συστατικών αυτών από τα πρόβατα, παρόλο που

απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος παραμονής τους στη μεγάλη κοιλία από ότι η ξυλώδης βλάστηση η οποία επιλέγεται από τις αίγες (Illius and Gordon, 1991).

Φαίνεται δηλαδή από τα παραπάνω ότι αίγες και πρόβατα διαφέρουν τόσο στην επιλογή των φυτών που θα καταναλώσουν κατά τη βόσκηση όσο και στον τρόπο που αποδομούν τα συστατικά αυτά εντός του ζωικού οργανισμού. Για τους λόγους αυτούς είναι πιθανό οι ουσίες που επιλέγονται ως βιοδείκτες για την αναγνωρισιμότητα των ζωικών προϊόντων που προέρχονται από αίγες και πρόβατα να έχουν διαφορετική ανταπόκριση σε κάθε είδος ζώου.

4. Τα τερπένια στο ζωικό οργανισμό

4.1. Αποδόμηση

Οι μικροοργανισμοί και τα ένζυμά τους έχουν γενικά αποδειχθεί πολύπλευροι βιοκαταλύτες και χρησιμοποιούνται ευρέως βιομηχανικά για τη βιομετατροπή διαφόρων ενώσεων. Σε αντίθεση με τις συνηθισμένες χημικές διαδικασίες, οι οποίες απαιτούν ακραίες θερμοκρασίες και πιέσεις, οι μικροβιακές μετατροπές λαμβάνουν χώρα υπό ενδιάμεσες συνθήκες (Chatterjee and Bhattacharyya, 2001). Η μεγάλη κοιλία (MK) των μηρυκαστικών είναι χώρος όπου φιλοξενείται πλούσια μικροχλωρίδα, αποτελεί ένα συνεχές σύστημα ζυμώσεων όπου λαμβάνουν χώρα πολλές μικροβιακές διεργασίες. Ωστόσο, για να μπορέσει η MK να λειτουργήσει αρμονικά θα πρέπει να εξασφαλιστούν συνθήκες όπως η διατήρηση του pH, της οσμωτικής πίεσης και κυρίως οι αναερόβιες συνθήκες για τη διάσπαση των συστατικών της τροφής από τους μικροοργανισμούς (McDonald et al. 1995). Οι ιδανικές συνθήκες λειτουργίας της MK εξασφαλίζονται όσον αφορά στο pH με την βοήθεια των φωσφορικών και δικαρβονικών οξέων που περιέχονται στο σίελο και τα οποία δρουν ως ρυθμιστικά διαλύματα εντός της MK ρυθμίζοντας τις τιμές του. Η οσμωτική πίεσή της διατηρείται σταθερή και ίση με αυτή του αίματος με τη ανταλλαγή ιόντων ανάμεσα στο αίμα και τη MK. Τέλος το οξυγόνο που εισέρχεται στη MK κατά την κατάποση της τροφής, χρησιμοποιείται άμεσα από τους μικροοργανισμούς έτσι ώστε να διατηρηθεί το αναερόβιο περιβάλλον, το οποίο αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη δράση των μικροοργανισμών της (Stewart, 1991).

Η διερεύνηση των μικροβιακών μετατροπών στη MK στο παρελθόν είχε μελετηθεί κυρίως με την τοποθέτηση συριγγίων (Malecky et al., 2009) σε αυτή. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, για λόγους που σχετίζονται με τη ευζωία, η μέθοδος αυτή αποφεύγεται και η μελέτη της συμπεριφοράς των συστατικών της τροφής εντός της MK καθώς και η τροποποίηση του μικροβιακού περιβάλλοντος προτιμάται να γίνεται με τη χρήση οισοφαγικού καθετήρα (Geishauser and Gitzel, 1996). Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται άρχικά ότι η λήψη των δειγμάτων γίνεται με τις λιγότερες δυνατές παρεμβάσεις στην φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού του ζώου. Επιπλέον παρέχεται η δυνατότητα η λήψη των δειγμάτων να γίνεται σε αναερόβιες συνθήκες και κατά συνέπεια το σφάλμα που πιθανόν παρατηρείται στα αποτελέσματα από την επίδραση του οξυγόνου στη MK, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των συριγγίων, περιορίζεται.

Όσον αφορά στα τερπένια η πλειονότητα των μελετών των μικροβιακών μετατροπών τους στη ΜΚ αφορούν στα **μονοτερπένια**. Έχει αναφερθεί για παράδειγμα, ότι ποσότητες της 1,8-κινεόλης μπορούν να αποδομηθούν στη μεγάλη κοιλία. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερα επίπεδα αυτής στο πλάσμα και αύξηση της κατανάλωσης της τροφής μετά από χρονικό διάστημα μιας εβδομάδας κατά το οποίο τα ζώα προσαρμόστηκαν στην κατανάλωσή της (Dziba *et al.*, 2006). Αποτελέσματα από δοκιμές που έγιναν σε αρνιά, χρησιμοποιώντας τη 1,8-κινεόλη με έγχυση στη μεγάλη κοιλία, συγκρινόμενα με δοκιμές ενδοφλέβιας χορήγησης, στηρίζουν την υπόθεση ότι η αποδόμηση στη μεγάλη κοιλία, πριν από την απορρόφηση της 1,8-κινεόλης και την είσοδό της στο κυκλοφορικό σύστημα, μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωσή της και την παρατηρούμενη ανθεκτικότητα και προσαρμογή των αρνιών στην ουσία αυτή (Dziba *et al.*, 2006).

Ανάμεσα στα διάφορα μονοτερπένια, το **λεμονένιο** είναι ευρέως διαθέσιμο και κύριο συστατικό στα έλαια που προέρχονται από φυτά της οικογένειας Rutaceae. Οι χαρακτηριστικές οργανοληπτικές του ιδιότητες για παράδειγμα, καθώς και οι χρήσεις του στα τρόφιμα έχουν οδηγήσει σε εκτενή έρευνα όσον αφορά στη σύνθεσή του όπως και τη μικροβιακή αποδόμησή του (Tan & Day, 1998). Ωστόσο οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στη μικροβιακή μετατροπή του **λεμονενίου** αναφέρουν χαμηλή παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού κατά τη διάσπασή του η οποία πιθανόν οφείλεται στη πτητικότητα και την τοξικότητα του **λεμονενίου** για τους περισσότερους μικροοργανισμούς (Uribe and Pena, 1990). Οι Malecky *et al.* (2009a) διερεύνησαν *in vitro* το βαθμό αποδόμησης 17 τερπενίων και οξυγονωμένων μονοτερπενίων, που είναι τυπικά συστατικά της διατροφής των ζώων που τρέφονται στη βοσκή, μετά την ανάμιξή τους με υγρό μεγάλης κοιλίας από γαλακτοπαραγωγές αίγες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο βαθμός αποδόμησης διέφερε σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα τερπένια. Η παρουσία ενός ή περισσότερων δακτυλίων στο μόριο του τερπενίου καθώς και η παρουσία οξυγόνου συσχετίστηκαν με την χαμηλή αποδόμηση των ουσιών αυτών στο υγρό της μεγάλης κοιλίας. Ωστόσο οι παραπάνω ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται κατά την αποδόμηση των τερπενίων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας δεν είναι ακόμα αρκετά γνωστοί.

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την αποδόμηση των τερπενίων στο έδαφος κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (Misra *et al.*, 1996; Kleinheinz *et al.*, 1999), παρέχουν στοιχεία για την στήριξη υποθέσεων σχετικά με την

αποδόμηση των τερπενίων τόσο στο αναερόβιο περιβάλλον της ΜΚ όσο και για την κλίμακα στην οποία η διαδικασία αυτή στο περιβάλλον της ΜΚ επηρεάζεται από την παρουσία οξυγόνου. Για παράδειγμα, ο αναερόβιος σχηματισμός της γερανιαλής από λιναλοόλη και του γερανικού οξέος από λεμονένιο στο έδαφος έχει παρατηρηθεί από το βακτήριο *Alcaligenes defragrans* (Kleinheinz *et al.*, 1999). Επιπλέον, πιθανές αλληλεπιδράσεις όπως η σύνδεση με πρωτεΐνες και οι μοριακές δομές που σχηματίζονται σε υδρόφοβες επιφάνειες μπορεί να συνυπολογιστούν ως παράγοντες που επηρεάζουν την αποδόμηση των ουσιών αυτών (Kleinheinz *et al.*, 1999).

Οι Harder και Probian (1995) μελέτησαν την αναερόβια αποδόμηση μονοτερπενίων, μεταξύ των οποίων το **α-πινένιο** και το **λεμονένιο**, από το μικροοργανισμό *Pseudomonas citronellolis* που είχε καλλιεργηθεί σε αναερόβιες συνθήκες. Βρέθηκε ότι, σε αντίθεση με τα μη κυκλικά μονοτερπένια, τα κυκλικά οξειδώνονταν αναερόβια από μικροοργανισμούς.

Οι Malecky *et al.* (2009b), επίσης, προσδιόρισαν μικρό ποσοστό ανάκτησης στο δωδεκαδάκτυλο 4 τερπενίων που χορήγησαν, μέσω συριγγίων, στη μεγάλη κοιλία γαλακτοπαραγωγών αίγών και απέδωσαν αυτά τα αποτελέσματα στην σημαντική αποδόμηση των 4 τερπενίων στο χώρο της μεγάλης κοιλίας. Οι ίδιοι ερευνητές απέδωσαν την μεγαλύτερη αποδομηση των τερπενίων που παρατηρήθηκε στο παραπάνω *in vivo* πείραμα, σε σχέση με αποτελέσματα από *in vitro* πειράματα, σε διάφορους παράγοντες όπως, στην μεταφορά των τερπενίων στην αέρια φάση λίγα λεπτά μετά την κατανάλωσή τους, κατά το μηρυκασμό και την αποβολή αερίων ή στην απορρόφηση των συστατικών αυτών από το επιθήλιο της μεγάλης κοιλίας στην κυκλοφορία του αίματος. Ωστόσο, υποστήριξαν ότι κύριος λόγος για την σημαντική μείωση των 4 τερπενίων στην παραπάνω μελέτη ήταν η έντονη αποδόμησή τους ύστερα απ' την εκτεταμένη προσαρμογή των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας σε αυτά.

Επιπλέον οι McIntosh *et al.*, (2003) διερεύνησαν *in vitro* και σε αναερόβιες συνθήκες την επίδραση μίγματος αιθερίων ελαίων στους μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν από το υγρό της μεγάλης κοιλίας γαλακτοπαραγωγών αγελάδων. Διαπίστωσαν ότι όταν προστέθηκε ποσότητα 100 $\mu\text{g/ml}$ αιθερίων ελαίων σε καλλιέργεια βακτηρίων, το γένος *Streptococcus bovis* ήταν το πιο ανθεκτικό ενώ παρατηρήθηκε ότι τα είδη *Prevotella ruminicola* και *Prevotella bryantii* προσαρμόστηκαν στην παρουσία των τερπενίων. Αντίθετα από τα αποτελέσματα της ίδιας μελέτης τα πρωτόζωα δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη αιθερίων ελαίων

ενώ ο μύκητας *N. frontalis* φάνηκε ότι ανέστειλε τη δράση του σε συγκέντρωση 40 μg/ml. Ωστόσο, οι ερευνητές συμπέραναν ότι ο μεγαλύτερος αριθμός των μικροοργανισμών της MK δεν επηρεάστηκε στις συνθήκες του πειράματος που αναφέρθηκε.

4.2. Μεταβολισμός

Ένα αντικείμενο που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά στους δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες και ειδικότερα στα τερπένια και παραμένει, ειδικά για τα φυτοφάγα ζώα, αδιευκρίνιστο κατά το μεγαλύτερο τμήμα του, αποτελεί ο καταβολισμός των τερπενίων. Οι τοξικές ενώσεις που απορροφώνται από τον οργανισμό μεταβολίζονται στο ήπαρ για να σχηματίσουν σύμπλοκα που θα βοηθήσουν στην απέκκρισή τους (Caldwell, 1982).

Παρά την γενικότερη έλλειψη δεδομένων για το μεταβολισμό των τερπενίων εντός του ζωικού οργανισμού, είναι παραδεκτό σήμερα ότι ο μεταβολισμός των ουσιών αυτών σε επίπεδο ιστών χωρίζεται σε δύο φάσεις: την ενεργοποίηση (functionalization-Φάση I) και τη σύζευξη (conjugation- Φάση II). Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στη Φάση I σκοπό έχουν να εισάγουν ή να ελευθερώσουν μια χαρακτηριστική ομάδα όπως -OH, NH₂, -COOH. Οι περισσότερες αντιδράσεις σε αυτή τη φάση περιλαμβάνουν οξειδώσεις που καταλύονται από την ομάδα των ενζύμων P450, αλλά και υδρολύσεις που είναι εξίσου σημαντικές για πολλούς δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες όπως οι εστέρες, οι αμίνες ή οι γλυκοσίδες. Στη Φάση II λειτουργικές ομάδες των ξενοβιοτικών ή των μεταβολιτών τους, χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία συνδέσμων με ενδογενείς ενώσεις όπως το γλυκουρονικό οξύ, γλυκίνη ή η γλουταθειόνη. Το σύμπλοκο που προκύπτει είναι περισσότερο πολικό από ότι η πρόδρομη ουσία περιορίζοντας έτσι την επαναπορρόφηση από τους νεφρούς. Επιπλέον μπορεί να αποτελέσει ένα υπόστρωμα για την ενεργό μεταφορά τους μέσω των νεφρών ή της χοληφόρου οδού διαδικασία η οποία μπορεί να αυξήσει το βαθμό απέκκρισης των ουσιών αυτών από τον οργανισμό (Lee and Kim, 2004). Γενικά ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών δρα κυρίως στα λιπόφιλα συστατικά που μετατρέπονται σε περισσότερο πολικούς μεταβολίτες και έτσι απεκκρίνονται πιο άμεσα.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Pass *et al.*, (2001) αναφέρεται ότι η δυνατότητα των διαφόρων ζωικών οργανισμών να καταναλώνουν διαφορετικές ποσότητες τερπενίων (τα οποία σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν

τοξικώσεις) οφείλεται στο βαθμό εξέλιξης των συστημάτων αποτοξίνωσης του κάθε είδους. Για παράδειγμα τα κοάλα (*Phascolarctos cinereus*) στην Αυστραλία μπορούν να καταναλώσουν μεγάλες ποσότητες φύλλων ευκαλύπτου, που περιέχει πολλά τερπένια, χωρίς να παρουσιάσουν προβλήματα τοξικότητας. Επίσης οι Foley *et al.*, (1987) υποστήριξαν ότι ορισμένα μαρσιποφόρα στην Αυστραλία (*Petauroides volans* και *Trichosurus vulpecula*) είναι ικανά να αποφύγουν την τοξική επίδραση των τερπενίων, διότι ο μικροβιακός πληθυσμός στο παχύ έντερο προστατεύεται από τη δράση τους εξαιτίας της απορρόφησής τους από το στόμαχο και το λεπτό έντερο και της αποτοξίνωσής τους στο ήπαρ.

Ο ιδιαίτερα σημαντικός ρόλος του κυτοχρώματος P450 στην αποτοξίνωση των τερπενίων αναφέρεται και από τους Pass *et al.*, (2001) οι οποίοι διαπίστωσαν ότι τόσο η παρουσία του συστήματος των ενζύμων όσο και η ενεργότητά τους στο ήπαρ των κοάλα (*Phascolarctos cinereus*) αυξήθηκαν μετά την κατανάλωση σιτηρεσίου που περιείχε μίγμα τερπενίων. Το σύστημα του κυτοχρώματος P450 αποτελείται από ένζυμα ικανά να μεταβολίσουν ένα ευρύ φάσμα ενδογενών συστατικών και ξενοβιοτικών, χημικών ενώσεων δηλαδή που μπορεί να βρίσκονται στους ζωικούς ιστούς μετά την απορρόφησή τους από το περιβάλλον χωρίς να έχουν θρεπτική αξία (McLean and Duncan, 2006). Έτσι για παράδειγμα η οξειδωση του P450 δημιουργεί ενεργούς μεταβολίτες που συνδέονται με πρωτεΐνες και DNA έχοντας ως αποτέλεσμα κυτταροτοξικότητα και καρκινογενέσεις (Fu *et al.*, 2004). Ωστόσο, η αλλαγή της χημικής δομής των ξενοβιοτικών κατά το μεταβολισμό συνήθως μεταβάλλει και τη βιολογική δραστηριότητα του μορίου, αν και αυτό δεν έχει πάντα ως αποτέλεσμα την αποτοξίνωση διότι υπάρχουν παραδείγματα όπου ο μεταβολίτης παραμένει ενεργός (Zhou *et al.*, 2004). Παρόλα αυτά οι περισσότερες πληροφορίες που είναι διαθέσιμες για αυτή τη μεγάλη οικογένεια των ενζύμων στα θηλαστικά προέρχονται κυρίως από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ανθρώπους και ποντίκια ενώ κατά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση δεν βρέθηκαν αναφορές για τα μηρυκαστικά.

Επιπλέον θα πρέπει να επισημανθεί ότι είναι δυνατό η έκθεση των μηρυκαστικών μέσω της διατροφής σε δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες να οδηγεί σε αντίστοιχη προσαρμογή του μικροβιακού πληθυσμού της μεγάλης κοιλίας (McLean and Duncan 2006). Το παραπάνω γεγονός μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές αλλαγές στο ρυθμό του μεταβολισμού τους στη μεγάλη κοιλία και κατά συνέπεια στην ποσότητα που είναι διαθέσιμη στο κατώτερο πεπτικό και μπορεί να απορροφηθεί από το ζωϊκό οργανισμό. Για παράδειγμα η έκθεση των μηρυκαστικών

για ορισμένες ημέρες σε οξαλικά άλατα στο σιτηρέσιό τους οδηγεί στον πολλαπλασιασμό του *Oxalobacter formigenes*, ενός βακτηρίου ικανού να αποδομεί τα οξαλικά άλατα (Allison *et al.*, 1985). Τα ζώα που έχουν προσαρμοστεί στην κατανάλωση αυτών των ενώσεων μπορούν να ρυθμίσουν ανάλογα την κατανάλωσή τους, ενώ ο ρυθμός αποδόμησης των ενώσεων αυτών στη μεγάλη κοιλία αυξάνεται με την αύξηση στην έκθεση των ζώων σε αυτά τα συστατικά (Duncan *et al.*, 1997).

Αυτό που θα πρέπει ωστόσο να αναφερθεί είναι ότι για τα περισσότερα είδη ζώων οι συγκεντρώσεις πάνω από τις οποίες ενεργοποιείται ο μηχανισμός της αποτοξίνωσης καθώς επίσης και το χρονικό διάστημα πέρα από το οποίο οι ζωικοί οργανισμοί αρχίζουν να παρουσιάζουν αρνητικές συνέπειες της τοξίκωσης δεν έχουν ακόμα προσδιοριστεί. Οι Boyle *et al.*, (1999) απέδωσαν αυτό το γεγονός στο ότι ο αρχικός στόχος των επιστημόνων ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός βασικών μεταβολιτών και έτσι δεν δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι τα φυτοφάγα ζώα, έχουν την ικανότητά να επιλέγουν και να ρυθμίζουν την ποσότητα των ξενοβιοτικών που καταναλώνουν καθώς και να προσαρμόζουν τη μικροχλωρίδα της μεγάλης κοιλίας, στην κατανάλωση αυτών των συστατικών. Μπορούν έτσι να εντάσσουν στο σιτηρέσιό τους τροφές που περιέχουν μόρια όπως τα τερπένια, ειδικά σε περιόδους που η ανεύρεση τροφής στις βοσκές είναι περιορισμένη χωρίς αυτό να δρα αρνητικά στην υγεία και την παραγωγικότητά τους (Dziba *et al.*, 2006).

5. Τερπένια και κτηνοτροφικά προϊόντα

5.1 Αναγνωρισιμότητα των ζωικών προϊόντων

Τα συστήματα κτηνοτροφικής παραγωγής ποικίλουν από εντατικά, τα οποία δεν περιλαμβάνουν καθόλου βόσκηση, μέχρι εκτατικά τα οποία χρησιμοποιούν βοσκότοπους ακόμη και σε ορεινές περιοχές. Ειδικότερα η αιγοπροβατοτροφία στην Ελλάδα είναι ο κλάδος που χρησιμοποιεί τους βοσκοτόπους και αφορά αδρά την εκτροφή περίπου 10 εκατομμυρίων προβάτων και 5 εκατομμυρίων αιγών (Eurostat, 2007). Τόσο τα πρόβατα όσο και οι αίγες ανήκουν σε φυλές μικτών αποδόσεων και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γάλακτος και κρέατος. Η πλειονότητα των ζώων ανήκει σε τοπικές φυλές που προσαρμόζονται εύκολα στις δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες εκτροφής τους, οι οποίες έχουν υποστεί βελτίωση με σκοπό την αύξηση των αποδόσεων (Hadjigeorgiou et al., 2002). Όσον αφορά στο γάλα αυτό κατά το μεγαλύτερο ποσοστό του χρησιμοποιείται για την παρασκευή τυριών και άλλων προϊόντων (όπως το γιαούρτι) (Anifantakis and Kalatzopoulos, 1984; Pappa *et al.*, 2006; Zygoiannis, 2006).

Σε όλα τα παραγωγικά συστήματα, παρά τις επιμέρους διαφορές που πιθανόν παρουσιάζουν τα εκτρεφόμενα είδη, είναι ιδιαίτερα σημαντικό από οικονομική άποψη να μεγιστοποιηθεί η αναλογία βοσκήσιμης ύλης στο σιτηρέσιο των ζώων για να μειωθεί το κόστος της διατροφής. Επιπλέον, καθώς το καταναλωτικό κοινό ενδιαφέρεται περισσότερο για την προέλευση των ζωικών προϊόντων και η σύνδεσή τους με τη βόσκηση καθησυχάζει ως προς τους κινδύνους από τις πρόσφατες κρίσεις, η γνώση των καταναλωτών σχετικά με τον τρόπο εκτροφής των ζώων αποτελεί σημαντικό παράγοντα επιλογής προϊόντων που προέρχονται από ζώα που έχουν διατραφεί στη βοσκή.

Τα περισσότερα από τα συστήματα πιστοποίησης της ονομασίας των προϊόντων χρησιμοποιούν επιτόπιους και διοικητικούς ελέγχους για την επιβεβαίωση της αυθεντικότητας των προϊόντων. Η εργαστηριακή επιβεβαίωση της προέλευσης των προϊόντων αποτελεί όμως την ισχυρότερη απόδειξη της ποιότητάς των. Η ανάγκη αυτή οδήγησε στην αναζήτηση ουσιών, όπως τα τερπένια, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αναγνωρισιμότητας στα ζωικά προϊόντα. Ωστόσο η έλλειψη στοιχείων για την επάρκειά τους ως βιοδείκτες και για τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των σε βιολογικά υγρά και γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς και η έλλειψη δεδομένων σχετικά με το μεταβολισμό των ουσιών αυτών στο

ζωικό οργανισμό και ειδικότερα στη μεγάλη κοιλία, οδήγησε στο σχεδιασμό της παρούσας μελέτης.

5.2. Κρέας και Γαλακτοκομικά προϊόντα

Η μελέτη της σχέσης ανάμεσα στα ποιοτικά χαρακτηριστικά της βοσκής (πρώτη ύλη) και εκείνα του παραγόμενου προϊόντος, αντιπροσωπεύει μια σχετικά νέα προσέγγιση στη έρευνα για τα ζωικά προϊόντα (Mariaca *et al.*, 1997) Ειδικότερα, οι μελέτες που διερευνούν τη σχέση κατανάλωσης τερπενίων με ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά της παραγωγής είναι σχετικά λίγες (Πίνακας 4). Σε ότι αφορά στο κρέας οι Priolo *et al.*, (2004) βρήκαν, ότι το **β-καρνοφυλλένιο** που προσδιορίστηκε στο περινεφρικό λίπος αρνιών μπορούσε να αποτελέσει στοιχείο για τη διάκριση μεταξύ των σφάγιων των ζώων που έχουν διατραφεί στη βοσκή και αυτών που έχουν λάβει σιτηρέσιο αποτελούμενο κυρίως από δημητριακούς καρπούς. Το γεγονός αυτό τεκμηριώνεται και από άλλους ερευνητές (Young *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 2011) οι οποίοι προσδιόρισαν υψηλά ποσοστά τερπενίων στο λίπος των ζώων που διατρέφονταν στη βοσκή.

Οι Priolo *et al.*, (2003) ήταν σε θέση να διακρίνουν το κρέας από δύο διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Γαλλίας αξιολογώντας την παρουσία β-πινενίου στο λιπώδη ιστό των βοοειδών. Επιπλέον, οι Larick *et al.*, (1987) και Moio *et al.*, (1996) αναφέρουν ότι ορισμένα μονο- και σεσκιτερπένια μπορούν να μεταφερθούν αυτούσια από τη φυτική ύλη στο κρέας και στα γαλακτοκομικά προϊόντα και έχουν προταθεί ως βιοδείκτες των ζωικών προϊόντων που προέρχονται από ζώα που βρίσκονταν στη βοσκή (Mariaca *et al.*, 2001; Prache *et al.*, 2003).

Οι Cornu *et al.*, (2001), αναφέρουν ότι τα σεσκιτερπένια α-φελλανδρένιο, **β-καρνοφυλλένιο**, γ-τερπινένιο, είναι τα κύρια συστατικά ανάμεσα σε άλλα τερπένια που προσδιορίστηκαν σε δείγματα φυτών που προέρχονταν από βοσκοτόπους και ανιχνεύτηκαν στα παραγόμενα ζωικά προϊόντα (Cornu *et al.*, 2001). Έτσι, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το πείραμα των Mariaca *et al.*, (2001), οι Priolo *et al.*, (2004) και οι Cornu *et al.*, (2001) πρότειναν να χρησιμοποιηθεί το β-καρνοφυλλένιο ως βιοδείκτης των συστημάτων εκτροφής που βασίζονται στη βοσκή.

Παρόλα αυτά δεν συνδέονται όλα τα τερπένια που ανιχνεύονται στο λιπώδη ιστό των μηρυκαστικών με τη διατροφή στη βοσκή. Για παράδειγμα, το β-γουργενένιο βρέθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο λιπώδη ιστό σταβλισμένων

αμνών σε σύγκριση με αμνούς που βρίσκονταν στη βοσκή (Priolo *et al.*, 2004). Επίσης, το **λεμονένιο** προσδιορίστηκε σε υψηλά ποσοστά στο λιπώδη ιστό αμνών που λάμβαναν σιτηρέσιο πλούσιο σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές και σε βοοειδή στα οποία διατρέφονταν με ενσίρωμα σε σύγκριση με τα ζώα που βρίσκονταν στη βοσκή.

Σε ότι αφορά στα γαλακτοκομικά προϊόντα, οι Fernandez *et al.*, (2003) βρήκαν ότι το γάλα που προέρχεται από ορεινές περιοχές, που όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι πλουσιότερες σε τερπένια, ήταν πιο πλούσιο σε σεσκιτερπένια από ότι αυτό που προέρχεται από πεδινές περιοχές. Επιπλέον, οι Martin *et al.*, (2005) έδειξαν ότι το γάλα που προέρχεται από αγελάδες που έβοσκαν, περιείχε υψηλότερη συγκέντρωση και ευρύτερη ποικιλία τερπενίων από ότι το γάλα που προέρχονταν από ζώα που κατανάλωναν συμπυκνωμένες ζωοτροφές. Οι Abilleirra *et al.*, (2010) ενισχύοντας το παραπάνω συμπέρασμα προσδιόρισαν την αλλαγή στη συγκέντρωση των τερπενίων στο γάλα προβατινών κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου όπως αυτή επηρεάζεται από το διαφορετικό τρόπο της διατροφής. Το σιτηρέσιο αυτών των προβατινών κατά τη διάρκεια του χειμώνα αποτελούνταν από ενσίρωμα μηδικής και μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών, την άνοιξη (Μάρτιο – Απρίλιο) από βοσκή και μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών, ενώ από το Μάιο τα ζώα διατρέφονταν αποκλειστικά στη βοσκή. Τα μονοτερπένια, **α-πινένιο**, β-πινένιο, **λεμονένιο**, β-φελλανδρένιο, ανιχνεύτηκαν σε όλα τα δείγματα γάλακτος καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, σε μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις στα δείγματα γάλακτος που ελήφθησαν κατά το χρονικό διάστημα που τα ζώα διατρέφονταν αποκλειστικά στη βοσκή. Ωστόσο τα σεσκιτερπένια, **β-καρυοφυλλένιο**, α-χουμουλένιο, α-κουμπεμπένιο, ανιχνεύτηκαν μόνο στα δείγματα γάλακτος των ζώων που διατρέφονταν σε βοσκότοπους με μεγαλύτερη βιοποικιλότητα φυτικών ειδών. Έτσι οι παραπάνω ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το β-καρυοφυλλένιο, το οποίο προσδιορίστηκε και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο γάλα σε σχέση με τα άλλα δύο σεσκιτερπένια, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πιθανό βιοδείκτη σε ότι αφορά στο γάλα των ζώων που προέρχεται από τη βοσκή.

Ωστόσο όχι μόνο το γάλα αλλά και το τυρί που παράγεται από φυσικές βοσκές με μεγάλη ποικιλομορφία φυτικής ύλης, φαίνεται να διαφέρει σημαντικά, όσον αφορά στο προφίλ των τερπενίων, από τα αντίστοιχα προϊόντα που προέρχονται από εκτάσεις τεχνητών λειμώνων όπου η ποικιλομορφία των ειδών είναι περιορισμένη. Οι Dumont and Adda (1978) βρήκαν σεσκιτερπένια μόνο στο τυρί Beaufort που παρασκευάζεται από γάλα που παράγεται το καλοκαίρι όταν οι

αγελάδες έβοσκαν σε ορεινές βοσκές. Οι Imhof *et al.*, (1994) επιβεβαίωσαν αυτά τα αποτελέσματα ανιχνεύοντας μια σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση τερπενίων σε τυριά που προέρχονταν από ορεινούς βοσκότοπους σε σύγκριση με αυτά που προέρχονταν από πεδινές βοσκές. Οι Cornu *et al.*, (2005) που προσδιόρισαν το προφίλ των τερπενίων σε διαφορετικά είδη τυριού που παρασκευάστηκαν από το ίδιο γάλα είτε παστεριωμένο είτε όχι, βρήκαν ότι τα τερπένια που ανιχνεύονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα διαφορετικά είδη τυριού τόσο στο παστεριωμένο όσο και στο μη παστεριωμένο γάλα ήταν τα: **α-πινένιο**, **λεμονένιο** και **β-καρνοφυλλένιο**. Οι μικρές διαφορές ωστόσο που εντοπίζονται στο συνολικό προφίλ των τερπενίων μπορούν πιθανόν να αποδοθούν στην παστερίωση. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επηρεάζει άμεσα το προφίλ των τερπενίων μέσω της θερμικής κατεργασίας ή έμμεσα μέσω του περιορισμού της δράσης της ενδογενούς μικροχλωρίδας. (Cornu *et al.*, 2005). Οι Coulon *et al.*, (2005) συμπεραίνουν ότι αφού οι διαφορές στο προφίλ των τερπενίων είναι πολύ μικρές ανάμεσα στο παστεριωμένο και στο μη παστεριωμένο γάλα οι αντίστοιχες διαφορές που εντοπίζονται σε διάφορα τυριά οφείλονται στη διαφορετική μικροχλωρίδα του μη παστεριωμένου γάλακτος.

Σε ενίσχυση του ευρήματος αυτού έρχονται και τα συμπεράσματα από τους Buchin *et al.*, (1999) οι οποίοι βρήκαν διαφορετική γεύση σε τυρί που προερχόταν από ορεινό βοσκότοπο σε σύγκριση με αυτό που προήλθε από πεδινή βοσκή. Το παραπάνω γεγονός επιβεβαιώνεται και από τους Dumont και Adda (1978) οι οποίοι σύγκριναν τη γεύση των τυριών Beaufort και Gruyere που προέρχονταν από δύο διαφορετικές περιοχές της Γαλλίας και τη συνέδεσαν τις διαφορές που εντόπισαν με τις αρωματικές ιδιότητες των φυτών που καταναλώνουν οι αγελάδες.

Ενισχύοντας την παραπάνω άποψη, ο Berodier (1997) έδειξε ότι η βοτανική σύνθεση της βλάστησης μπορεί να συνδεθεί με το διαφορετικό άρωμα που παρατηρείται σε διαφορετικά είδη τυριού. Διαφορές στο άρωμα βρέθηκαν ακόμη ανάμεσα σε τυριά που παρασκευάστηκαν από γάλα που προέρχεται από διαφορετικές περιοχές της ίδιας εκμετάλλευσης Έχει παρατηρηθεί, επίσης, ότι τυριά πλούσια σε τερπένια είχαν πιο έντονη γεύση, ήταν πιο πικάντικα, είχαν μεγαλύτερη ελαστικότητα και τα χαρακτηριστικά αυτά αποδόθηκαν στην κατανάλωση των τερπενίων μέσω της βόσκησης (Martin *et al.*, 2005). Αυτή η έμμεση συσχέτιση των τερπενίων με τα χαρακτηριστικά του τυριού πιστοποιήθηκε σε μελέτη (Martin *et al.*, 2002) σύμφωνα με την οποία το τυρί που παρασκευάστηκε από το γάλα που είχε τερπένια είχε διαφορετικές οργανοληπτικές ιδιότητες σε σχέση με το τυρί της ομάδας του μάρτυρα.

Οι Coulon και Priolo (2002), συμπέραναν ότι το τυρί παρουσιάζει διαφορές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, που συνδέονται τόσο με διαφορετικούς τύπους χορτονομής (σανός ή βοσκή) όσο και με διαφορετικές πρακτικές διαχείρισης του ίδιου κοπαδιού.

Πίνακας 4. Μελέτες ζωικής παραγωγής που διερευνούν τη σχέση κατανάλωσης τερπενίων με ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά της παραγωγής

Συγγραφέας	Τερπένιο	Είδος ζώου	Αντικείμενο μελέτης
Addis <i>et al.</i> , 2006	α-πινένιο , καμφένιο	Πρόβατα	Προσθήκη του φυτού <i>Chrysanthemum coronarium</i> στο σιτηρέσιο βόσκοντων προβάτων και αξιολόγηση της επίδρασης του στα πτητικά συστατικά του γάλακτος και του τυριού
Moio <i>et al.</i> , 1996	Σεσκιτερπένια	Αγελάδες	Επίδραση των διαφορετικών σιτηρεσίων στα χαρακτηριστικά του βόειου γάλατος και κρέατος
Estell <i>et al.</i> , 2000	1,8-κινεόλη, δ ₃ -καρένιο, π-κυμένιο, σαμπινένιο	Αρνιά	Επίδραση 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων τερπενίων στην κατανάλωση μηδικής
Fedele <i>et al.</i> , 2005	Τερπένια ολικό προφίλ	Αίγες	Χαρακτηρισμός του προφίλ των τερπενίων του γάλακτος και του τυριού που προέρχεται από γαλακτοπαραγωγές αίγες σε τρεις διαφορετικές εποχές του έτους
Priolo <i>et al.</i> , 2004	α-πινένιο , σαμπινένιο β-πινένιο, α-τερπινένιο π-κυμένιο, λεμονένιο β-καρνοφυλλένιο	Αρνιά	Προσδιορισμός των πτητικών ουσιών στο υποδόριο λίπος αρνιών που: 1) έβοσκαν 2) λάμβαναν συμπυκνωμένες ζωοτροφές 3) έβοσκαν και στο τελικό στάδιο της πάχυνσης λάμβαναν συμπυκνωμένες ζωοτροφές
Buchin <i>et al.</i> , 1999	α-πινένιο , β-μυρσένιο β-πινένιο, καμφένιο α-τερπινολένιο	Αγελάδες	Προσδιορισμός της επίδρασης της σύνθεσης της φυτικής ύλης της βοσκής στα χαρακτηριστικά του παραγόμενου τυριού κατά τη διάρκεια 3 διαφορετικών περιόδων του έτους.
Fernandez <i>et al.</i> , 2003	α-πινένιο, λεμονένιο δ ₃ -καρένιο, π-κυμένιο β-καρνοφυλλένιο	Αίγες	Αξιολόγηση κατά τη διάρκεια 3 διαφορετικών χρονικών περιόδων της επίδρασης των φυτών <i>Lolium perenne</i> (56.8% λεμονένιο), <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Geranium molle</i> , <i>Asperula odorosa</i> , <i>Cichorium intybus</i> και <i>Galium verum</i> στη συγκέντρωση και το προφίλ των τερπενίων του γάλακτος
Estell <i>et al.</i> , 2002	καμφένιο, Μυρσένιο Οξείδιο του καρνοφυλλενίου β-πινένιο	Αρνιά	Επίδραση των τερπενίων στην κατανάλωση συμπηκτων μηδικής από αμνούς
Favaro <i>et al.</i> , 2005	α-πινένιο , β-πινένιο καμφένιο, β-μυρσένιο α-φελλανδένιο, δ ₃ -καρένιο α-τερπινένιο, γ-τερπινένιο μ-κυμένιο, π-κυμένιο λεμονένιο , τερπινεόλη β-καρνοφυλλένιο		Αναγνωριστικότητα τερπενίων σε τυρί Asiago με χρήση της μεθόδου SPME

Η διαφοροποίηση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού γενικότερα εκτιμάται ότι εξαρτάται από μια σειρά από διαφορετικούς μηχανισμούς όπως: 1) μεταφορά συστατικών της τροφής στο γάλα και το τυρί, χωρίς τροποποιήσεις, 2) αλλαγή στην περιεκτικότητα του τυριού σε λίπος και πρωτεΐνες η οποία πιθανόν να οφείλεται στην ποιότητα του γάλακτος που χρησιμοποιείται (π.χ. υψηλή υγρασία που επηρεάζει το χρόνο πήξης, ο γονότυπος της καζεΐνης του ζώου που επηρεάζει την υφή του παραγόμενου προϊόντος) 3) μεταφορά στο τυρί από το γάλα ή το αίμα των ενδογενών ενζύμων όπως οι πρωτεάσες και κυρίως η πλασμίνη (ένα ενδογενές ένζυμο από το αίμα το οποίο είναι ανθεκτικό στη θερμική κατεργασία) που τροποποιούν την διαδικασία της πρωτεόλυσης και/ή της λιπόλυσης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και 4) τροποποιήσεις στο μικροβιακό οικοσύστημα του τυριού (σύσταση, δυναμική και δραστηριότητα) που οφείλονται στο διαφορετικό σιτηρέσιο που καταναλώνουν τα ζώα (Coulon *et al.*, 2004).

5.3 Τερπένια και υγεία

Τα τερπένια αποτελούν, όπως έχει ήδη αναφερθεί, συστατικά λειτουργικών τροφίμων έχοντας δώσει δείγματα θετικής επίδρασης στη διατήρηση της καλής υγείας του ανθρώπου καθώς και στην πρόληψη ασθενειών (Dillard and German, 2000). Για παράδειγμα, σε επιδημιολογική μελέτη που έγινε σε κατοίκους του Μεξικό (οι οποίοι χρησιμοποιούσαν φυτά που περιείχαν τερπένια) για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II με ή χωρίς συνδυασμό με φάρμακα που χορηγούνται από την κλασσική ιατρική για την θεραπεία της πάθησης, διαπιστώθηκε σημαντική βελτίωση στον έλεγχο της νόσου (Andrade – Cetto and Heinrich, 2005). Επιπλέον εξαιτίας και της αντιμικροβιακής τους δράσης φαίνεται ότι μπορούν να προασπίσουν την υγεία του ανθρώπου. Έχει βρεθεί ότι όταν εφαρμόστηκαν συγκεντρώσεις 1% v/v, 2% v/v και 4% v/v τερπενίων σε παθογόνα στελέχη όπως: *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* και *Salmonella typhimurium* που απομονώθηκαν από ορνίθια κρεοπαραγωγής και παχυνόμενα χοιρίδια παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων στελεχών σε όλες τις συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν (Penalver *et al.*, 2005). Σήμερα τα σκευάσματα με αιθέρια έλαια προωθούνται στην αγορά ως αντιμικροβιακοί παράγοντες για την αντικατάσταση των αντιβιοτικών στη ζωική παραγωγή. Σε πρόσφατη έρευνα στην οποία αξιολογήθηκε η επίδραση της διαιτητικής προσθήκης αιθερίων ελαίων στη μικροχλωρίδα του εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής επιβεβαιώθηκαν οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες και η θετική τους

επίδραση στην μικροχλωρίδα του εντέρου καθώς και στο ρυθμό ανάπτυξης των πτηνών (Mountzouris *et al.*, 2011).

Εκτός από την αντιμικροβιακή τους δράση ωστόσο φαίνεται ότι ειδικά τα μονοτερπένια παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση. Έχει βρεθεί από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια ότι έχουν χημειοθεραπευτική δράση ενάντια σε διάφορες μορφές καρκίνου όπως του πνεύμονα και του στομάχου (Crowell, 1997). Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί ότι το μονοτερπένιο περιλλυλ-αλκοόλη φαίνεται ότι προκαλεί μείωση των καρκινικών κυττάρων του παχέως εντέρου και του ήπατος των ποντικών (Bardon *et al.*, 2002), ενώ η γερανιόλη μειώνει σημαντικά τον αριθμό των καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια που έπασχαν από λευχαιμία (Crowell, 1999). Ένα ακόμη μονοτερπένιο που χορηγήθηκε σε τρωκτικά που έπασχαν από καρκίνο του παγκρέατος σε συνδυασμό με την περιλλυλ-αλκοόλη και είχε σημαντικά θετικά αποτελέσματα στην μείωση του αριθμού των καρκινικών κυττάρων, είναι το λεμονένιο. Βρέθηκε ότι ποσότητα 1400 mg/kg ΣΒ είχε θετικά αποτελέσματα στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (Crowell, 1999).

Σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχουν τα **τερπένια** και στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Η Crowell (1997) διαπίστωσε ότι τα μονοτερπένια έχουν τόσο προστατευτική όσο και θεραπευτική δράση έναντι του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Σε πείραμα που πραγματοποίησε σε ποντίκια που έπασχαν από καρκίνο του μαστού παρατήρησε ότι δόση 65 mg/kg ΣΒ λεμονενίου είχε χημειοθεραπευτική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους είναι άγνωστος, έχει βρεθεί όμως ότι προκαλούν την έκφραση των παραγόντων αποτοξίνωσης, IGF-II και TGF- β καθώς και απόπτωση. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται κατά το αρχικό στάδιο της Φάσης I και της Φάσης II του ενζυμικού μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας ουσιαστικά αποτοξίνωση ή καταστροφή των κυττάρων αυτών (Crowell, 1999).

Έτσι, η παρουσία τερπενίων μπορεί να αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά στη διατροφή του ανθρώπου, διότι φαίνεται από τα παραπάνω ότι επηρεάζει θετικά την υγεία. Παρόλο που τα στοιχεία προς την κατεύθυνση αυτή είναι περιορισμένα, η παρουσία των ουσιών αυτών στους ιστούς είναι πιθανό να παρέχει προστασία έναντι ασθενειών που συνδέονται με χρόνιες παθήσεις, όπως ο διαβήτης (Dillard and German 2000). Έτσι σε συνδυασμό με τις θεραπευτικές ιδιότητές τους έναντι του καρκίνου μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πρόκληση για την αύξηση της πρόσληψης αυτών των μορίων από τον άνθρωπο μέσω της διατροφής του.

5.4 Τερπένια και κυτταροτοξικότητα

Όπως προαναφέρθηκε τα τερπένια αποτελούν μέρος της άμυνας των φυτών έναντι των φυτοφάγων ζώων (Dudareva *et al.*, 2004), αφού αποτελούν “τοξικές ενώσεις” για τους ζωικούς οργανισμούς, ειδικά όταν καταναλωθούν σε μεγάλες ποσότητες (Johnson *et al.*, 1976). Πολλά από τα κλινικά συμπτώματα που προκαλούν τα τερπένια δεν παρουσιάζονται στα φυτοφάγα ζώα, καθώς αυτά ρυθμίζουν την κατανάλωσή τους κάτω από τα επίπεδα που τα τερπένια θα μπορούσαν να τους προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία τους (Dziba and Provenza, 2008; Dziba *et al.*, 2006; Torregrossa and Dearing, 2009; Estell, 2010). Ειδικά τα μηρυκαστικά προτιμούν να μειώσουν την κατανάλωση της τροφής που περιέχει τερπένια και τους προκαλεί τοξικότητα, εξαιτίας της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης που προκαλείται από το πεπτικό, κατά τη διαδικασία της πέψης φυτικών ιστών με τερπένια (Provenza, 1995; Torregrossa and Dearing, 2009).

Πιθανοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται μετά την απορρόφηση των ουσιών αυτών είναι η εκδήλωση τοξικότητας (Johnson *et al.*, 1976), η μείωση της μικροβιακής δραστηριότητας στη μεγάλη κοιλία και η διαταραχή της οξεοβασικής ισορροπίας στον οργανισμό (Foley *et al.*, 1995; Illius and Jessop, 1997).

Ενώσεις, όπως τα τερπένια, που είναι άφθονες στη φυτική ύλη έχει βρεθεί ότι μπορούν να επηρεάζουν ενδοκυτταρικές διεργασίες που συνδέονται με την απόπτωση (Pan *et al.*, 2008). Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η χαμοδρυά (Germander - *Teucrium chamaedrys*), τα διτερπένια της οποίας προκάλεσαν απόπτωση σε ηπατικά κύτταρα ποντικών σε χρονικό διάστημα 2 ωρών (Fau *et al.*, 1997). Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ένας ρυθμιζόμενος δηλαδή μηχανισμός ικανός να ελέγξει την ύπαρξη των ανεπιθύμητων ή επιζήμιων κυττάρων για τον οργανισμό.

Η απόπτωση που προκαλούν ουσίες όπως τα τερπένια προσδιορίζεται με *in vitro* δοκιμές των υπό μελέτη ουσιών σε κυτταρικές σειρές. Έτσι προσδιορίζεται η τοξική δόση πάνω από την οποία σταματά ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Η κυτταρική σειρά αναφοράς για τον προσδιορισμό αυτό είναι η συνεχής κυτταρική σειρά νεφρού κονίκλου (Rabbit kidney) RK13. Ως κυτταροτοξικότητα ορίζεται η δυνατότητα μιας ουσίας να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο (Eisenbrand *et al.*, 2002). Τα περισσότερα πειράματα που μελετούν την κυτταροτοξικότητα *in vitro* μετρούν τον αριθμό των νεκρών κυττάρων. Η *in vitro* τοξικότητα είναι σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό για παράδειγμα της δυνατότητας μιας ουσίας να προκαλέσει

κυτταρικό θάνατο, ως συνέπεια βλάβης, σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Επιπλέον, προσδιορίζεται το εύρος των συγκεντρώσεων για περαιτέρω, πιο λεπτομερείς *in vitro* δοκιμές, που μπορούν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για παραμέτρους όπως η πιθανή τοξικότητα επί των γονιδίων, η έναρξη μεταλλάξεων ή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Με τον προσδιορισμό της δόσης στην οποία το 50% των κυττάρων προσβάλλονται (TC₅₀) είναι δυνατή η ποσοτική σύγκριση μιας ουσίας σε διαφορετικά συστήματα ή πολλών ουσιών σε ένα σύστημα (Eisenbrand *et al.*, 2002).

Όσον αφορά στα μονο- και σεσκιτερπένια, έχει μελετηθεί σε ιδιαίτερα περιορισμένη κλίμακα το είδος των ουσιών και ο βαθμός της βλάβης που προκαλούν στα κύτταρα. Οι πιο κοινές κυτταρικές βλάβες που παρουσιάζονται στις δοκιμές τοξικότητας είναι η αναστολή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, η μείωση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων (Werner *et al.*, 1999), οι αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων και οι αλλαγές στον πολλαπλασιασμό τους (North-Root *et al.*, 1982).

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση ορισμένων φυτικών ενώσεων και πιο συγκεκριμένα των τερπενίων, ως προς τη δυνατότητα χρήσης τους στην αναγνωρισιμότητα των ζωικών προϊόντων. Για το λόγο αυτό ένα μίγμα τριών τερπενίων χορηγήθηκε από το στόμα σε ζώα. Τα τερπένια επιλέχθηκαν με κριτήρια τη διαφορετική χημική τους δομή και την συχνότητα ανίχνευσής τους στη φυτική ύλη και ήταν το δικυκλικό μονοτερπένιο α-πινένιο, το μονοκυκλικό μονοτερπένιο λεμονένιο και το σεσκιτερπένιο β-καρνοφυλλένιο.

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί:

- η δυνατότητα ανίχνευσης των τερπενίων στο αίμα, το γάλα και το τυρί αιγών και προβάτων.
- η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των συγκεντρώσεων των συγκεντρώσεων των τερπενίων στο αίμα, το γάλα και το τυρί και η σύγκριση των συγκεντρώσεών τους στα παραπάνω βιολογικά υλικά σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση που χορηγήθηκε στα ζώα.
- η επίδραση των τερπενίων στη γαλακτοπαραγωγή και στα χημικά χαρακτηριστικά και τα λιπαρά οξέα του γάλακτος αιγών και προβάτων.
- η επίδραση των τερπενίων στα χημικά χαρακτηριστικά και τη σύνθεση των λιπαρών οξέων του τυριού που παρασκευάστηκε από γάλα αιγών και προβάτων που είχαν καταναλώσει τερπένια.

Επιπλέον, ύστερα από την εξαγωγή των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων πειραμάτων η έρευνα στράφηκε στην αξιολόγηση:

- της ικανότητας του υγρού της μεγάλης κοιλίας να αποδομεί τα τερπένια *in vitro*
- της πιθανότητας ο βαθμός αποδόμησης των τερπενίων να επηρεάζεται από την προηγούμενη προσαρμογή ή όχι του μικροβιακού πληθυσμού της μεγάλης κοιλίας σε αυτά.

Τέλος, διερευνήθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των τερπενίων:

- με τη χρήση των τερπενίων α-πινένιο, λεμονένιο και β-καρνοφυλλένιο σε *in vitro* δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων επί της συνεχούς κυτταρικής σειράς RK-13, η οποία αποτελεί κυτταρική σειρά αναφοράς για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας.

2. Πείραμα 1ο και 2ο

2.2. Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1. Αίγες και Πρόβατα

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην πειραματική εγκατάσταση του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκαν οκτώ ενήλικες υγιείς αίγες (Z.B. 55 kg, s.d. 6,4 kg) (διασταύρωση ντόπιας φυλής × Alpine) και οκτώ ενήλικες υγιείς προβατίνες (Z.B. 69 kg, s.d. 6.4 kg) (διασταύρωση ντόπιας φυλής) στο τελευταίο τρίμηνο της γαλακτικής περιόδου. Τα ζώα βρίσκονταν σε ενιαίο υπαίθριο χώρο, ελεύθερο από τις τρεις πλευρές, όπου εν μέρει καλύπτονταν με στέγαστρο, ο οποίος ήταν κατάλληλα διαμορφωμένος ώστε να πληροί τις προδιαγραφές σε ότι αφορά την υγεία και την ευζωία των ζώων. Το πείραμα διήρκεσε 20 ημέρες και τα ζώα διατρέφονταν ομαδικά και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Το σιτηρέσιο που χρησιμοποιήθηκε για τις αίγες αποτελούνταν από μηδική (8 kg/ημέρα) και άχυρο (2 kg/ημέρα) καθώς και εμπορικό μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (8 kg/ημέρα). Το σιτηρέσιο που χρησιμοποιήθηκε για τα πρόβατα αποτελούνταν από μηδική (10 kg/ημέρα) και άχυρο (2 kg/ημέρα) καθώς και εμπορικό μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (8 kg/ημέρα). Το μίγμα των συμπυκνωμένων ζωοτροφών είχε, σε βάση ΞΟ, την παρακάτω σύσταση: 10% πρωτεΐνη; 4% ινώδεις ουσίες; 1,2 % Ca; 0,9 % P, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Το σιτηρέσιο είχε καταρτιστεί και στα δύο πειράματα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτει τις ανάγκες συντήρησης των ζώων καθώς και τις ανάγκες γαλακτοπαραγωγής τους.

Τόσο οι αίγες όσο και τα πρόβατα χωρίστηκαν σε δύο ισοδύναμες ομάδες - την ομάδα του μάρτυρα (C) και την ομάδα της επέμβασης (T) - με βάση το σωματικό τους βάρος, και την γαλακτοπαραγωγή τους η οποία ήταν κατά μέσο όρο 1,2 kg/ημέρα και 0,70 kg/ημέρα αντίστοιχα. Στα ζώα της ομάδας της επέμβασης χορηγήθηκε από το στόμα μίγμα από τα εξής τερπένια: α-πινένιο, λεμονένιο, β-καρνοφυλλένιο (Sigmaaldrich: No.2320878 USA, No.2278135 Switzerland, No.2017461 Spain) με καθαρότητα 98,5 %. Τα τρία τερπένια χορηγήθηκαν σε μίγμα με φυτικό έλαιο (σογιέλαιο) ως φορέα, που είχε παρασκευαστεί ώστε να παρέχει την ποσότητα του 1g από το κάθε τερπένιο σε συνολικό όγκο 10 ml μίγματος. Η προκαθορισμένη ποσότητα (10 ml) του μίγματος χορηγούνταν από το στόμα, με ειδική δοσιμετρική συσκευή, κάθε πρωί (09:00) πριν από τη λήψη της τροφής στα

ζώα της ομάδας της επέμβασης για χρονικό διάστημα 18 ημερών, ενώ στα ζώα της ομάδας του μάρτυρα χορηγούνταν αντίστοιχα ίση ποσότητα φυτικού ελαίου (10 ml) χωρίς προσθήκη τερπενίων. Η συνολική ημερήσια ποσότητα των τερπενίων που χορηγούνταν στα ζώα ήταν 42 mg/kg ΣΒ. Κατά τη διάρκεια του πειράματος δείγμα του μίγματος του φυτικού ελαίου και των τερπενίων αναλύονταν για να πιστοποιηθεί ότι δεν υπήρχαν μεταβολές στη συγκέντρωση των τερπενίων που χορηγούνταν στα ζώα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Δείγματα αίματος συλλέγονταν από τη σφαγίτιδα φλέβα με τη χρήση φιαλιδίων ηπαρίνης αρνητικής πίεσης στους χρόνους 0, 2, 4, 8 και 12 ώρες μετά την πρώτη χορήγηση των τερπενίων καθώς και στις ημέρες 2, 3, 5, 7, 15, 18, 19 και 20^η του πειράματος. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 1700g για 10 λεπτά και το πλάσμα συλλέγονταν και αποθηκεύονταν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι να αναλυθεί για τον προσδιορισμό των τερπενίων.

Ατομικά δείγματα γάλακτος συλλέχθηκαν κατά τις ημέρες 1, 2, 3, 5, 7, 11, 13, 15, 18, 19 και 20 για τον προσδιορισμό των τερπενίων και στα δύο είδη ζώων. Επιπλέον δείγματα γάλακτος συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους και τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων πήξεως του γάλακτος. Όσον αφορά στις αίγες οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 7, 11, 13, 18, 19, 20 ενώ για τα πρόβατα πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 1, 2, 7, 11, 13, 15, 18, 19 και 20. Μετά τη συλλογή τα δείγματα αποθηκεύτηκαν άμεσα στην κατάψυξη (-20°C) μέχρι να αναλυθούν για τον προσδιορισμό των τερπενίων σε αυτά.

2.3 Αναλύσεις δειγμάτων γάλακτος

2.3.1 Προσδιορισμός χημικής σύστασης του γάλακτος

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση των τιμών λίπους, λακτόζης, πρωτεΐνης, ολικών στερεών και στερεών άνευ λίπους στα δείγματα γάλακτος. Ο προσδιορισμός των παραπάνω χαρακτηριστικών του γάλακτος έγινε με το όργανο Milkoscan FT 6000 (Foss Electric, Denmark).

2.3.2 Προσδιορισμός των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων πήξεως του γάλακτος

Για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων πήξεως του γάλακτος χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Formagraph (Foss Electric, Denmark 1980). Το όργανο αυτό αποτελείται από μια συσκευή προετοιμασίας των δειγμάτων όπου το γάλα

θερμαίνεται στους 35⁰C, στη συνέχεια προστίθεται το ένζυμο (πυτιά), και μια συσκευή μέτρησης με προσαρμοσμένα ατσάλινα εκκρεμή σε σχήμα δακτυλίου χρησιμοποιούνται για να μετρούν τη διαφορετική συνεκτικότητα των πήγμάτων. Η συσκευή είναι συνδεδεμένη με ειδικό λογισμικό H/Y με το οποίο γίνεται η επεξεργασία των σημάτων που λαμβάνονται από το όργανο.

Το όργανο αυτό υπολογίζει τρεις παραμέτρους:

α) τον χρόνο που μεσολαβεί από την προσθήκη της πυτιάς μέχρι την έναρξη σχηματισμού του πήγματος, t (min)

β) τον χρόνο που απαιτείται για να σκληρύνει το πήγμα μέχρι το εύρος της διακλάδωσης του βραχίονα να γίνει 20 mm., K_{20} (min)

γ) το τελικό εύρος A_{30} (mm) της διακλάδωσης του βραχίονα, από τη στιγμή της προσθήκης της πυτιάς μέχρι τα 30 min, σημείο το οποίο στην πράξη ισοδυναμεί με την τελική συνεκτικότητα του πήγματος και τη στιγμή της διαίρεσής του.

Η πυτιά που χρησιμοποιείται είναι σε μορφή σκόνης με δύναμη 1: 120.000 διαλυμένη σε νερό με συγκέντρωση 0,2% w/v. Από το διάλυμα αυτό 0,2 ml προστίθενται στα 10 ml γάλακτος. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε υγρή πυτιά με δύναμη 1:15.000 με τη διάλυση στο νερό να είναι 1,6% v/v.

2.3.3 Προσδιορισμός σύνθεσης λιπαρών οξέων του γάλακτος

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων στο λίπος του γάλακτος έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Rose Gottlieb (Standard 16C: 1987, IDF). Αρχικά χρησιμοποιήθηκε αμμωνιακό διάλυμα για τη διάσπαση των λιποσφαιρίων. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αιθέρα και αλκοολικό διάλυμα το οποίο διευκολύνει το λίπος να περάσει από την υδατική φάση του γάλακτος, στη φάση των διαλυτών. Διαχωρίζονται οι φάσεις και με εξάτμιση του αιθέρα παραλαμβάνεται το λίπος.

Μετά την παραλαβή του λίπους πραγματοποιήθηκε η μεθυλεστεροποίηση των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μεθυλεστέρων σε αέριο χρωματογράφο (IDF Standard 182:1999). Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η εστεροποίηση των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων και όχι των ελεύθερων λιπαρών οξέων.

Ο χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν GC-17A Shimadzu, εφοδιασμένος με τη στήλη SP-2340 διαστάσεων 30 m × 0.2 mm I.D και ήταν

συνδεδεμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Ο προσδιορισμός των ουσιών που μας ενδιέφεραν έγινε με χρωματογραφικό εργαστηριακό αυτοματοποιημένο λογισμικό σύστημα Chromomelon GC και τη χρήση ρποτύπων μεθυλεστέρων.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των τερπενίων ήταν το παρακάτω: 45°C για 5 λεπτά; αύξηση κατά 5°C/λεπτό μέχρι τους 150°C; παραμονή σε αυτή τη θερμοκρασία για 5min, αύξηση 7°C/λεπτό μέχρι 220°C; παραμονή σε αυτή τη θερμοκρασία για 20min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν στους 250°C. Το αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ήλιο και η ταχύτητα ροής του ήταν 35 cm/s.

2.4. Παρασκευή σκληρού τυριού - Κεφαλοτύρι

Το κεφαλοτύρι παρασκευάζεται σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας με τεχνολογίες που διαφέρουν ανάλογα με την περιοχή. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία είναι αυτή που ακολουθείται στις περισσότερες τυροκομικές μονάδες και αποτελεί το πρωτόκολλο που ακολουθείται από το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του ΓΠΑ. Για κάθε τυροκόμηση συλλέχθηκε το γάλα, χωριστά για κάθε μία από τις ομάδες του μάρτυρα και της επέμβασης, από την πρωινή και τη βραδινή άμελξη για 3 συνεχόμενες ημέρες και αποθηκεύτηκε στους 4°C. Μετά την παστερίωση του γάλακτος (68°C) και την ψύξη στους 35°C προστέθηκαν οξυγαλακτικές καλλιέργειες (μίγμα *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus bulgaricus* και *Lactobacillus lactis*) και πτυιά. Στη συνέχεια το τυρόπηγμα που δημιουργήθηκε διαιρέθηκε, αναθερμάνθηκε (43-44°C), τοποθετήθηκε σε καλούπια, αλατίστηκε και αφέθηκε σε θάλαμο ωρίμανσης για 4 μήνες.

2.4.1 Αναλύσεις στα δείγματα τυριού

Πριν την κάθε ανάλυση, αφαιρέθηκε η επιδερμίδα ή η επιφανειακή στρώση του τυριού, με τέτοιο τρόπο ώστε παραλάβουμε αντιπροσωπευτικό δείγμα του τυριού. Το δείγμα αλέστηκε και μεταφέρθηκε προς διατήρηση σε αεροστεγή περιέκτη μέχρι να γίνει η ανάλυση.

2.4.1.1 Προσδιορισμός της λιποπεριεκτικότητας (Μέθοδος Gerber-Van-Gulik)

Η λιποπεριεκτικότητα του τυριού προσδιορίστηκε με την κλασική μέθοδο Gerber-Van-Gulik (προσθήκη θειϊκού οξέος υψηλής πυκνότητας, το οποίο διαλύει

όλα τα άλλα συστατικά του τυριού εκτός από το λίπος). Από την εκλυόμενη θερμότητα το λίπος ρευστοποιείται και διαχωρίζεται με φυγοκέντρηση από τη υδατική φάση. Η συγκέντρωση του λίπους στο δείγμα διαβάζεται στο ανώτερο βαθμολογημένο τμήμα του ειδικού γυάλινου σωλήνα που ονομάζεται βουτυρόμετρο (IDF, 1991).

2.4.1.2 Προσδιορισμός ολικού, υδατοδιαλυτού αζώτου και πρωτεϊνών

Οι ολικές αζωτούχες ουσίες στο τυρί προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Kjeldahl. Συνοπτικά η διαδικασία έχει ως εξής: πραγματοποιείται καύση του δείγματος τυριού με χρήση συσκευής καύσης σε μίγμα πυκνού θειικού οξέος, υπεροξειδίου του υδρογόνου και αντιαφριστικού παράγοντα, παρουσία καταλύτη, με αποτέλεσμα την μετατροπή του οργανικού αζώτου σε θειικό αμμώνιο. Στη συνέχεια προστίθεται περίσσεια καυστικού νατρίου προς σχηματισμό αμμωνιάς. Με αυτόματη αποστακτική συσκευή η αμμωνία δεσμεύεται σε περίσσεια διαλύματος βορικού οξέος και προσδιορίζεται άμεσα το ολικό άζωτο με τιτλοδότηση με υδροχλωρικό οξύ παρουσία δείκτη. Το υδατοδιαλυτό άζωτο αναλύθηκε όπως και το ολικό άζωτο με τη διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση εισάγεται για καύση διήθημα τυριού, το οποίο έχει προκύψει ύστερα από ομογενοποίηση (stomacher) με τη χρήση νερού και διήθηση. Το διήθημα που προέκυπτε περιείχε το υδατοδιαλυτό άζωτο (IDF, 1993).

2.5 Ανίχνευση και προσδιορισμός τερπενίων στο πλάσμα του αίματος και στα ζωικά προϊόντα

2.5.1 Προσδιορισμός τερπενίων στο πλάσμα αίματος

Τα δείγματα πλάσματος τόσο για τις αίγες όσο και για τα πρόβατα εκχυλίστηκαν με τη χρήση πετρελαϊκού αιθέρα σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται από τους Desage *et al.*, (1996) και με τις αναγκαίες τροποποιήσεις όπως περιγράφονται πιο κάτω. Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν 250 μl πλάσματος στα οποία προστέθηκαν 750 μl πετρελαϊκού αιθέρα σε ειδικό γυάλινο σωλήνα, ο οποίος έκλεινε με καπάκι στο εσωτερικό του οποίου υπήρχε ειδική στρώση PTFE υλικού. Μετά τη φυγοκέντρηση η οποία έγινε σε 1700×g για 10 λεπτά στους 4°C το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε σε σωλήνα 2 ml, ενώ στο υπόλειμμα προστέθηκαν 250 μl πετρελαϊκού αιθέρα και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες για την συλλογή τυχόν υπολειμμάτων από τερπένια. Τα δύο εκχυλίσματα

ενώθηκαν και από αυτά 1ml μεταφέρθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο έτοιμο για χρωματογραφική ανάλυση με τη χρήση του αυτόματου δειγματολήπτη.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που αναλύθηκαν χρησιμοποιήθηκαν εξωτερικά πρότυπα διαλύματα (external standards) βαθμονόμησης. Σε κάθε ημέρα ανάλυσης πραγματοποιούνταν ενέσεις διαλυμάτων των αναλυόμενων ενώσεων σε διαφορετικές γνωστές συγκεντρώσεις. Από τα εμβαδά των ουσιών στα χρωματογραφήματα προέκυψε η καμπύλη βαθμονόμησης βάσει της οποίας προσδιορίστηκαν τελικά οι ποσότητες των υπο διερεύνηση μορίων στα άγνωστα δείγματα (Huber, 2001). Τα διαλύματα βαθμονόμησης τα οποία εγχύονταν στο GC/MS είχαν συγκέντρωση 0,0001 µg/ ml, 0,001 µg/ ml, 0,01 µg/ ml, 0,1 µg/ ml, 1 µg/ ml, 10 µg/ ml, 100 µg/ ml. Το όριο ποσοτικοποίησης της τροποποιημένης μεθόδου ήταν 0,0001 µg/ ml. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου η οποία εκφράζεται ως σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD) για κάθε μία συγκέντρωση και για κάθε ένα τερπενιο που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Επαναληψιμότητα μεθόδου προσδιορισμού τερπενίων στο αίμα.

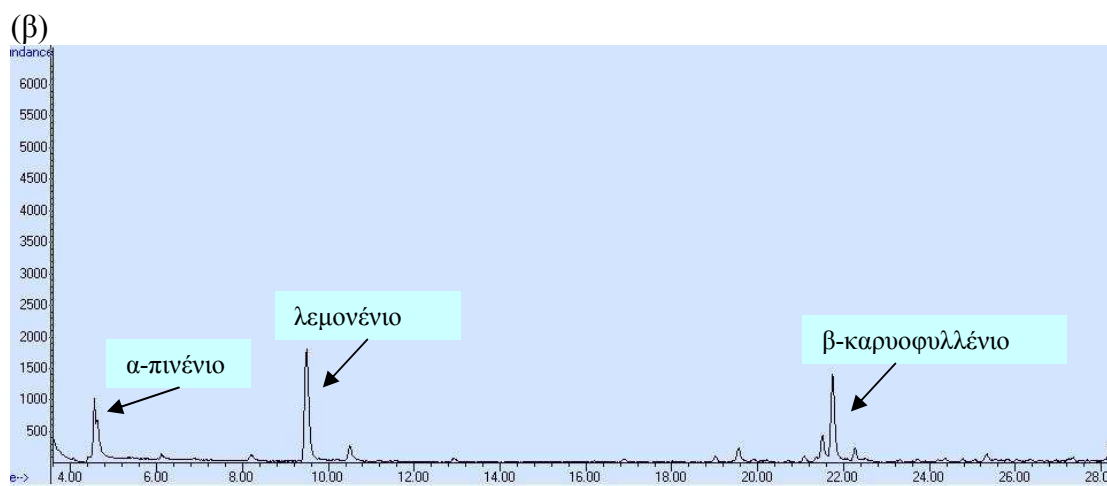
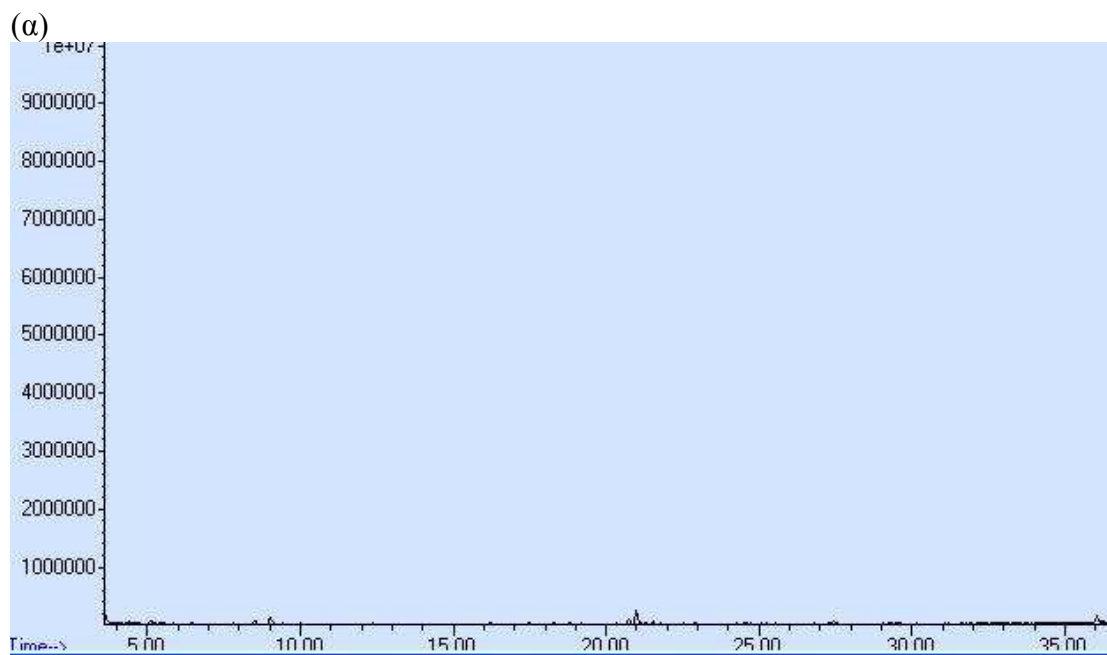
		Συγκεντρώσεις (µg/ml)						
		0,0001	0,001	0,01	0,1	1	10	100
RSD (%)	α-πινένιο	11,99	3,09	7,09	6,54	8,00	7,74	6,15
	Λεμονένιο	8,51	7,91	6,65	8,56	6,92	9,85	11,32
	β-καρνοφυλλένιο	7,70	6,32	9,76	8,80	10,43	8,15	10,67

Ο χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν Hewlett-Packard 5890, εφοδιασμένος με τη στήλη HP 5 διαστάσεων 25 m × 0,2 mm I.D. Ο χρωματογράφος ήταν συνδεδεμένος με φασματοφωτόμετρο μάζας (MSD HP 5970) με τη χρήση ανιχνευτή ιονισμού ηλεκτρονίων (EI). Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αυτόματος δειγματολήπτης (ALS 7673) και ο προσδιορισμός των ουσιών που μας ενδιέφεραν έγινε με τη χρήση του προγράμματος MS 3.2 της Pascal Chemstation (HP 59970) και τη χρήση της βιβλιοθήκης NIST (National Institute of Standards and Technology, USA).

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των τερπενίων ήταν το παρακάτω: 35°C για 1 λεπτό; αύξηση κατά 15°C/λεπτό μέχρι τους 75°C; αύξηση 3°C/λεπτό μέχρι 90°C; αύξηση 20°C/λεπτό μέχρι τους 180°C;

αύξηση 25°C/λεπτό μέχρι τους 280°C. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν στους 250°C. Το ήλιο ήταν το αέριο που χρησιμοποιήθηκε και η ταχύτητα κίνησης ήταν 35 cm/s. Η απεικόνιση των δειγμάτων στο χρωματογράφο φαίνεται στην Εικόνα 7.

Εικόνα 7. Χρωματογραφική απεικόνιση δειγμάτων πλάσματος αίματος από ζώα (α) τα οποία δεν καταλάωναν τερπένια (β) καταλάωναν τερπένια (α-πινένιο, λεμονένιο και β-καρνοφυλλένιο).

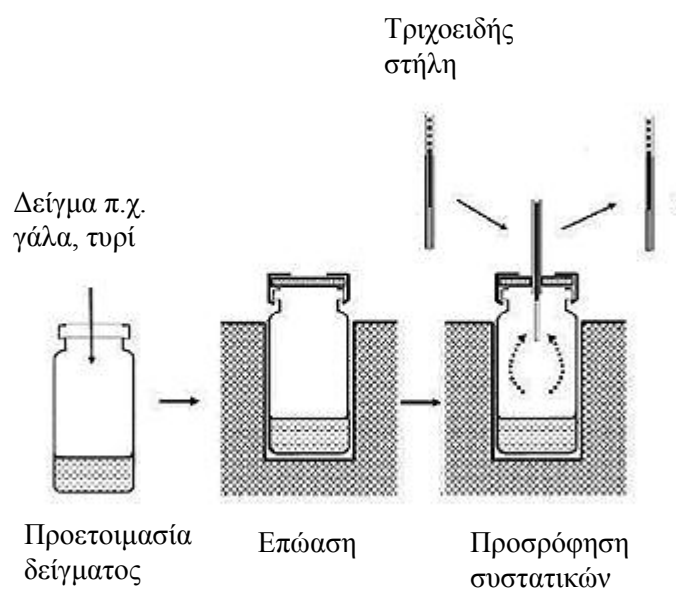


2.5.2 Ανίχνευση και προσδιορισμός τερπενίων στο γάλα

Τα δείγματα γάλακτος αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια της νύχτας πριν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) (Buchholz and Pawllszyn, 1994). Σύμφωνα με αυτή την τεχνική 3 ml

δείγματος τοποθετήθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο με ειδικό PTFE καπάκι. Στη συνέχεια στο φιαλίδιο προσαρμόστηκε ειδική βελόνα στο άκρο της οποίας είχε εφαρμοστεί μια τριχοειδής ίνα διαμέτρου 75 μm CAR/PDMS (carboxen/polydimethylsiloxane) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) για την προσρόφηση των πτητικών μορίων που μας ενδιέφεραν. Το δείγμα, στο οποίο είχε τοποθετηθεί μικρός μαγνήτης ανάδευσης με σκοπό να ενίσχυσει την απελευθέρωση από το δείγμα των πτητικών ενώσεων, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο (45°C) για 20 λεπτά με την τριχοειδή στήλη προσαρμοσμένη στο φιαλίδιο προκειμένου να γίνει η προσρόφηση των τερπενίων (Εικόνα 8).

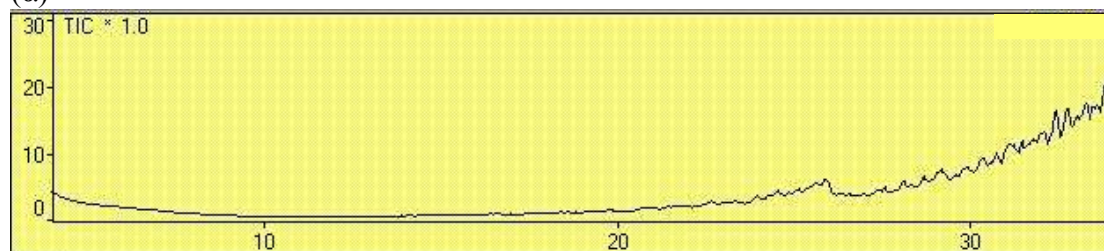
Εικόνα 8. Διαδικασία εκχύλισης με τη μέθοδο HS-SPME.



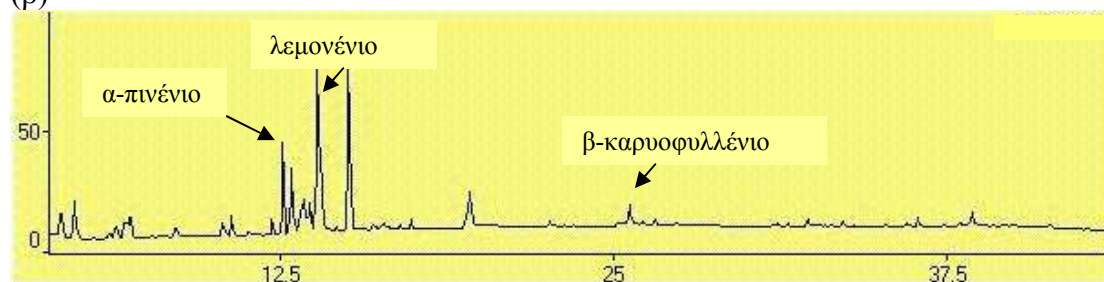
Στη συνέχεια η ίνα εισήχθη σε χρωματογράφο μάζας συνδεδεμένο με φασματοφωτόμετρο μαζών (GC/MS-QP5050 Shimadzu). Ο διαχωρισμός έγινε με στήλη DB5-MS διαστάσεων 30m×0,25mm×0,25 μm . Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο: 45°C για 3 λεπτά, αύξηση κατά 5 C/ λεπτό μέχρι τους 220°C και περαιτέρω αύξηση κατά 10°C / λεπτό μέχρι τους 250°C. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν στους 250°C. Ο λόγος m/z είχε προσδιοριστεί από 70 έως 300. Η απεικόνιση των δειγμάτων στο χρωματογράφο φαίνεται στην Εικόνα 9.

Εικόνα 9. Χρωματογραφική απεικόνιση δειγμάτων γάλακτος (α) χωρίς τερπένια (β) με τερπένια α-πινένιο, λεμονένιο και β-καρυοφυλλένιο.

(α)



(β)



Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που αναλύθηκαν χρησιμοποιήθηκαν εξωτερικά πρότυπα διαλύματα (external standards) βαθμονόμησης. Σε κάθε ημέρα ανάλυσης πραγματοποιούνταν εγχύσεις διαλυμάτων των αναλυόμενων ουσιών σε διαφορετικές γνωστές συγκεντρώσεις. Από τα εμβαδά των ουσιών στα χρωματογραφήματα προέκυψε η καμπύλη βαθμονόμησης βάσει της οποίας προσδιορίστηκαν τελικά οι ποσότητες των ενώσεων στα άγνωστα δείγματα (Buchholz and Pawllszyn, 1994). Τα διαλύματα τα οποία εγχύονταν στο GC/MS είχαν συγκέντρωση 0,01 μg/ ml, 0,1 μg/ ml, 1 μg/ ml, 10 μg/ ml, 100 μg/ ml. Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ήταν 0,01 μg/ ml. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου η οποία εκφράζεται ως σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD) για κάθε μία συγκέντρωση και για κάθε ένα τερπένιο που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Επαναληψιμότητα μεθόδου προσδιορισμού τερπενίων στο γάλα.

		Συγκεντρώσεις (μg/ml)				
		0,01	0,1	1	10	100
RSD (%)	α-πινένιο	9,53	6,67	4,51	4,02	3,02
	Λεμονένιο	3,09	4,61	3,35	3,55	5,34
	β-καρνοφυλλένιο	8,96	8,18	4,30	4,68	4,10

2.5.3 Ανίχνευση και προσδιορισμός τερπενίων στο τυρί

Για τον προσδιορισμό των τερπενίων στο τυρί, ελήφθησαν 10g δείγματος αλεσμένου τυριού σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθείται από το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γ.Π.Α και ομογενοποιήθηκαν με 4 g Na₂SO₄ και την προσθήκη 4 ml H₂O. Από το μίγμα που προέκυψε 3 g τοποθετήθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο με ειδικό καπάκι PTFE και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης όπως έχει ήδη περιγραφεί. Χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος αέριος χρωματογράφος μάζας και το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα με αυτό που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των τερπενίων στο γάλα.

2.5.4 Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και τη χρήση μικτών γραμμικών προτύπων (Linear Mixed Models) του στατιστικού πακέτου S-plus (version 6.1, 2001). Στο πρότυπο χρησιμοποιήθηκε ως επίδραση η επέμβαση και η ημέρα του πειράματος κατά την οποία ελήφθησαν τα δείγματα. Η ατομική επίδραση του ζώου έχει συμπεριληφεί στην ανάλυση ως τυχαία επίδραση. Αναλυτικά, το πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν

$$y_{ijkl} = a + \text{Ημέρα}_k + \text{Επέμβαση}_j + b_i + e_{ijkl}$$

όπου:

a = σταθερός όρος

i = 1-8, αριθμός ζώων, $b_i \sim N(0, \sigma_b^2)$

j = μάρτυρας, α- πινένιο, λεμονένιο, β-καρνοφυλλένιο

k = 1, ..., n, ημέρα δειγματοληψίας

e = σφάλμα εκτίμησης, $e_{ijkl} \sim N(0, \sigma_e^2)$

Επίσης, στα πλαίσια μιας ανάλυσης ευαισθησίας, η επίδραση του ζώου συμπεριλήφθηκε και μέσω ενός συναφούς προτύπου επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (repeated measures) αλλά το μικτό πρότυπο προτιμήθηκε τελικά γιατί προσαρμόζεται καλύτερα στα δεδομένα όπως προέκυψε από τις τιμές των αναλύσεων απόκλισης (Deviance) και AIC. Σε κάθε περίπτωση, τα ποιοτικά αποτελέσματα των δύο προτύπων ήταν κοινά. Οι τυχούσες αλληλεπιδράσεις, των τριών τερπενίων που χρησιμοποιήθηκαν, δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση.

3 Αποτελέσματα 1ου και 2ου Πειράματος

3.1 Αίγες

3.1.1 Ύψος γαλακτοπαραγωγής και χημική σύσταση αίγειου γάλακτος

Ο μέσος όρος της παραγωγής γάλακτος ανά ομάδα και ανά ημέρα ήταν 1,2 kg και δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ζώων των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Εξέλιξη της γαλακτοπαραγωγής αιγών (kg/κεφαλή/ημέρα) για τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Επέμβαση	Ημέρα											SE	P
	1	2	3	5	7	11	13	15	18	19	20		
C	1,18	1,33	1,59	1,30	1,35	1,24	1,18	1,28	1,13	1,24	1,20	0,015	ns
T	1,06	1,10	1,14	1,30	1,15	1,16	1,10	1,11	1,01	1,01	1,03	0,015	

ns: $P > 0,05$

Παρόμοια, η χημική σύσταση του γάλακτος κυμάνθηκε σε φυσιολογικά επίπεδα και δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην ομάδα του μάρτυρα και της επέμβασης σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Χημική σύσταση αίγειου γάλακτος από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Χημικά χαρακτηριστικά	Επέμβαση		Τυπικό σφάλμα	P
	C (n = 24)	T (n = 24)		
Λίπος (%)	3,93	3,22	0,503	ns
Πρωτεΐνη (%)	4,00	4,07	0,232	ns
Λακτόζη (%)	4,33	4,00	0,044	ns
ΣΥΑΛ (%)	8,62	8,32	0,713	ns
ΣΥ (%)	12,56	11,55	0,216	ns

ns: $P > 0,05$

ΣΥΑΛ: στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους, ΣΥ: στερεό υπόλειμμα

3.1.2 Χαρακτηριστικές ιδιότητες πήξεως του αίγιου γάλακτος

Ο χρόνος πήξης (r) για το γάλα των ζώων της ομάδας του μάρτυρα (C) ήταν μικρότερος ($P < 0,01$) από αυτόν που αντιστοιχεί στο γάλα των ζώων της ομάδα της επέμβασης (T). Η προσθήκη δηλαδή των τερπενίων στο σιτηρέσιο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου που απαιτείται μέχρι την έναρξη του σχηματισμού πήγματος (Πίνακας 9).

Ωστόσο η συνεκτικότητα του πήγματος (A_{30}) και ο χρόνος που απαιτείται για να σκληρύνει το πήγμα μέχρι το εύρος της διακλάδωσης του βραχίονα να είναι 20 mm (K_{20}), δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες του πειράματος (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Μέσοι όροι χαρακτηριστικών ιδιοτήτων πήξεως του γάλακτος των αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Ιδιότητες πήξεως	Επέμβαση		Τυπικό σφάλμα	P
	C (n = 24)	T (n = 24)		
r (min)	14,77	19,75	0,532	**
K₂₀ (min)	9,10	7,28	1,435	ns
A₃₀ (min)	16,61	13,64	1,653	ns

** $P < 0,01$, ns: $P > 0,05$

3.1.3 Σύνθεση λιπαρών οξέων στο λίπος του γάλακτος των αιγών

Η ανάλυση των δειγμάτων του γάλακτος των αιγών ως προς τις συγκεντρώσεις της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στο γάλα των αιγών έδειξε ότι για τα περισσότερα από αυτά δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο γάλα των ζώων του μάρτυρα και της επέμβασης. Ωστόσο στατιστικώς σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν στο C_{10} ($P < 0,05$), του οποίου το ποσοστό ήταν υψηλότερο στα ζώα της ομάδας της επέμβασης σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Πιο αναλυτικά το C_{10} παρουσίασε αυξητική τάση από την αρχή των δειγματοληψιών και η συγκέντρωσή του συνέχισε να αυξάνει μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας. Όσον αφορά στο C_{18} ($P < 0,05$) εδώ το ποσοστό του ήταν υψηλότερο στα ζώα της ομάδας του μάρτυρα και χαμηλότερο στα ζώα που λάμβαναν το μίγμα τερπενίων. Τέλος, για το CLA η συγκέντρωσή του παρουσίασε υψηλότερη συγκέντρωση ($P < 0,001$) στα ζώα της ομάδας της επέμβασης σε σχέση με τα ζώα της

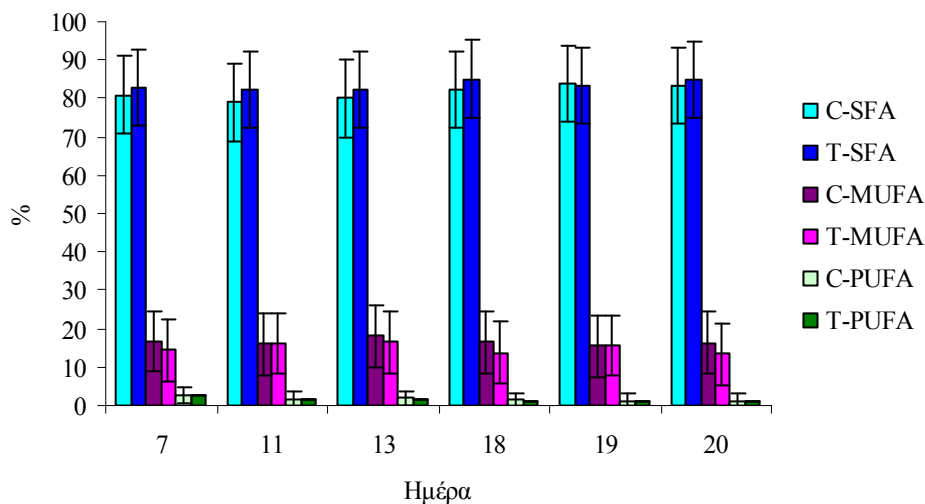
ομάδας του μάρτυρα (Πίνακας 10). Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσής του από την αρχή της χορήγησης των τερπενίων η οποία παραμένει σε υψηλά ποσοστά στην ομάδα της επέμβασης μέχρι και το τέλος της χορήγησης των τερπενίων. Η ομαδοποίηση των λιπαρών οξέων σε κατηγορίες ανάλογα με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας δεν παρουσίασε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των κορεσμένων (SFA), μονοακόρεστων (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) λιπαρών οξέων μεταξύ των ζώων της ομάδας του μάρτυρα και της επέμβασης (Διάγραμμα 1).

Πίνακας 10. Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων λιπαρών οξέων ως ποσοστό επί του συνόλου (%), στο γάλα των αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Λιπαρό οξύ	Επέμβαση		Τυπικό σφάλμα	P
	C	T		
C ₄	1,21	1,36	0,204	ns
C ₆	1,85	1,70	0,742	ns
C ₈	10,08	11,28	0,115	*
C ₁₀	6,24	6,38	0,815	ns
C ₁₂	15,80	16,86	0,536	ns
C ₁₄	0,83	0,85	0,268	ns
C _{14:1}	40,95	41,62	1,113	ns
C ₁₆	0,28	0,28	0,196	ns
C _{16:1}	4,09	3,64	0,185	*
C ₁₈	15,35	13,82	0,985	ns
C _{18:1}	0,90	0,83	0,607	ns
C _{18:2}	0,46	0,34	0,469	ns
C _{18:3}	0,27	0,46	0,076	***
CLA	1,21	1,36	0,204	ns

*P< 0,05, ***P< 0,001, ns: P>0,05,

Διάγραμμα 1. Εξέλιξη της συγκέντρωσης, ως ποσοστό επί του συνόλου (%), κορεσμένων (SFA), μόνο- (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) λιπαρών οξέων στο γάλα αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

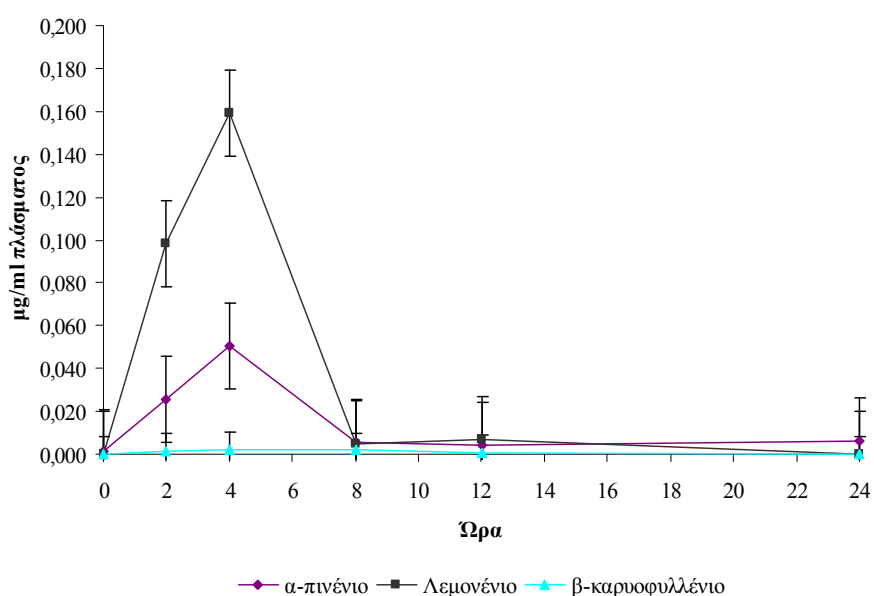


3.1.4 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης τερπενίων στο πλάσμα του αίματος των αιγών

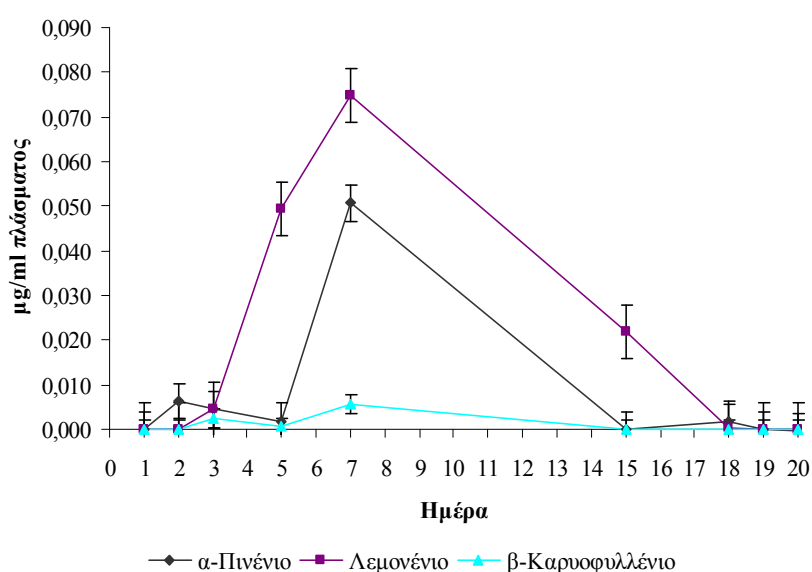
Η συγκέντρωση του α -πινενίου και του λεμονενίου στο πλάσμα του αίματος των αιγών κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών από την χορήγηση των τερπενίων παρουσίασε αυξητική πορεία η οποία κορυφώθηκε στη δειγματοληψία των 4 ωρών μετά τη λήψη του μίγματος των τερπενίων. Στη φάση αυτή η συγκέντρωση του λεμονενίου ήταν σχεδόν 3 φορές μεγαλύτερη από αυτή του α -πινενίου ($P < 0,05$), ενώ η συγκέντρωση του β -καρνοφυλλενίου ήταν σχεδόν μηδενική (Διάγραμμα 2). Τα τρία τερπένια προσδιορίστηκαν σε συγκεντρώσεις κοντά στο μηδέν στο πλάσμα του αίματος των ζώων της ομάδας της επέμβασης 8 ώρες μετά τη χορήγηση των τερπενίων, όπως συνέβη και για το β -καρνοφυλλένιο συνεχώς από την αρχική στιγμή της χορήγησης των τερπενίων (Διάγραμμα 2). Επιπλέον κανένα από τα τερπένια που μελετήθηκαν δεν προσδιορίστηκε στα ζώα της ομάδας του μάρτυρα. Η συγκέντρωσή του α -πινενίου και του λεμονενίου στο πλάσμα του αίματος των αιγών παρουσίασε αύξηση μέχρι την 7^η ημέρα, η οποία ήταν υψηλότερη για το δεύτερο ($P < 0,05$), ενώ το β -καρνοφυλλένιο προσδιορίστηκε σε συγκεντρώσεις κοντά στο μηδέν σε όλα τα

δείγματα του πλάσματος της ομάδας της επέμβασης και σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 3).

Διάγραμμα 2. Εξέλιξη των μέσων όρων των συγκεντρώσεων (μg/ml) α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρσοφυλλενίου κατά τις πρώτες 24 ώρες στο πλάσμα του αίματος των αιγών που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια κατά τη διάρκεια του πειράματος.



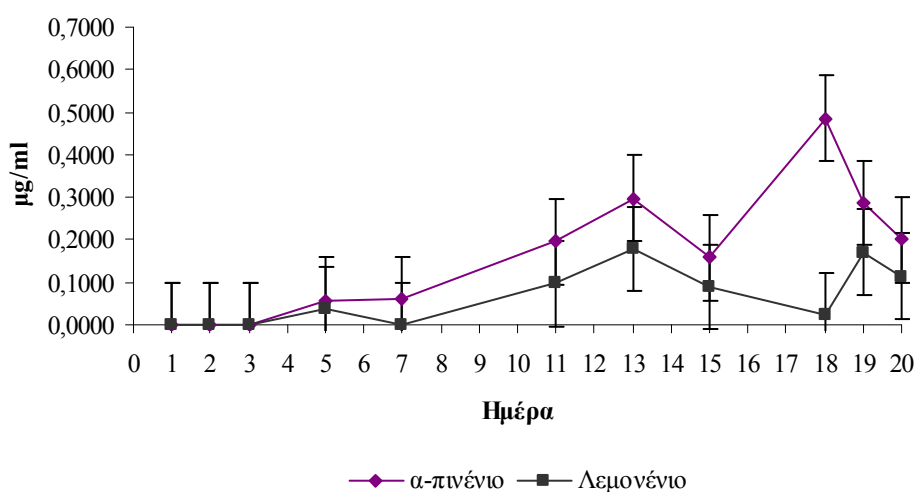
Διάγραμμα 3. Εξέλιξη των μέσων όρων των συγκεντρώσεων (μg/ml) α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρσοφυλλενίου στο πλάσμα του αίματος των αιγών που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια κατά τη διάρκεια του πειράματος.



3.1.5 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης τερπενίων στο αίγιο γάλα

Οι αναλύσεις για τον προσδιορισμό των τερπενίων στα δειγμάτων γάλακτος που ελήφθησαν από τα ζώα της ομάδας της επέμβασης έδειξαν ότι το α-πινένιο και το λεμονένιο ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα της ομάδας της επέμβασης μετά την 3^η ημέρα από τη χορήγηση των τερπενίων παρόλο που οι συγκεντρώσεις διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις ημέρες (Διάγραμμα 4). Η συγκέντρωση παρουσίασε αυξητική πορεία και για τα δύο τερπένια μέχρι την 13^η ημέρα η οποία ακολουθήθηκε από μείωση την 15^η και 18^η ημέρα για το α-πινένιο και το λεμονένιο αντίστοιχα ($P < 0,05$). Στις δύο τελευταίες δειγματοληψίες και τα δύο τερπένια παρουσίασαν μείωση στη συγκέντρωσή τους στο γάλα κατά τη 19^η ημέρα η οποία συνεχίστηκε την τελευταία ημέρα του πειράματος (Διάγραμμα 4). Ωστόσο η συγκέντρωση του α-πινενίου παρέμενε διαρκώς υψηλότερη από αυτή του λεμονενίου σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ($P < 0,05$), ενώ όπως έχει ήδη αναφερθεί και στην περίπτωση του πλάσματος του αίματος των αιγών, σε όλα τα δείγματα γάλακτος της ομάδας της επέμβασης το β-καρνοφυλλένιο δεν ανιχνεύτηκε. Επιπλέον στα δείγματα γάλακτος της ομάδας του μάρτυρα κανένα από τα τερπένια που ερευνώνται δεν ανιχνεύτηκε (Διάγραμμα 4).

Διάγραμμα 4. Εξέλιξη των μέσων όρων των συγκεντρώσεων (μg/ml) α-πινενίου και λεμονενίου στο γάλα των αιγών που ελάμβαναν 1g/ κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα τερπένια κατά τη διάρκεια του πειράματος.



3.1.6 Χημικά χαρακτηριστικά και συγκέντρωση λιπαρών οξέων στο αίγαιο τυρί

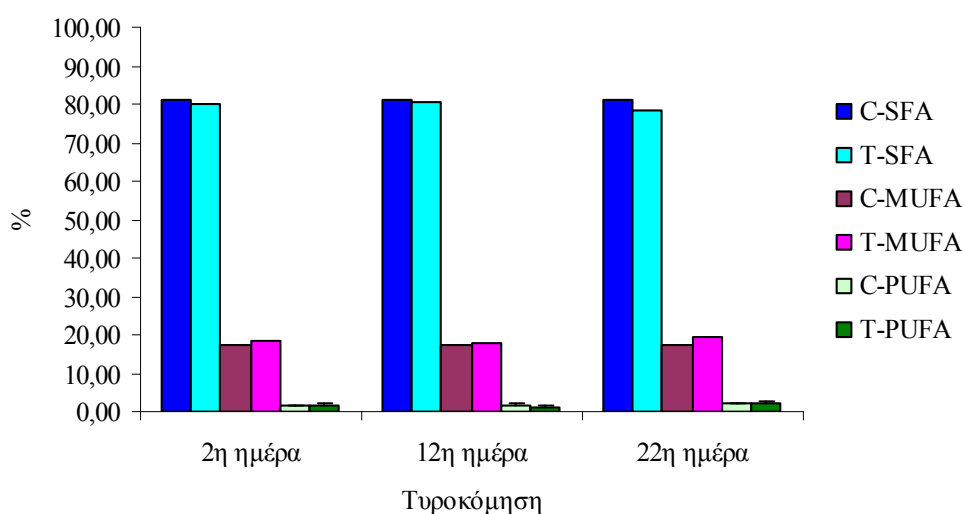
Η χημική σύσταση του τυριού που παρασκευάστηκε από τις δύο ομάδες ζώων δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Χημική σύσταση αίγειου τυριού που παράχθηκε από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) και στις τρεις τυροκομήσεις (1, 2 και 3) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

	Συστατικό			
	Υγρασία (%)	Λίπος (%)	Ολική Πρωτεΐνη (%)	Υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη (%)
Επέμβαση		1^η τυροκόμηση		
C	42,75	28,7	25,81	1,25
T	46,14	24,75	27,01	1,70
		2^η τυροκόμηση		
C	42,24	27,1	23,61	1,88
T	43,87	27,05	27,07	1,98
		3^η τυροκόμηση		
C	45,92	31,3	22,97	1,68
T	45,89	27,7	25,20	1,78

Η αναλογία σε κορεσμένα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA) και πολυακόρεστα (PUFA) λιπαρά οξέα στο λίπος του τυριού των αιγών παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 5. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστιώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων του μάρτυρα και τις επέμβασης και για τα δύο είδη ζώων. Η αναλογία των κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) προσδιορίστηκε σε ποσοστό 80% του συνόλου των λιπαρών οξέων, ενώ για τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σε ποσοστά 18,5% και 1,5% αντίστοιχα για τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα και της επέμβασης (Διάγραμμα 5).

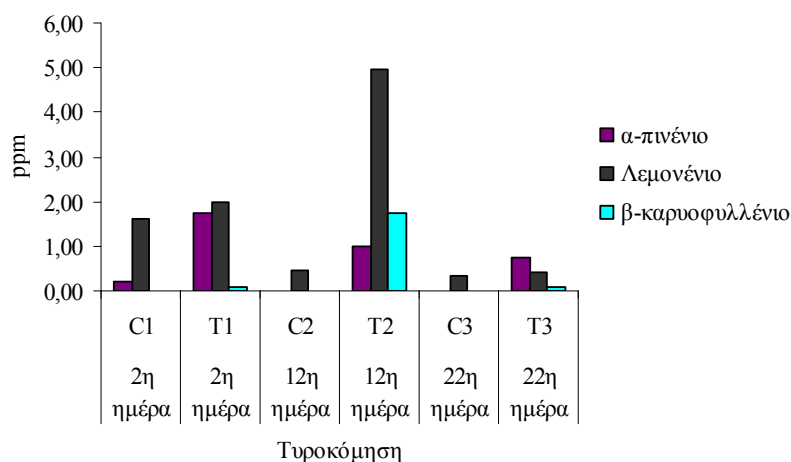
Διάγραμμα 5. Ποσοστό επί τοις εκατό κορεσμένων (SFA) μονο- (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) λιπαρών οξέων στο τυρί αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης κατά τις 3 τυροκομήσεις.



3.1.7 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης τερπενίων στο αίγιο τυρί

Στο τυρί της ομάδας της επέμβασης ανιχνεύτηκαν και τα τρία τερπένια, ωστόσο μεγαλύτερη παρουσιάστηκε η συγκέντρωσή τους στη δεύτερη τυροκόμηση. Η συγκέντρωση των τερπενίων μειώθηκε μετά το τέλος της χορήγησης των τερπενίων στα ζώα γεγονός το οποίο φαίνεται και στο διάγραμμα (T1-T3, Διάγραμμα 6). Παρόλα αυτά κανένα από τα τερπένια δεν ανιχνεύτηκαν στο τυρί σε ποσοστό ανάλογο με την ποσότητα η οποία χορηγήθηκε στα ζώα, ενώ το λεμονένιο ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα τυριού των ζώων της ομάδας του μάρτυρα (C1-C3, Διάγραμμα 6).

Διάγραμμα 6. Συγκέντρωση (ppm) του α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου σε τυρί που παρασκευάστηκε από το γάλα των αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια και των τριών τυροκομήσεων (1, 2 και 3).



3.2 Πρόβατα

3.2.1 Ύψος γαλακτοπαραγωγής και χημική σύσταση πρόβειου γάλακτος

Ο μέσος όρος της παραγωγής γάλακτος ανά ομάδα ανά ημέρα ήταν 0,73 kg και δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ζώων των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Εξέλιξη της γαλακτοπαραγωγή προβάτων (kg/κεφαλή/ημέρα) για τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Επέμβαση	Ημέρα										SE	P	
	1	2	3	5	7	11	13	15	18	19			20
C	0,65	0,60	0,48	0,78	0,70	0,85	0,83	0,70	0,51	0,93	0,75	0,018	ns
T	0,74	0,65	0,71	0,70	0,78	0,70	0,88	0,78	0,50	0,90	0,88		

ns: $P > 0,05$

Η χημική σύσταση του γάλακτος δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων του μάρτυρα και της επέμβασης (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Χημική σύσταση πρόβειου γάλακτος από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Χημικά χαρακτηριστικά	Επέμβαση		Τυπικό σφάλμα	P
	C (n = 44)	T (n = 44)		
Λίπος (%)	6,53	6,46	0,231	ns
Πρωτεΐνη (%)	5,43	5,37	0,091	ns
Λακτόζη (%)	4,68	4,66	0,0042	ns
ΣΥΑΛ (%)	10,99	10,88	0,143	ns
ΣΥ (%)	17,35	17,35	0,284	ns

ns: $P > 0,05$.

ΣΥΑΛ: στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους, ΣΥ: στερεό υπόλειμμα

3.2.2 Χαρακτηριστικές ιδιότητες πήξεως του πρόβειου γάλακτος

Η ομάδα του μάρτυρα δε διέφερε σημαντικά από την ομάδα της επέμβασης τόσο στο χρόνο που μεσολάβησε από την προσθήκη της πυτιάς μέχρι την έναρξη σχηματισμού πήγματος (r), όσο και στη συνεκτικότητα του πήγματος (A_{30}) (Πίνακας 14).

Όπως όμως φαίνεται στον πίνακα 14, οι δύο ομάδες παρουσίασαν διαφορές ($P < 0,05$), στο χρόνο που απαιτήθηκε για να σκληρύνει το πήγμα μέχρι το εύρος της διακλάδωσης να είναι 20 mm (K_{20}), όπου η ομάδα των ζώων της επέμβασης παρουσίαζε υψηλότερη τιμή K_{20} από αυτή των ζώων της ομάδας του μάρτυρα.

Πίνακας 14. Μέσοι όροι χαρακτηριστικών ιδιοτήτων πήξεως του γάλακτος προβάτων από τα δείγματα των ομάδων επέμβασης (T) και μάρτυρα (C) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Ιδιότητες πήξεως	Επέμβαση		Τυπικό φάσμα	P
	C (n = 44)	T (n = 44)		
r (min)	13,87	13,07	1,115	ns
K_{20} (min)	4,13	4,65	0,144	*
A_{30} (min)	37,62	35,09	1,532	ns

* $P < 0,05$, ns: $P > 0,05$

3.2.3 Σύνθεση λιπαρών οξέων στο λίπος του γάλακτος των προβάτων

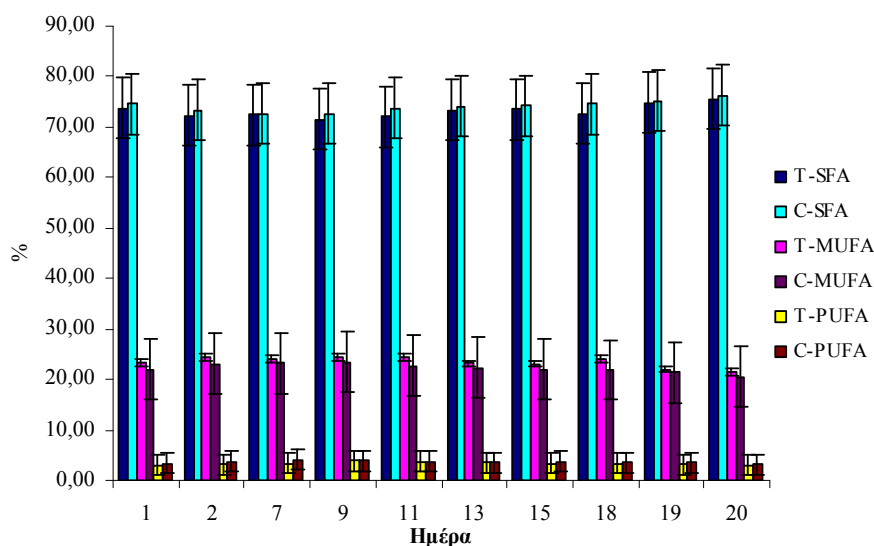
Τα αποτελέσματα σχετικά με τη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων στο λίπος του γάλακτος των προβάτων έδειξαν ότι για τα περισσότερα από αυτά δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα ζώα του μάρτυρα και της επέμβασης. Ωστόσο στατιστικώς σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν στο C₁₈ (P<0,05) το οποίο παρουσιάστηκε αυξημένο στα ζώα της ομάδας της επέμβασης σε σχέση με τα ζώα της ομάδας του μάρτυρα (Πίνακας 15). Μετά την έναρξη χορήγησης των τερπενίων στα ζώα της ομάδας της επέμβασης η συγκέντρωσή του C₁₈ ακολούθησε μια σημαντικά αυξητική πορεία μέχρι και την 11^η ημέρα οπότε και σημειώθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό στο C₁₈. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσής του η οποία επανήλθε στο επίπεδα που προσδιορίστηκαν κατά την 1^η ημέρα της χορήγησης των τερπενίων. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στις κατηγορίες λιπαρών οξέων, δηλαδή μεταξύ των κορεσμένων (SFA), μονοακόρεστων (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) λιπαρών οξέων μεταξύ των ζώων της ομάδας του μάρτυρα και της επέμβασης (Διάγραμμα 7).

Πίνακας 15. Μέσοι όροι της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων, ως ποσοστό επί του συνόλου (%), στο γάλα των προβάτων των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T).

Λιπαρό οξύ	Επέμβαση		Τυπικό σφάλμα	P
	C	T		
C ₄	1,65	1,63	0,290	ns
C ₆	2,08	1,19	0,227	ns
C ₈	2,60	2,26	0,219	ns
C ₁₀	8,71	7,40	0,656	ns
C ₁₂	4,85	4,42	0,321	ns
C ₁₄	13,47	12,29	0,307	ns
C _{14:1}	0,49	0,49	0,023	ns
C ₁₆	32,92	22,21	0,751	ns
C _{16:1}	1,19	1,09	0,219	ns
C ₁₈	6,85	8,33	0,416	*
C _{18:1}	20,54	21,88	1,002	ns
C _{18:2}	2,55	2,36	0,161	ns
C _{18:3}	0,72	0,67	0,065	ns
CLA	0,37	0,34	0,144	ns

*: P<0,05, ns: P>0,05

Διάγραμμα 7. Εξέλιξη της συγκέντρωσης ως ποσοστό επί του συνόλου (%) των κορεσμένων (SFA), μόνο- (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) λιπαρών οξέων στο λίπος του γάλακτος προβάτων των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

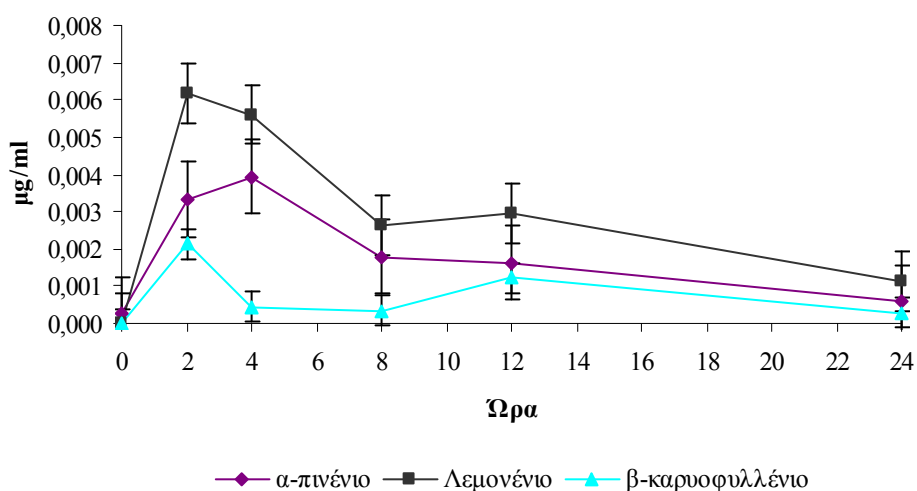


3.2.4 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης τερπενίων στο πλάσμα του αίματος των προβάτων

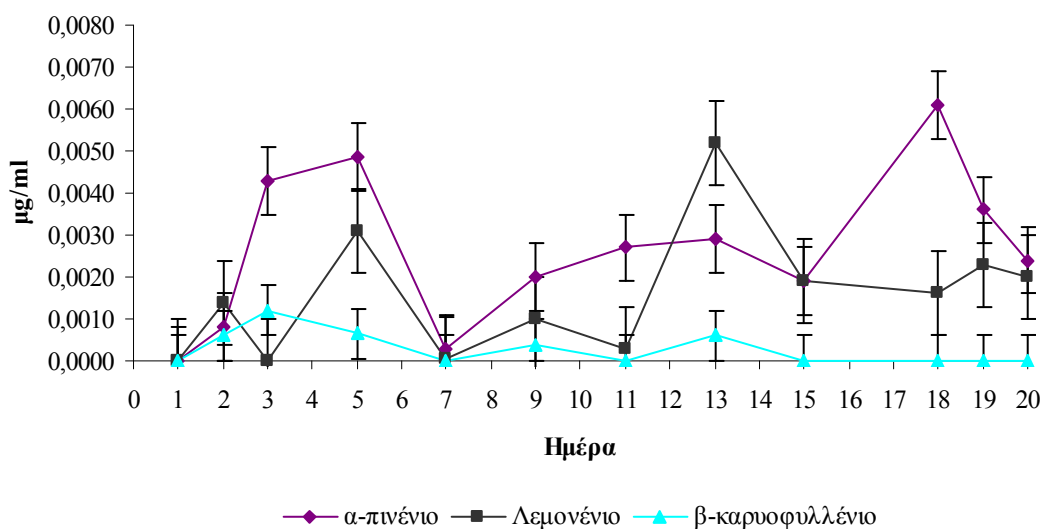
Η συγκέντρωση του α -πινενίου και του λεμονενίου στο πλάσμα του αίματος κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών μετά την χορήγηση του μίγματος των τερπενίων παρουσίασε την μέγιστη τιμή της 2 ώρες μετά τη χορήγηση με τη συγκέντρωση του λεμονενίου να είναι 2 φορές σχεδόν υψηλότερη από του α -πινενίου και 3 φορές ($P < 0,05$) από αυτή του β -καρνοφυλλενίου (Διάγραμμα 8). Τα τρία τερπένια ανιχνεύτηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα του αίματος της ομάδας της επέμβασης 24 ώρες μετά την χορήγηση τους (Διάγραμμα 8). Επιπλέον, κανένα από τα τερπένια δεν ανιχνεύτηκε στα ζώα της ομάδας του μάρτυρα. Η συγκέντρωσή τους σε όλη τη διάρκεια του πειράματος παρουσίασε παραλλακτικότητα ανάμεσα στις ημέρες για το α -πινένιο και το λεμονένιο ($P < 0,05$), ενώ το β -καρνοφυλλένιο ανιχνεύτηκε σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις (έως 0,002 $\mu\text{g/ml}$ πλάσματος) στα ζώα της ομάδας της επέμβασης σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 8). Αρχικά το α -πινένιο και το λεμονένιο παρουσίασαν αύξηση στη συγκέντρωσή τους μέχρι την 5^η ημέρα ενώ η συγκέντρωση του β -καρνοφυλλενίου αυξήθηκε μέχρι την 3^η ημέρα, όμως και τα τρία τερπένια παρουσίασαν πτώση στη συγκέντρωσή τους κατά την 7^η ημέρα (Διάγραμμα 9). Στη συνέχεια το α -πινένιο και το λεμονένιο αυξήθηκαν μέχρι την 13^η και 18^η ημέρα και

μειώθηκαν κατά την 15^η ημέρα και μετά το τέλος της χορήγησης των τερπενίων αντίστοιχα (Διάγραμμα 9). Αντίθετα το β-καρνοφυλλένιο παρέμεινε σε συγκεντρώσεις κοντά στο μηδέν μετά την 15^η ημέρα του πειράματος (Διάγραμμα 9).

Διάγραμμα 8. Εξέλιξη των μέσων όρων των συγκεντρώσεων (μg/ml) α-πινενίου, λιμονενίου και β-καρνοφυλλενίου κατά τις πρώτες 24 ώρες στο πλάσμα του αίματος των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια κατά τη διάρκεια του πειράματος.



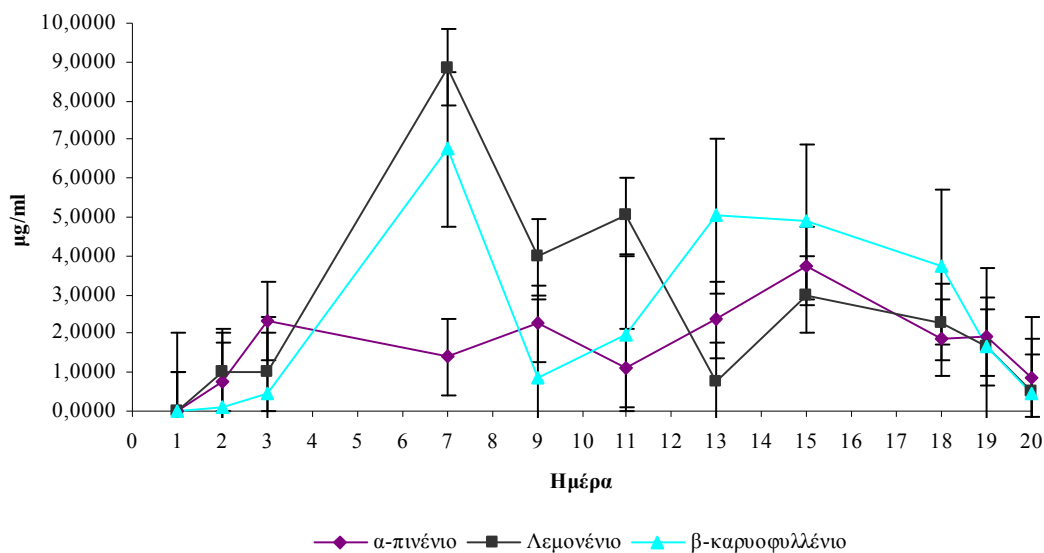
Διάγραμμα 9. Εξέλιξη των μέσων όρων των συγκεντρώσεων (μg/ml) α-πινενίου, λιμονενίου και β-καρνοφυλλενίου στο πλάσμα του αίματος των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια κατά τη διάρκεια του πειράματος.



3.2.5 Ανίχνευση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης τερπενίων στο γάλα των προβάτων

Η ανάλυση των δειγμάτων γάλακτος που ελήφθησαν από τα ζώα της ομάδας της επέμβασης έδειξαν ότι το α-πινένιο, λεμονένιο και το β-καρνοφυλλένιο ανιχνεύτηκαν σε όλα τα δείγματα της ομάδας της επέμβασης μετά την 3^η ημέρα από τη χορήγηση των τερπενίων παρόλο που οι συγκεντρώσεις διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις ημέρες (Διάγραμμα 10). Οι συγκεντρώσεις παρουσίασαν αύξηση μέχρι την 7^η ημέρα, η οποία ακολουθήθηκε από μείωση την 9^η ημέρα για το λεμονένιο και το β-καρνοφυλλένιο ($P < 0,05$). Παρόλα αυτά η συγκέντρωση του α-πινενίου στο γάλα φαίνεται να παραμένει στις συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν κατά την 3^η ημέρα (Διάγραμμα 10). Μετά τη λήξη της χορήγησης των τερπενίων την 18^η ημέρα παρατηρήθηκε συνεχής μείωση και στα τρία τερπένια μέχρι την τελευταία ημέρα της δειγματοληψίας ($P < 0,05$) (Διάγραμμα 10). Επιπλέον κανένα από τα τρία τερπένια δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα γάλακτος της ομάδας του μάρτυρα.

Διάγραμμα 10. Εξέλιξη των μέσων όρων των συγκεντρώσεων ($\mu\text{g/ml}$) α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου στο γάλα των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα τερπένια κατά τη διάρκεια του πειράματος.



3.2.6 Χημικά χαρακτηριστικά και συγκέντρωση λιπαρών οξέων στο πρόβειο τυρί

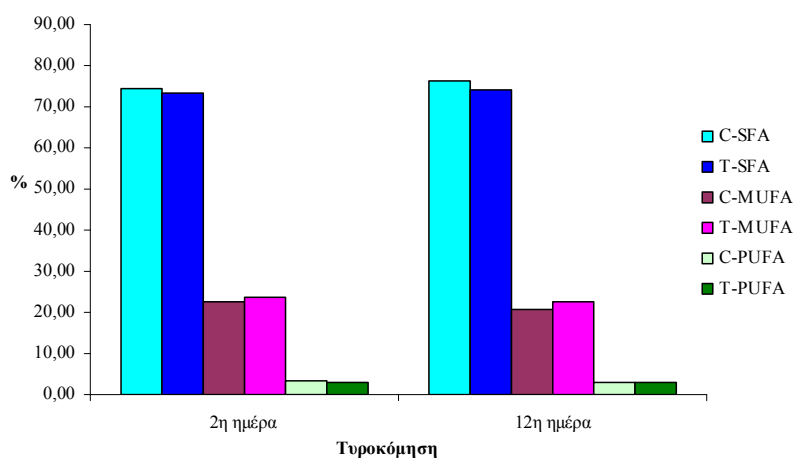
Η χημική σύσταση του τυριού που παρασκευάστηκε από το γάλα των ζώων των δύο ομάδων (C και T) δεν παρουσίασε διαφορές και στις δύο τυροκομήσεις που πραγματοποιήθηκαν (Πίνακας 16).

Πίνακας 16. Χημική σύσταση πρόβειου τυριού που παράχθηκε από τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) και στις δύο τυροκομήσεις (1 και 2).

Συστατικό				
	Υγρασία (%)	Λίπος (%)	Ολική Πρωτεΐνη (%)	Υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη (%)
Επέμβαση				
			1^η τυροκόμηση	
C	37,45	33,00	24,45	8,73
T	34,28	35,17	24,45	6,99
			2^η τυροκόμηση	
C	33,83	34,00	24,38	6,03
T	34,24	35,00	24,85	6,11

Η περιεκτικότητα του λίπους του τυριού των προβάτων σε κορεσμένα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA) και πολυακόρεστα (PUFA) λιπαρά οξέα κατά τις δύο τυροκομήσεις παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 11. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) ανιχνεύτηκαν και για τις δύο ομάδες σε ποσοστό 75% ενώ τα μονοακόρεστα (MUFA) και πολυακόρεστα (PUFA) λιπαρά οξέα προσδιορίστηκαν σε ποσοστά 20% και 3% αντίστοιχα για τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα και της επέμβασης.

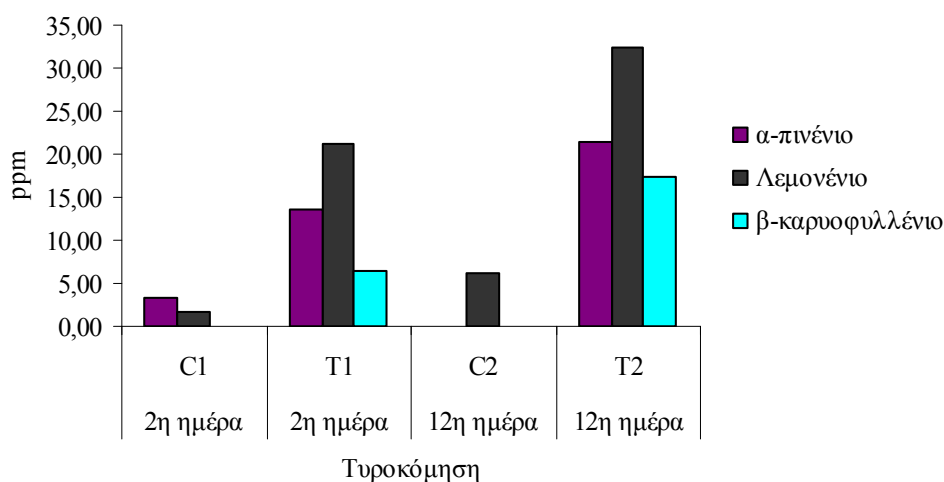
Διάγραμμα 11. Ποσοστό επί τοις εκατό των κορεσμένων (SFA), μονο- (MUFA) και πολυακόρεστων (PUFA) λιπαρών οξέων στο τυρί προβάτων των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τις 2 τυροκομήσεις.



3.2.7 Συγκέντρωση τερπενίων στο πρόβειο τυρί

Στο τυρί της ομάδας της επέμβασης ανιχνεύτηκαν και τα τρία τερπένια, ωστόσο μεγαλύτερη παρουσιάστηκε η συγκέντρωσή τους στη δεύτερη τυροκόμηση. Παρόλα αυτά και τα τρία τερπένια δεν ανιχνεύτηκαν στο τυρί σε ποσοστό ανάλογο με την ποσότητα η οποία χορηγήθηκε στα ζώα. Επιπλέον το λεμονένιο ανιχνεύτηκε και στα δύο δείγματα τυριού των ζώων της ομάδας του μάρτυρα. (C1-C2, Διάγραμμα 12).

Διάγραμμα 12. Συγκέντρωση (ppm) του α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου σε τυρί που παρασκευάστηκε από το γάλα των προβάτων των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια και των δύο τυροκομήσεων (1 και 2).



3.3. Σχολιασμός αποτελεσμάτων 1ου και 2ου πειράματος

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε σχέση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία η από του στόματος χορήγηση καθαρών τερπενίων στις αίγες και τα πρόβατα καθώς και η μελέτη τη μεταφοράς τους στο γάλα και το τυρί. Η δόση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκε ώστε να αντιστοιχεί περίπου στην ποσότητα που φυσιολογικά καταναλώνουν τα βόσκοντα ζώα (Utsumi *et al.*, 2009) και δεν διαφοροποιείται σε σχέση με τις ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν σε άλλα πειράματα (Dziba *et al.*, 2006; Dziba and Provenza, 2008; Villalba *et al.*, 2006a; Utsumi *et al.*, 2009) χωρίς τα ζώα να παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα που παραπέμπουν σε προβλήματα υγείας. Ειδικότερα, οι Dziba *et al.*, (2006) χορήγησαν έως 125 mg /kg ΣΒ 1,8-κινεόλης σε αρνιά εντός της μεγάλης κοιλίας και δεν παρατήρησαν καμία αρνητική επίδραση στην υγεία των ζώων. Η παραπάνω δόση ήταν συγκριτικά αρκετά μεγαλύτερη από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη και η οποία ήταν 42 mg/kg ΣΒ, όπου επίσης δεν παρατηρήθηκαν αρνητικές επιδράσεις. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί ότι στα ζώα που διατρέφονται σε θαμνώδεις και δασικούς βοσκότοπους (Πίνακας 3) η ποσότητα τερπενίων που χορηγήθηκε στην παρούσα μελέτη μπορεί να καταναλωθεί με τη λήψη για παράδειγμα 600 g του φυτού *Pistacia lentiscus*, 250g *Juniperous sp.* και 250g του φυτού *Bupleurum fruticosum*.

Η παραλλακτικότητα που παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των τερπενίων στο πλάσμα του αίματος, τόσο στις αίγες όσο και στα πρόβατα στην παρούσα μελέτη, έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων μελετών (Hollman *et al.*, 1997; Boyle *et al.*, 2002; Boyle *et al.*, 2005; McLean *et al.*, 2008). Ωστόσο οι Boyle *et al.*, (2002) προσδιόρισαν την υψηλότερη συγκέντρωση 1,8 κινεόλης στο πλάσμα του αίματος των πόσσουμ (*Trichosurus vulpecula*) 20 λεπτά μετά την χορήγηση του συστατικού από το στόμα. Αντίθετα στην παρούσα μελέτη η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε και για τα τρία τερπένια 4 ώρες μετά τη χορήγησή τους στις αίγες και 2 ώρες μετά τη χορήγησή τους στα πρόβατα. Επιπλέον όταν οι Boyle *et al.*, (2005) χορήγησαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 2 και 4 % του σιτηρεσίου) 1,8-κινεόλης σε πόσσουμ (*Trichosurus vulpecula*) διαπίστωσαν ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του μορίου αυτού στο πλάσμα του αίματος προσδιορίστηκαν 20 λεπτά, 1 ώρα και 2 ώρες αντίστοιχα μετά την χορήγηση του τερπενίου αυτού από το στόμα. Οι παραπάνω ερευνητές απέδωσαν αυτές τις διαφοροποιήσεις στο μικρότερο χρονικό διάστημα που τα ζώα αφιέρωναν για να

τραφούν όσο η συγκέντρωση της 1,8-κινεόλης αυξανόταν. Παρόλο που υπάρχουν μελέτες που εξετάζουν την παρουσία των τερπενίων στο πλάσμα του αίματος μετά την από του στόματος χορήγησή τους, αυτές αφορούν μικρότερα χρονικά διαστήματα που δεν ξεπερνούν τις 180 ώρες (Boyle et al. 1999; Boyle et al. 2002; Boyle et al. 2005; Dziba et al., 2006), ενώ τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζουν για πρώτη φορά πειραματικά δεδομένα για ένα σημαντικά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παραλλακτικότητα στη συγκέντρωση των τερπενίων που παρατηρήθηκε, παρόλο που η χορήγησή τους παρέμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, πιθανόν να επηρεάστηκε και από άλλους παράγοντες εκτός από τη δόση, όπως η ικανότητα του ήπατος και των ενζύμων του να αποδομήσουν τις ουσίες αυτές (McLean and Duncan 2006). Η διαδικασία αυτή σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές πραγματοποιείται μέσω των ενζύμων της ομάδας του κυτοχρώματος P450.

Η γαλακτοπαραγωγή τόσο των αιγών όσο και των προβάτων ήταν σύμφωνη με τα δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία (Albenzio *et al.*, 2006; Pirisi *et al.*, 2007; Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008). Ωστόσο όσον αφορά στις αίγες η παρουσία των τερπενίων στο σιτηρέσιό τους δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά τη γαλακτοπαραγωγή στην παρούσα μελέτη. Παρατηρήθηκε όμως στα ζώα της ομάδας της επέμβασης πτωτική τάση της παραγωγής γάλακτος σε σχέση με τα ζώα της ομάδας του μάρτυρα. Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται από τους Tornambe *et al.*, (2006) όπου αγελάδες που κατανάλωναν σιτηρέσιο πλούσιο σε τερπένια είχαν μικρότερη γαλακτοπαραγωγή σε σύγκριση με τα ζώα που δε λάμβαναν σιτηρέσιο πλούσιο σε τερπένια. Επίσης, οι Malecky *et al.*, (2009b) οι οποίοι χορήγησαν σε γαλακτοπαραγωγές αίγες μίγμα 4 τερπενίων (α-πινένιο, β-πινένιο, π-κυμένιο, λιναλοόλη) δεν βρήκαν διαφορές στη γαλακτοπαραγωγή αιγών που λάμβαναν μίγμα με υψηλή συγκέντρωση τερπενίων σε σύγκριση με τη γαλακτοπαραγωγή των ζώων που λάμβαναν μίγμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε τερπένια.

Παρόμοια, η παραγωγή του γάλακτος στα πρόβατα δεν επηρεάστηκε στατιστικώς σημαντικά στην παρούσα μελέτη, παρόλο που υπήρχε μια αυξητική τάση στη παραγωγή γάλακτος στα ζώα της ομάδας της επέμβασης σε σχέση με τα ζώα της ομάδας του μάρτυρα. Αυτό όμως φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση τόσο με τα αποτελέσματα των αιγών, όπου η ομάδα του μάρτυρα παρουσίασε μια τάση για

υψηλότερη γαλακτοπαραγωγή όσο και με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται από τους Malecky *et al.*, (2009b) όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω.

Τα χημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος των αιγών και των προβάτων δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την χορήγηση του μίγματος των τερπενίων. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Tornambe *et al.*, (2008) οι οποίοι βρήκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα χημικά χαρακτηριστικά γάλακτος αγελάδων οι οποίες λάμβαναν σιτηρέσιο με τερπένια. Πιο συγκεκριμένα οι παραπάνω ερευνητές βρήκαν υψηλότερη συγκέντρωση λίπους και χαμηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης στο γάλα των αγελάδων όταν διατρέφονταν σε βοσκότοπο με φυτά πλούσια σε περιεχόμενο τερπενίων. Αντίθετα οι Malecky *et al.* (2009b) δεν βρήκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην πρωτεΐνη και το λίπος του γάλακτος αιγών που λάμβαναν τερπένια και απέδωσαν αυτά τα αποτελέσματα στην απουσία επίδρασης των τερπενίων στον μεταβολισμό των συστατικών της τροφής εντός της μεγάλης κοιλίας. Επιπλέον, οι Santos *et al.*, (2010) αναφέρουν ότι όταν ένα μίγμα αιθερίων ελαίων, όπου περιέχονται τερπένια, προστέθηκε σε σιτηρέσιο αγελάδων, τα ζώα της ομάδας της επέμβασης είχαν υψηλότερη λιποπεριεκτικότητα από ότι τα ζώα της ομάδας του μάρτυρα.

Σε ότι αφορά στα χαρακτηριστικά της πήξεως του γάλακτος και για τα δύο είδη ζώων αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία (Park *et al.*, 2007). Ειδικά σε ότι αφορά τις αίγες, η διαφορά που παρατηρήθηκε στο χρόνο που απαιτείται για την έναρξη σχηματισμού πήγματος (r) μεταξύ των δύο ομάδων, με την ομάδα της επέμβασης να παρουσιάζει υψηλότερη τιμή, μπορεί να ερμηνευτεί από την χαμηλότερη συγκέντρωση του λίπους στα ζώα της ομάδας της επέμβασης καθώς όπως αναφέρεται και από τους Scintu *et al.*, (2007), υπάρχει αρνητική συσχέτιση του r και της συγκέντρωσης του λίπους του γάλακτος. Οι τιμές που παρατηρούνται στο πρόβειο γάλα στο χρόνο που απαιτείται για να σκληρύνει το πήγμα μέχρι το εύρος της διακλάδωσης να είναι 2 cm (K_{20}) συμφωνούν με τις τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Bencini, 2002; Park *et al.*, 2007). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των προβάτων όσον αφορά την παράμετρο K_{20} έρχονται τα αποτελέσματα των Jaramillo *et al.*, (2009) οι οποίοι παρατήρησαν ότι τα γάλα των ζώων που είχαν διατραφεί με σιτηρέσιο πλούσιο σε εσπεριδοειδή απαιτούσε περισσότερο χρόνο για να σκληρύνει το πήγμα σε σχέση με το γάλα των ζώων που ελάμβαναν σιτηρέσιο με μικρή ή καθόλου προσθήκη εσπεριδοειδών. Ωστόσο οι διαφορές που εντοπίζονται στην παράμετρο K_{20} ανάμεσα στις δύο ομάδες, φαίνεται

να οφείλονται στην αρνητική συσχέτιση με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης που διαφοροποιούνται στις ομάδες του μάρτυρα και της επέμβασης. Φαίνεται δηλαδή ότι η υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης μειώνει το χρόνο που απαιτείται για να σκληρύνει το πήγμα όπως αναφέρεται και από άλλους ερευνητές (Bencini, 2002).

Τα αποτελέσματα που αφορούν στη σύνθεση των λιπαρών οξέων και πιο συγκεκριμένα στα C₁₀ και C₁₈ καθώς και στο CLA στο λίπος του γάλακτος των αιγών και το C₁₈ στο γάλα των προβάτων τα οποία παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05), έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Revello-Chion *et al.* (2010). Οι παραπάνω ερευνητές παρατήρησαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση τερπενίων στο γάλα μεταξύ ζώων που είχαν διατραφεί σε βοσκές με φυτική ύλη φτωχή σε τερπένια, σε σύγκριση με το γάλα των ζώων που προερχόταν από βοσκές πλούσιες σε τερπένια τα οποία ανιχνεύτηκαν στο γάλα των ζώων σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση στα κορεσμένα λιπαρά οξέα σε βοσκές με χαμηλή περιεκτικότητα σε τερπένια σε σύγκριση με βοσκές πλούσιες σε τερπένια στις οποίες η συγκέντρωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων ήταν χαμηλότερη. Αντίστοιχα τα μονο- και πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση όταν προέρχονταν από πλούσιες σε τερπένια βοσκές και χαμηλότερη συγκέντρωση όταν προέρχονταν από βοσκές φτωχές σε τερπένια. Το γεγονός αυτό έρχεται ωστόσο σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όπου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα κορεσμένα, τα μονο και τα πολύ ακόρεστα λιπαρά οξέα στις δύο ομάδες ζώων. Επίσης, σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι De Nino και Batteli (2008) βρήκαν σημαντική επίδραση στην αύξηση της συγκέντρωσης του CLA στο λίπος του γάλακτος αγελάδων που έβοσκαν σε ορεινούς βοσκότοπους, στους οποίους κατά κύριο λόγο συναντώνται φυτά με σημαντική συγκέντρωση τερπενίων, σε σχέση με αυτό που προερχόταν από ζώα που έβοσκαν σε πεδινές βοσκές. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του CLA των αιγών που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη, όπου η συγκέντρωσή τους ήταν μεγαλύτερη στα ζώα που λάμβαναν τερπένια, σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας του μάρτυρα. Στις μελέτες που αναφέρθηκαν ωστόσο δεν είναι δυνατό να αποδειχθεί αν τα τερπένια ή κάποια άλλα συστατικά της βοσκής ήταν αυτά που προκάλεσαν τις αλλαγές στο προφίλ των λιπαρών οξέων. Θα πρέπει βέβαια να επισημανθεί ότι και στις δύο προαναφερόμενες μελέτες τα ζώα κατανάλωναν φυτική ύλη με διαφορετική περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα γεγονός που φανερώνει ότι και αυτός ο παράγοντας επηρέασε τη συγκέντρωση

των λιπαρών οξέων στο τελικό προϊόν. Ωστόσο, όπως ήδη αναφέρθηκε οι De Nino και Batteli (2008) συσχέτισαν την υψηλή συγκέντρωση τερπενίων και την αυξημένη συγκέντρωση λιπαρών οξέων όπως το C₁₈ και CLA με την κατανάλωση συγκεκριμένων ειδών φυτικής ύλης που ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των δικοτυλήδων και απαντώνται σε ορεινές βοσκές πλούσιες σε τερπένια.

Στην παρούσα μελέτη οι διαφορετικές συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων που εντοπίζονται πιθανόν να οφείλονται και στην φυσική παραλλακτικότητα μεταξύ των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο στην περίπτωση των αιγών όσο και στην περίπτωση των προβάτων τα ζώα των ομάδων του μάρτυρα και της επέμβασης κατανάλωναν το ίδιο σιτηρέσιο και η μόνη διαφοροποίηση που υπήρχε στο σιτηρέσιό τους ήταν η προσθήκη τερπενίων σε αυτό. Είναι δηλαδή πιθανό τα τερπένια να αλλάζουν την ικανότητα των μικροοργανισμών της Μ.Κ. να μεταβολίσουν τα λιπαρά οξέα της τροφής. Επιπλέον μια πιθανή εξήγηση στις διαφορές που εντοπίζονται στο προφίλ των λιπαρών οξέων ανάμεσα στα ζώα των ομάδων του μάρτυρα και της επέμβασης θα μπορούσε να είναι η αλλαγή, με την παρουσία των τερπενίων, στην έκφραση κάποιων γονιδίων, όπως για παράδειγμα εκείνων της Δ⁹-αφυδρογονάσης (Tsiplakou *et al.*, 2008) η οποία επηρεάζει τη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων και ειδικότερα του CLA στο γάλα.

Η εμφάνιση των τερπενίων στο γάλα πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα τριών ημερών μετά την έναρξη της χορήγησής τους και για τα δύο είδη ζώων γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών (Buchin *et al.*, 1999; Viallon *et al.*, 2000). Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος, όπου τα μονοτερπένια (α-πινένιο, λεμονένιο) ανιχνεύτηκαν σε όλα τα δείγματα γάλακτος των αιγών και των προβάτων των ομάδων επέμβασης, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν στους μάρτυρες, δείχνουν ότι πιθανόν αυτά θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες για την αναγνωρισιμότητα του γάλακτος. Σε αυτό το συμπέρασμα κατέληξαν και οι Priolo *et al.* (2004) οι οποίοι συμπέραναν ότι τα πτητικά συστατικά, όπως τα τερπένια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες σε προϊόντα που προέρχονται από ζώα που έχουν τραφεί στη βοσκή. Όσον αφορά στο β-καρνοφυλλένιο αυτό προσδιορίστηκε μόνο στα δείγματα γάλακτος των προβάτων που λάμβαναν τερπένια ενώ ανιχνεύτηκε σε ελάχιστα δείγματα του γάλακτος των αντίστοιχων αιγών. Παρατηρείται δηλαδή αφενός μια διαφοροποίηση στα δύο είδη ζώων, ειδικά ως προς το β-καρνοφυλλένιο, ενώ τα αποτελέσματα από τις αίγες έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Tornambe *et al.*, (2006) οι οποίοι μελέτησαν την αλλαγή του προφίλ των τερπενίων

σε γάλα αγελάδων που διατρέφονταν στη βοσκή και συμπέραναν ότι τα σεσκιτερπένια και ειδικότερα το β-καρυοφυλλένιο αποτελεί περισσότερο αξιόπιστο βιοδείκτη σε σχέση με τα μονοτερπένια.

Αυτό που θα πρέπει να αναφερθεί είναι ότι αρχικά αναμενόταν η συγκέντρωση των τερπενίων στο γάλα των προβάτων να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των αιγών γεγονός που επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Η υπόθεση αυτή αρχικά τέθηκε εξαιτίας της ικανότητας των αιγών να καταναλώνουν μεγαλύτερη ποικιλία φυτών όπως θαμνώδη και ξυλώδη βλάστηση στα οποία η συγκέντρωση των τερπενίων είναι μεγαλύτερη. Αυτό θεωρήθηκε ότι αποτελούσε ένδειξη ότι οι αίγες θα ήταν περισσότερο “εξοικειωμένες” με την κατανάλωση ενώσεων όπως τα τερπένια και κατά συνέπεια και με την αποτοξίνωση των ουσιών αυτών από τον οργανισμό τους. Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι η εφάπαξ δόση με την οποία τα ζώα στον παρόντα πειραματισμό λάμβαναν τερπένια δεν ανταποκρίνεται σε πραγματικές συνθήκες βόσκησης, κατά τη διάρκεια της οποίας τα ζώα λαμβάνουν την τροφή σταδιακά και κατά συνέπεια και τα τερπένια που βρίσκονται σε αυτή. Η διαφορά αυτή πιθανόν να είχε επίδραση στη διαφοροποίηση των συγκεντρώσεων των τερπενίων που θα προσδιορίζονταν σε βόσκοντα ζώα. Η σταδιακή έκθεση των μικροοργανισμών της Μ.Κ. στα τερπένια πιθανόν να επιτρέπει υψηλότερη απόδοση στον μεταβολισμό των τερπενίων στη Μ.Κ. Από την άλλη πλευρά η βαθμιαία είσοδος των τερπενίων στην κυκλοφορία του ζώου πιθανόν να επιτρέπει την αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή τους από τους μηχανισμούς αποτοξίνωσης. Φαίνεται δηλαδή ότι η προσαρμογή των ζώων στη κατανάλωση ενός συστατικού της τροφής όπως τα τερπένια έχει σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά του στο ζωικό οργανισμό γεγονός που επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες (Mote *et al.*, 2008). Επιπλέον, η διαφορά στη συγκέντρωση των τερπενίων στο γάλα αιγών και προβάτων θα μπορούσε να αποδοθεί και στη μεγαλύτερη παραμονή των συστατικών της τροφής, κατά συνέπεια και των τερπενίων, στο πεπτικό σύστημα των προβάτων σε σχέση με τις αίγες.

Ο προσδιορισμός των τερπενίων στο τυρί των αιγών έδειξε ότι τα ίδια μονοτερπένια (α-πινένιο και λεμονένιο) ανιχνεύτηκαν και στο τυρί που παρασκευάστηκε από τις αίγες της ομάδας της επέμβασης. Σε αυτή την περίπτωση, παρόλο που το λεμονένιο ανιχνεύτηκε σε όλα τα τυριά της ομάδας της επέμβασης, ανιχνεύτηκε και στα τυριά της ομάδας του μάρτυρα, αλλά σε μικρότερες βέβαια συγκεντρώσεις. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του γάλακτος των αιγών όπου το β-

καρνοφυλλένιο δεν ανιχνεύτηκε στα περισσότερα δείγματα γάλακτος, στα δείγματα του τυριού ανιχνεύτηκε το τερπένιο αυτό και αυτό δημιουργεί ερωτήματα ως προς τη χρήση του συγκεκριμένου συστατικού ως βιοδείκτη, τουλάχιστον όσον αφορά στις αίγες.

Επιπλέον και τα τρία τερπένια (α-πινένιο, λεμονένιο και β-καρνοφυλλένιο) προσδιορίστηκαν επίσης και στο πρόβειο τυρί που παρασκευάστηκε από τα ζώα της ομάδας της επέμβασης, αλλά σε διαφορετική αναλογία από την ποσότητα η οποία είχε χορηγηθεί στα ζώα. Ωστόσο κάποια από αυτά (α-πινένιο και λεμονένιο) προσδιορίστηκαν, σε μικρότερες βέβαια συγκεντρώσεις, στο τυρί που προήλθε από τα ζώα της ομάδας του μάρτυρα. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις για το α-πινένιο και το λεμονένιο στο τυρί τόσο των αιγών όσο και των προβάτων σε σχέση με το β-καρνοφυλλένιο γεγονός που δείχνει ότι τα δύο πρώτα θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες.

Παρόλο αυτά και σε αντίθεση με τα παραπάνω έρχονται μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε αγελάδες (Fernandez *et al.*, 2003; Tornambe *et al.*, 2006) οι οποίες συμπέραναν ότι τα σεσκιτερπένια και κυρίως το β-καρνοφυλλένιο αποτέλεσε πιο αξιόπιστο βιοδείκτη από ότι τα μονοτερπένια. Οι παραπάνω ερευνητές προσδιόρισαν τα τερπένια στο γάλα αγελάδων που προέρχονταν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και διαπίστωσαν ότι η ομάδα των σεσκιτερπενίων ήταν αυτή που μπορούσε να διαφοροποιήσει το γάλα των διαφορετικών περιοχών. Έτσι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα σεσκιτερπένια αποτελούν καλύτερο βιοδείκτη για τη διάκριση των γαλακτοκομικών προϊόντων που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Φαίνεται δηλαδή, σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε αγελάδες ότι τα σεσκιτερπένια ανταποκρίνονται καλύτερα στις ιδιότητες του βιοδείκτη για την αναγνωρισιμότητα των προϊόντων διαφορετικών περιοχών. Παρατηρείται δηλαδή μια διαφοροποίηση ανάμεσα στην ανταπόκριση του κάθε συστατικού στα διαφορετικά είδη ζώων. Πιθανή εξήγηση για την διαφοροποίηση αυτή θα μπορούσε να είναι οι διαφορές που αναφέρθηκαν τόσο στην επιλογή διαφορετικών φυτικών ειδών κατά τη βόσκηση όσο και στις διαφορές στο πεπτικό σύστημα των διαφορετικών ειδών ζώων.

Σε ότι αφορά στα κορεσμένα, μονο- και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που προσδιορίστηκαν στο τυρί δεν παρουσιάστηκαν διαφορές ανάμεσα, τόσο στις αίγες όσο και στα πρόβατα, στις ομάδες του μάρτυρα και της επέμβασης. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με εκείνων των DeNino και Batteli (2008) οι οποίοι

βρήκαν σημαντικές διαφορές στα λιπαρά οξέα του τυριού, κυρίως στο CLA και στο C₁₈, ανάμεσα σε αγελάδες που κατανάλωναν σιτηρέσιο πλούσιο σε τερπένια σε σχέση με εκείνες που λάμβαναν σιτηρέσιο με μικρή συγκέντρωση τερπενίων σε αυτό.

Ο προσδιορισμός των τερπενίων στο τυρί των αιγών και των προβάτων έδειξε την παρουσία και των τριών τερπενίων στα δείγματα και των δύο ομάδων. Είναι γνωστό ότι το τυρί είναι ένα συμπυκνωμένο προϊόν του γάλακτος, οπότε ουσίες που βρίσκονται στο γάλα σε μικρές ποσότητες είναι πιο εύκολο να ανιχνευτούν στο τυρί. Το γεγονός αυτό πιθανόν εξηγεί και την ανίχνευση του β-καρνοφυλλενίου στο τυρί της ομάδας της επέμβασης των αιγών το οποίο απουσίαζε από το γάλα της ίδια ομάδας ζώων. Δεδομένου ότι η ωρίμανση είναι μια σύνθετη διαδικασία ζυμώσεων είναι δυνατό να αλλάξει το προφίλ των τερπενίων εξαιτίας της βιοαποδόμησης (de Carvalho and da Fonseca, 2006). Επιπλέον από τους Viallon *et al.*, (1999) επισημαίνεται ότι το προφίλ των τερπενίων στο τυρί που προέρχονταν από αγελάδες που κατανάλωναν βοσκή διαφορετικής φυτικής σύστασης διέφερε σημαντικά τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά. Παρόλα αυτά οι Revello-Chion *et al.*, (2010) βρήκαν ότι καμία διαφορά δεν υπήρχε στο προφίλ των τερπενίων ανάμεσα σε γάλα που προερχόταν από βόσκουσες αγελάδες και στο αντίστοιχο ώριμο τυρί. Σε συμφωνία με τους Revello-Chion *et al.*, (2010) έρχονται και τα αποτελέσματα των Gaspardo *et al.*, (2009) οι οποίοι δεν βρήκαν καμία διαφορά στη συγκέντρωση των τερπενίων ανάμεσα στο γάλα αγελάδων και στο αντίστοιχο ώριμο τυρί. Άλλοι ερευνητές (Cornu *et al.*, 2005) υποστηρίζουν ότι τα τερπένια τροποποιούν τη δυναμική ή τη δραστηριότητα του μικροβιακού οικοσυστήματος κατά τη διάρκεια της παρασκευής του τυριού και στη συνέχεια της ωρίμανσης. Ωστόσο ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται η διαδικασία αυτή δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

Παρόλο που τα τερπένια ανιχνεύτηκαν στο πλάσμα του αίματος, το γάλα και το τυρί των ζώων της ομάδας της επέμβασης (T), τόσο των αιγών όσο και των προβάτων, η συγκέντρωσή τους διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις ημέρες. Αυτή η παραλλακτικότητα αναφέρεται επίσης και από τους Viallon *et al.*, (2000), οι οποίοι βρήκαν ότι η συγκέντρωση των τερπενίων στο πλάσμα του αίματος και το γάλα διέφερε σημαντικά, παρόλο που η χορήγησή τους στα ζώα ήταν συνεχής. Επίσης, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όσον αφορά στην παραλλακτικότητα των τερπενίων στο γάλα έρχονται τα αποτελέσματα των De Noni και Batteli (2008), οι οποίοι σε δείγματα γάλακτος αγελάδων εντόπισαν σημαντική ημερήσια παραλλακτικότητα στην συγκέντρωσή τους σε τερπένια. Αυτό μπορεί να

αποδοθεί στο γεγονός ότι τα τερπένια μεταβολίζονται στον οργανισμό του ζώου και διασπώνται εντός του ζωικού οργανισμού σε διαφορετικά όργανα (μεγάλη κοιλία, ήπαρ, νεφροί) όπου ο ρυθμός της απέκκρισης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες (Villalba *et al.*, 2006b). Οι McLean *et al.*, (1993) αναφέρουν ότι τα τερπένια απορροφώνται από το έντερο ως λιπόφιλα συστατικά και απαιτούν να μεταβολιστούν προς υδρόφιλα πριν την απέκκριση από τα ούρα.

Ο μεταβολισμός των τερπενίων στη Μ.Κ. αποτελεί το πρώτο βήμα για την απαλλαγή του οργανισμού από τις ανεπιθύμητες ενώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών. Η δυνατότητα αυτή καθώς και οι πιθανοί παράγοντες που την επηρεάζουν δεν έχουν περιγραφεί καθόλου στη σχετική βιβλιογραφία.

4. Πείραμα 3ο - Μελέτη του ρυθμού αποδόμησης των τερπενίων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας αιγών και προβάτων

4.1 Υλικά και Μέθοδοι

4.1.1 Προπειραματική διαδικασία

Για την μελέτη του ρυθμού αποδόμησης των τερπενίων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας πραγματοποιήθηκε προπειραματική διερεύνηση προκειμένου να προσδιοριστεί το κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο και να προσδιοριστούν οι κατάλληλοι χρόνοι λήψεως των δειγμάτων.

4.1.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στην πειραματική εγκατάσταση του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα ενήλικα υγιή αρσενικά ζώα – δύο κριοί (Ζ.Β 56 kg) και δύο τράγοι- (Ζ.Β 65 kg.). Τα ζώα βρίσκονταν στον ίδιο χώρο ο οποίος είναι κατάλληλα διαμορφωμένος ώστε να πληροί τις προδιαγραφές όσον αφορά στην υγεία και την ευζωία των ζώων. Το πείραμα διήρκεσε 6 εβδομάδες όπου τα ζώα διατρέφονταν ομαδικά και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό. Το σιτηρέσιο που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από μηδική και άχυρο καθώς και εμπορικό μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Από τα ζώα ελήφθησαν δείγματα υγρού μεγάλης κοιλίας (Μ.Κ) με τη βοήθεια οισοφαγικού καθετήρα. Η δειγματοληψία ακολουθούσε το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο σε όλη τη διάρκεια του πειράματος και πραγματοποιούνταν το πρωί πριν τη λήψη τροφής από τα ζώα. Η επιλογή της μεθόδου αυτής έγινε με κύριο γνώμονα την εξασφάλιση της ευζωίας γεγονός που δεν μπορούσε να διασφαλιστεί με τη χρήση συριγγίων τα οποία παραβιάζουν βασικές αρχές της. Επιπλέον στόχος ήταν να μην έχει διαταραχθεί το αναερόβιο περιβάλλον της Μ.Κ., το οποίο στα ζώα με συρίγγιο εκτίθεται συχνά στον ατμοσφαιρικό αέρα. Τα δείγματα ελήφθησαν υπό συνθήκες θερμικής σταθερότητας ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα σημαντικής διαφοροποίησης στο μικροβιακό πληθυσμό του δείγματος.

Την 1^η και 2^η εβδομάδα του πειράματος το σιτηρέσιο των ζώων δεν περιείχε τερπένια. Την 3^η και 4^η εβδομάδα (15^η ημέρα) του πειράματος στα ζώα χορηγούνταν κάθε πρωί από το στόματος 1 g από κάθε ένα από τα παρακάτω τερπένια: α-πινένιο, λεμονένιο, β-καρνοφυλλένιο (Sigmaaldrich: No.2320878 USA, No.2278135 Switzerland, No.2017461 Spain) με καθαρότητα 98,5%. Ένα μίγμα και των τριών τερπενίων παρασκευάστηκε, με τη χρήση φυτικού ελαίου ως φορέα με σκοπό να

παρέχει την ποσότητα τερπενίων που είχε προκαθοριστεί σε συνολικό όγκο 10 ml μίγματος τερπενίων φυτικού ελαίου. Την 5^η και 6^η εβδομάδα του πειράματος τα ζώα λάμβαναν σιτηρέσιο χωρίς την προσθήκη τερπενίων. Στο τέλος κάθε εβδομάδας γινόταν λήψη υγρού μεγάλης κοιλίας από τα ζώα με σκοπό την *in vitro* μελέτη του ρυθμού αποδόμησης των τερπενίων.

Το δείγματα τοποθετούνταν σε γυάλινα δοχεία συλλογής και μεταφέρονταν άμεσα στο εργαστήριο προκειμένου να διαχωριστούν σε κάθε μία από τις δοκιμές. Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* και οι οποίες έγιναν σε διπλή επανάληψη ήταν οι παρακάτω: 1) διαλύματα πλήρους υγρού Μ.Κ. (RF) 2) Μάρτυρας (NRF). Σε κάθε μία από τις δοκιμές 9 ml από κάθε διάλυμα τοποθετήθηκαν σε γυάλινους σωλήνες καλλιέργειας που έφεραν βιδωτό καπάκι με PTFE. Σε κάθε έναν από τους σωλήνες καλλιέργειας προστέθηκε 1 ml διάλυμα PBS-Tween 20 στο οποίο υπήρχαν 100 μg/ml των τερπενίων: α-πινένιο, λεμονένιο, β-καρυοφυλλένιο. Ο τελικός συνολικός όγκος ήταν 10 ml. Σαν μάρτυρας (NRF) χρησιμοποιήθηκαν σωλήνες με ρυθμιστικό διάλυμα PBS στο οποίο προστέθηκε 1 ml διάλυμα PBS-Tween 20 με 100 μg/ml των τερπενίων: α-πινένιο, λεμονένιο, β-καρυοφυλλένιο. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν στους 39°C σε επωαστικό κλίβανο που έφερε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, (90% N₂ και 10% CO₂). Δείγματα 1 ml από κάθε ένα από τους σωλήνες καλλιέργειας του διαλύματος πλήρους υγρού Μ.Κ. και του μάρτυρα (NRF) ελήφθησαν στους χρόνους 0, 2, 4, 8, 21, 24 ώρες μετά τη προσθήκη των τερπενίων. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι να αναλυθούν για την περιεκτικότητά τους σε τερπένια.

4.1.3 Ανάλυση δειγμάτων υγρού μεγάλης κοιλίας σε τερπένια

Τα δείγματα, αφού αποψύχθηκαν, αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των τερπενίων σε αυτά. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα διχλωρομεθανίου/μεθανόλης σε αναλογία 2:1. Έτσι στο 1ml του δείγματος προστέθηκαν αρχικά 500 μl του διαλύματος διχλωρομεθανίου/μεθανόλης και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση σε 2000×g για 7 λεπτά και συλλέχθηκε η οργανική φάση. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε με άλλα 500 μl διαλύματος διχλωρομεθανίου/μεθανόλης και στη συνέχεια με 250 μl διχλωρομεθανίου και φυγοκεντρήθηκαν όπως περιγράφεται πιο πάνω. Τα εκχυλίσματα ενοποιήθηκαν και στη συνέχεια 1ml τοποθετήθηκε σε φιαλίδια χρωματογραφίας και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι να αναλυθούν για την περιεκτικότητά τους σε τερπένια.

4.1.4 Υπολογισμοί και στατιστική επεξεργασία

Οι συγκεντρώσεις των τερπενίων που προσδιορίστηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί ο ρυθμός αποδόμησης κάθε τερπενίου. Με τη χρήση της εκθετικής εξίσωσης :

$$y_t = a \times e^{bt}$$

προσδιορίστηκε ο ρυθμός αποδόμησης των τερπενίων b , όπου y είναι η συγκέντρωση του εκάστοτε τερπενίου σε χρόνο t , a η αρχική συγκέντρωση και t ο χρόνος της δειγματοληψίας.

Στο ρυθμό αποδόμησης των τερπενίων μεταξύ των δειγμάτων του υγρού της μεγάλης κοιλίας (RF) και του μάρτυρα (NRF) έγινε σύγκριση με τη χρήση του μη παραμετρικού Mann-Whitney t-test.

Η σύγκριση της παραλλακτικότητας των ρυθμών αποδόμησης μεταξύ των εβδομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης (one way ANOVA). Το Levene's test έδειξε πως η υπόθεση της ίσης διακύμανσης δεν απορρίπτεται. Οι διαφορές που προέκυψαν (π.χ. Διαφορά ρυθμών αποδόμησης τερπενίου/h = Ρυθμός αποδόμησης τερπενίου/h εβδομάδας 1 - Ρυθμός αποδόμησης τερπενίου/h εβδομάδας 2) αναλύθηκαν με τη χρήση του Bonferroni post-hoc test (SPSS, version 17, 1996).

4.2 Αποτελέσματα 3ου πειράματος

4.2.1 Προσδιορισμός ρυθμού αποδόμησης τερπενίων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας

Ο μέσος ρυθμός αποδόμησης του κάθε τερπενίου διέφερε σημαντικά από το ρυθμό αποδόμησης του μάρτυρα (Πίνακας 17).

Πίνακας 17. Συνολικός μέσος όρος ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) των τερπενίων από ομαδοποίηση των δεδομένων ως προς τα είδη ζώων και τον πειραματικό χρόνο.

Συστατικό	Επέμβαση		P
	RF (n=24)	NRF (n=12)	
α-πινένιο	0,0355±0,0067	0,0010±0,0000	*
λεμονένιο	0,049±0,0083	0,0005±0,0002	*
β-καρνοφυλλένιο	0,0432±0,0107	0,0013±0,0002	*

*(P<0,05), RF: Υγρό μεγάλης κοιλίας, NRF: Μάρτυρας

Πιο αναλυτικά στον πίνακα 18 παρουσιάζεται ο μέσος όρος του ρυθμού αποδόμησης του α-πινενίου στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ανά εβδομάδα. Δεν παρουσιάζονται ιδιαίτερες διαφορές ωστόσο παρατηρείται μια τάση σημαντικότητας ($P = 0,084$) ανάμεσα στην δεύτερη εβδομάδα κατά την οποία δεν χορηγούνταν το μίγμα των τερπενίων και την πέμπτη εβδομάδα η οποία ήταν η πρώτη εβδομάδα μετά τη διακοπή της χορήγησης των τερπενίων. Επίσης μια τάση ($P = 0,091$) εντοπίζεται ανάμεσα στην τρίτη εβδομάδα η οποία είναι η πρώτη εβδομάδα χορήγησης του μίγματος των τερπενίων με την πέμπτη εβδομάδα.

Πίνακας 18. Σύγκριση των διαφορών των συνολικών μέσων όρων του ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) του α-πινενίου στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ανεξάρτητα από το είδος του ζώου ανά εβδομάδα.

Εβδομάδα	1	2	3	4	5	6
1		-0,004	-0,019	-0,046	-0,018	0,012
Τυπικό σφάλμα		0,0048	0,0086	0,0244	0,0057	0,1451
P<		0,983	0,507	0,657	0,257	0,987
2			-0,015	-0,042	-0,022	0,017
Τυπικό σφάλμα			0,0085	0,0244	0,0055	0,0144
P<			0,715	0,730	0,084 [†]	0,932
3				-0,027	-0,037	0,032
Τυπικό σφάλμα				0,0254	0,0091	0,0161
P<				0,965	0,091 [†]	0,598
4					-0,063	0,585
Τυπικό σφάλμα					0,0246	0,280
P<					0,401	0,539
5						-0,005
Τυπικό σφάλμα						0,0148
P<						1,000

[†]: τάση

Όσον αφορά στο λεμονένιο (Πίνακας 19) παρουσιάζεται ο μέσος όρος του ρυθμού αποδόμησης από το υγρό της μεγάλης κοιλίας ανά εβδομάδα. Όπως φαίνεται υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0,05$) ανάμεσα στη πρώτη εβδομάδα κατά την οποία δεν χορηγούνταν το μίγμα των τερπενίων και την πέμπτη εβδομάδα κατά την πρώτη εβδομάδα δηλαδή μετά το τέλος της χορήγησης των τερπενίων. Παρατηρείται επίσης μια τάση ($P = 0,064$) ανάμεσα στην τρίτη εβδομάδα η οποία είναι η πρώτη εβδομάδα χορήγησης των τερπενίων και την πέμπτη εβδομάδα κατά την οποία η χορήγηση των τερπενίων είχε σταματήσει. Το β-καρβοφυλλένιο

(Πίνακας 20) δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο ρυθμό αποδόμησης ανά εβδομάδα.

Πίνακας 19. Σύγκριση των διαφορών των συνολικών μέσων όρων του ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) του λεμονενίου στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ανεξάρτητα από το είδος του ζώου ανά εβδομάδα.

Εβδομάδα	1	2	3	4	5	6
1		0,004	-0,026	-0,062	0,021	0,021
Τυπικό σφάλμα		0,0084	0,0087	0,0273	0,0028	0,0093
P<		1,000	0,317	0,505	0,032*	0,528
2			-0,029	-0,066	0,018	0,170
Τυπικό σφάλμα			0,0122	0,0286	0,0090	0,1264
P<			0,398	0,481	0,619	0,897
3				-0,036	0,047	0,046
Τυπικό σφάλμα				0,0287	0,0092	0,0128
P<				0,909	0,064 [†]	0,102
4					0,083	0,083
Τυπικό σφάλμα					0,0275	0,0289
P<					0,297	0,304
5						-0,005
Τυπικό σφάλμα						0,0097
P<						1,000

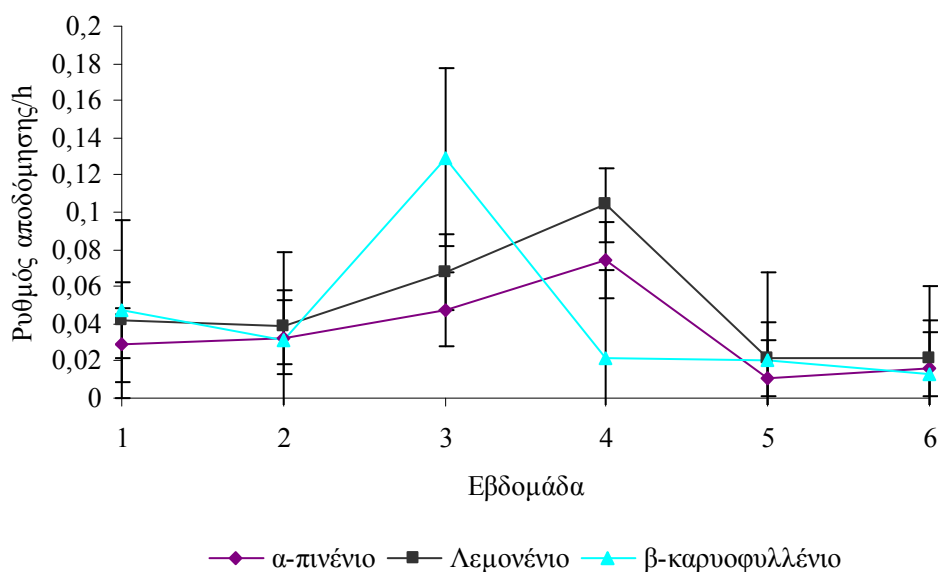
*: $P < 0,05$, [†]: τάση

Πίνακας 20. Σύγκριση των διαφορών των μέσων όρων του ρυθμού αποδόμησης (h^{-1}) του β-καρνοφυλλενίου στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ανεξάρτητα από το είδος του ζώου ανά εβδομάδα.

Εβδομάδα	1	2	3	4	5	6
1		-0,017	-0,022	-0,027	-0,027	0,035
Τυπικό σφάλμα		0,0080	0,0313	0,0052	0,0133	0,0093
P<		0,557	0,392	0,182	0,597	0,145
2			-0,099	-0,009	-0,011	0,018
Τυπικό σφάλμα			0,0317	0,0072	0,0142	0,0106
P<			0,268	0,880	0,998	0,732
3				-0,12	-0,12	0,117
Τυπικό σφάλμα				0,0311	0,0334	0,0320
P<				0,218	0,209	0,178
4					-0,001	0,008
Τυπικό σφάλμα					0,0128	0,0086
P<					1,000	0,980
5						0,008
Τυπικό σφάλμα						0,0150
P<						1,000

Στο Διάγραμμα 13 περιγράφεται η εξέλιξη του ρυθμού αποδόμησης των τερπενίων α-πινένιο, λεμονένιο και β-καρνοφυλλένιο στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ανά εβδομάδα. Φαίνεται ότι υπήρχε μια αύξηση του ρυθμού αποδόμησης του α-πινενίου και του λεμονενίου κατά την τέταρτη εβδομάδα κατά την δεύτερη δηλαδή εβδομάδα μετά την χορήγηση των τερπενίων. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού αποδόμησης την πέμπτη εβδομάδα τόσο για το α-πινένιο όσο και για το λεμονένιο κατά την πρώτη εβδομάδα δηλαδή μετά το τέλος της χορήγησης των τερπενίων. Όσον αφορά στο β-καρνοφυλλένιο ο ρυθμός αποδόμησης του παρουσίασε αυξητική τάση κατά την τρίτη εβδομάδα, την πρώτη εβδομάδα χορήγησης των τερπενίων και στη συνέχεια μειώθηκε σημαντικά κατά την τέταρτη εβδομάδα και μέχρι το τέλος του πειράματος.

Διάγραμμα 13. Εξέλιξη του ρυθμού αποδόμησης των τερπενίων α-πινένιο, λεμονένιο και β-καρνοφυλλένιο στο υγρό της μεγάλης κοιλίας, ανεξάρτητα από το είδος του ζώου, ανά εβδομάδα.



4.3 Σχολιασμός των αποτελεσμάτων του 3ου πειράματος

Μέχρι πρόσφατα η μελέτη, όσον αφορά στα τερπένια, επικεντρωνόταν κυρίως σε ό,τι έχει να κάνει με τη βακτηριοστατική τους δράση (Turner *et al.*, 1999), την αντιμικροβιακή τους δράση, τις χημειοθεραπευτικές ιδιότητες απέναντι σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του παχέως εντέρου και των πνευμόνων (Crowell, 1999), τη χρήση τους ως βιοδείκτες ή την επίδρασή τους στη συμπεριφορά (Villalba and Provenza, 2005). Ωστόσο υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την αποδόμηση των συστατικών αυτών από τους μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας. Πολλοί

ερευνητές αναφέρουν (Roberts and Olson, 1999; Broudiscou *et al.*, 1999; McIntosh *et al.*, 2003; Macheboeuf *et al.*, 2008; Malecky *et al.*, 2009b) ότι επηρεάζουν την λειτουργία της μεγάλης κοιλίας αναστέλλοντας τη δράση ορισμένων μικροοργανισμών και αυξάνοντας την πεπτικότητα τόσο της ξηράς ουσίας όσο και της κυτταρίνης (Villalba *et al.*, 2006). Παραμένει όμως σχεδόν άγνωστος ο τρόπος που βιοτικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες στη μεγάλη κοιλία επηρεάζουν την αποδόμηση των τερπενίων, παρόλο που η δράση τους είναι πιθανό να μεταβάλλει τόσο το προφίλ των τερπενίων όσο και τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων ζωικών προϊόντων (Malecky and Broudiscou, 2009).

Η μέθοδος του οισοφαγικού καθετήρα για τη λήψη του υγρού Μ.Κ. που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε με βάση της αρχές της ευζωίας διότι επέφερε λιγότερο στρες και πόνο σε σχέση με τη χρήση συριγγίων Μ.Κ. (Lawrence and Appleby, 1996). Επιπλέον η μέθοδος, μετά από κατάλληλη εκπαίδευση ήταν εύκολη στην εφαρμογή της και διασφάλιζε τη μη διατάραξη του αναερόβιου περιβάλλοντος της Μ.Κ. Η προσπάθεια στόχευε στο να μην υπάρξει μεταβολή στο μικροβιακό περιβάλλοντος της ΜΚ από την παρουσία του οξυγόνου όπως έχει βρεθεί ότι συμβαίνει κατά τη χρήση των συριγγίων (Geishauer and Gitzel, 1996). Σε ότι αφορά τη μέθοδο της *in vitro* επώασης που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του ρυθμού αποδόμησης των τερπενίων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας σύμφωνα με τους Villalba and Provenza (2010) η επιλογή ενός σταθερού συστήματος, όπως αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, στο οποίο δεν προστίθενται διαλύματα που υποκαθιστούν το σιέλο, αποτελεί το πρώτο βήμα για έρευνα στο πεδίο αυτό. Επιπλέον, όπως έχει αναφερθεί από τους Geishauer and Gitzel (1996) η μέθοδος του οισοφαγικού καθετήρα δίνει πολύ καλά αποτελέσματα σε διάφορες παραμέτρους (pH, ΠΛΟ, NH₃) που μετρήθηκαν στο υγρό της μεγάλης κοιλίας που ελήφθη από ενήλικα πρόβατα επιφέροντας τις λιγότερες αλλαγές στο μικροβιακό οικοσύστημα σε σχέση με τη μέθοδο των συριγγίων.

Η μεγάλη κοιλία αποτελεί το πρώτο τμήμα του πεπτικού συστήματος όπου τα τερπένια μπορούν να μεταβολιστούν πριν πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε άλλη μετατροπή ή αποδόμησή τους σε άλλα όργανα όπως το ήπαρ (Malecky *et al.*, 2009b). Στην παρούσα μελέτη η παρουσία του υγρού της μεγάλης κοιλίας (RF) είχε σαν αποτέλεσμα σημαντικά υψηλότερο ρυθμό αποδόμησης των τερπενίων σε σύγκριση με τα δείγματα της ομάδας του μάρτυρα (NRF) (P<0,05). Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των τερπενίων που χρησιμοποιήθηκαν για την *in vitro* αποδόμηση δεν

διαφοροποιούνται ουσιαστικά από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν σε άλλες μελέτες (Caslamiglia *et al.*, 2007; Busquet *et al.*, 2007).

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν στο ρυθμό αποδόμησης των τερπενίων όταν τα ζώα λαμβάνουν μίγμα τερπενίων κατά τις εβδομάδες 3 και 4 μπορούν να αποδοθούν στην πιθανή προσαρμογή των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας σε αυτά τα συστατικά. Η προσαρμοστικότητα του μικροβιακού περιβάλλοντος της μεγάλης κοιλίας στα τερπένια παρουσιάζεται και σε άλλες μελέτες (Malecky *et al.*, 2009b; Malecky and Broudiscou 2009). Ωστόσο θα πρέπει στο σημείο αυτό να επισημανθεί ότι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στις περισσότερες μελέτες αφορά στη χρήση συριγγίων γεγονός που πιθανόν να διαφοροποιεί τα αποτελέσματα αυτά από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω η μέθοδος των συριγγίων προκαλεί αλλαγές στο μικροβιακό οικοσύστημα εντός της μεγάλης κοιλίας. Έτσι η διατάραξη της ομοιοστασίας στη μεγάλη κοιλία μπορεί να έχει σαν πιθανό αποτέλεσμα την αλλαγή σε παραμέτρους που επηρεάζουν το ρυθμό αποδόμησης συστατικών όπως τα τερπένια γεγονός που όσο είναι δυνατό αποφεύγεται με τη μέθοδο του οισοφαγικού καθετήρα.

Οι Malecky and Broudiscou (2009), μελέτησαν την *in vitro* αποδόμηση 9 τερπενίων μεταξύ των οποίων και το α-πινένιο στο υγρό της μεγάλης κοιλίας γαλακτοπαραγωγών αιγών, που λάμβαναν δύο διαφορετικά σιτηρέσια, α) πλούσιο σε άμυλο ή β) πλούσιο σε κυτταρίνες κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Διαπίστωσαν ότι η προηγούμενη προσαρμογή των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας σε ένα σιτηρέσιο πλούσιο σε δομικούς (κυτταρίνη) υδατάνθρακες περισσότερο από ότι σε αποθηκευτικούς (άμυλο) αύξησε την αποδόμηση των τερπενίων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη σε χρονικό διάστημα 3 ωρών. Συμπεράναν δε ότι επειδή τα διαφορετικά σιτηρέσια είχαν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών της Μ.Κ. παρατηρήθηκε αυτή η διαφορά στην αποδόμηση των τερπενίων.

Όπως ήδη αναφέρθηκε στα αποτελέσματα, παρά το ότι κατά την 3^η και 4^η εβδομάδα χορηγήθηκε ένα μίγμα τερπενίων στα ζώα, ο ρυθμός αποδόμησης στην ομάδα της επέμβασης όπου τα τερπένια είχαν προστεθεί σε υγρό μεγάλης κοιλίας δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα η τάση που παρατηρήθηκε για το α-πινένιο ανάμεσα στις εβδομάδες 3 και 5 καθώς και η στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P=0,032$) που εντοπίζεται στο ρυθμό αποδόμησης του λεμονενίου ανάμεσα στις εβδομάδες 1 και 5 δείχνει μια περιορισμένη επίδραση στο ρυθμό αποδόμησης των

τερπενίων, η οποία συμφωνεί με αποτελέσματα άλλων μελετών. Για παράδειγμα, όταν αιθέρια έλαια, ευγενόλης, λεμονενίου, θυμόλης, προστέθηκαν σε υγρό μεγάλης κοιλίας αγελάδων *in vitro* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0, 5, 50, 500, 5000 mg/l) εντοπίστηκαν ελάχιστες μεταβολές στο ρυθμό αποδόμησης ακόμα και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (Castillejos *et al.*, 2006). Επιπλέον, οι Busquet *et al.*, (2006) μελέτησαν την επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων στην μικροβιακή ζύμωση γαλακτοπαραγωγών αγελάδων με τη βοήθεια συσκευής ζύμωσης συνεχούς ροής εφαρμόζοντας μικρότερες συγκεντρώσεις (0, 3, 30, 300, 3000 mg/l) από ότι οι Castillejos *et al.*, (2006) και συμπέραναν επίσης ότι οι μικροοργανισμοί της μεγάλης κοιλίας έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται σε φυτικά συστατικά όταν αυτά προστίθενται στο υγρό της μεγάλης κοιλίας. Παρόλο που από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν φάνηκε ξεκάθαρα προσαρμογή των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας στις ουσίες που χορηγήθηκαν, η στατιστικώς σημαντική διαφορά που εντοπίστηκε στο λεμονένιο και η αυξητική τάση στο ρυθμό αποδόμησης του απινενίου φαίνεται να δείχνουν ότι μεγαλύτερος αριθμός ζώων θα μπορούσε να δώσει στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο ρυθμό αποδόμησης και να φανεί ξεκάθαρα η προσαρμογή των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας στα τερπένια.

Πιο συγκεκριμένα η προσαρμογή των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας σε τερπένια αναφέρθηκε και από τους Malecky *et al.*, (2009b). Στην παραπάνω μελέτη χορηγήθηκε μίγμα μονοτερπενίων, α- και β-πινένιο, λιναλοόλη και το πικυμένιο. απευθείας στη μεγάλη κοιλία αιγών και διερευνήθηκε ο ρυθμός αποδόμησης τους στο δωδεκαδάκτυλο. Διαπιστώθηκε ότι ένα μικρό ποσοστό από την ποσότητα των μονοτερπενίων που είχε αρχικά χορηγηθεί προσδιορίστηκε στο δωδεκαδάκτυλο. Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε κατά ένα μέρος στην βιομετατροπή των συστατικών αυτών και την αποβολή τους από τα ούρα αλλά κατά κύριο λόγο συνδέθηκε με την εκτεταμένη προσαρμογή των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας στις υπό μελέτη ουσίες. Πιθανόν η απουσία στατιστικά σημαντικού αποτελέσματος που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, από την έκθεση των μικροοργανισμών της ΜΚ στα τερπένια ως προς την αποδόμηση των τερπενίων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας, να μπορεί να αποδοθεί είτε στη σχετικά χαμηλή δόση που χρησιμοποιήθηκε για την δοσολόγηση των ζώων ή στην απουσία επίδρασης των τερπενίων στο μικροβιακό πληθυσμό της μεγάλης κοιλίας. Το τελευταίο αναφέρεται και από τους Villalba και Provenza (2010) οι οποίοι συμφωνώντας με τους Cardozo *et al.*, (2004) υποστηρίζουν ότι παρόλο που κάποια φυτικά εκχυλίσματα φαίνεται αρχικά να έχουν επίδραση στα

ζυμωτικά φαινόμενα των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας, φαίνεται ότι ο μικροβιακός πληθυσμός πιθανώς ισορροπεί σύντομα (σε χρονικό διάστημα 6 ημερών) από την προσθήκη του νέου συστατικού. Έτσι επισημαίνουν ότι θα πρέπει οι παρόμοιες μελέτες να πραγματοποιούνται για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, προκειμένου να αποφεύγονται λανθασμένες ερμηνείες και να εξάγονται ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με τη δράση φυτικών εκχυλισμάτων στο μικροβιακό οικοσύστημα της μεγάλης κοιλίας. Το γεγονός της εξαγωγής λανθασμένων συμπερασμάτων αποφεύχθηκε κατά την παρούσα μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε για χρονικό διάστημα 6 εβδομάδων, ένα ικανό χρονικό διάστημα για την προσαρμογή των μικροοργανισμών στην προσθήκη των νέων συστατικών.

Το χρονικό διάστημα των 24 ωρών που επιλέχθηκε για την *in vitro* επώαση έρχεται σε συμφωνία με τις περισσότερες μελέτες (Cardozo *et al.*, 2004; Castillejos *et al.*, 2005) που διερευνούν την επίδραση των τερπενίων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας. Ωστόσο, τα διαφορετικά αποτελέσματα που παρατηρούνται στις παραπάνω μελέτες και σχετίζονται με το διαφορετικό ρυθμό αποδόμησης των τερπενίων, είναι πιθανό να οφείλονται στις διαφορετικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Οι Castillejos *et al.*, (2005) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα της επίδρασης των τερπενίων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας είναι δοσοεξαρτώμενα και η καλύτερη αποτελεσματικότητά τους συνδέεται με την υψηλότερη χορηγούμενη δόση. Οι Benchaar *et al.*, (2007a) συμπέραναν σε *in vitro* μελέτες ότι υψηλές δόσεις είτε μίγματος αιθερίων ελαίων, των οποίων τα τερπένια αποτελούν κύρια συστατικά, είτε καθαρών ουσιών θα μπορούσε δυνητικά να αλλάξει τη ζύμωση εντός της μεγάλης κοιλίας και έτσι να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της διατροφής στα μηρυκαστικά.

Όπως αναφέρουν οι Estell *et al.*, (2010), οι οποίοι μέτρησαν την συγκέντρωση ορισμένων τερπενίων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας μετά από επώαση 24 ωρών, το α-πινένιο και το λεμονένιο ανερχόταν στο 50% της ποσότητας που χορηγήθηκε ενώ η συγκέντρωση του β-καρυοφυλλενίου προσδιορίστηκε στο 70% της αρχικής. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Broudiscou *et al.*, (2007) οι οποίοι μελέτησαν το ρυθμό αποδόμησης διαφορετικών τερπενίων, μετά από επώαση 24 ωρών σε υγρό μεγάλης κοιλίας αιγών και παρατήρησαν υψηλή ικανότητα του μικροβιακού οικοσυστήματος της μεγάλης κοιλίας να διασπά το α-πινένιο. Επιπλέον, οι Pouloroulou *et al.*, (2010) παρατήρησαν ότι οι ρυθμοί αποδόμησης για το α-πινένιο και το λεμονένιο ήταν για τις αίγες 80 και 50 ενώ αντίστοιχα για τα

πρόβατα ήταν 60 και 45. Όσον αφορά στο β-καρνοφυλλένιο οι παραπάνω ερευνητές βρήκαν ότι ο ρυθμός αποδόμησής του και στις δύο περιπτώσεις ήταν 55. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών συμφωνούν εν μέρει με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όσον αφορά στις αλλαγές στο ρυθμό αποδόμησης που παρατηρούνται κατά τις δύο εβδομάδες χορήγησης των τερπενίων (Διάγραμμα 13).

5. Πείραμα 4ο - Προσδιορισμός της κυτταροστατικής - κυτταροτοξικής δράσης τερπενίων *in vitro*, στην συνεχή κυτταρική σειρά νεφρού κουνελιού RK13.

Αξιολόγηση με την χρωματομετρική μέθοδο MTT [3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

5.1 Υλικά και Μέθοδοι

Ο προσδιορισμός της κυτταροστατικής δράσης των τερπενίων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του ΓΠΑ σε ειδικό χώρο που διατηρούνται καλλιέργειες ζωικών κυττάρων *in vitro*.

Για την αξιολόγηση της επίδρασης των τερπενίων στη βιωσιμότητα των κυττάρων *in vitro* εφαρμόστηκε η κλασική χρωματομετρική μέθοδος MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων (Eisenbrand *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 2006; Lantto *et al.*, 2009). Η μέθοδος βασίζεται στην μετατροπή των κίτρινων κρυστάλλων τετραζολίου MTT, που προστίθενται στα βοηθία σε κρυστάλλους φορμαζάνης, μωβ χρώματος, από τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα. Οι κρύσταλλοι που σχηματίζονται από τη φορμαζάνη διαλύονται και στο έγχρωμο διάλυμα που προκύπτει προσδιορίζεται, με τη χρήση φωτόμετρου, η οπτική απορρόφηση (Lantto *et al.*, 2009).

Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης των τερπενίων *in vitro* (Eisenbrand *et al.*, 2002) χρησιμοποιήθηκε η συνεχής κυτταρική σειρά RK-13 (Rabbit Kidney 13) (προέλευσης νεφρού κονίκλου). Το κριτήριο επιλογής της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς ήταν ότι αποτελεί σύνηθες πρότυπο για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας (Gandolfi 1990; Duffy and McNae 1990; Walker and Coleman 1995). Τα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν *in vitro* σε ειδικές πλαστικές φιάλες των 25cm² και των 75 cm² (Greiner bio one, Germany). Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Dulbecco's MEM (Minimum Essential Medium), εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου μόσχου (Fetal Calf Serum, FCS) σε αναλογία 10 και L-Glutamine (200Mm) σε αναλογία 1. Στο θρεπτικό υλικό προστέθηκε διάλυμα αντιβιοτικών (πενικιλίνη, 1000 IU/ml, και στρεπτομυκίνη, 100μg/ml) σε αναλογία 1%. Για τις διόδους των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θρυψίνης (Trypsin/EDTA). Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας Lonza (Belgium).

Για την προσδιορισμό της κυτταροστατικής δράσης των τερπενίων χρησιμοποιήθηκε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 βοθρίων (Greiner bio one, Germany), στην οποία τοποθετήθηκαν 10^4 κύτταρα RK13, ανά βοθρίο. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν διαλύματα PBS και κάθε ένα από τα υπό μελέτη τερπένια (α -πινένιο, λεμονένιο και β -καρυοφυλλένιο) αραιώθηκαν σε συγκεντρώσεις: 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 6,25 $\mu\text{g/ml}$ και 3,1 $\mu\text{g/ml}$. Επιπλέον, παρασκευάστηκε διάλυμα PBS, στο οποίο και τα τρία τερπένια αραιώθηκαν σε συγκεντρώσεις 300 $\mu\text{g/ml}$ (100 $\mu\text{g/ml}$ από κάθε ένα από τα α -πινένιο, λεμονένιο, β -καρυοφυλλένιο), 150 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 37,5 $\mu\text{g/ml}$, 18,75 $\mu\text{g/ml}$, 9,3 $\mu\text{g/ml}$. Στη συνέχεια, κάθε συγκέντρωση τερπενίων εφαρμόστηκε σε τρεις επαναλήψεις, πλακών με κύτταρα. Επιπλέον, ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα βοθρία με τα κύτταρα, στα οποία είχε προστεθεί διάλυμα PBS χωρίς την παρουσία τερπενίων. Στη συνέχεια οι πλάκες των 96 θέσεων τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα 37°C, με ατμόσφαιρα 5% CO₂, για 24 ώρες, ώστε να εκτιμηθεί η δόσοεξαρτώμενη επίδραση στη συνεχή κυτταρική σειρά RK13 για τα τρία τερπένια, καθώς και το μίγμα αυτών.

Μετά την πάροδο 24 ωρών το MTT διαλυμένο σε PBS σε συγκέντρωση 5mg/ml, προστέθηκε σε όλα τα βοθρία και η πλάκα επωάστηκε για 4 ώρες σε θερμοκρασία 37°C. Στη συνέχεια, αφού απορρίφθηκε το διάλυμα του MTT, στα βοθρία προστέθηκε 100 μl ισοπροπανόλη προκειμένου να διαλυθούν οι κρύσταλλοι που πιθανόν να είχαν δημιουργηθεί. Τέλος, η πλάκα τοποθετήθηκε σε φασματοφωτόμετρο με φίλτρο μήκους κύματος 570 nm και προσδιορίστηκε η απορρόφηση ώστε να υπολογιστεί τελικά το ποσοστό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων στην καλλιέργεια και να ποσοτικοποιηθεί η κυτταροτοξικότητα (καταστροφή - νέκρωση των κυττάρων) των επιδράσεων. Τα αποτελέσματα προκύπτουν συγκρίνοντας την απορρόφηση του φωτός των μεταβολικά ενεργών κυττάρων μεταξύ των φυσιολογικών (μάρτυρες με PBS) και των επωασμένων με τερπένια κυττάρων.

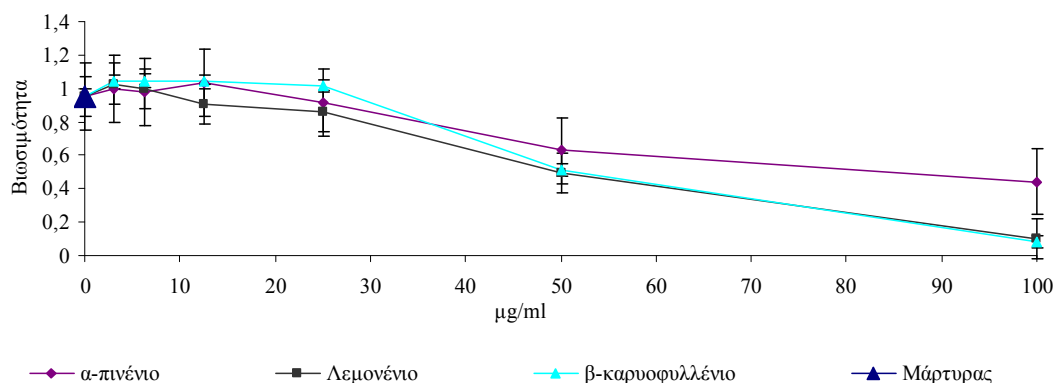
5.2 Αποτελέσματα 4ου πειράματος

5.2.1 Αξιολόγηση της κυτταροστατικής-κυτταροτοξικής δράσης τερπενίων in vitro σε κύτταρα νεφρού κουνελιού (RK-13) με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT

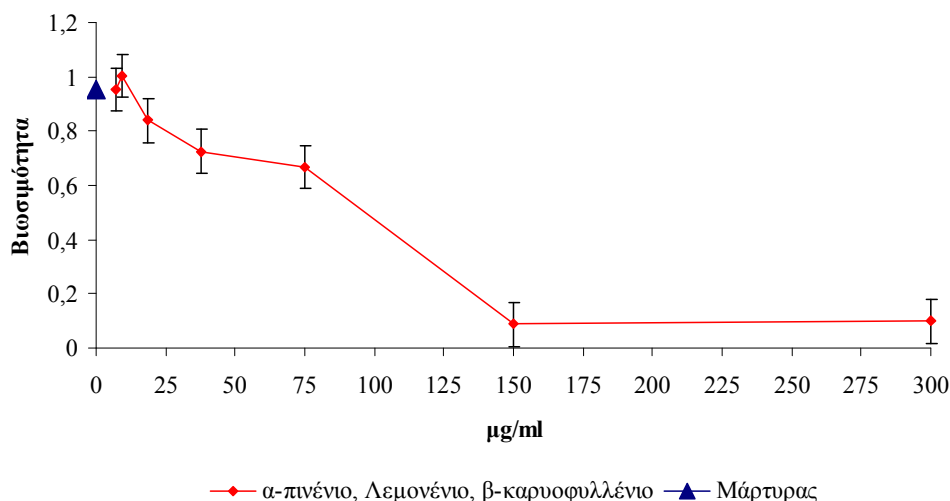
Από τα αποτελέσματα (Διάγραμμα 14) φαίνεται ότι το ποσοστό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων μεταξύ των συγκεντρώσεων όσον αφορά στο α -πινένιο παρουσιάζει μια σχεδόν σταθερή τιμή μέχρι τα 25 $\mu\text{g/ml}$ ωστόσο

παρατηρείται σημαντική μείωση ($P<0,05$) του αριθμού των μεταβολικά ενεργών κυττάρων από την συγκέντρωση των 50 $\mu\text{g/ml}$, η οποία γίνεται σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0,01$) στα 100 $\mu\text{g/ml}$. Αντίστοιχη πορεία ακολουθούν το λεμονένιο και το β -καρβοφυλλένιο όπου μόνο οι συγκεντρώσεις των 50 $\mu\text{g/ml}$ και 100 $\mu\text{g/ml}$ φαίνεται ότι επηρεάζουν σημαντικά ($P<0,05$) τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων (Διάγραμμα 14). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα της ομάδας του αρνητικού μάρτυρα (φυσιολογικά κύτταρα) στα οποία είχε προστεθεί διάλυμα PBS χωρίς την προσθήκη τερπενίων διέφεραν σημαντικά όσον αφορά στον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων σε σύγκριση με τα κύτταρα όπου είχε προστεθεί το μίγμα των τριών τερπενίων ($P<0,05$) στις συγκεντρώσεις των 150, 300 $\mu\text{g/ml}$.

Διάγραμμα 14. Εξέλιξη της βιωσιμότητας των κυττάρων *in vitro* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT και τη χρήση φασματοφωτόμετρου μετά την εφαρμογή αυξανόμενων συγκεντρώσεων α -πινενίου, λιμονενίου και β -καρβοφυλλενίου στη συνεχή κυτταρική σειρά RK13



Διάγραμμα 15. Εξέλιξη της βιωσιμότητας των κυττάρων *in vitro* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT και τη χρήση φασματοφωτόμετρου μετά την εφαρμογή 100 $\mu\text{g/ml}$ από κάθε ένα από τα τερπένια: α -πινένιο, λεμονένιο και β -καρνοφυλλένιο στη συνεχή κυτταρική σειρά RK13.



Στην Διάγραμμα 15 παρουσιάζεται η αντίδραση των μεταβολικά ενεργών κυττάρων στην συνεχή κυτταρική σειρά RK-13 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μέχρι τη συγκέντρωση των 300 $\mu\text{g/ml}$. Στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0,05$) στον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων ανάμεσα παρατηρήθηκε μέχρι την συγκέντρωση των 150 $\mu\text{g/ml}$. Ωστόσο μετά από αυτή τη συγκέντρωση δεν παρατηρείται διαφορά στην οπτική πυκνότητα (ή απορρόφηση) γεγονός που φανερώνει ότι ο αριθμός των μεταβολικά ενεργών κυττάρων μετά τη συγκέντρωση αυτή δεν μεταβάλλεται (Διάγραμμα 15).

5.3. Σχολιασμός αποτελεσμάτων του 4ου πειράματος

Όσον αφορά στην κυτταροτοξικότητα αυτό που θα πρέπει να σημειωθεί είναι ότι και στα τρία τερπένια, α -πινένιο, λεμονένιο και β -καρνοφυλλένιο, που χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις με συγκέντρωση μικρότερη από 50 $\mu\text{g/ml}$ ήταν αυτές που εξασφάλιζαν την μεγαλύτερη επιβίωση των κυττάρων της συνεχούς κυτταρικής σειράς RK13 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Όπως αναφέρεται και από άλλους ερευνητές, οι οποίοι διερεύνησαν την κυτταροστατική δράση εκχυλίσματος του φυτού *Rhaphidophora korthalsii* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, προσδιόρισαν ότι οι συγκεντρώσεις τερπενίων πάνω από 50 $\mu\text{g/ml}$ (Wong & Tan,

1996) είναι εκείνες που είχαν κυτταροστατικά αποτελέσματα. Στην παρούσα μελέτη, σε ότι αφορά την ταυτόχρονη χορήγηση και των τριών τερπενίων, η δόση που επιτρέπει την επιβίωση μεγαλύτερου αριθμού μεταβολικά ενεργών κυττάρων είναι όταν σε αυτά χορηγείται ποσότητα 50 $\mu\text{g/ml}$ από κάθε ένα από τα τερπένια α -πινένιο, λεμονένιο και β -καρυοφυλλένιο. Ωστόσο δε φαίνεται να παρουσιάζεται διαφοροποίηση στην ταυτόχρονη χορήγηση και των τριών τερπενίων όσον αφορά στην κυτταροτοξική τους δράση σε σχέση με την εφαρμογή κάθε ενός από τα τρία τερπένια χωριστά σε κύτταρα της συνεχούς κυτταρικής σειράς RK13. Η συνολική ποσότητα των τερπενίων που διαπιστώθηκε ότι προκαλεί κυτταροτοξική δράση ήταν στη συγκέντρωση 150 $\mu\text{g/ml}$ όπου και φάνηκε ότι η επίδρασή τους πιθανόν στην απόπτωση των κυττάρων ήταν στατιστικώς σημαντική. Φαίνεται δηλαδή ότι η ταυτόχρονη χορήγηση των τριών τερπενίων έχει σημαντική επίδραση στον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων σε αντίστοιχη συγκέντρωση (50 $\mu\text{g/ml}$) με την επίδραση που είχε στη συνεχή κυτταρική σειρά RK13 η χορήγηση από κάθε ένα από τα τερπένια: α -πινένιο, λεμονένιο και β -καρυοφυλλένιο χωριστά.

Οι συγκεντρώσεις των τερπενίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν αντίστοιχες με τις συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν σε *in vitro* δοκιμές για αντιμετώπιση πληθυσμών εντόμων (Phillips *et al.* 1995) και τη θεραπεία ασθενειών (Crowell 1999) όπως ο καρκίνος. Οι Moreno *et al.*, (2005) διαπίστωσαν ότι συγκεντρώσεις 100 $\mu\text{g/ml}$ είχαν ως αποτέλεσμα την επιβίωση λιγότερο από το 50 των μεταβολικά ενεργών κυττάρων, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Οι Diaz *et al.*, (2008) μελέτησαν την κυτταρική επιβίωση σε καρκινικά κύτταρα ήπατος για 24 ώρες και βρήκαν ότι σε συγκέντρωση 74 $\mu\text{g/ml}$ επιβίωσε λιγότερο από το 50 των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν. Διαπίστωσαν δηλαδή ότι η απόπτωση είναι ο κύριος μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από την επίδραση των δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών όπως τα τερπένια.

Αυτό που θα πρέπει να τονιστεί είναι ότι μέσω της διερεύνησης της κυτταροστατικής δράσης των τερπενίων στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε ότι οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν τόσο στα *in vivo* πειράματα σε αίγες και πρόβατα όσο και στο *in vitro* πείραμα όπου μελετήθηκε ο ρυθμός αποδόμησης των τερπενίων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν τοξικές. Πιο αναλυτικά η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε στα *in vivo* πειράματα, σε σχέση με το συνολικό όγκο του υγρού της μεγάλης κοιλίας (25 lt),

ήταν αναλογικά 40 µg/ml από κάθε ένα από τα τρία τερπένια στο υγρό της μεγάλης κοιλίας ποσότητα σημαντικά μικρότερη από τα 50 µg/ml που φαίνεται να προκαλεί κυτταροτοξική δράση στα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Σε αυτό αν προσθέσουμε το γεγονός ότι τα *in vivo* πειράματα πραγματοποιούνται σε δυναμικά συστήματα (μεγάλη κοιλία) μπορούμε να συμπεράνουμε ότι δεν υπήρχε αρνητική επίδραση των τερπενίων στον ζωικό οργανισμό. Όσον αφορά στο *in vitro* πείραμα όπου διερευνήθηκε ο ρυθμός αποδόμησης των τερπενίων στο υγρό της μεγάλης κοιλίας η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10 µg/ml οπότε και σε αυτή την περίπτωση επιβεβαιώνεται ότι δεν υπήρξε κυτταροτοξική δράση των τερπενίων.

E. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν σε αίγες και πρόβατα με σκοπό την διερεύνηση της χρήσης των τερπενίων ως βιοδείκτες για τα προϊόντα ζωϊκής προέλευσης συμπεραίνεται ότι είναι δυνατό να αποτελέσουν μια πιθανή επιλογή για την αναγνωρισιμότητα τους. Ωστόσο δεν ανταποκρίνονται πλήρως στις ιδιότητες των βιοδεικτών. Έτσι για να μπορέσει να πιστοποιηθεί η χρήση τους και να αυξηθεί η αξιοπιστία τους ως βιοδείκτες θα ήταν σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με την παρουσία και άλλων συστατικών της τροφής όπως για παράδειγμα το προφίλ των λιπαρών οξέων στο παραγόμενο ζωικό προϊόν. Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι αίγες και πρόβατα ανήκουν σε δύο διαφορετικές ομάδες όσον αφορά στις διατροφικές τους συνήθειες (Hofmann, 1989), γεγονός που συνδέεται με διαφορές που σχετίζονται με τη φυσιολογία της πέψης των θρεπτικών συστατικών για κάθε είδος. Οι αίγες είναι γνωστές για τις διατροφικές τους προτιμήσεις σε θαμνώδη και ξυλώδη βλάστηση (Duncan and Poppi, 2008), η οποία περιέχει υψηλά επίπεδα τερπενίων (Vasta *et al.*, 2008), ενώ αντίθετα τα πρόβατα προτιμούν ποώδη βλάστηση η οποία έχει σταθερά χαμηλότερη περιεκτικότητα σε τερπένια (Mariaca *et al.*, 1997)

Έτσι οι διαφορές που αναφέρονται παραπάνω ανάμεσα στα δύο είδη ζώων διαπιστώνονται και στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης στην οποία προσδιορίστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις τερπενίων στο αίμα το γάλα και το τυρί αιγών και προβάτων. Μια ερμηνεία που θα μπορούσε να δοθεί για τις διαφορές αυτές θα μπορούσε να είναι οι ανατομικές και φυσιολογικές διαφορές ανάμεσα στα δύο είδη ζώων (Chilliard *et al.*, 2003). Όσον αφορά στην ανατομία τους αίγες και πρόβατα διαφέρουν στο μέγεθος των σιελογόνων αδένων, με τα πρόβατα να υπολείπονται, όπως και στο μέγεθος του ήπατος ενώ αντίθετα διαθέτουν μεγαλύτερο σε μέγεθος πεπτικό σωλήνα σε σχέση με τις αίγες (Shiple, 1999). Το γεγονός αυτό πιθανόν να διαφοροποιεί τον τρόπο που μόρια όπως τα τερπένια αποδομούνται και μεταβολίζονται στο πεπτικό σύστημα.

Οι διαφορές που εντοπίστηκαν στις συγκεντρώσεις τερπενίων στο γάλα και στο αίμα αιγών και προβάτων στην παρούσα μελέτη έχουν άμεση σχέση με την αποδόμηση και το μεταβολισμό της τροφής και κατά συνέπεια και των συστατικών αυτής όπως για παράδειγμα των τερπενίων. Έτσι, όπως αναφέρει τόσο ο Hofmann (1989) όσο και πιο πρόσφατες μελέτες (Tsiplakou *et al.* 2011) η μεγαλύτερης διάρκειας παραμονή της ποώδους βλάστησης στον πεπτικό σωλήνα των προβάτων έχει σαν αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη εκμετάλλευση της τροφής που αυτά

καταναλώνουν (Gordon, 2003). Ωστόσο, αυτό αποτελεί μια υπόθεση σε ότι αφορά σιτηρέσια που περιέχουν τερπένια διότι η σχετική βιβλιογραφική έρευνα που πραγματοποιήθηκε έδειξε ότι δεν υπάρχουν μελέτες που σχετίζονται με τη διερεύνηση του ρυθμού ροής των συστατικών αυτών σε αίγες και πρόβατα. Επίσης θα πρέπει να αναφερθεί ότι παρόλο που τα πρόβατα έχουν βραδύτερο ρυθμό εκκένωσης των στερεών συστατικών στους προστομάχους μόρια όπως τα τερπένια πιθανόν να μην διακινούνται με την ίδια ταχύτητα όπως τα υπόλοιπα συστατικά της τροφής. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει αφορμή για περαιτέρω έρευνα προς την κατεύθυνση αυτή. Επιπλέον οι αίγες εξαιτίας της συμπεριφοράς τους κατά τη βόσκηση και την επιλογή ξυλωδών και θαμνωδών φυτών στη διατροφή τους έχουν πιθανόν αναπτύξει ένα μηχανισμό αποτοξίνωσης των ουσιών αυτών με αποτέλεσμα η διάχυσή τους στα βιολογικά υγρά να είναι μικρότερη σε σχέση με τα πρόβατα.

Ένας ακόμη παράγοντας που πιθανόν επηρεάζει αυτή τη διαφοροποίηση είναι η διαφορετική μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται στον πεπτικό σωλήνα εξαιτίας του διαφορετικού σιτηρεσίου που καταναλώνουν τα δύο είδη ζώων διαμορφώνοντας έτσι διαφορετικές συνθήκες στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας (Gordon, 2003; Estell, 2010). Όπως αναφέρθηκε και στα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας οι μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας αποδομούν τα τερπένια γεγονός που έμμεσα υποδηλώνει ότι πιθανόν να μεταβάλλουν τη μικροχλωρίδα της μεγάλης κοιλίας τροποποιώντας τις αναλογίες των μικροοργανισμών σε αυτή όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Busquet *et al.*, 2006; Castillejos *et al.*, 2007; Malecky *et al.*, Θα πρέπει επίσης να τονιστεί ότι η ύπαρξη σχετικών βιβλιογραφικών δεδομένων περισσότερο για βοοειδή, που αποτελούν και το μεγαλύτερο σε αριθμό ζωικό κεφάλαιο σε χώρες της Βόρειας Ευρώπης (Moio *et al.*, 1996; Fernandez *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005; Tornambe *et al.*, 2006) και λιγότερο για τα αιγοπρόβατα σε συνδυασμό με τη σημασία των ζώων αυτών στη χώρα μας, αποτέλεσαν ισχυρό κίνητρο για τη διερεύνηση των τερπενίων στα μικρά μηρυκαστικά. Ωστόσο αυτό που παρατηρήθηκε ήταν η καλύτερη ανταπόκριση των μονοτερπενίων (α-πινένιο, λεμονένιο) σε αίγες και πρόβατα σε σχέση με το σεκιτερπένιο β-καρνοφυλλένιο το οποίο προτείνεται από άλλους ερευνητές (Cornu *et al.* 2005; Favaro *et al.* 2005; Tornambe *et al.* 2006) ως αξιόπιστος βιοδείκτης για τα ζωικά προϊόντα που προέρχονται από βοοειδή. Φαίνεται δηλαδή ότι στα μικρά μηρυκαστικά τα μονοτερπένια αποτελούν καλύτερο βιοδείκτη.

Για να μπορέσει να γίνει αποδεκτή στο μέλλον η αδιαμφισβήτητη χρήση των τερπενίων ως βιοδείκτες θα πρέπει να πληρούνται οι προδιαγραφές που τέθηκαν από τους Spencer *et al.*, (2008) και αφορούν το χαρακτηρισμό μιας ουσίας ως βιοδείκτη. Έτσι φαίνεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ότι τα τερπένια που χρησιμοποιήθηκαν καλύπτουν εν μέρει τις προδιαγραφές που θέτουν οι Spencer *et al.*, (2008), για το χαρακτηρισμό μιας ουσίας ως πιθανού βιοδείκτη. Η πρώτη προϋπόθεση που τέθηκε από τους παραπάνω ερευνητές σύμφωνα με την οποία θα πρέπει να είναι διαθέσιμες οι αναλυτικές τεχνικές με υψηλή αναλυτική ισχύ, σε ποιοτικό και ποσοτικό επίπεδο, ικανοποιείται όσον αφορά στη χρήση των τερπενίων ως βιοδείκτες στην παρούσα μελέτη. Η μέθοδος της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) που επιλέχθηκε για τον προσδιορισμό των τερπενίων στο γάλα και το τυρί, εξαιτίας της υψηλής διακριτικής της ικανότητας είχε σαν αποτέλεσμα τον ικανοποιητικό προσδιορισμό ακόμα και πολύ μικρών συγκεντρώσεων τερπενίων στα προϊόντα αυτά. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται και από άλλους ερευνητές (Eisert and Pawliszyn, 1997; Cornu *et al.*, 2001; Fedele *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2006) οι οποίοι χρησιμοποίησαν τη μέθοδο αυτή εκμεταλλευόμενοι τα πλεονεκτήματα που προσφέρει και έχουν να κάνουν με την ικανότητα προσδιορισμού πολύ μικρών ποσοτήτων και τη μη χρήση οργανικών διαλυτών πολλοί από τους οποίους είναι επικίνδυνοι για την υγεία. Όσον αφορά στις υπόλοιπες προδιαγραφές αυτές φαίνονται να πληρούνται σε σχέση με την ευαισθησία που παρουσιάζουν οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν σε συνάρτηση με το σιτηρέσιο.

Η ανίχνευση των τερπενίων στα βιολογικά υγρά ζώων που καταναλώναν τερπένια και η μη ανίχνευσή τους στα ζώα της ομάδας του μάρτυρα υποδηλώνει την άμεση σχέση των τερπενίων με το σιτηρέσιο που καταναλώνουν τα ζώα και την ευσθησία του στην ύπαρξη ή μη των τερπενίων σε αυτό. Ωστόσο, παραμένει ακόμα να διευκρινιστεί περαιτέρω ο ρόλος των ουσιών αυτών σε σχέση με παράγοντες όπως η απορρόφηση, ο μεταβολισμός και η απέκρισή τους από τον οργανισμό του ζώου. Σε αυτή την πρώτη προσέγγιση που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, προέκυψαν σημαντικά συμπεράσματα όσον αφορά στις προδιαγραφές που απαιτούνται για την μελλοντική χρήση κυρίως του α-πινενίου, λεμονενίου ως δείκτες αναγνωρισιμότητας των ζωικών προϊόντων καθώς και πως σε συνδυασμό με τη χρήση δευτερογενών δεικτών όπως τα λιπαρά οξέα θα μπορούσαν να αποτελέσουν αξιόπιστους βιοδείκτες.

Βιβλιογραφία

Abilleira, E., Vitro, M., Najera, A.I., Albisu, M., Perez-Elortondo, F.J., Ruiz de Gordo, H.C., De Renobales, M., Barron, L.J.R., 2010. Effects of seasonal changes in feeding management under part-time grazing on terpene concentration of ewes' milk. *Journal of Dairy Research*, 1-7.

Acamovic, T., Brooker, J.D., 2005. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society* 64, 403-412.

Addis, M., Pinna, G., Molle, G., Fiori, M., Spada, S., Decandia, M., Scintu, M.F., Piredda, G., Pirisi, A., 2006. The inclusion of a daisy plant (*Chrysanthemum coronarium*) in dairy sheep diet: 2. Effect on the volatile fraction of milk and cheese. *Livestock Science* 101, 68-80.

Ait Said, S., Fernandez, C., Greff, S.p., Derridj, A., Gauquelin, T., Mevy, J.-P., 2011. Inter-population variability of leaf morpho-anatomical and terpenoid patterns of *Pistacia atlantica* Desf. ssp. *atlantica* growing along an aridity gradient in Algeria. *Flora* 206, 397-405.

Akpulat, H.A., Tepe, B., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., 2005. Composition of the essential oils of *Tanacetum argyrophyllum* (C. Koch) Tvetz. var. *argyrophyllum* and *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae) from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 511-516.

Albenzio, M., Caroprese, M., Marino, R., Muscio, A., Santillo, A., Sevi, A., 2006. Characteristics of Garganica goat milk and Cacioricotta cheese. *Small Ruminant Research* 64, 35-44.

Allison, M.J., Dawson, K.A., Mayberry, W.R., Foss, J.G., 1985. *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: Oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. *Archives of Microbiology* 141, 1-7.

Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 325-348.

Anifantakis, E.M., Kalatzopoulos, G.K., 1984. Ewe and goat milk and their utilization (in Greek). In: Greece, N.D.C.o. (Ed.), *Training Seminar in Dairying*, Athens, pp. 16-20.

Animut, G., Goetsch, A.L., 2008. Co-grazing of sheep and goats: *Small Ruminant Research* 77, 127-145.

Barber, M.C., Clegg, R.A., Travers, M.T., Vernon, R.G., 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1347, 101-126.

Bardon, S., Foussard, V.r., Fournel, S., Loubat, A.s., 2002. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Letters* 181, 187-194.

- Becker, T., 2000. Consumer perception of fresh meat quality: a framework for analysis. *British Food Journal* 102, 158-176.
- Benchaar, C., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Wang, Y., Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., 2007a. Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. *Canadian Journal of Animal Science* 87, 413-419.
- Benchaar, C., Petit, H.V., Berthiaume, R., Ouellet, D.R., Chiquette, J., Chouinardt, P.Y., 2007b. Effects of essential oils on digestion, ruminant fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy Science* 90, 886-897.
- Bencini, R., 2002. Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 705-719.
- Berodier, F., Lavanchy, P., Zannoni, M., Casals, J., Herrero, L., Adamo, C., 1997. A guide to the sensory evaluation of smell, aroma and taste of hard and semi-hard cheeses. *LWT - Food Science and Technology* 30, 653-664.
- Bertolini, M., Bevilacqua, M., Massini, R., 2006. FMECA approach to product traceability in the food industry. *Food Control* 17, 137-145.
- Besle, J.M., Viala, D., Martin, B., Pradel, P., Meunier, B., Berdague, J.L., Fraisse, D., Lamaison, J.L., Coulon, J.B., 2010. Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *Journal of Dairy Science* 93, 2846-2856.
- Blanch, G.P., Calvo, M.M., Herraiz, M., Reglero, G., 1996. Differentiation of heat-treated milks by using steam distillation solvent extraction. *Z. Lebensm Unters Forsch* 202, 303-307.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161, 839-851.
- Boyle, R., McLean, S., Foley, J.W., Davies, W.N., 1999. Comparative metabolism of dietary terpene p-cymene in generalist and specialist folivorous marsupials. *Journal of Chemical Ecology* 25, 2109-2126.
- Boyle, R.R., McLean, S., Brandon, S., Pass, G.J., Davies, N.W., 2002. Application of solid-phase microextraction to the quantitative analysis of 1,8-cineole in blood and expired air in a Eucalyptus herbivore, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Journal of Chromatography B* 780, 397-406.
- Boyle, R.R., McLean, S., Brandon, S., Wiggins, N., 2005. Rapid absorption of dietary 1, 8-cineole results in critical blood concentration of cineole and immediate cessation of eating in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Journal of Chemical Ecology* 31, 2775-2790.
- Broudiscou, L.-P., Papon, Y., Broudiscou, A.F., 1999. Optimal mineral composition of artificial saliva for fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microorganisms. *Animal Feed Science and Technology* 79, 43-55.

- Broudiscou, L.P., Cornu, A., Rouzeau, A., 2007. In vitro degradation of 10 mono- and sesquiterpenes of plant origin by caprine rumen micro-organisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87.
- Buchholz, K.D., Pawllszyn, J. 1994. Optimization of Solid-Phase Microextraction conditions for determination of phenols. *Analytical Chemistry* 66, 160-167.
- Buchin, S., Delague, V., Duboz, G., Berdague, J.L., Beuvier, E., Pochet, S., Grappin, R., 1998. Influence of Pasteurization and Fat Composition of Milk on the Volatile Compounds and Flavor Characteristics of a Semi-hard Cheese. *Journal of Dairy Science* 81, 3097-3108.
- Buchin, S., Martin, B., Dupont, D., Bornard, A., Achilleos, C., 1999. Influence of the composition of Alpine highland pasture on the chemical, rheological and sensory properties of cheese. *Journal of Dairy Research* 66, 579-588.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science* 89, 761-771.
- Buttery, R.G., Kamm, J.A., Ling, L.C., 1982. Volatile components of alfalfa flowers and pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30, 739-742.
- Caldwell, J., 1982. Conjugation reactions in foreign-compound metabolism: Definition, consequences, and species variations. *Drug Metabolism Reviews* 13, 745-777.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., Ferret, A., 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science* 90, 2580-2595.
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science* 82, 3230-3236.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *Journal of Dairy Science* 89, 2649-2658.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, R., 2005. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology* 119, 29-41.
- Chatterjee, T., Bhattacharyya, D.K., 2001. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 541-546.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., Lamberet, G., 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science* 86, 1751-1770.

- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M., 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 828-855.
- Clericuzio, M., Alagona, G., Ghio, C., Toma, L., 2000. Ab Initio and Density Functional Evaluations of the Molecular Conformations of Γ A-Caryophyllene and 6-Hydroxycaryophyllene. *Journal of Organic Chemistry* 65, 6910-6916.
- Collomb, M., Botikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B., Bosset, J.O., 2002. Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal* 12, 649-659.
- Cornu, A., Carnat, A.P., Martin, B., Coulon, J.B., Lamaison, J.L., Berdague, J.L., 2001. Solid-phase microextraction of volatile components from natural grassland plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 203-209.
- Cornu, A., Kondjoyan, N., Martin, B., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Berdague, J.-L., Coulon, J.-B., 2005a. Terpene profiles in Cantal and Saint-Nectaire-type cheese made from raw or pasteurised milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85,, 2040-2046.
- Cornu, A., Rabiau, N., Kondjoyan, N., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Tournayre, P., Berdague, J.L., Martin, B., 2009. Odour-active compound profiles in Cantal-type cheese: Effect of cow diet, milk pasteurization and cheese ripening. *International Dairy Journal* 19, 588-594.
- Coulon, J.B., Delacroix-Buchet, A., Martin, B., Pirisi, A., 2004. Relationships between ruminant management and sensory characteristics of cheeses: A review. *Lait* 84, 221-241.
- Coulon, J.B., Delacroix-Buchet, A., Martin, B., Pirisi, A., 2005. Ruminant management and sensory characteristics of cheeses. *Productions Animales* 18, 49-62.
- Coulon, J.B., Priolo, A., 2002. Sensory properties of meat and dairy products are affected by the forages consumed by the animals. *Productions Animales* 15, 333-342.
- Croteau, R., Kutchan, M.T., Lewis, G.N., Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 1250-1318.
- Crowell, P.L., 1997. Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *Breast cancer Research and Treatment* 46, 191-197.
- Crowell, P.L., 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *Journal of Nutrition* 129, 775S-778S.

- De Carvalho, C.C.C.R., Da Fonseca, M.M.R., 2006. Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances* 24, 134-142.
- De Moraes, C.M., Mescher, M.C., Tumlinson, J.H., 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410, 577-579.
- De Noni, I., Battelli, G., 2008. Terpenes and fatty acids profiles of milk fat and "Bitto" cheese as affected by transhumance of cows on different mountain pastures. *Food Chemistry* 109, 299-309.
- Dearing, M.D., Foley, W.J., McLean, S., 2005. The influence of plant secondary metabolites on the nutritional ecology of herbivorous terrestrial vertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 36, 169-189.
- Desage, M., Schaal, B., Soubeyrand, J., Orgeur, P., Brazier, J.L., 1996. Gas chromatographic-mass spectrometric method to characterise the transfer of dietary odorous compounds into plasma and milk. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 678, 205-210.
- Diaz, C., Quesada, S., Brenes, O., Aguilar, G., Ciccio, J.F., 2008. Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. *Natural Product Research* 22, 1521-1534.
- Dillard, C.J., Bruce German, J., 2000. Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1744-1756.
- Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V.M., Pichersky, E., 1996. Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell* 8, 1137-1148.
- Dudareva, N., Pichersky, E., 2000. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiology* 122, 627-633.
- Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J., 2004. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiology* 135, 1893-1902.
- Duffy, P.A., McNae, F.R., 1990. In vitro toxicity of antibiotics to LLC-RK rabbit kidney cells. *Toxicology in Vitro* 4, 375-380.
- Dumont, J.P., Adda, J., 1978. Occurrence of sesquiterpenes in mountain cheese volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 364-367.
- Duncan, A.J., Frutos, P., Young, S.A., 1997. Rates of oxalic acid degradation in the rumen of sheep and goats in response to different levels of oxalic acid administration. *Animal Science* 65, 451-455.
- Duncan, A.J., Hartley, S.E., Iason, G.R., 1994. The effect of monoterpene concentrations in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) on the browsing behaviour of red deer (*Cervus elaphus*). *Canadian Journal of Zoology* 72, 1715-1720.

Duncan, A.J., Poppi, D.P., Gordon, I.J., Prins, H.H.T., 2008. Nutritional Ecology of Grazing and Browsing Ruminants. The Ecology of Browsing and Grazing. Springer, 89.

Duncan A.J., Elwert C., Villalba J.J., Yearsley J., Pouloupoulou I., Gordon I.J. 2005 Terpenes concentration in *Sitka spruce*. Unpublished data.

Dziba, L.E., Hall, J.O., Provenza, F.D., 2006. Feeding behavior of lambs in relation to kinetics of 1,8-cineole dosed intravenously or into the rumen. Journal of Chemical Ecology 32, 391-408.

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

Egorin, M.J., Sentz, D.L., Rosen, D.M., Ballesteros, M.F., Kearns, C.M., Callery, P.S., Eiseman, J.L., 1996. Plasma pharmacokinetics, bioavailability, and tissue distribution in CD2F1 mice of halomon, an antitumor halogenated monoterpene isolated from the red algae *Portieria hornemannii*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 39, 51-60.

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J., 2002. Methods of in vitro toxicology. Food and Chemical Toxicology 40, 193-236.

Eisert, R., Pawliszyn, J., 1997. New trends in Solid-Phase Microextraction. Critical Reviews in Analytical Chemistry 27, 103-135.

Estell, R.E., 2010. Coping with shrub secondary metabolites by ruminants. Small Ruminant Research 94, 1-9.

Estell, R.E., Fredrickson, E.L., Anderson, D.M., Havstad, K.M., Remmenga, M.D., 2000. Effect of individual terpenes on consumption of alfalfa pellets by sheep. Journal of Animal Science 78, 1636-1640.

Estell, R.E., Fredrickson, E.L., Anderson, D.M., Havstad, K.M., Remmenga, M.D., 2002. Effects of four mono- and sesquiterpenes on the consumption of alfalfa pellets by sheep. Journal of Animal Science 80, 3301-3306.

Estell, R.E., Utsumi, S.A., Cibils, A.F., 2010. Measurement of monoterpenes and sesquiterpenes in serum, plasma, and rumen fluid from sheep. Animal Feed Science and Technology 158, 104-109.

Fady, B., Arbez, M., Marpeau, A., 1992. Geographic variability of terpene composition in *Abies cephalonica* Loudon and *Abies* species around the Aegean: hypotheses for their possible phylogeny from the Miocene. Trees 6, 162-171.

Favaro, G., Magno, F., Boaretto, A., Bailoni, L., Mantovani, R., 2005. Traceability of Asiago Mountain Cheese: A Rapid, Low-Cost Analytical Procedure for its Identification Based on Solid-Phase Microextraction. Journal of Dairy Science 88, 3426-3434.

- Fedele, V., Claps, S., Rubino, R., Sepe, L., Cifuni, G.F., 2004a. Variation in terpene content and profile in milk in relation to the dominant plants in the diet of grazing goats. *South African Journal of Animal Sciences* 34, 145-147.
- Fedele, V., Rubino, R., Claps, S., Manzi, P., Marconi, S., Pizzoferrato, L., 2004b. Seasonal variation in retinol concentration of goat milk associated with grazing compared to indoor feeding. *South African Journal of Animal Sciences* 34, 148-150.
- Fedele, V., Rubino, R., Claps, S., Sepe, L., Morone, G., 2005. Seasonal evolution of volatile compounds content and aromatic profile in milk and cheese from grazing goat. *Small Ruminant Research* 59, 273-279.
- Fernandez-Garcia, E., Imhof, M., Schlichtherle-Cerny, H., Bosset, J.O., Nunez, M., 2008. Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant. *International Dairy Journal* 18, 147-157.
- Fernandez, C., Astier, C., Rock, E., Coulon, J.B., Berdague, J.L., 2003. Characterization of milk by analysis of its terpene fractions. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 445-451.
- Foley, W.J., Lassak, E.V., Brophy, J., 1987. Digestion and absorption of Eucalyptus essential oils in greater glider (*Petauroide svolans*) and brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Journal of Chemical Ecology* 13, 2115-2130.
- Fu, P.P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M.W., 2004. Pyrrolizidine Alkaloids - Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms. *Drug metabolism Reviews* 36, 1-55.
- Gambliel, H.A., Cates, R.G., 1995. Terpene changes due to maturation and canopy level in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) flush needle oil. *Biochemical Systematics and Ecology* 23, 469-476.
- Gandolfi, A.J., Brendel, K., 1990. In vitro systems for nephrotoxicity studies. *Toxicology in Vitro* 4, 337-345.
- Gasparido, B., Procida, G., Volaric, S., Sgorlon, S., Stefanon, B., 2009. Determination of volatile fractions in raw milk and ripenes cheese by means of GC-MS. Results of a survey performed in the marginal area between Italy and Slovenia. *Italian Journal of Animal Science* 8, 377-390.
- Geishauser, T., Gitzel, A. 1996. A comparison of rumen fluid sampled by oro-ruminal probe versus rumen fistula. *Small Ruminant Research* 21, 63-69.
- Gershenzon, J., 1994. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *Journal of Chemical Ecology* 20, 1281-1328.
- Ghosh, P., Besra, S.E., Tripathi, G., Mitra, S., Vedasiromoni, J.R., 2006. Cytotoxic and apoptogenic effect of tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) root extract (TRE) and

two of its steroidal saponins TS1 and TS2 on human leukemic cell lines K562 and U937 and on cells of CML and ALL patients. *Leukemia Research* 30, 459-468.

Gordon, I.J., 1989. Vegetation community selected by ungulates on the Isle of Rhum. I. Food supply. *Journal of Applied Ecology* 26, 35-51.

Gordon, I.J., 2003. Browsing and grazing ruminants: are they different beasts? *Small Ruminant Research* 181, 13-21.

Gounaris, Y., Skoula, M., Fournaraki, C., Drakakaki, G., Makris, A., 2002. Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. *Biochemical Systematics and Ecology* 30, 249-258.

Ha, J.K., Lindsay, R.C., 1991. Volatile Alkylphenols and Thiophenol in Species-related Characterizing Flavors of Red Meats. *Journal of Food Science* 56, 1197-1202.

Hadjigeorgiou, I., Vallerand, F., Tsimpoukas, K. and Zervas, G., 2002. The socio-economics of sheep and goat farming in Greece and the implications for future rural development. *Options Méditerranéennes, Séries B* 39 : 83-93.

Hadjigeorgiou, I., Gordon, I.J., Milne, J.A., 2003. Comparative preference by sheep and goats for Graminaeae forages varying in chemical composition. *Small Ruminant Research* 49, 147-156.

Hadjigeorgiou, I., Osoro, K., Fragoso de Almeida, J.P. and Molle, G., (2005a). Southern European grazing lands: production, environmental and landscape management aspects. *Livestock Production Science*, 96 (1 SPEC. ISS): 51-59.

Hampel, D., Mosandl, A., Wumest, M., 2005. Induction of de novo volatile terpene biosynthesis via cytosolic and plastidial pathways by methyl jasmonate in foliage of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2652-2657.

Harder, J., Probian, C., 1995. Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3804-3808.

Hauswirth, C.B., Scheeder, M.R.L., Beer, J.H., 2004. High ω -3 Fatty Acid Content in Alpine Cheese: The Basis for an Alpine Paradox. *Circulation* 109, 103-107.

Hofmann, R.R., 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* 78, 443-457.

Hollman, P.C.H., Van Trijp, J.M.P., Buysman, M.N.C.P., V.d. Gaag, M.S., Mengelers, M.J.B., De Vries, J.H.M., Katan, M.B., 1997. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS letters* 418, 152-156.

Huber, L. (2001). "Validation of analytical methods: review and strategy " LC GC International.

Huch, H. & Staba E. (1993). "Ontogenic Aspects of Ginkgolide Production in *Ginkgo biloba*". *Planta med.*, Vol. 59, N. 3, 232-239.

IDF (International Dairy Federation), 1982: Cheese and Processed Cheese-Total Solids Content (Reference Method). Standard FIL-IDF 4A. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

IDF (International Dairy Federation), 1987. Milk determination of fat content (Rose Gottlieb) Standard 16 C. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

IDF (International Dairy Federation), 1991: Milk and Milk Products. Fat Content. General Guidance on the use of Butyrometric Methods. Standard FIL-IDF 52. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

IDF (International Dairy Federation), 1993: Milk Nitrogen Content. Standard FIL-IDF 220B. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

IDF Standard 182 (1999). In: Milkfat: Preparation of fatty acid methyl esters. International Dairy Federation, Brussels.

Illius, A.W., Gordon, I.J., 1991. Prediction of intake and digestion in ruminants by a model of rumen kinetics integrating animal size and plant characteristics. *The Journal of Agricultural Science* 116, 145-157.

Illius, A.W., Jessop, N.S., 1995. Modeling metabolic costs of allelochemical ingestion by foraging herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 21, 693-719.

Imhof, R., Glamottli, H., Bosset, J.O., 1994. Volatile Organic Aroma Compounds Produced by Thermophilic and Mesophilic Mixed Strain Dairy Starter Cultures. *LWT Food Science and Technology* 27, 442-449.

Jaramillo, D.P., Garcia, T., Buffa, M., Rodriguez, M., Guamis, B., Trujillo, A. 2009. Effect of the inclusion of whole citrus in the ration of lactating ewes on the properties of milk and cheese characteristics during ripening. *Journal of Dairy Science* 92, 469-476.

Johnson, A.E., James, L.F., Spillet, J., 1976. The abortifacient and toxic effects of big sagebrush (*Artemisia tridentata*) and juniper (*Juniperus osteosperma*) on domestic sheep. *Journal of Range Management* 29, 278-280.

Karamanoli, K., Vokou, D., Menkissoglu, U., Constantinidou, H.I., 2000. Bacterial colonization of phyllosphere of Mediterranean aromatic plants. *Journal of Chemical Ecology* 26, 2035-2048.

- Karoui, R., De Baerdemaeker, J., 2007. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry* 102 (3), 621-640.
- Karmiris, I.E., Nastis, A.S., 2010. Diet overlap between small ruminants and the European hare in a Mediterranean shrubland. *Central European Journal of Biology* 5, 729-737.
- King, D.J., Gleadow, R.M., Woodrow, I.E., 2004. Terpene deployment in *Eucalyptus polybractea*; relationships with leaf structure, environmental stresses, and growth. *Functional Plant Biology* 31, 451-460.
- Kleinheinz, G.T., Baglet, S.T., St.John, W.P., Rughani, J.R., McGinnis, G.D., 1999. Characterization of alpha-pinene-degrading microorganisms and application to a bench-scale biofiltration system for VOC degradation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 151-157.
- Langenheim, J.H., 1994. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20, 1223-1280.
- Lantto, T.A., Colucci, M., Zevadove, V., Hiltunen, R., Raasmaja, A., 2009. Cytotoxicity of curcumin, resveratrol and plant extracts from basil, juniper, laurel and parsley in SH-SY5Y and CV1-P cells. *Food Chemistry* 117, 405-411.
- Larick, D.K., Hedrick, H.B., Bailey, M.E., Williams, J.E., Hancock, D.L., Garner, G.B., Morrow, R.E., 1987. Flavor constituents of beef as influenced by forage and grain feeding. *Journal of Food Science* 52, 245-251.
- Lee, W., Kim, R.B., 2004. Transporters and Renal Drug Elimination. pp. 137-166.
- Leiber, F., Kreuzer, M., Nigg, D., Wettstein, H.R., Scheeder, M.R.L., 2005. A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows' milk of alpine origin. *Lipids* 40, 191-202.
- Llusia, J., Penuelas, G., Alessio, A., Estiarte, M., 2006. Seasonal contrasting changes of foliar concentrations of terpenes and other volatile organic compound in four dominant species of a Mediterranean shrubland submitted to a field experimental drought and warming. *Physiologia Plantarum* 127, 632-649.
- Llusia, J., Penuelas, J., 2000. Seasonal patterns of terpene content and emission from seven Mediterranean woody species in field conditions. *American Journal of Botany* 87, 133-140.
- Lucker, J., El Tamer, M.K., Schwab, W., Verstappen, F.W.A., Van Der Plas, L.H.W., Bouwmeester, H.J., Verhoeven, H.A., 2002. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *European Journal of Biochemistry* 269, 3160-3171.
- Macheboeuf, D., Morgavi, D.P., Papon, Y., Mousset, J.L., Arturo-Schaan, M., 2008. Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. *Animal Feed Science and Technology* 145, 335-350.

- Malecky, M., Broudiscou, L.P., 2009. Disappearance of nine monoterpenes exposed in vitro to the rumen microflora of dairy goats: Effects of inoculum source, redox potential, and vancomycin. *Journal of Animal Science* 87, 1366-1373.
- Malecky, M., Broudiscou, L.P., Schmidely, P., 2009a. Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. *Animal Feed Science and Technology* 154, 24-35.
- Malecky, M., Fedele, V., Broudiscou, L.P., 2009b. In vitro degradation by mixed rumen bacteria of 17 mono- And sesquiterpenes typical of winter and spring diets of goats on Basilicata rangelands (southern Italy). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 531-536.
- Mariaca, R.G., Berger, T.F.H., Gauch, R., Imhof, M.I., Jeangros, B., Bosset, J.O., 1997. Occurrence of Volatile Mono- and Sesquiterpenoids in Highland and Lowland Plant Species as Possible Precursors for Flavor Compounds in Milk and Dairy Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4423-4434.
- Mariaca, R.G., Fernandez-Garcia, E., Mohedano, A.F., Nunez, M., 2001. Volatile fraction of ewe's milk semi-hard cheese manufactured with and without the addition of a cysteine proteinase. *Food Science and Technology International* 7, 131-139.
- Martin, B., Verdier-Metz, I., Buchin, S., Hurtaud, C., Coulon, J.B., 2005. How do the nature of forages and pasture diversity influence the sensory quality of dairy livestock products? *Animal Science* 81, 205-212.
- Martin, D.M., Gershenzon, J., Bohlmann, J., 2003. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant Physiology* 132, 1586-1599.
- Martin, G.J., Martin, M.L., 1995. Stable Isotope Analysis of Food and Beverages by Nuclear Magnetic Resonance. *Annual Reports on NMR Spectroscopy* 31, 81-104.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A. 1995. *Animal Nutrition*, 5th edition.
- McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beever, D.A., Newbold, C.J., 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5011-5014.
- McLean, S., Brandon, S., Boyle, R.R., Wiggins, N., 2008. Development of tolerance to the dietary plant secondary metabolite 1,8-cineole by brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Journal of Chemical Ecology* 34, 672-680.
- McLean, S., Duncan, A.J., 2006. Pharmacological perspectives on the detoxification of plant secondary metabolites: Implications for ingestive behavior of herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 32, 1213-1228.

- McLean, S., Foley, J.W., Davies, W.N., Brandon, S., Duo, L., Blackman, J.A., 1993. Metabolic fate of dietary terpenes from *Eucalyptus radiata* in common ringtail possum (*Pseudocheirus peregrinus*). *Journal of Chemical Ecology* 19, 1625-1643.
- Misra, G., Pavlostathis, G.H., Perdue, E.M., Araujo, A., 1996. Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 831-838.
- Moe, T., 1998. Perspectives on traceability in food manufacture. *Trends in Food Science and Technology* 9, 211-214.
- Moio, L., Rillo, L., Ledda, A., Addeo, F., 1996. Odorous Constituents of Ovine Milk in Relationship to Diet. *Journal of Dairy Science* 79, 1322-1331.
- Morand-Fehr, P., Fedele, V., Decandia, M., Le Frileux, Y., 2007. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68, 20-34.
- Mote, E.T., Villalba, J.J., Provenza, D.F., 2008. Sequence of food presentation influences intake of foods containing tannins and terpenes. *Applied Animal Behaviour Science* 113, 57-68.
- Mountzouris, K.C., Paraskevas, V., Tsirtsikos, P., Palamidi, I., Steiner, T., Schatzmayr, G., Fegeros, K., 2011. Assessment of a phytogenic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. *Animal Feed Science and Technology*. *In press*
- Nieva Moreno, M.I., Zampini, I.C., Ordóñez, R.M., Jaime, G.S., Vattuone, M.A., Isla, M.I., 2005. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8957-8962.
- North Root, H., Yackovich, F., Demetrulias, J., 1982. Evaluation of an in vitro cell toxicity test using rabbit corneal cells to predict the eye irritation potential of surfactants. *Toxicology Letters* 14, 207-212.
- Noziere, P., Graulet, B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P., Doreau, M., 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology* 131, 418-450.
- O'Connell, J.E., Fox, P.F., 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal* 11, 103-120.
- Olivier, R., Lavoie, A.V., Ormero, E., Mouillot, F., Greff, S., Lecareux, C., Staudt, M., Fernandez, C., 2011. Compost spreading in Mediterranean shrubland indirectly increases biogenic emissions by promoting growth of VOC-emitting plant parts. *Atmospheric Environment* 45, 3631-3639.
- Ormero, E., Fernandez, C., Mevy, J.-P., 2007. Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry* 68, 840-852.

- Pan, M.H., Ghai, G., Ho, C.T., 2008. Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Molecular Nutrition and Food Research* 52, 43-52.
- Papachristou, T.G., 1997. Foraging behaviour of goats and sheep on Mediterranean kermes oak shrublands. *Small Ruminant Research* 24, 85-93.
- Papachristou, T.G., Nastis, A., 1993. Diets of goats grazing oak shrublands of varying in northern Greece. *Journal of Range Management* 46, 220-226.
- Papachristou, T.G., Nastis, A., 1996. Influence of deciduous broadleaved woody species in goat nutrition during the dry season in northern Greece. *Small Ruminant Research* 20, 15-22.
- Pappa, C., Kandarakis, I., Anifantakis, E.M., Zerfiridis, G.K., 2006. Influence of types of milk and culture on the manufacturing practices, composition and sensory characteristics of Teleme cheese during ripening. *Food Control* 17, 570-581.
- Park, Y.W., 2007. Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68, 73-87.
- Pass, G.J., McLean, S., Stupans, I., Davies, N., 2001. Microsomal metabolism of the terpene 1,8-cineole in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*), koala (*Phascolarctos cinereus*), rat and human. *Xenobiotica* 31, 205-221.
- Pawliszyn, J., 1995. New directions in sample preparation for analysis of organic compounds. *Trends in Analytical Chemistry* 14, 113-122.
- Penalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., Perea, A., 2005. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS* 113, 1-6.
- Petrakis, P.V., Couladis, M., Roussis, V., 2005. A method for detecting the biosystematic significance of the essential oil composition: The case of five Hellenic *Hypericum L.* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 873-898.
- Phillips, T.W., Parajulee, M.N., Weaver, D.K., 1995. Toxicity of terpenes secreted by the predator *Xylocoris flavipes* (Reuter) to *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.). *Journal of Stored Products Research* 31, 131-138.
- Piasentier, E., Valusso, R., Camin, F., Versini, G., 2003. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science* 64, 239-247.
- Pietta, P., Mauri, P. & Rava, A. (1992). "Rapid liquid chromatography of terpenes in *Ginkgo biloba L.* extracts and products." *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, Vol. 10, N. 10-12, 1077-1079.
- Pirisi, A., Lauret, A., Dubeuf, J.P., 2007. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Ruminant Research* 68, 167-178.

- Poulopoulou, I., Pitulis, N., Mountzouris, K.C., Hadjigeorgiou, I., Xylouri, E., 2010. In vitro evaluation of terpene 's effects on aspects of animal physiology: cytotoxicity and rumen degradation. Book of Abstracts of the 61st Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Wageningen Academic, The Netherlands, 127.
- Prache, S., Cornu, A., Berdague, J.L., Priolo, A., 2005. Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research* 59, 157-168.
- Prache, S., Martin, B., Noziere, P., Engel, E., Besle, J.M., Ferlay, A., Micol, D., Cornu, A., Cassar-Malek, I., Andueza, D., 2007. Diet authentication in ruminants from the composition of their products and tissues. *Productions Animales* 20, 295-307.
- Prache, S., Priolo, A., Grolier, P., 2003. Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: Its significance for the traceability of grass-feeding. *Journal of Animal Science* 81, 360-367.
- Prache, S., Theriez, M., 1999. Traceability of lamb production systems: Carotenoids in plasma and adipose tissue. *Animal Science* 69, 29-36.
- Priolo, A., Cornu, A., Prache, S., Krogmann, M., Kondjoyan, N., Micol, D., Berdague, J.L., 2004. Fat volatiles tracers of grass feeding in sheep. *Meat Science* 66, 475-481.
- Priolo, A., Micol, D., Agabriel, J., Prache, S., Dransfield, E., 2002. Effect of grass or concentrate feeding systems on lamb carcass and meat quality. *Meat Science* 62, 179-185.
- Priolo, A., Prache, S., Micol, D., Agabriel, J., 2003. Reflectance spectrum of adipose tissue to trace grass feeding in sheep: Influence of measurement site and shrinkage time after slaughter. *Journal of Animal Science* 80, 886-891.
- Provenza, F.D., 1995. Postingestive feedback as an elementary determinant of food preference and intake in ruminants. *Journal of Range Management* 48, 2-17.
- Raspor, P., 2005. Bio-markers: Traceability in food safety issues. *Acta Biochimica Polonica* 52, 659-664.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y., 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research* 79, 57-72.
- Renou, J.-P., Deponge, C., Gachon, P., Bonnefoy, J.-C., Coulon, J.-B., Garel, J.-P., Verit, R., Ritz, P., 2004. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. *Food Chemistry* 85, 63-66.
- Revello Chion, A., Tabacco, E., Giaccone, D., Peiretti, P.G., Battelli, G., Borreani, G., Variation of fatty acid and terpene profiles in mountain milk and "Toma piemontese"

cheese as affected by diet composition in different seasons. *Food Chemistry* 121, 393-399.

Roberts, L.J., Olson, E.B., 1999. Effect of *Euphorbia esula* on sheep rumen microbial activity and mass in vitro. *Journal of Chemical Ecology* 25, 297-314.

Rogosic, J., Pfister, J.A., Provenza, D.F., Grbesa, D., 2006. Sheep and goat preference for and nutritional value of Mediterranean maquis shrubs. *Small Ruminant Research* 64, 169-179.

Rossi, R., Basilico, F., 2009. "Analytical methods for characterizing bioactive terpene lactones in *Ginkgo Biloba* extracts and performing pharmacokinetic studies in animal and human." www.intechopen.com/download/pdf/pdfs_id/12832

Roussis, V., Tsoukatou, M., Petrakis, P.V., Ioanna, C., Skoula, M., Harborne, J.B., 2000. Volatile constituents of four *Helichrysum* species growing in Greece. *Biochemical systematics and ecology* 28, 163-175.

Santos, A.M., Vasconcelos, T., Mateus, E., Farrall, M.H., Gomes da Silva, M.D.R., Paiva, M.R., Branco, M., 2006. Characterization of the volatile fraction emitted by phloems of four pinus species by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. 28th International Symposium on Capillary Chromatography and Electrophoresis 1105, 191-198.

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

Sanz Sampelayo, M.R., Fernandez Navarro, J.R., Hermoso, R., Gil Extremera, F., Rodriguez Osorio, M., 2006. Thermogenesis associated to the intake of a diet non-supplemented or supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acid-rich fat, determined in rats receiving the same quantity of metabolizable energy. *Annals of Nutrition and Metabolism* 50, 184-192.

Saroglou, V., Marin, P.D., Rancic, A., Veljic, M., Skaltsa, H., 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. *Biochemical systematics and ecology* 35, 146-152.

Scintu, M.F., Piredda, G., 2007. Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. *Goat and Sheep Milk* 68, 221-231.

Sekiya, J., Kajiwara, T., Munechika, K., Hatanaka, A., 1983. Distribution of lipoxygenase and hydroperoxide lyase in the leaves of various plant species. *Phytochemistry* 22, 1867-1869.

Serrano, E., Cornu, A., Kondjoyan, N., Agabriel, J., Micol, D., 2011. Traceability of grass feeding in beef: terpenes, 2,3-octanedione and skatole accumulation in adipose tissue of young bulls. *Animal* 5, 641.

- Serrano, E., Cornu, A., Kondjoyan, N., Figueredo, G., Agabriel, J., Micol, D., 2007. Terpene accumulation in muscle and fatty tissues of calves supplemented with essential oils. *Journal of Animal and Feed Sciences* 16, 168-179.
- Sfougaris, A.I., 1996. Food resources and quality for the introduced Cretan wild goat or agrimi *Capra aegagrus cretica* on Atalanti island, Greece and implications for ecosystem management. *Biological Conservation* 78.
- Sharkey, T.D., Chen, X., Yeh, S., 2001. Isoprene Increases Thermotolerance of *Fosmidomycin*-Fed Leaves. *Plant Physiology* 125, 2001-2006.
- Shipley, L.A., Illius, A.W., Hobbs, N.T., Spalinger, D.E., 1999. Predicting bite size selection of mammalian herbivores: a test of a general model of diet optimization. *Oikos* 84, 55-68.
- Spencer, J.P.E., Abd El Mohsen, M.M., Minihane, A.M., Mathers, J.C., 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: Strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition* 99, 12-22.
- Stewart, C.S. 1991. The rumen bacteria. In: *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. Editor J.P. Jouanx, INRA. ISBN: 2-7380-0345-1.
- Suzuki, J., Bailey, M.E., 1985. Direct sampling capillary GLC analysis of flavor volatiles from ovine fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 343-347.
- Tan, Q., Day, D.F., 1998. Organic co-solvent effects on the bioconversion of (R)-(+)-limonene to (R)-(+)-terpineol. *Process Biochemistry* 33, 755-761.
- Tava, A., Pecetti, L., 1997. Volatiles from *Medicago sativa* complex flowers. *The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular* 45, 1145-1148.
- Tibballs, J., James, A., 1995. Eucalyptus oil - Medicinal therapy or folk remedy? *Australian Journal of Hospital Pharmacy* 25, 516-519.
- Tornambe, G., Cornu, A., Pradel, P., Kondjoyan, N., Carnat, A.P., Petit, M., Martin, B., 2006. Changes in Terpene Content in Milk from Pasture-Fed Cows. *Journal of Dairy Science* 89, 2309-2319.
- Tornambe, G., Cornu, A., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Kondjoyan, N., Figueredo, G., Hulin, S., Martin, B., 2008. Addition of Pasture Plant Essential Oil in Milk: Influence on Chemical and Sensory Properties of Milk and Cheese. *Journal of Dairy Science* 91, 58-69.
- Torregrossa, A.M., Dearing, M.D., 2009. Nutritional toxicology of mammals: Regulated intake of plant secondary compounds. *Functional Ecology* 23, 48-56.
- Toso, B., Procida, G., Stefanon, B., 2002. Determination of volatile compounds in cows' milk using headspace GC-MS. *Journal of Dairy Research* 69, 569-577.

- Tsiplakou, E., Kominakis, A., Zervas, G., 2008a. The interaction between breed and diet on CLA and fatty acids content milk fat of four sheep breeds kept indoors or at grass. *Small Ruminant Research* 74, 179-187.
- Tsiplakou, E., Kominakis, A., Zervas, G., 2008b. The interaction between breed and diet on CLA and fatty acids content of milk fat of four sheep breeds kept indoors or at grass. *Small Ruminant Research* 74, 179-187.
- Tsiplakou, E., Hadjigeorgiou, I., Sotirakoglou, K., Zervas, G. 2011. Differences in mean retention time of sheep and goats under controlled feeding practices. *Small Ruminant Research* 95, 48-53.
- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E.E., Froehlich, J.E., Croteau, R., 1999. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology* 120, 879-886.
- Uribe, S., Pena, A., 1990. Toxicity of allelopathic monoterpene suspensions on yeast dependence on droplet size. *Journal of Chemical Ecology* 16, 1399-1408.
- Utsumi, S.A., Cibils, A.F., Estell, R.E., Soto-Navarro, S.A., Van Leeuwen, D., 2009. Seasonal changes in one seed juniper intake by sheep and goats in relation to dietary protein and plant secondary metabolites. *Small Ruminant Research* 81, 152-162.
- Van Beek, T.A. (2002), Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts. *Journal of Chromatography A*, Vo. 967, N. 1, 21-55.
- Vasta, V., Nudda, A., Cannas, A., Lanza, M., Priolo, A., 2008. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Small Ruminant Research* 147, 223-246.
- Vasta, V., Priolo, A., 2006. Ruminant fat volatiles as affected by diet. A review. *Meat Science* 73, 218-228.
- Viallon, C., Martin, B., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Garel, J.P., Coulon, J.B., Berdague, J.L., 2000. Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. *Lait* 80, 635-641.
- Viallon, C., Verdier-Metz, I., Denoyer, C., Pradel, P., Coulon, J.B., Berdague, J.L., 1999. Desorbed terpenes and sesquiterpenes from forages and cheeses. *Journal of Dairy Research* 66, 319-326.
- Villalba, J.J., Provenza, D.F., 2010. Challenges in Extrapolating in vitro findings to in vivo evaluation of plant resources. In *In Vitro Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies*. Springer Science & Business Media B.V., Dordrecht, 233-242.

- Villalba, J.J., Provenza, F.D., 2005. Foraging in chemically diverse environments: Energy, protein, and alternative foods influence ingestion of plant secondary metabolites by lambs. *Journal of Chemical Ecology* 31, 123-138.
- Villalba, J.J., Provenza, F.D., Olson, K.C., 2006. Terpenes and carbohydrate source influence rumen fermentation, digestibility, intake, and preference in sheep. *Journal of Animal Science* 84, 2463-2473.
- Walker, I., Coleman, M.D., 1995. The blood-brain barrier: in vitro methods and toxicological applications. *Toxicology in Vitro* 9, 191-204.
- Wall, B., 1994. Quality Management at Golden Wonder. *Industrial Management & Data System* 94, 24-28.
- Welch, L.B., McArthur, E.D., 1981. Variation of monoterpenoid content among subspecies and accessions of *Artemisia tridentata* grown in a uniform garden. *Journal of Range Management* 34, 380-384.
- Welch, L.B., Rederson, C.J., 1981. In vitro digestibility among accessions of big sagebrush by wild mule deer and its relationship to monoterpenoid content. *Journal of Range Management* 34, 497-500.
- Werner, M., Zissler, D., Peschke, K., 1999. Structure and energy pathways of spermatozoa of the rove beetle *Aleochara bilineata* (Coleoptera, Staphylinidae). *Tissue and Cell* 31, 413-420.
- Wong, K.T., Tan, B.K.H., 1996. In vitro cytotoxicity and immunomodulating property of *Rhaphidophora korthalsii*. *Journal of Ethnopharmacology* 52, 53-57.
- Yang, C., Xu, Y.R. & Yao, W.X. (2002). Extraction of Pharmaceutical Components from *Ginkgo biloba* Leaves Using Supercritical Carbon Dioxide. *Journal Agricultural Foods Chemistry*, Vol 50, N. 4, 846-849.
- Young, O.A., Berdague, J.L., Viallon, C., Rousset-Akrim, S., Theriez, M., 1997. Fat-borne volatiles and sheepmeat odour. *Meat Science* 45, 183-200.
- Zhou, S., Koh, H.L., Gao, Y., Gong, Z.Y., Lee, E.J.D., 2004. Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. *Life Sciences* 74, 935-968.
- Zou, J., Cates, C.R., 1995. Foliage constituents of Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Pinaceae)): their seasonal variation and potential role in Douglas Fir resistance and silviculture management. *Journal of Chemical Ecology* 21, 387-402.
- Zygoiannis, D., 2006. Sheep production in the world and in Greece. Keynote Lectures of the 6th International Sheep Veterinary Congress 62, 143-147.
- Ραγκούση-Ιγνατιάδου, Β., *Χημεία Φυσικών Προϊόντων*, Αθήνα, 198

Παράρτημα

Πίνακας 21. Εξέλιξη της συγκέντρωσης λιπαρών οξέων επί τοις εκατό (%) στο γάλα των αιγών των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Λιπαρό οξύ (%)	Επέμβαση	Ημέρα						P
		7	11	13	18	19	20	
C ₄	C	0,25	0,78	0,89	1,16	1,03	1,22	ns
	T	0,57	0,07	0,55	0,74	0,55	0,64	
C ₆	C	1,27	1,58	1,13	1,33	1,04	0,89	ns
	T	1,25	1,33	1,28	1,39	1,20	1,67	
C ₈	C	1,96	2,46	2,06	2,37	1,00	1,19	ns
	T	2,27	2,07	1,96	2,53	1,12	0,21	
C ₁₀	C	9,94a	10,94b	9,77a	10,817b	11,79b	13,05c	*
	T	11,07a	10,22b	10,36b	11,63c	11,81c	12,39c	
C ₁₂	C	5,83	6,06	5,79	6,13	6,84	6,69	ns
	T	4,53	6,14	5,65	7,63	7,67	6,52	
C ₁₄	C	14,83	15,51	16,21	15,59	16,79	15,59	ns
	T	16,24	16,36	16,64	7,06	17,41	17,11	
C _{14:1}	C	1,07	1,05	1,04	0,77	0,58	0,48	ns
	T	0,86	1,06	1,07	0,73	0,98	0,36	
C ₁₆	C	42,09	41,17	40,45	40,47	39,99	40,85	ns
	T	41,30	41,82	42,44	40,54	39,15	42,64	
C _{16:1}	C	0,12	0,17	0,18	0,30	0,53	0,51	ns
	T	0,21	0,13	0,39	0,29	0,63	0,38	
C ₁₈	C	4,43a	3,62b	3,77b	3,97b	4,87a	3,83b	*
	T	3,61a	3,70a	2,94b	3,29a	4,45a	3,79a	
C _{18:1}	C	15,39	14,67	16,91	15,26	14,34	15,26	ns
	T	13,30	14,85	15,11	12,84	13,97	12,60	
C _{18:2}	C	1,43	1,36	1,44	1,17	1,19	1,26	ns
	T	1,04	1,29	1,17	1,03	1,22	1,15	
C _{18:3}	C	0,19	0,16	0,08	0,09	1,19	1,12	ns
	T	0,19	0,12	0,16	0,09	0,42	1,11	
CLA	C	0,49a	0,46a	0,57a	0,38a	0,09b	0,10b	***
	T	0,49a	0,87a	0,63a	0,56b	0,19b	0,12b	

*P< 0,05, ***P< 0,001, ns: P>0,05, a,b,c: στατιστικώς σημαντικές (P< 0,05) διαφορές μεταξύ των ημερών

Πίνακας 22. Εξέλιξη της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων επί τοις εκατό (%) στο γάλα των προβάτων των ομάδων του μάρτυρα (C) και της επέμβασης (T).

Λιπαρό οξύ	Επέμβαση	Ημέρα										P
		1	2	7	9	11	13	15	18	19	20	
C ₄	C	1,87	1,50	1,45	1,57	2,01	1,45	1,08	1,74	1,85	1,99	ns
	T	2,06	1,93	1,80	1,18	1,19	1,55	1,56	1,79	1,57	1,70	
C ₆	C	2,16	1,88	1,89	1,95	2,13	1,93	1,76	2,32	2,40	2,41	ns
	T	2,13	2,00	1,95	1,54	1,58	1,83	1,83	1,98	1,98	2,24	
C ₈	C	2,50	2,46	2,37	2,43	2,55	2,50	2,44	2,96	2,90	2,94	ns
	T	2,46	2,38	2,22	2,03	1,86	2,16	2,18	2,34	2,45	2,49	
C ₁₀	C	8,34	8,31	7,97	8,15	8,30	8,41	8,47	9,74	9,57	9,81	ns
	T	7,97	7,52	7,08	6,76	6,51	7,13	7,04	7,54	8,23	8,27	
C ₁₂	C	4,69	4,37	4,54	4,59	4,61	4,63	4,72	5,37	5,22	5,37	ns
	T	4,67	4,47	4,15	4,19	4,03	4,26	4,18	4,54	4,91	4,84	
C ₁₄	C	13,50	13,46	13,05	13,03	13,27	13,62	14,59	13,63	13,70	13,87	ns
	T	13,09	12,66	12,53	12,55	12,73	13,07	12,89	12,75	13,49	13,41	
C _{14:1}	C	0,49	0,52	0,53	0,48	0,47	0,50	0,48	0,52	0,48	0,48	ns
	T	0,48	0,48	0,51	0,45	0,47	0,47	0,47	0,54	0,50	0,50	
C ₁₆	C	33,77	32,92	33,25	32,78	32,89	33,47	33,67	31,48	32,26	32,73	ns
	T	32,20	31,66	33,04	33,56	34,21	33,48	34,14	32,77	33,33	33,71	
C _{16:1}	C	1,82	1,12	1,18	1,08	1,22	1,11	1,07	1,18	1,01	1,09	ns
	T	1,61	1,13	1,13	0,99	1,00	0,84	1,03	1,15	1,09	0,96	
C ₁₈	C	6,78a	7,02b	7,05b	7,18b	6,86a	7,00b	7,51c	6,38a	6,39a	6,32a	*
	T	8,04a	8,54b	8,56b	8,70b	8,82c	8,72b	8,63b	7,73b	7,74a	7,83a	
C _{18:1}	C	19,71	21,36	21,60	21,86	20,95	20,71	20,38	20,16	19,84	18,88	ns
	T	21,27	22,92	22,55	23,00	22,85	21,85	21,65	22,32	20,39	19,95	
C _{18:2}	C	2,23	2,53	2,66	2,79	2,59	2,59	2,68	2,57	2,53	2,35	ns
	T	2,02	2,28	2,35	2,61	2,54	2,38	2,37	2,47	2,37	2,26	
C _{18:3}	C	0,51	0,42	0,69	0,36	0,41	0,28	0,45	0,27	0,22	0,21	ns
	T	0,44	0,31	0,30	0,68	0,40	0,39	0,22	0,23	0,24	0,21	
CLA	C	0,60	0,71	0,74	0,76	0,72	0,76	0,78	0,74	0,74	0,66	ns
	T	0,54	0,62	0,73	0,71	0,72	0,73	0,73	0,71	0,62	0,56	ns

*: P<0,05, ns: P>0,05, a,b,c: στατιστικώς σημαντικές (P< 0,05) διαφορές μεταξύ των ημερών.

Πίνακας 23. Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου (μg/ml) κατά τις πρώτες 24 ώρες στο πλάσμα του αίματος των αιγών που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια

	Ωρα δειγματοληψίας						SE	P
	0	2	4	8	12	24		
Επέμβαση	α-πινένιο							
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	**
T	0,001	0,026	0,051	0,006	0,004	0,006		
	Λεμονένιο							
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	*
T	0,000	0,098	0,159	0,005	0,007	0,000		
	β-καρνοφυλλένιο							
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0006	ns
T	0,000	0,002	0,002	0,002	0,001	0,000		

Πίνακας 24 Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου (μg/ml) στο πλάσμα του αίματος των αιγών που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

	Ημέρα δειγματοληψίας										SE	P
	1	2	3	5	7	15	18	19	20			
Επέμβαση	α-πινένιο											
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	**
T	0,000	0,006	0,004	0,002	0,051	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000		
	Λεμονένιο											
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	*
T	0,000	0,000	0,005	0,050	0,075	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000		
	β-καρνοφυλλένιο											
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0006	ns
T	0,000	0,000	0,003	0,001	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		

Πίνακας 25 Μέσος όρος συγκέντρωσης (μg/ml) α-πινενίου και λεμονενίου στο γάλα των αιγών που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

	Ημέρα δειγματοληψίας												SE	P
	1	2	3	5	7	11	13	15	18	19	20			
Επέμβαση	α-πινένιο													
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,14	***
T	0,000	0,000	0,000	0,058	0,060	0,195	0,296	0,159	0,486	0,286	0,201			
	Λεμονένιο													
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,09	***
T	0,000	0,000	0,000	0,038	0,000	0,972	0,178	0,089	0,023	0,170	0,114			

Πίνακας 26 Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου (μg/ml) κατά τις πρώτες 24 ώρες στο πλάσμα του αίματος των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια

	Ωρα δειγματοληψίας						SE	P
	0	2	4	8	12	24		
Επέμβαση	α-πινένιο							
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	**
T	0,000	0,003	0,004	0,002	0,002	0,001		
	Λεμονένιο							
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	**
T	0,000	0,006	0,006	0,003	0,003	0,001		
	β-καρνοφυλλένιο							
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	*
T	0,000	0,002	0,000	0,000	0,001	0,000		

Πίνακας 27 Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων α-πινενίου, λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου (μg/ml) στο πλάσμα του αίματος των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα παραπάνω τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

	Ημέρα δειγματοληψίας												SE	P
	1	2	3	5	7	9	11	13	15	18	19	20		
Επέμβαση	α-πινένιο													
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	***
T	0,000	0,008	0,004	0,005	0,001	0,002	0,003	0,003	0,002	0,006	0,004	0,002		
	Λεμονένιο													
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	***
T	0,000	0,001	0,000	0,003	0,001	0,003	0,005	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002		
	β-καρνοφυλλένιο													
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	*
T	0,000	0,006	0,001	0,007	0,000	0,004	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000		

Πίνακας 28 Μέσος όρος συγκέντρωσης (μg/ml) α-πινενίου λεμονενίου και β-καρνοφυλλενίου στο γάλα των προβάτων που ελάμβαναν 1g/κεφαλή/ημέρα από κάθε ένα από τα τερπένια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

	Ημέρα δειγματοληψίας												SE	P
	1	2	3	7	9	11	13	15	18	19	20			
Επέμβαση	α-πινένιο													
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,6	***
T	0,000	0,766	2,314	1,395	2,250	1,112	2,351	3,737	1,887	1,919	0,852			
	Λεμονένιο													
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	**
T	0,000	1,001	1,006	8,855	3,966	5,033	0,776	2,996	2,289	1,641	0,484			
	β-καρνοφυλλένιο													
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,01	***
T	0,000	0,101	0,4353	6,761	0,871	1,988	5,028	4,876	3,719	1,689	0,439			