

Αξιοποίηση Φυσικών Αντιοξειδωτικών στην Εκτροφή των Αγροτικών Ζώων για Παραγωγή Προϊόντων Ποιότητας

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Ζωοτεχνίας

MIS 380231

Δράση 6^η : Ποιότητα αυγών ωοπαραγωγών ορνίθων

Παραδοτέα: D6_P4

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ ΚΑΙ
ΝΑΡΙΝΓΙΝΗΣ ΣΕ ΩΟΤΟΚΕΣ ΟΡΝΙΘΕΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΛΙΠΑΡΩΝ
ΟΞΕΩΝ ΤΟΥ ΚΡΟΚΟΥ**

Υλικά και μέθοδοι

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της διατροφικής χορήγησης εσπεριδίνης και ναρινγίνης στο προφίλ λιπαρών οξέων του κρόκου έγινε συλλογή 8 αυγών ανά επέμβαση στην αρχή του πειράματος (0 εβδομάδα) την 1^η, 5^η και 9^η εβδομάδα του πειράματος. Ακολούθησε διαχωρισμός του κρόκου από το αυγό και στη συνέχεια οι κρόκοι λυοφιλοποιήθηκαν. Για τον προσδιορισμό της σύνθεσης της λιπαρής φάσης του κρόκου έγινε αρχικά εκχύλιση του λίπους από τους λυοφιλοποιημένους κρόκους και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων. Η ακριβής διαδικασία περιγράφεται παρακάτω:

1. Εκχύλιση του ολικού λίπους των κρόκων των αυγών με τροποποιημένη μέθοδο Folch

Η μέθοδος εκχύλισης του λίπους από ζωικούς ιστούς όπως αναπτύχθηκε από τους Folch et al. (1957) θεωρείται μια κλασική και αξιόπιστη μέθοδος για την ποσοτική παραλαβή των ολικών λιπιδικών συστατικών. Βάσει της μεθόδου αυτής, σε ομογενοποιημένο δείγμα προστίθεται μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης 2:1 (v/v) και ακολουθεί προσθήκη νερού σε αναλογία 0,2 (v) προς τον αρχικό συνολικό όγκο των διαλυτών.

Για την εκχύλιση του ολικού λίπους από τα δείγματα των λυοφιλοποιημένων κρόκων των αυγών εφαρμόστηκε μια τροποποιημένη μορφή της μεθόδου Folch. Αρχικά, καθένα δείγμα λυοφιλοποιημένου κρόκου κονιορτοποιήθηκε και ομογενοποιήθηκε. Από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,5 g ξηρής μάζας κρόκου. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε 3 στάδια και χρησιμοποιήθηκαν 7,20 mL συνολικών διαλυτών CHCl₃-MeOH-H₂O σε αναλογία 2:1:0,6 (v/v/v) [αναλογία «δείγμα-διαλύτης» 1:14,4 (v/v)].

2. Ανάλυση με χρωματογραφία αερίου-υγρού (GLC) για τον προσδιορισμό της ποιότητας και της ποσότητας των λιπαρών οξέων του ολικού λίπους των κρόκων μετά από εστεροποίηση.

Αρχή μεθόδου

Τα λιπαρά οξέα των λιπιδικών εκχυλισμάτων μετατρέπονται στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες τους μέσω εστεροποίησης σε αλκαλικό περιβάλλον. Για τη μετατροπή των



ουδέτερων λιπιδίων, και κυρίως των κηρών, σε μεθυλεστέρες εφαρμόζεται η οξυκαταλυόμενη μεθανόλυση. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η πτητικότητα των λιπαρών οξέων. Στη συνέχεια, οι μεθυλεστέρες ενίονται στον αέριο χρωματογράφο και καθώς διαπερνούν τη στήλη κατανέμονται ανάμεσα στο υλικό της στατικής φάσης και του φέροντος αερίου (ήλιο, He). Η κατανομή των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων εξαρτάται από την πτητικότητα και τη συγγένειά τους με τη στατική φάση. Πραγματοποιείται, λοιπόν, έκλυση των μεθυλεστέρων από τη στήλη, και στην περίπτωση που αυτή είναι πολική διαχωρίζει τα cis-trans ισομερή των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων, τα υδροξύ-, ίσο- και αντίσο- λιπαρά οξέα κατά σειρά ελαττώμενης πτητικότητας και αυξανόμενης συγγένειας προς τη στατική φάση, σε μικρό χρόνο ανάλυσης, συνήθως 20-60 min.

Η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων γίνεται με σύγκριση των χρόνων κατακράτησής τους (Retention time, Rt) με τους χρόνους κατακράτησης των προτύπων των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων. Παρέχεται, λοιπόν, η δυνατότητα προσδιορισμού της σχετικής αναλογίας των λιπαρών οξέων στο μετρούμενο δείγμα μέσω του ανιχνευτή F.I.D., του οποίου το σήμα εξαρτάται από τα ιόντα που παράγονται κατά την καύση των συστατικών του δείγματος σε φλόγα υδρογόνου-αέρα και από την ύπαρξη δραστικών ομάδων (π.χ. υδροξύλιο, αμινομάδα) στις ουσίες.

Πειραματική Πορεία

Εστεροποίηση σε ήπιο αλκαλικό περιβάλλον

Δείγμα ολικών λιπιδίων (40 mg ολικού λίπους) από κάθε δείγμα κρόκου, εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Κατόπιν, προστίθενται 1,00 mL n-εξανίου με το εσωτερικό πρότυπο του λαυρικού οξέος στον ίδιο διαλύτη και 0,15 mL καυστικού καλίου 2,0 N σε μεθανόλη. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται ισχυρά για 2 min σε κυκλοαναδευτήρα. Έπειτα, προστίθενται 0,2 g θεικού νατρίου (αφυδατικό μέσο) και το σύστημα αφήνεται για περίπου 10-15 min προκειμένου να γίνει εξισορρόπηση των δύο φάσεων. Στην άνω φάση του εξανίου παραμένουν οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων, ενώ στην κάτω μεθανολική φάση μεταφέρονται η γλυκερίνη και άλλα αδιάλυτα συστατικά του δείγματος (Σινάνογλου, 1998; Sinanoglou and Miniadis-Meimaroglou, 1998).

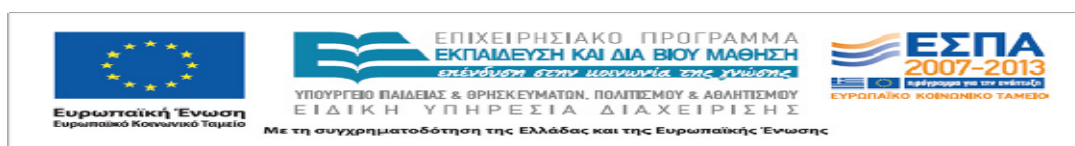
Πρότυποι μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων

□ Supelco TM 37 Component FAME Mix C4-C24, 100mg Neat, Catalog No: 18919- 1AMP (Merck, Darmstadt, Germany)

□ Supelco PUFA No.1, Marine Source, 100mg Neat, Catalog No: 47033

Metal standards (titrisol) (Merck, Darmstadt, Germany)

Οργανολογία



□ Αεριοχρωματογράφος Agilent 6890 Series Gas Chromatograph με ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (F.I.D.) εφοδιασμένος με split/splitless εισαγωγή. Ο αεριοχρωματογράφος περιέχει τα βασικά μέρη του συστήματος, δηλαδή το φούρνο με θέση για δύο στήλες, δύο χώρους εισαγωγής του δείγματος αντιστοίχως (injectors) και τον ανιχνευτή (detector).

□ Στήλη: DB-23 capillary column (60m×0,25 mm i.d., 0,15 μm film) [50%-Cyanopropyl-methylpolysiloxane], υψηλής πολικότητας, σχεδιασμένη για την ανάλυση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAMES), με εξαιρετική διαχωριστική ικανότητα των cis- και trans-FAME ισομερών.

□ Οβίδα αερίου ηλίου (He) (φέρων αέριο), η οποία συνδέεται με τον αεριοχρωματογράφο μέσω βαλβίδας μείωσης της πίεσης (μειωτήρας) που φέρει μανόμετρο.

□ Οβίδα αερίου υδρογόνου (H₂) (καύσιμο), η οποία συνδέεται με τον αεριοχρωματογράφο μέσω βαλβίδας μείωσης της πίεσης (μειωτήρας) που φέρει μανόμετρο.

□ Οβίδα ατμοσφαιρικού αέρα (οξειδωτικό), η οποία συνδέεται με τον αεριοχρωματογράφο μέσω βαλβίδας μείωσης της πίεσης (μειωτήρας) που φέρει μανόμετρο.

□ Μικροσύριγγα Hamilton, 1 μL

□ H/Y με το υποστηρικτικό λογισμικό Hewlett Packard (Agilent) ChemStation Software

□ Καταγραφέας HP

Πορεία της GC ανάλυσης

Η αρχική θερμοκρασία προγραμματίστηκε στους 100 °C για 0 min. Στη συνέχεια, αυξήθηκε από τους 100 °C έως τους 150 °C με ρυθμό 10 °C/ min και διατηρήθηκε σταθερή στους 150 °C για 0 min, μετά αυξήθηκε από τους 150 °C στους 195 °C με ρυθμό 2 °C/min και διατηρήθηκε στους 195 °C για 5 min. Ακολούθησε αύξηση από τους 195 °C στους 210 °C με ρυθμό 1 °C/min. Διατηρήθηκε στους 210 °C για 0 min και τέλος, αυξήθηκε από τους 210 °C στους 240 °C με ρυθμό 10 °C/min όπου διατηρήθηκε σε αυτήν τη θερμοκρασία για 5 min. Η ανάλυση διήρκεσε 55,5 min (Sinanoglou et al., 2013). Η αναλογία split ratio που επιλέχθηκε ήταν 10:1 (v/v).

Αποτελέσματα

Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση της χορήγησης των υπό μελέτη φυσικών αντιοξειδωτικών και της βιταμίνης E στο προφίλ των λιπαρών οξέων στον κρόκο του αυγού (P, P-linear>0.05) σε καμία από τις

δειγματοληψίες (1^η, 5^η και 9^η εβδομάδες χορήγησης). Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την 9^η εβδομάδα του πειράματος.

Πίνακας 1. Επίδραση της χορήγησης εσπεριδίνης και ναρινγίνης για 9 εβδομάδες στο προφίλ λιπαρών οξέων στο κρόκο του αυγού φωτόκων ορνίθων.

Fatty Acid	Επέμβαση						SEM	P-value	P-linear C-E1-E2	P-linear C-N1-N2
	C	E1	E2	N1	N2	VE				
C12:0	0,0075	0,0067	0,0093	0,0075	0,0082	0,0072	0,00169	0,917	0,475	0,812
C14:0	0,517	0,4825	0,547	0,506	0,534	0,461	0,039	0,642	0,634	0,748
C14:1	0,137	0,11	0,136	0,127	0,143	0,108	0,015	0,47	0,968	0,823
C15:0	0,086	0,088	0,088	0,089	0,09	0,082	0,006	0,937	0,805	0,612
C16:0	30,24	30,16	32,67	31,43	30,82	28,96	1,28	0,448	0,317	0,625
Iso-C16:0	0,845	0,914	0,992	0,951	0,847	0,969	0,067	0,519	0,204	0,978
C16:1 ω-9 (cis)	4,66	4,04	4,89	4,77	4,65	4,04	0,364	0,404	0,685	0,992
Iso-C17:0	0,061	0,06	0,075	0,068	0,073	0,066	0,006	0,456	0,194	0,254
Anteiso-C17:0	0,006	0,008	0,011	0,007	0,008	0,008	0,003	0,811	0,254	0,538
Cyclo-C17:0	0,04	0,045	0,037	0,043	0,04	0,038	0,006	0,938	0,799	0,906
C17:0	0,193	0,216	0,203	0,202	0,2	0,2	0,011	0,779	0,562	0,789
C17:1 ω-7	0,101	0,119	0,12	0,12	0,115	0,115	0,008	0,555	0,223	0,3
C18:0	7,26	7,37	7,78	7,03	7,2	7,4	0,36	0,779	0,415	0,9
C18:1 ω-9 (trans)	0	0	0,142	0	0	0,013	0,0078	0,556	0,234	-
C18:1 ω-9 (cis)	37,74	38,33	34,19	36,54	37,42	38,49	2,046	0,694	0,349	0,827
C18:1 ω-7 (cis)	1,84	1,66	1,54	1,83	1,8	2,45	0,363	0,586	0,22	0,833
C18:2ω-6cla	0,061	0,057	0,076	0,062	0,066	0,278	0,089	0,444	0,342	0,636
C18:2 ω-6 t9,t11	0,024	0,027	0,029	0,026	0,033	0,032	0,005	0,786	0,502	0,178
C18:2 ω-6 (cis)	12,94	13,15	13,13	13,13	12,83	12,88	0,58	0,997	0,802	0,856
C18:3 ω-6 (cis)	0,133	0,123	0,13	0,131	0,118	0,125	0,011	0,939	0,884	0,363
C18:3 ω-3 (cis)	0,285	0,268	0,275	0,276	0,28	0,268	0,014	0,95	0,568	0,772
C18:4 ω-3 (cis)	0,0295	0,027	0,026	0,033	0,029	0,025	0,004	0,794	0,559	0,98
C19:0	0,037	0,035	0,046	0,048	0,044	0,042	0,007	0,769	0,449	0,507
C20:0	0,012	0,012	0,013	0,011	0,011	0,015	0,003	0,928	0,738	0,8
C20:1 ω-9 (cis)	0,168	0,149	0,17	0,16	0,16	0,175	0,012	0,657	0,941	0,675
C20:2 ω-6 (cis)	0,021	0,009	0,011	0,011	0,009	0,013	0,005	0,551	0,262	0,219
C20:3 ω-6 (cis)	0,125	0,124	0,229	0,131	0,138	0,143	0,036	0,313	0,16	0,48
C20:4 ω-6 (cis)	0,152	0,131	0,131	0,13	0,141	0,131	0,017	0,923	0,408	0,695
C20:3 ω-3 (cis)	1,46	1,52	1,53	1,37	1,4	1,58	0,091	0,554	0,619	0,555
C20:5 ω-3 (cis)	0,001	0	0	0	0	0	0,0004	0,43	-	-
C22:2 ω-6 (cis)	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
C22:4 ω-6 (cis)	0,105	0,092	0,099	0,094	0,11	0,115	0,014	0,842	0,774	0,849
C22:5 ω-6 (cis)	0,001	0	0	0	0	0,002	0,0009	0,549	0,234	0,234
C22:5 ω-3 (cis)	0,318	0,307	0,393	0,318	0,341	0,363	0,042	0,682	0,25	0,645
C24:0	0,096	0,046	0,057	0,055	0,041	0,055	0,023	0,611	0,382	0,224
C22:6 ω-3 (cis)	0,319	0,323	0,344	0,297	0,321	0,365	0,031	0,717	0,62	0,967
sufa	39,39	39,44	42,53	40,45	39,9	38,3	1,53	0,507	0,286	0,657
mufa	44,64	44,4	41,06	43,5	44,3	45,4	1,88	0,669	0,322	0,763
pufa	15,97	16,15	16,41	16,01	15,81	16,3	0,68	0,99	0,656	0,818
ω3	2,41	2,44	2,57	2,3	2,37	2,6	0,16	0,74	0,542	0,816
ω6	13,56	13,71	13,84	13,72	13,44	13,72	0,59	0,998	0,724	0,848

ω3/ω6	0,177	0,179	0,185	0,169	0,177	0,192	0,01	0,665	0,586	0,962
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------	-------	-------	-------

M: ομάδα του μάρτυρα, VE: βιταμίνη E 0,2g/kg τροφής, E1: εσπεριδίνη 0,750 g/kg τροφής, E2: εσπεριδίνη 1,5 g/kg τροφής, N1: ναρινγίνη 0,750 g/kg τροφής, N2: ναρινγίνη 1,5 g/kg τροφής.

P-linear: Επίπεδο σημαντικότητας για γραμμική σχέση μεταξύ C και E1, E2 και C και N1, N2

Βιβλιογραφικές Αναφορές

Folch, J., Lee, M. and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1): 497–509.

Σινάνογλου, Β. (1998). “Μελέτη της σύστασης των ολικών λιποειδών, απομόνωση και ταυτοποίηση των φωσφολιπιδίων των κεφαλόποδων μαλακίων *Eledone moschata*, *Sepia officinalis* και *Todarodes sagitatus* της Μεσογείου”. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας, Αθήνα.

Sinanoglou, V.J. and Miniadis-Meimaroglou, S. (1998). Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Research International*, 31(6-7): 467–473.

Sinanoglou, V. J., Strati, I. F., Bratakos, S. M., Proestos, C., Zoumpoulakis, P. and Miniadis-Meimaroglou, S. (2013). On the Combined Application of Iatroscaan TLC-FID and GC-FID to Identify Total, Neutral, and Polar Lipids and Their Fatty Acids Extracted from Foods. *ISRN Chromatography*, 2013, 8 pages.

Η Επιτροπή Πιστοποίησης Παραδοτέων

Π. Σιμιτζής
Λέκτορας

Μ. Χαρισμάδου
Επίκουρος καθηγήτρια

Π. Ζουμπουλάκης
Ερευνητής