

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Διερεύνηση της χρήσης υποπροϊόντων γεωργικών βιομηχανιών στη
διατροφή εκτρεφόμενων σαλιγκαριών»**

Θεοδώρου Αλέξανδρος

Βόλος 2018

**«Διερεύνηση της χρήσης υποπροϊόντων γεωργικών βιομηχανιών στη διατροφή
εκτρεφόμενων σαλιγκαριών»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1) Μαριάνθη Χατζιωάννου, Επίκουρος Καθηγήτρια – Εκτροφή Σαλιγκαριών και Βατράχων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. ***Επιβλέπουσα***

2) Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης, Επίκουρος Καθηγητής – Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. ***Μέλος***

3) Περσεφόνη Γιαννούλη, Επίκουρος Καθηγήτρια – Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος Τροφίμων Φυτικής Προέλευσης, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. ***Μέλος***

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, κα. Μαριάνθη Χατζηγιάννου για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κα. Περσεφόνη Γιαννούλη και κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κωνσταντίνο Αποστόλου για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά του, καθώς επίσης όλους όσους συμμετείχαν στο πείραμα για την αμέριστη συμπαράστασή τους και βοήθεια στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τη χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών στη διατροφή εκτρεφόμενων ζώων καθώς και στην προσθήκη τους στο κρέας και τα προϊόντα του. Τα υποπροϊόντα της βιομηχανίας κρασιού (στέμφυλα οينوποιίας) είναι ευρέως διαδεδομένα στις Μεσογειακές χώρες και αποτελούν πηγή τους.

Διατροφικό πείραμα έλαβε χώρα για 60 ημέρες σε διχτυοκήπιο μονάδας εκτροφής σαλιγκαριών στην Κεντρική Ελλάδα, με σκοπό την απόκτηση δεδομένων όσον αφορά την προσθήκη στέμφυλων οينوποιίας, υπό τη μορφή αλεύρου, σε σιτηρέσια εκτρεφόμενων σαλιγκαριών, την μελέτη της επίδρασης τους στην παραγωγική απόδοση της εκτροφής και στην ποιότητα του κρέατος (φιλέτο) των σαλιγκαριών. Συνολικά 270 σαλιγκάρια χωρίστηκαν σε 9 πειραματικές μεταχειρίσεις (3 σιτηρέσια, 3 διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες), τοποθετήθηκαν σε κλιματολογικά ελεγχόμενους κλωβούς και σιτίζονταν ανά δύο ημέρες. Εκτιμήθηκαν παράμετροι μεταβολής βάρους κάθε 15 ημέρες, συνολικής αύξησης βάρους και κατανάλωσης / σαλιγκάρι / ημέρα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε και εκτίμηση περιεκτικότητας πολυφαινολών στο μυϊκό ιστό των σαλιγκαριών και στα σιτηρέσια που εκείνα διατράφηκαν.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προέκυψε ότι, στα ποσοστά των συστατικών της θρεπτικής σύστασης των σιτηρεσιών (εκτός της πρωτεΐνης) και της θρεπτικής σύστασης του μυϊκού ιστού των σαλιγκαριών των διατροφικών ομάδων, δεν παρουσιάστηκε ουδεμία διαφοροποίηση. Από το μέσο τελικό βάρος εκτιμήθηκε ότι τα σαλιγκάρια όλων των πειραματικών μεταχειρίσεων έφτασαν στο εμπορικό τους μέγεθος μετά την πάροδο των δύο μηνών του πειράματος, καθώς με το πέρας του τα σαλιγκάρια έφτασαν σχεδόν στο δεκαπλάσιο του αρχικού τους βάρους. Ο μέσος όρος αύξησης των σαλιγκαριών δεν επηρεάστηκε από την επιλογή του σιτηρεσιού, αλλά από

II

τη θέση του κλωβού. Από την ανάλυση των πολυφαινολών (μέση περιεκτικότητα εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος ανά kg δείγματος) προέκυψε για τα σιτηρέσια υπήρξε διαφοροποίηση μεταξύ τους ανάλογη της προσθήκης αλεύρου στέμφυλων σε αυτά, ενώ για τους μυϊκούς ιστούς των σαλιγκαριών υπήρξε διαφοροποίηση μόνο για εκείνα που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο Σ2 (μάρτυρας με προσθήκη αλεύρου στέμφυλων 14 %) σε σχέση εκείνα που διατράφηκαν με τα άλλα δύο σιτηρέσια (M = μάρτυρας και Σ1 = μάρτυρας με προσθήκη αλεύρου στέμφυλων 7 %). Το χρώμα του μυϊκού ιστού δεν επηρεάστηκε.

Εν κατακλείδι, από τα στοιχεία της παρούσας μελέτης αποδείχθηκε ότι ενδέχεται να συμπεριληφθεί άλευρο στέμφυλων μέχρι 14 % σε κοινό σιτηρέσιο χωρίς να επηρεαστεί η επιβίωση, η αύξηση των σαλιγκαριών και η θρεπτική σύσταση του μυϊκού ιστού τους, με θετική όμως επίδραση στη ποιότητα του βρώσιμου μυϊκού ιστού - φιλέτου σαλιγκαριών.

Λέξεις-κλειδιά: Διατροφή, στέμφυλα οινοποιίας, πολυφαινόλες, αύξηση βάρους, σύσταση μυϊκού ιστού

III

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Γενικά.....	1
1.2 Διατροφή εκτρεφόμενων σαλιγκαριών.....	2
1.3 Στέμφυλα οινοποιίας.....	2
1.4 Χρήση στέμφυλων στη ζωική παραγωγή.....	6
1.5 Στέμφυλα στη βιομηχανία τροφίμων.....	10
1.6 Σκοπό.....	11
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
2.1 Παραγωγή αλεύρου στέμφυλων και κατάρτιση σιτηρεσίων.....	13
2.2 Πειραματική διαδικασία.....	15
2.3 Έναρξη και παράμετροι πειράματος.....	18
2.4 Δειγματοληψίες βάρους.....	19
2.5 Εργαστηριακές αναλύσεις.....	19
2.6 Στατιστική ανάλυση.....	30
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	32
3.1 Κλιματολογικές συνθήκες.....	32
3.2 Συνολική Θνησιμότητα.....	33
3.3 Βάρη σαλιγκαριών πειράματος.....	34
3.4 Μεταβολή βάρους σαλιγκαριών.....	39
3.5 Αύξηση βάρους.....	40
3.6 Αναλύσεις στη σύσταση σιτηρεσίου.....	42
3.7 Κατανάλωση τροφής.....	43
3.8 Σύσταση μυϊκού ιστού.....	44
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	47
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	54
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56
ABSTRACT.....	60

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Το σαλιγκάρι αποτελεί τρόφιμο το οποίο καταναλώνεται από εκατομμύρια ανθρώπους σε ολόκληρο τον κόσμο (FAO, 2001). Η εντατική του κατανάλωση ξεκίνησε από τα τέλη του 19ου αιώνα, εξαιτίας κυρίως της μεγάλης προβολής των γαστρονομικών του προσόντων. Οι πιο σημαντικοί καταναλωτές του είναι οι κάτοικοι της Ευρώπης, με κυριότερη τη Γαλλία (Bonnet *et al.*, 1990). Το εμπορικό ενδιαφέρον αυτό δεν αφορά μόνο στη γαστρονομία αλλά και το χώρο της φαρμακευτικής, της δερματολογίας και της αισθητικής (Bonnemain 2005, Tsoutsos *et al.* 2009). Τα σημαντικότερα εμπορεύσιμα είδη εδώδιμων σαλιγκαριών στην Ελλάδα είναι: το *Helix pomatia* (Linnaeus, 1758), το *Helix lucorum* (Linnaeus, 1758), το *Cornu aspersum* (Muller 1774, συν. *Helix aspersa*), και το *Eobania vermiculata* (Muller, 1774). Στην εκτροφή χρησιμοποιείται πολύ συχνά ένα υποείδος του είδους *C. aspersum*, το *Helix aspersa maxima* (Χατζηιωάννου & Στάικου, 2015).

Για μια επιτυχημένη εκτροφή είναι αναγκαία η χρησιμοποίηση ενός ορθολογικού σιτηρεσίου στη διατροφή των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών, το οποίο θα προάγει τους μέγιστους ρυθμούς ανάπτυξης, την υγεία και ευζωία του οργανισμού με το χαμηλότερο δυνατό κόστος. Αν και η κατάρτιση ενός σιτηρεσίου για μια εντατική εκτροφή είναι εμπειρική (η κοινή πρακτική στις σαλιγκαροτροφικές μονάδες είναι η χορήγηση ορνιθοτροφών και μεγάλων ποσοτήτων σε ποσοστό 12 % με 30 % μαρμαρόσκονης ως κύριας πηγής ασβεστίου), εντούτοις στην Ελλάδα υπάρχουν βιομηχανίες παρασκευής ζωοτροφών που παρασκευάζουν εξειδικευμένα σιτηρέσια για την εκτροφή σαλιγκαριών (σαλιγκαροτροφή) και για όλους τους κύκλους εκτροφής μιας παραγωγής (π.χ. γόνος, πάχυνση, γεννήτορες).

1.2 Διατροφή εκτρεφόμενων σαλιγκαριών

Όμοια με την ανάπτυξη των σαλιγκαριών στο φυσικό περιβάλλον, έτσι και στην εκτροφή τους, η ποιότητα της χορηγούμενης τροφής παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των σαλιγκαριών. Οι διατροφικές απαιτήσεις των σαλιγκαριών για τις πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες, βιταμίνες κ.α., είναι ελάχιστα γνωστές. Γενικά, ένας τρόπος να καλύψουν τα σαλιγκάρια τις διατροφικές τους απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά είναι να συμπεριλάβουν μεγαλύτερη ποικιλία τροφών στη δίαιτα τους. Η καταλληλότερη σύσταση του σιτηρεσίου για τη διατροφή των γαστερόποδων πρέπει να αποτελείται από προκαθορισμένες αναλογίες στα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Σημαντικά θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των σαλιγκαριών είναι οι υδατάνθρακες (συμπεριλαμβανομένων σύνθετων πολυσακχαριτών, όπως η κυτταρίνη), τα λιπίδια και τα περιεχόμενα σε αυτά απαραίτητα λιπαρά οξέα, τα ανόργανα στοιχεία και οι βιταμίνες (Delaney & Gelperin, 1986). Σημαντική και απαραίτητη είναι η πραγματοποίηση ερευνών, για τη συλλογή στοιχείων, που αφορούν την κατάρτιση ισόρροπων σιτηρεσίων που θα χορηγούνται σε σαλιγκάρια, καθώς οι γνώσεις που υπάρχουν, όσον αφορά τις διατροφικές ανάγκες σε θρεπτικά συστατικά των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών είναι μέχρι σήμερα ελλιπείς. Εντούτοις, τέτοιου είδους έρευνες είναι σπάνιες (Milinsk *et al.*, 2003).

1.3 Στέμφυλα οινοποίησης

Τα υποπροϊόντα της βιομηχανίας κρασιού είναι ευρέως διαθέσιμα στις Μεσογειακές χώρες. Το σταφύλι αποτελεί την μεγαλύτερη παγκοσμίως καλλιέργεια φρούτου και σύμφωνα με τον FAO-STAT (2012) ετησίως παράγονται 69 και πλέον

εκατομμύρια τόνοι σταφυλιών και από αυτούς τα 44 εκατομμύρια τόνοι παράγονται στην Ευρώπη (Rodrigo *et al.*, 2011).

Τα στέμφυλα σταφυλιών περιλαμβάνουν τους βόστρυχους, από τα γιγαρτά (κουκούτσια) και από τα υπολείμματα ραγών (Εικόνα 1) που μένουν μετά την παραλαβή του γλεύκους (μούστος) (Brenes *et al.*, 2015).

Σε πρόσφατη έρευνα που διεξήχθη στην Ιταλία, αναφέρεται ότι παράγονται ετησίως περίπου 600.000 τόνοι υπολείμματα σταφυλιών, με ποσοστό υγρασίας περίπου 50% που ξηραίνονται για να αποδώσουν περίπου 15% με 17% άλευρο στέμφυλων. Ήτοι, η ποσότητα του αλεύρου αυτού ανέρχεται σε 88.816 τόνους, που είναι ικανή να δικαιολογήσει τη χρήση της στην διατροφή της ζωικής παραγωγής (Ragni *et al.*, 2013).



Εικόνα 1. Τα υπολείμματα ραγών, οι βόστρυχοι και τα γιγαρτά των σταφυλιών (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

Ξηρά στέμφυλα με τη μορφή ενός σκουροκάστανου αλεύρου κυκλοφόρησαν στην Ελλάδα, τα τελευταία 20 χρόνια, και περιείχαν ολικές αζωτούχες ουσίες από 8% έως 11% και κυτταρίνες από 27% έως 31% (Αρχείο ανάλυσης ζωοτροφών, Εργαστήριο Διατροφής Ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ). Σύμφωνα με τους Σαββαΐδη και συν. (2014) η μέση χημική σύσταση (ως % του συνόλου) των

αζύμωτων στέμφυλων είναι: υγρασία 50-60%, σάκχαρα 6-10%, οργανικά οξέα 1-2%, φαινολικές ενώσεις 1-2%, ενώσεις μετάλλων 1-2%, κυτταρίνη 10-20%, λιπίδια 2-4% καθώς και πρωτεΐνες, βιταμίνες, αρωματικές ενώσεις, πηκτίνες, ζύμες και βακτήρια. Η υγρασία των στέμφυλων (βέλτιστη τιμή περίπου 50%) σχετίζεται με τα πιεστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην οινοποίηση.

Τα στέμφυλα σταφυλιών χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον, μετά τη διαδικασία της οινοποίησης, είτε για την παραγωγή αιθανόλης (απόσταξη τσίπουρου, ούζου κ.τ.λ) είτε για τη διατροφή των ζώων λόγω της ενδιαφέρουσας βιολογικής τους δράσης (Goni *et al.*, 2007), καθώς επίσης και ένα μικρό ποσοστό που χρησιμοποιείται ως λίπασμα (Goni *et al.*, 2007) και για την εξαγωγή τρυγικού οξέως που λόγω της μικροβιολογικής σταθερότητας του δεν προσβάλλεται εύκολα από βακτήρια και ζύμες (Brenes *et al.*, 2015).

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα στέμφυλα είναι πλούσια σε λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες (Perumalla & Hettiarachchy, 2011). Σύμφωνα με τους Nicodemous *et al* (2007), έχει υπολογιστεί πως περίπου το 3% της παραγωγής χρησιμοποιείται κυρίως για την παρασκευή ζωοτροφής μηρυκαστικών και της παροχής των απαραίτητων ινών στην κονικλοτροφία. Τα υποπροϊόντα αυτά είναι πλούσια σε πολυφαινόλες {(σε ποσοστό περίπου 5-8% (Shi *et al.* 2003, Xia *et al.* 2010)}, επισήμως γνωστά και ως ταννίνες, και σε διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί (Alonso *et al.* 2002, Torres *et al.* 2002, Vivero *et al.* 2011) τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί η θετική επίδραση τους εξαιτίας της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής τους δράσης.

Πίνακας 1. Χημική σύσταση των στέμφυλων οινοποιίας (g/kg ξηρής ουσίας). (Sayago-Ayerdi *et al.* 2009).

Πρωτεΐνες	138,50
Διάφορα σάκχαρα	20,70
Λίπος	9,87
Τέφρα	24,10
Ινώδεις ουσίες	151,80
Πολυφαινόλες	
Εκχυλίσιμες πολυφαινόλες	48,70
Συμπυκνωμένες τανίνες	150,90
Υδρολυμένες τανίνες	26,00
Αντιοξειδωτική ικανότητα (ABTS μέθοδος, $\mu\text{mol trolox}$ ισοδύναμα /g ξηρής ουσίας)	
Εκχυλίσιμες πολυφαινόλες	377,1
Συμπυκνωμένες τανίνες	81,4
Υδρολυμένες τανίνες	167,4

Οι φαινολικές ενώσεις αφθονούν στα σταφύλια και στα στέμφυλα. Θεωρούνται άριστα αντιοξειδωτικά. Οι πολυφαινόλες στα σταφύλια βρίσκονται σε ποσοστό 75% στην φλούδα και στα γιγαρτά (Πίνακας 2), αλλά η σύνθεση και η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι η περιοχή καλλιέργειας και η ποικιλία του σταφυλιού. Επομένως, είναι ενδιαφέρον να χρησιμοποιηθούν στέμφυλα με υψηλές συγκεντρώσεις σε πολυφαινόλες (Χία *et al.*, 2010).

Πίνακας 2. Φαινολικές ενώσεις στα στέμφυλα. Οι τιμές του πίνακα είναι σε mg/g. (Pinelo *et al.*, 2006)

<u>Ένωση</u>	<u>Στέμφυλα</u>	<u>Φλοιός</u>	<u>Σπόρια</u>	<u>Μίσχος</u>
Γαλλικό οξύ	0,03-0,11	0,03	0,10-0,11	-
Κουταρικό οξύ	0 -1,23	0,03-1,23	-	-
Καφταρικό οξύ	0-6,97	0,11-6,97	-	0,04
Κατεχίνη	0-0,18	0-0,16	2,14-2,15	0,06
Επικατεχινή	0-0,16	0-0,13	0,88-0,91	0,28
Επικατεχινή -3-γαλλική	0-0,03	0,04	0,25-0,31	0,07
Ταννίνες	0,22-2,32	1,61	3,56-6,15	0,22-0,89
Ολικές ανθοκυανίνες	11,47-29,82	11,47-29,82	-	-

1.4 Χρήση στέμφυλων στην ζωική παραγωγή

Η σημαντικότερη ιδιότητα των εκχυλισμάτων από σταφύλια, του κρασιού καθώς και των φυτικών πολυφαινολών που περιέχουν, θεωρείται η αντιοξειδωτική τους δράση, δηλαδή η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και τις άλλες ΔΜΟ που παράγονται στους ζωντανούς οργανισμούς και που μπορούν να προκαλούν βλάβες σε βιολογικά μακρομόρια οδηγώντας στην πρόκληση διαφόρων ασθενειών (Murthy *et al.* 2002, De Beer *et al.*, 2003, Landrault *et al.* 2001). Για παράδειγμα, η καρδιοπροστατευτική δράση του κρασιού αποδίδεται κυρίως στην ικανότητα των πολυφαινολών που περιέχει να παρεμποδίζουν την οξείδωση της

λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Teissedre *et al.*, 2000). Η οξείδωση της LDL θεωρείται σημαντικός παράγοντας για το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας στα αγγεία. Επιπλέον, στην αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οφείλεται εν μέρει και η πιθανή αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων από σταφύλια. Έχει αναφερθεί ότι ένα πολυφαινολικό κλάσμα από σπέρματα σταφυλιών ανέστειλε την επαγόμενη από 7,12-διμεθυλοβενζοανθρακίνη (DMBA) καρκινογένεση σε επιδερμίδα ποντικών, και αυτή η δράση οφειλόταν πιθανώς στην αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών του κλάσματος (Zhao *et al.*, 1999). Επιπρόσθετα, εκχύλιμα από σπέρματα σταφυλιών πλούσιο σε προανθοκυανιδίνες ανέστειλε την κυτταροτοξικότητα σε κερατινοκύτταρα που προκαλούνταν από οξειδωτικούς παράγοντες (Bagchi *et al.*, 2000). Για την εκτίμηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Activity) των αντιοξειδωτικών ουσιών χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι.

Διαπιστώθηκε ότι η χρήση των πολυφαινολών των στέμφυλων σταφυλιών διαμέσου του σιτηρεσίου στη διατροφή αγροτικών ζώων, επιδρά θετικά για την διατήρηση της ευζωίας των παραγωγικών ζώων καθώς και για την βελτίωση της ποιότητας του κρέατος και την ελάττωση της οξείδωσης των λιπαρών οξέων (τάγγιση) (Ragni *et al.* 2013, Georgiev *et al.* 2014, Moate *et al.* 2014). Σε μικρές συγκεντρώσεις, τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που καθυστερούν την οξείδωση των εύκολα οξειδώσιμων βιομορίων, όπως τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες σε προϊόντα κρέατος, αποτέλεσμα που συμβάλει στην αύξηση της εμπορικής διάρκειας των προϊόντων προστατεύοντας τα από την υποβάθμιση της ποιότητας τους εξαιτίας της τάγγισης (Brenes *et al.*, 2015). Ξηρά στέμφυλα προσθέτονται στα συμπληρωματικά σιτηρέσια μηρυκαστικών και μονοπλών, καθώς και στα πλήρη σιτηρέσια χοίρων και πτηνών μέχρι 10% (Piccioni, 1965). Αν δεν αφαιρεθούν βόστρυχοι και γιγαρτά, η

πεπτικότητα των θρεπτικών ουσιών είναι πολύ χαμηλή (Piccioni 1965, Καλαισάκης 1975). Γενικά, το περιεχόμενο φυτικών ινών των υποπροϊόντων κρασιού είναι πολύ υψηλό, πράγμα που περιορίζει τη χρήση τους στην διατροφή των μονογαστρικών ζώων (Ragni *et al.* 2013, Moate *et al.* 2014, Brenes *et al.* 2015).

Τα υπολείμματα σταφυλιών παρουσιάζουν σπουδαίο ζωοτροφικό ενδιαφέρον για την Ελλάδα, που είναι αξιόλογη παραγωγός χώρα κρασιών από σταφύλια και επομένως κάθε χρόνο λαμβάνονται τεράστιες ποσότητες τέτοιων υπολειμμάτων (Σπαής και συν., 2002). Υπολογίζεται πως τα στέμφυλα αποτελούν περίπου το 20% της παραγωγής των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση.



Εικόνα 2. Το εμπορικό άλευρο στέμφυλων οινοποιίας «bioflavia» (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

Τα στέμφυλα σταφυλιών, με την ξηρή αλευρώδη μορφή τους που παράγονται στην Ελλάδα, μολονότι άρχισε η χρησιμοποίησή τους κατά ένα μικρό ποσοστό στη διατροφή των ζώων, πιστεύεται ότι υπάρχει δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε μεγαλύτερα ποσοστά για αυτόν τον σκοπό, αρκεί να δημιουργηθούν μερικές ακόμα μονάδες συγκέντρωσης και ξήρανσης των στέμφυλων (Σπαής και συν., 2002). Στην Ελλάδα δεν υπάρχουν μονάδες που να επεξεργάζονται στέμφυλα. Επίσης, λόγω της

γεωγραφικής διασποράς της παραγωγής οίνου στην ελληνική επικράτεια δεν ευνοείται η δημιουργία μιας κεντρικής μονάδος αξιοποίησης στέμφυλων, όπου θα δημιουργούνται οικονομίες κλίμακας, εξαιτίας του υψηλού κόστους μεταφοράς.

Παραδοσιακά τα στέμφυλα αποθηκεύονται υπό αναερόβιες συνθήκες σε διάφορους τύπους περιεκτών όπως οριζόντιες σήραγγες ή μεγάλες δεξαμενές από πλαστικό, ξύλο ή τσιμέντο που σφραγίζονται από πάνω με καπάκι ή με φύλλα από πλαστικό καλυμμένα με άμμο. Σήμερα χρησιμοποιούνται επίσης δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα ή πλαστικούς σάκους για πιο αεροστεγή αποθήκευση (Σαββαΐδης και συν., 2014). Ανάλογα με τη σύσταση των στέμφυλων (οξύτητα, pH, σάκχαρα) και τις συνθήκες ζύμωσης (θερμοκρασία, παρουσία οξυγόνου), προκύπτουν διαφορετικά αρωματικά συστατικά, κάνοντας περισσότερο κατανοητή την διακύμανση της σύστασης των αποσταγμάτων στέμφυλων. Η διάρκεια της ζύμωσης είναι 6-15 ημέρες περίπου. Τα στέμφυλα παραμένουν στις δεξαμενές χωρίς να ελέγχεται η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία (Σαββαΐδης και συν., 2014). Συνεπώς οι επικρατούσες εξωτερικές καιρικές συνθήκες καθορίζουν το περιβάλλον της ζύμωσης στο εσωτερικό των δεξαμενών. Για τη διατήρηση της θερμοκρασίας της ζύμωσης σε ανεκτά για τη ζύμη επίπεδα, ήταν απαραίτητο να γίνεται η αποθήκευση των στέμφυλων σε μικρής χωρητικότητας δεξαμενές εφοδιασμένες με συστήματα ανάδευσης και ψύξης, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης ζύμωση των σακχάρων σε θερμοκρασίες κάτω των 30°C. Τα στέμφυλα μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης μπορούσαν να αποσταχθούν απ' ευθείας ή να παραμείνουν για κάποιο σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (από 1-2 εβδομάδες έως και 3 μήνες) στις δεξαμενές (Σαββαΐδης και συν., 2014). Η αποθήκευση των στέμφυλων απουσία αέρα γίνεται συνήθως με: α) πλήρωση και ερμητικό κλείσιμο της δεξαμενής, β) απομάκρυνση του αέρα από μισογεμάτες δεξαμενές από αδρανές αέριο όπως άζωτο ή διοξείδιο του άνθρακα. Ακόμη για

αποφυγή επαφής των στέμφυλων με τον αέρα, το υλικό της δεξαμενής πρέπει να είναι κατάλληλο όπως για παράδειγμα οι δεξαμενές από πλαστικό και οι πλαστικοί σάκοι προσφέρουν τον καλύτερο φραγμό σε σχέση με τις ξύλινες ή τις τσιμεντένιες δεξαμενές (Σαββαΐδης και συν., 2014).

1.5 Στέμφυλα στη βιομηχανία τροφίμων

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τη χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών στη διατροφή ζώων καθώς και στην προσθήκη τους στο κρέας και τα προϊόντα του. Ο στόχος είναι να βελτιωθεί η αντιοξειδωτική τους ικανότητα διαμέσου του σιτηρεσίου. Συγχρόνως, επιπλέον ένας στόχος είναι να ενισχυθεί το άρωμα, η γεύση, το χρώμα, η σύσταση, η θρεπτική αξία και συγχρόνως να παρέχουν στον οργανισμό αντιοξειδωτική προστασία απέναντι στις βλαβερές συνέπειες της παρουσίας των ελεύθερων ριζών (Conzales-Paranas *et al.* 2004, Balsundram *et al.* 2006).

Σε ανταπόκριση των πρόσφατων απαιτήσεων για φυσικά προϊόντα και την διάθεση των καταναλωτών να πληρώσουν αδρά για τα προϊόντα αυτά (Sebranek & Bacus, 2007), η βιομηχανία κρέατος προσπαθεί να βρει φυσικές λύσεις για την μείωση της οξείδωσης των βιομορίων και την αύξηση της προστιθέμενης αξίας των προϊόντων μέσω της αύξησης της εμπορικής διάρκειας ζωής τους (Brenes *et al.*, 2015).

Τα οινοποιητικά απόβλητα (στέμφυλα) λόγω του όγκου και του οργανικού φορτίου, αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα επιβάρυνσης του περιβάλλοντος, διότι κατά την οινοποίηση παράγεται ένας πολύ μεγάλος όγκος στερεών αποβλήτων

που συνιστά το 17% του βάρους των χρησιμοποιούμενων σταφυλιών. Οινοποιούνται ανά έτος χιλιάδες τόνοι σταφυλιών παράγοντας μεγάλο όγκο στέμφυλων που απορρίπτονται χωρίς καμία επεξεργασία στο περιβάλλον. Έτσι ουσιαστικά παραμένει αναξιοποίητο, με αποτέλεσμα το οργανικό τους φορτίο να επιβαρύνει τα γειτονικά οικοσυστήματα (Goni *et al.*, 2007). Το ιδιαίτερα υψηλό οργανικό φορτίο των στέμφυλων δεν βιοαποικοδομείται εύκολα, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις πολυφαινολικών ενώσεων οδηγούν στην εμφάνιση βιοτοξικών φαινομένων, με αποτέλεσμα να δημιουργείται υποβάθμιση στο φυσικό περιβάλλον. Ένας επιπλέον στόχος, που προκύπτει από την χρήση υποπροϊόντων οινοποιίας στην διατροφή των ζώων, είναι ότι θα μπορούσε να καταστεί δυνατή η μείωση της περιβαλλοντικής επίδρασης της παραγωγικής διαδικασίας, δια μέσου της λεγόμενης «κυκλικής εκτροφής», καθώς επίσης και η καλύτερη αξιοποίηση ενός σιτηρεσίου (τόσο οικονομικά, όσο και διατροφικά) που θα χρησιμοποιηθεί από μία εκτροφή αποτέλεσμα που θα συμβάλλει στην μείωση του κόστους της παραγωγικής διαδικασίας (Brenes *et al.*, 2015).

1.6 Σκοπός

Στην σαλιγκαροτροφία, δεν έχει διερευνηθεί έως σήμερα η προσθήκη αλεύρου στέμφυλων σε σιτηρέσια, τόσο σε διεθνές όσο και σε εθνικό επίπεδο. Επιπροσθέτως, δεν έχει μελετηθεί ούτε και το επίπεδο του ποσοστού του αλεύρου στέμφυλων που ενδέχεται να συμμετέχει σε μία εμπορική σαλιγκαροτροφή, καθώς και ποια η δραστηριότητα του.

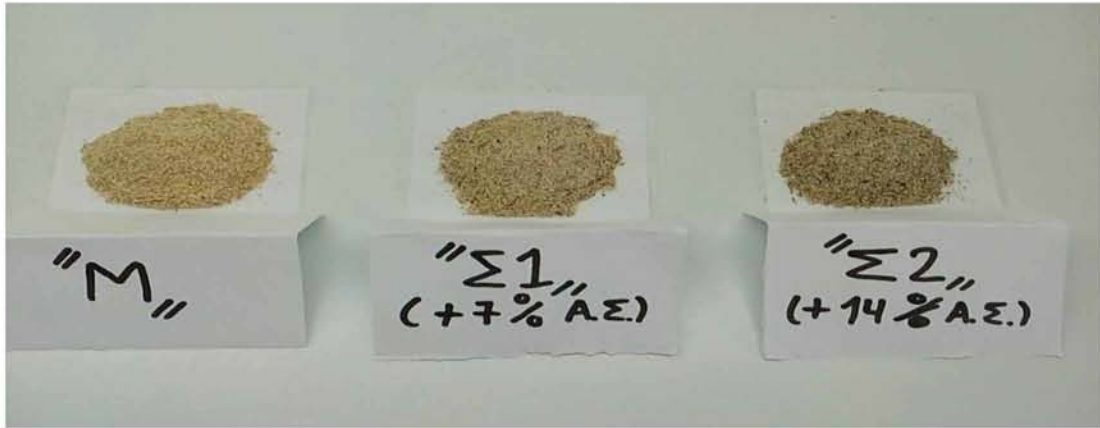
Για τον σκοπό αυτό, η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στο να εξάγει κάποια προκαταρκτικά στοιχεία όσον αφορά την προσθήκη στέμφυλων οινοποιίας σε σιτηρέσια εκτρεφόμενων σαλιγκαριών, υπό τη μορφή αλεύρου, με στόχο την μελέτη της επίδρασης τους στην παραγωγική απόδοση της εκτροφής και στην ποιότητα του κρέατος (φιλέτο) των σαλιγκαριών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Παραγωγή αλεύρου στέμφυλων και κατάρτιση σιτηρεσίων

Το άλευρο στέμφυλων παράχθηκε από σταφύλια μονάδας οινοποιητηρίου που εδρεύει στη Θεσσαλία. Παρελήφθησαν ζυμωμένα στέμφυλα (κατόπιν οινοποίησης) συγκεκριμένης ποικιλίας σταφυλιών σε νωπή κατάσταση. Αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη (-20 °C) μέχρι την επεξεργασία τους για την παρασκευή αλεύρου, αφού προηγουμένως είχε γίνει καθαρισμός με απιονισμένο νερό για την έκπλυση από τον μούστο που πιθανόν να είχε παραμείνει σε αυτά. Στο εργαστήριο, τα στέμφυλα υπέστησαν απόσταξη σε κλίβανο για 15 λεπτά στους 94 °C περίπου, για την εξαγωγή της αιθανόλης (Moate *et al.*, 2014). Τα Dry Grape Marc (DGM) δημιουργήθηκαν από τα υπολείμματα σταφυλιών, τα οποία αποθηκεύτηκαν για αρκετούς μήνες πριν την κονιορτοποίηση τους από την μονάδα. Στη συνέχεια τα ξηρά στέμφυλα τοποθετήθηκαν σε ένα εργαστηριακό μύλο άλεσης όπου πραγματοποιήθηκε η μετατροπή τους σε σκόνη. Το άλευρο που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των τροφών αρχικά πέρασε από κόσκινο πόρου 0,5 mm (κοσκίνιση), για να μειωθεί η περιεκτικότητα των ακατέργαστων ινών (Ragni *et al.*, 2013).

Δημιουργήθηκαν 3 σιτηρέσια που χορηγήθηκαν στα σαλιγκάρια κατά τη διάρκεια του διατροφικού πειράματος και που περιγράφονται παρακάτω ως εξής (Εικόνα 3):



Εικόνα 3. Δείγμα των 3 πειραματικών σιτηρέσιων (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

- «M»: εμπορικό σιτηρέσιο (μάρτυρας) χωρίς προσθήκη αλεύρου στέμφυλων.
- «Σ1»: το εμπορικό σιτηρέσιο (M) με προσθήκη αλεύρου στέμφυλων σε ποσοστό 7% επί της νωπής ουσίας.
- «Σ2»: το εμπορικό σιτηρέσιο (M) με προσθήκη αλεύρου στέμφυλων σε ποσοστό 14% επί της νωπής ουσίας.

Για τις ανάγκες της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας διεξήχθησαν συγκεκριμένες εργαστηριακές αναλύσεις στο άλευρο στέμφυλων προτού εκείνο ενσωματωθεί στις τροφές, καθώς και στα σιτηρέσια του πειράματος. Από τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων εργαστηριακών αναλύσεων, προέκυψαν τα εξής:

Πίνακας 3. Εργαστηριακές αναλύσεις στο άλευρο στέμφυλων. (Οι τιμές προέκυψαν από μέσους όρους 3 επαναλήψεων).

Είδος Αναλύσεων	Άλευρο στέμφυλων
Υγρασία (%)	17
Ολικές Αζωτούχες Ενώσεις (%)	13,78
Ολικά Λιπαρά Οξέα (%)	7,05
Ολική Ενέργεια (KJ/g)	21,11
Ανόργανη Ουσία (%)	3,99
Υδατάνθρακες / Σάκχαρα (% Βrix)	2,2
Χρώμα	$\Delta L=12,47, \Delta a=2,96, \Delta b=6,71$
Οργανικά Οξέα (οξύτητα)	0,92
pH	8,21

Οι ίδιες εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν και για τα 3 σιτηρέσια του πειράματος (M, Σ1, Σ2). Η διαφορά ήταν ότι στις εν λόγω αναλύσεις δεν έγινε

μέτρηση χρώματος, ενώ έγινε μέτρηση των πολυφαινόλων εκφρασμένη σε mg συνολικού γαλλικού οξέος ανά kg δείγματος.

Πίνακας 4. Εργαστηριακές αναλύσεις στα 3 πειραματικά σιτηρέσια. (Οι τιμές προέκυψαν από μέσους όρους 3 επαναλήψεων. Με «A,B» παρουσιάζεται η στατιστική διαφορά).

Είδος Αναλύσεων	M	Σ1(+7%)	Σ2(+14%)
Υγρασία (%)	12,1 ^A	12,4 ^A	12,5 ^A
Ολικές Αζωτούχες Ενώσεις (%)	20,33 ^A	19,08 ^B	18,64 ^B
Ολικά Λιπαρά Οξέα (%)	4,03 ^A	4,01 ^A	3,98 ^A
Ολική Ενέργεια (KJ/g)	16,39 ^A	16,76 ^A	16,86 ^A
Ανόργανη Ουσία (%)	6,39 ^A	6,35 ^A	6,65 ^A
Υδατάνθρακες / Σάκχαρα (% Brix)	2,6 ^A	2,3 ^A	2,4 ^A
Πολυφαινόλες (mg GAE/kg)	37,3 ± 3,2 ^C	289,5 ± 7,2 ^B	629 ± 11 ^A
Οργανικά Οξέα (οξύτητα)	1,02	1,08	0,91
pH	8,44	8,62	8,23

2.2 Πειραματική διαδικασία

Το πείραμα εκτροφής έλαβε χώρα σε μονάδα εκτροφής σαλιγκαριών κλειστού τύπου (διχτυοκήπιο) στην ευρύτερη περιοχή της Μαγνησίας και είχε διάρκεια 2 μηνών, από τις 14 Αυγούστου μέχρι τις 14 Οκτώβρη του 2017.

Για τις ανάγκες του διατροφικού πειράματος χρειάστηκε να γίνει η κατάλληλη προεργασία για την υλοποίηση του. Αρχικά, σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν 9 κλωβοί από πλαστικοποιημένο γυαλί (plexiglass) με τη χρήση ειδικής σιλικόνης ενυδρείου. Ακόμα, κατασκευάστηκαν ειδικές ταΐστρες για την σίτιση των

διατροφικών ομάδων από στρόγγυλο πλαστικό διατομής 17 εκατοστών.



Εικόνα 4. Το πλαίσιο αλουμινίου με την ειδική πλαστική σήτα. (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)



Εικόνα 5. Κλωβός διατροφικής ομάδας που στο εσωτερικό του φαίνονται τα δύο στρόγγυλα πλαστικά διαφορετικής διατομής με τα 3 στηρίγματα. (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

Στη συνέχεια, οι 9 κλωβοί τοποθετήθηκαν μέσα στο διχτυοκήπιο της μονάδας εκτροφής σαλιγκαριών σε προκαθορισμένα σημεία, όπου πρωτίστως, σε αυτά είχε γίνει αφαίρεση των χόρτων. Οι κλωβοί θάφτηκαν περιμετρικά μέσα στο χώμα για 2-3 εκατοστά, ούτως ώστε να καταστεί δυνατό η καλύτερη εγκατάσταση και στιβαρότητα της εν λόγω κατασκευής (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Θέση 3 πειραματικών κλωβών στην μονάδα εκτροφής. (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

Ακόμη, στους 9 κλωβούς έγινε και η αντίστοιχη κωδικοποίηση αναλόγως του σιτηρεσίου και της επανάληψης [M(a), M(b), M(c), Σ1(a), Σ1(b), Σ1(c), Σ2(a), Σ2(b), Σ2(c)], ενώ συγκεκριμένα για τους κλωβούς [M(a), Σ1(b), Σ2(c)] εξαιτίας και της διαγώνιας διάταξης τους στο χώρο της μονάδας, τοποθετήθηκε δίπλα τους σε ένα μικρό μπολάκι με γυάλινο καπάκι ένα όργανο μέτρησης ημερήσιας υγρασίας και θερμοκρασίας (Εικόνα 7). Με το συγκεκριμένο όργανο λαμβάνονταν τιμές υγρασίας και θερμοκρασίας, ανά δεύτερη μέρα, που συνέπιπτε και με την χορήγηση του σιτηρεσίου στις διατροφικές ομάδες. Οι μετρήσεις αφορούσαν μέγιστες - ελάχιστες τιμές και τιμές στιγμής και για τις δύο αυτές παραμέτρους. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τον καλύτερο έλεγχο των δυο παραμέτρων, μιας και είναι από τις πιο καθοριστικές παραμέτρους για την δραστηριότητα και κατά συνέπεια σίτιση και αύξηση των σαλιγκαριών.



Εικόνα 7. Το όργανο μέτρησης ημερήσιας υγρασίας και θερμοκρασίας με το πλαστικό μπολάκι που τοποθετήθηκε. (Πηγή: προσωπικό αρχείο)

2.3 Έναρξη και παράμετροι πειράματος

Συλλέχθηκαν 270 σαλιγκάρια του είδους *Helix aspersa maxima* στο στάδιο του γόνου με τυχαία δειγματοληψία από την ίδια μονάδα. Χωρίστηκαν στις 9 πειραματικές μεταχειρίσεις ανά 30 σαλιγκάρια η κάθε μία, με εύρος από 1,72 έως 1,85 g. Η έναρξη του διατροφικού πειράματος πραγματοποιήθηκε στις 14/8/2017 με την πρώτη χορήγηση του σιτηρεσίου. Η σίτιση των σαλιγκαριών γίνονταν ανά δεύτερη ημέρα και η ποσότητα του σιτηρεσίου που χορηγούνταν στη κάθε πειραματική μεταχείριση ήταν 20 g, ποσότητα που είχε προζυγιστεί σε ζυγό ακριβείας δυο δεκαδικών ψηφίων. Η εκτίμηση της κατανάλωσης σιτηρεσίου έγινε διαμέσου του υπολογισμού του υπολοίπου που παρέμενε στην ταΐστρα και της αφαίρεσης του από την αρχική ποσότητα των 20 g σιτηρεσίου που χορηγούνταν σε κάθε πειραματική μεταχείριση. Εκτιμήθηκαν συνολικά η παράμετρος του μέσου όρου κατανάλωσης σιτηρεσίου από τις 9 πειραματικές μεταχειρίσεις, η ίδια παράμετρος εκφρασμένη ανά μία ημέρα και ανά σαλιγκάρι για τις 9 πειραματικές μεταχειρίσεις, καθώς και για την τελευταία παράμετρο εκτιμήθηκε ο συνολικός μέσος όρος για το κάθε σιτηρέσιο όπως αυτός προέκυψε από τις τρεις επαναλήψεις του κάθε σιτηρεσίου. Να αναφερθεί ότι, η σίτιση πραγματοποιούνταν ανά δεύτερη ημέρα, δηλαδή συνολικά έλαβαν χώρα 30 ταΐσματα για τις 60 ημέρες του πειράματος. Σε κάθε κλωβό χορηγούνταν σε ειδικό δοχείο ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3). Τέλος, κατά την παρατήρηση των νεκρών ατόμων γίνονταν αμέσως η απομάκρυνση τους από τους κλωβούς για λόγους υγείας και ευζωίας των ζώντων ατόμων και στη συνέχεια γίνονταν η καταμέτρηση τους.

2.4 Δειγματοληψίες βάρους

Για την περίοδο των δύο μηνών, έγιναν τέσσερις (4) μετρήσεις βάρους για κάθε ομάδα, ήτοι μια μέτρηση κάθε δεκαπέντε (15) ημέρες (εκτός της αρχικής μέτρησης του βάρους). Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα ως εξής:

- 1^η μέρα (αρχικό βάρος) στις 14/8/2018
- 15^η μέρα στις 28/8/2018
- 30^η μέρα στις 15/9/2018
- 45^η μέρα στις 29/9/2018
- 60^η μέρα (τελικό βάρος) στις 13/10/2018

Ο στόχος ήταν να εκτιμηθεί και να παρακολουθηθεί η αύξηση των σαλιγκαριών βαθμιαία και να πάρουμε πληροφορίες για το ποια από τις 4 υποπεριόδους του πειράματος τα σαλιγκάρια είχαν την καλύτερη απόδοση στο βάρος τους.

Στο τέλος του διατροφικού πειράματος, τα ζώα μεταφέρθηκαν από την μονάδα εκτροφής στο εργαστήριο της σχολής όπου θανατώθηκαν και αποκελυφώθηκαν. Στη συνέχεια, πάρθηκαν ατομικά δείγματα μυϊκού ιστού, τοποθετήθηκαν σε κωδικοποιημένα erpendorfs και αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).

2.5 Εργαστηριακές αναλύσεις

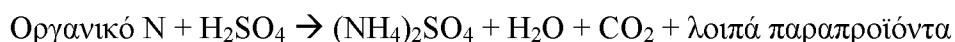
Για τις ανάγκες του πειράματος πραγματοποιήθηκαν ορισμένες εργαστηριακές αναλύσεις τόσο πριν την έναρξη του για την εκτίμηση των αρχικών τιμών των παραμέτρων, όσο και στο τέλος αυτού για την εκτίμηση των τελικών τιμών τους. Οι εργαστηριακές αναλύσεις αφορούσαν το άλευρο στέμφυλων που ενσωματώθηκε στα

σιτηρέσια του πειράματος, τα 3 σιτηρέσια του πειράματος (Μ, Σ1, Σ2) καθώς και την αρχική και τελική σύσταση του μυϊκού ιστού (πόδι) των σαλιγκαριών που αποτελεί και το εδωδιμο μέρος του είδους αυτού. Πιο συγκεκριμένα οι αναλύσεις αυτές έλαβαν χώρα και ήταν:

❖ Στο εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος:

- **Ολικές Αζωτούχες Ενώσεις (Πρωτεΐνες)**, με τη χρήση της μεθόδου Kjeldahl.

Ο προσδιορισμός των ολικών αζωτούχων ουσιών (πρωτεϊνών) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο προσδιορισμού αζωτούχων ουσιών Kjeldahl κατά AOAC (1990). Αρχικά, ζυγίστηκαν 200 mg κάθε δείγματος και μεταφέρθηκαν στις ειδικές φιάλες βρασμού της συσκευής Kjeldahl. Κατόπιν, ακολούθησε η διαδικασία της πέψης των δειγμάτων, τα οποία θερμαίνονται παρουσία πυκνού θειικού οξέος, πραγματοποιείται η διάσπαση όλων των αζωτούχων ουσιών και απελευθερώνεται το άζωτο (N) του δείγματος, το οποίο κατόπιν δεσμεύεται σε θειικό αμμώνιο, σύμφωνα με την παρακάτω χημική αντίδραση:



Σε κάθε φιάλη βρασμού προστέθηκαν, χρησιμοποιώντας τον ειδικό δοσομετρητή 15ml πυκνού H_2SO_4 και δύο ταμπλέτες καταλύτη Kjeldahl (περιείχε θείο) για να επιταχύνει την αντίδραση. Οι φιάλες βρασμού τοποθετήθηκαν σε ειδική συσκευή πέψης που ήταν τοποθετημένη σε απαγωγό και τα δείγματα αφέθηκαν να χωνευτούν και να βράσουν διαδοχικά σε τρία στάδια συνολικής διάρκειας 85 λεπτών:

➤ Στάδιο 1 → 5 λεπτά με ισχύ βρασμού 100%

- Στάδιο 2 → 20 λεπτά με ισχύ βρασμού 55%
- Στάδιο 3 → 60 λεπτά με ισχύ βρασμού 90%

Τα δείγματα αφέθηκαν να κρυώσουν για περίπου 30 λεπτά, αφήνοντας σε λειτουργία την παγίδα αερίων και τον απαγωγό.

Κατόπιν, ακολούθησε η διαδικασία της απόσταξης κατά την οποία το θειικό αμμώνιο αντιδρά με υδροξείδιο του νατρίου και αποδεσμεύεται αμμωνία (σε αέρια μορφή) και θειικό νάτριο. Η αμμωνία έπειτα αντιδρά με βορικό οξύ και το άζωτο του δείγματος δεσμεύεται σε μορφή βορικού αμμωνίου, σύμφωνα με τις εξής αντιδράσεις:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2\text{NaOH} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{BO}_3 \rightarrow \text{NH}_4^+:\text{H}_2\text{BO}_3^- + \text{H}_3\text{BO}_3$

Για τη διαδικασία της απόσταξης, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδική συσκευή απόσταξης. Αρχικά, κατά την απόσταξη, επιλέχθηκε το επιθυμητό πρόγραμμα και τοποθετήθηκε προσεκτικά η κάθε φιάλη στη συσκευή απόσταξης. Παράλληλα τοποθετήθηκε μία κωνική φιάλη με 3 σταγόνες δείκτη ερυθρού του μεθυλίου (methyl red) στην ειδική θέση της συσκευής για την υποδοχή της αμμωνίας στο διάλυμα βορικού οξέος. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 100 ml αποσταγμένου H_2O , 80 ml NaOH και 50 ml H_2BO_3 . Ο συνολικός χρόνος της απόσταξης κάθε δείγματος ήταν 6 λεπτά. Το βορικό αμμώνιο συγκεντρωνόταν σε κωνική φιάλη με τις σταγόνες του δείκτη, για να χρησιμοποιηθεί κατά την επόμενη και τελευταία διαδικασία της μεθόδου αυτή της τιτλοδότησης.

Τέλος, ακολούθησε η διαδικασία της τιτλοδότησης κατά την οποία το βορικό αμμώνιο τιτλοδοτείται με υδροχλωρικό οξύ χρησιμοποιώντας ένα δείκτη για το τελικό σημείο της παρακάτω χημικής αντίδρασης:



Η συγκέντρωση (σε moles) των ιόντων υδρογόνου που απαιτούνται για να καταλύσουν την αντίδραση έως το τελικό σημείο ισοδυναμεί με τη συγκέντρωση του αζώτου που περιέχει το δείγμα.

Η κωνική φιάλη που περιείχε το βορικό αμμώνιο τοποθετήθηκε σε θέση συνεχούς ανακίνησης στην ειδική βάση της συσκευής τιτλοδότησης και προστέθηκε ένας μαγνήτης στο πυθμένα της ώστε να επιτυγχάνεται η ανάδευση και στη συνέχεια προσθέτονταν σε αυτήν με αργό ρυθμό καταγεγραμμένη ποσότητα δεκατοκανονικού διαλύματος (0,1N) υδροχλωρικού οξέος (HCl). Η τελική αλλαγή του χρώματος στο διάλυμα σε χρώμα έντονου ροζ σηματοδοτούσε και το τελικό σημείο της αντίδρασης. Μόλις πραγματοποιήθηκε η αλλαγή του χρώματος του διαλύματος καταγράφηκαν τα ml του HCl που χρησιμοποιήθηκαν για την εξουδετέρωση του βορικού αμμωνίου του δείγματος. Η περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο (N %) υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$N\% = \frac{(\text{ml HCl} - \text{ml Blank}) \times N_{\delta/\text{το}\varsigma\text{HCl}} \times 0,014007}{\text{Βάρος Δείγματος, g}} \times 100$$

Όπου, Blank = η τιτλοδότηση κενής φιάλης (χωρίς δείγμα), η οποία χρησιμοποιείται ως συντελεστής διόρθωσης ή ως μάρτυρας.

Κατόπιν, από τη συγκέντρωση του αζώτου (N) στο δείγμα μπορεί να υπολογιστεί η περιεχόμενη πρωτεΐνη του που βρίσκεται μέσα σε αυτό σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Πρωτεΐνη (\%)} = \text{N (\%)} \times 6,25$$

Όπου, ο συντελεστής 6,25 προκύπτει από την παραδοχή ότι οι πρωτεΐνες περιέχουν 16% άζωτο (N).

- **Ολικά Λιπαρά Οξέα**, με τη χρήση της μεθόδου Soxhlet.

Ο προσδιορισμός του ολικού λίπους στα σιτηρέσια αποσκοπεί στην άντληση πληροφοριών, όσον αφορά στη διατροφική αξία μιας τροφής. Ο προσδιορισμός των ολικών λιπαρών οξέων έγινε με τη μέθοδο Soxhlet. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα δοχεία εκχύλισης στα οποία προστέθηκαν 3-4 πέτρες βρασμού, το μικτό βάρος των οποίων προζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια, προστέθηκε σε κάθε γυάλινη φιάλη ένας χάρτινος ηθμός, μέσα στον οποίο προστέθηκε περίπου 1 g ξηρής ουσίας σιτηρεσίου. Ακολούθησε η προσθήκη 150 ml πετρελαϊκού αιθέρα (που χρησιμοποιήθηκε ως οργανικός διαλύτης λίπους) στις φιάλες, με τη βοήθεια ενός ογκομετρικού κυλίνδρου. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής, οι γυάλινες φιάλες εκχύλισης που περιείχαν τα δείγματα, τοποθετήθηκαν στην ειδική συσκευή εκχύλισης λιπαρών ουσιών. Οι κυλινδρικές φιάλες επικοινωνούσαν από το πάνω μέρος τους, με κάθετο ψυκτήρα και πλευρικό άνω σωλήνα.

Κατά το πρώτο στάδιο της εκχύλισης, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 150 °C παρουσία του οργανικού διαλύτη. Έπειτα, ο οργανικός διαλύτης απορροφήθηκε και εκπλύθηκε στο δείγμα για 90 λεπτά της ώρας. Η θέρμανση πραγματοποιήθηκε σε θερμαινόμενες πλάκες και όχι σε γυμνή φλόγα, μέχρι το σημείο βρασμού του οργανικού διαλύτη. Με τη βοήθεια της εξάτμισης και της συμπύκνωσης στον ψυκτήρα, ο διαλύτης μεταφερόταν εντός του χάρτινου ηθμού, εκχυλίζοντας έτσι το λίπος.

Κατά το δεύτερο στάδιο της εκχύλισης, απορροφήθηκε ο διαλύτης για 15 λεπτά της ώρας με αποτέλεσμα τα ολικά λιπίδια του δείγματος να παραμείνουν στον πυθμένα του δοχείου εκχύλισης. Μετά το πέρας της εκχύλισης, τα δοχεία με τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φούρνο στους 75° C για 30 λεπτά της ώρας προκειμένου να εξατμιστεί εντελώς ο πετρελαϊκός αιθέρας που τυχόν παρέμεινε στο δείγμα. Στη συνέχεια τα δοχεία εκχύλισης μεταφέρθηκαν στο ξηραντήρα για 1 ώρα περίπου ώστε να κρυσώσουν. Αφού απομακρύνθηκε ο χάρτινος ηθμός που περιείχε το απολιπασμένο δείγμα, ακολούθησε επαναζύγιση των γυάλινων δοχείων εκχύλισης (που περιείχαν και τις πέτρες βρασμού) και καταγράφηκε του βάρους τους. Με τη βοήθεια της παρακάτω σχέσης προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ολικά λιπαρά οξέα:

$$\text{Ολικά λιπαρά οξέα} = (\text{τελικό βάρος δοχείου εκχύλισης} - \text{αρχικό βάρος}) * 100$$

- **Ολική Ενέργεια**, με τη χρήση αδιαβατικού θερμιδόμετρου.

Η θερμιδική αξία (ολική ενέργεια) είναι η ποσότητα θερμότητας (διακριτή από τη «θερμοκρασία») που εκλύεται από ένα δείγμα (π.χ. τροφίμου) κατά την πλήρη καύση του με τελικά προϊόντα καύσης τα CO₂ και H₂O. Η καύση γίνεται εντός κλειστού δοχείου («θερμιδόμετρο τύπου οβίδας») και η θερμότητα που εκλύεται θερμαίνει ένα εξωτερικό δοχείο εγνωσμένης θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας του εξωτερικού δοχείου καταγράφεται με θερμόμετρο και μέσω αυτής υπολογίζεται το θερμιδικό περιεχόμενο του δείγματος που κάηκε.

Διαδικασία προσδιορισμού

Ζυγίζουμε 0,3 έως 0,5 g δείγματος αλεσμένο εντός της ειδικής κυψελίδας και καταγράφουμε το βάρος του. Η κυψελίδα τοποθετείται στον υποδοχέα της οβίδας. Τοποθετούμε μία ίνα βαμβακιού στο δείγμα ώστε να έχει επαφή τόσο με το δείγμα όσο και με τον υποδοχέα. Ο υποδοχέας έπειτα τοποθετείται εντός της θερμιδομετρικής οβίδας. Το καπάκι της οβίδας να μην βιδώνεται πολύ σφιχτά. Ανοίγουμε τη βρύση (τουλάχιστον στη μέση) που είναι συνδεδεμένη με το θερμιδόμετρο. Ανοίγουμε τη φιάλη Οξυγόνου (κεντρική βαλβίδα, η βελόνα του μανόμετρου θα πάει γρήγορα στο 100 bar, ειδάλλως η φιάλη θέλει γέμισμα). Το μανόμετρο που δείχνει εισροή οξυγόνου στο θερμιδόμετρο θα πρέπει να είναι υψηλότερη των 30 bar και λιγότερο από 40 bar. Ανοίγουμε το διακόπτη στο θερμιδόμετρο. Περιμένουμε το θερμιδόμετρο να έρθει σε σταθερή κατάσταση (initialization). Τοποθετούμε την οβίδα στην κεφαλή του θερμιδομέτρου. Ο δείκτης (τετραγωνάκι) να είναι προς την κεφαλή και η οβίδα τοποθετείται ελαφρώς ανηφορικά. Πρέπει να σιγουρευτούμε ότι η οβίδα τοποθετήθηκε σωστά (περιστροφικά κινείται ελάχιστα). Επίσης, προσοχή μην ακουμπήσουμε το θερμιδόμετρο που έχει από δίπλα. Έπειτα ξεκινάει η ανάλυση του δείγματος με τα απαραίτητα βήματα στο πίνακα του θερμιδομέτρου. Όταν τελειώσει η διαδικασία, η οβίδα ανέρχεται σε μια ενδιάμεση θέση και γίνεται η εξαέρωση (venting) και σε δεύτερο στάδιο η οβίδα ανέρχεται στην αρχική της θέση. Καταγράφουμε την ένδειξη της θερμιδομέτρησης. Αφαιρούμε προσεκτικά την οβίδα τότε μόνο όταν δωθεί μήνυμα «Remove bomb». Ανοίγουμε προσεκτικά την οβίδα και ελέγχουμε α) την κυψελίδα αν κάηκε όλο το δείγμα εντός αυτής και β) για τυχόν εκτίναξη του δείγματος κατά την ανάλυση (π.χ. σωματίδια του δείγματος έχουν χυθεί στον πάτο και τα τοιχώματα της οβίδας).

- **Ανόργανη Ουσία (Τέφρα)**, με τη χρήση αποτεφρωτήρα.

Η τέφρα αντιπροσωπεύει τη συνολική ανόργανη ουσία του δείγματος. Ο προσδιορισμός της τέφρας (συνολική ανόργανη ουσία ενός δείγματος) για το κάθε σιτηρέσιο πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση 1g ξηρής ουσίας δείγματος από κάθε ένα σε 3 προζυγισμένα πορσελάνινα δισκία (12 δισκία / 3 σιτηρέσια) και από εκεί σε ειδικό αποτεφρωτήρα για 3 ώρες στους 600 °C (AOAC, 1990). Μετά το πέρας της διαδικασίας της αποτέφρωσης, τα δισκία με τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε ξηραντήριο και παρέμειναν εκεί για 24 ώρες. Ακολούθησε η ζύγιση των πορσελάνινων δισκίων, η καταγραφή του μικτού τους βάρους (δισκίο και δείγμα) και ο υπολογισμός του βάρους των αποτεφρωμένων δειγμάτων, με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$W \text{ αποτεφρωμένου δείγματος} = W \text{ μικτού αποτεφρωμένου δείγματος \& δισκίου} \\ - W \text{ δισκίου}$$

Όσον αφορά τον ποσοστιαίο προσδιορισμό της τέφρας που περιείχαν τα δείγματα, υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Τέφρα (\%)} = (W \text{ αποτεφρωμένου δείγματος} / W \text{ αρχικού δείγματος}) * 100$$

- **Πολυφαινόλες**, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου HACH DR 6000.

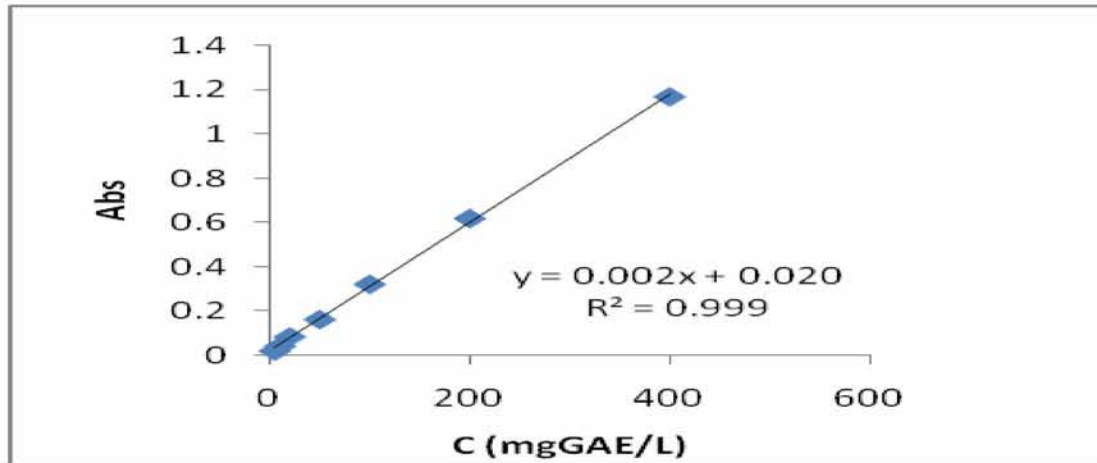
Για την ανάλυση των πολυφαινολών στα σιτηρέσια και στο μυϊκό ιστό των σαλιγκαριών χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ολικών πολυφαινολών εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέως ανά kg δείγματος.

Διαδικασία προσδιορισμού

0.5 g καλά ομογενοποιημένου δείγματος αφέθηκε σε 5 mL αιθανόλη για μία νύχτα. Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για το διαχωρισμό του εκχυλίσματος με τις ολικές πολυφαινόλες. Στη συνέχεια 100 μ L από το υπερκείμενο προστέθηκαν σε 3.50 mL υπερκάθαρου νερού (18.2 MΩ cm στους 25 °C), και προστέθηκαν 100 μ L από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Μετά από καλή ανάδευση και αφού πέρασαν 2 λεπτά προστέθηκαν 300 μ L διαλύματος ανθρακικού νατρίου 20% (w/v) και τα δείγματα αναμείχθηκαν καλά και αφέθηκαν σε ηρεμία για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ίδια πορεία ακολουθήθηκε και για τα πρότυπα διαλύματα και αφού μετρήθηκε η απορρόφηση στα 765 nm κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης (mg GAE/L).

Επικύρωση μεθόδου

Η γραμμική περιοχή της καμπύλης αναφοράς κυμάνθηκε από 5 έως 400 mgGAE/L, μια περιοχή ικανή να προσδιορίσει με ακρίβεια τις περιεκτικότητες των συγκεκριμένων δειγμάτων. Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης σε mg GAE/L. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου προσδιορίστηκε από το σταθερό σφάλμα του σταθερού όρου πολλαπλασιάζοντας με 3.3 και βρέθηκε ίσο με 17 και 51 mg GAE/kg.



Σχήμα 1. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.

❖ Στο εργαστήριο Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος:

- **Υδατάνθρακες (Σάκχαρα)**, με τη χρήση διαθλασίμετρου.

Όταν μια ακτίνα φωτός διέρχεται από ένα μέσο σε άλλο αλλάζει κατεύθυνση, διαθλάται. Το μέγεθος που περιγράφει το πόσο έντονα διαθλάται το φως ονομάζεται δείκτης διάθλασης. Αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά της διαλυμένης ουσίας κι εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η μέτρηση του δείκτη διάθλασης γίνεται με τα διαθλασίμετρα και μπορεί να χρησιμεύσει για τον καθορισμό της συγκέντρωσης των ουσιών που είναι διαλυμένες σε ένα υγρό, δηλαδή τα ολικά διαλυτά στερεά. Τα διαθλασίμετρα ακριβείας είναι βαθμολογημένα σε δείκτη διάθλασης. Αντίθετα εκείνα που χρησιμοποιούνται στην οινολογία είναι βαθμολογημένα σε βαθμούς Brix. Σχεδόν το σύνολο των διαλυτών στερεών αποτελείται από σάκχαρα οπότε η μέτρηση με διαθλασίμετρο αντιστοιχίζεται κατευθείαν σε συγκέντρωση σακχάρων (Brix: g σακχάρου/ 100 g διαλύματος).

Επειδή για τη μέτρηση απαιτείται μια μικρή μόνο ποσότητα δείγματος (μερικές σταγόνες) και τα διαθλασίμετρα (οπτικά ή ηλεκτρονικά) είναι φορητά, η μέθοδος αυτή προτιμάται για τον προσδιορισμό των σακχάρων στο εργαστήριο.

Διαδικασία προσδιορισμού

A) Ρύθμιση του οπτικού οργάνου (γίνεται αντίστοιχα και με ηλεκτρονικό). Συνήθως γίνεται με αποσταγμένο νερό θερμοκρασίας 20 °C, που είναι και η θερμοκρασία βαθμονόμησης της κλίμακας του οργάνου. Για το σκοπό αυτό τοποθετούνται 1-2 σταγόνες νερού πάνω στο καθαρό και στεγνό πρίσμα. Στη συνέχεια το πρίσμα σκεπάζεται με το κάλυμμα του και το όργανο είναι έτοιμο για παρατήρηση με τον αντικειμενικό φακό απέναντι από μια φωτεινή πηγή. Στο οπτικό πεδίο του οργάνου εμφανίζονται δυο τμήματα, ένα σκοτεινό και ένα φωτεινό, που χωρίζονται από μια διαχωριστική γραμμή.

B) Στη συνέχεια γίνεται η μέτρηση του δείκτη διάθλασης του δείγματος (γλεύκους). Στο πρίσμα του διαθλασιμέτρου τοποθετούνται 1-2 σταγόνες από το γλεύκος και διαβάζεται η μέτρηση με κλειστό το κάλυμμα.

- **Οργανικά Οξέα (οξύτητα).**

Δέκα (10) g δείγματος τοποθετείται σε κωνική φιάλη με 100 ml νερού που βράζει. Ακολουθεί ογκομέτρηση με KOH ή NaOH 0,1 N παρουσία φαινολοφθαλεΐνης μέχρις ότου να αποκτήσει το μίγμα μια ρόδινη χροιά ακόμα και μετά το πέρας 15 δευτερολέπτων από την ανακίνηση της κωνικής φιάλης. Τα ml KOH ή NaOH που καταναλώθηκαν αποδίδουν και τους βαθμούς της οξύτητας.

- **pH**, με τη χρήση πεχάμετρου pH60 DHS.

Για τον προσδιορισμό του pH, σε ένα ποτήρι ζέσεως βάζουμε 10 g δείγματος και τοποθετούμε 100 ml απιονισμένου νερού. Ανακατεύουμε και περιμένουμε να γίνει διαχωρισμός για περίπου 30 λεπτά. Φιλτράρουμε το μίγμα με διηθητικό χαρτί και τοποθετούμε το ηλεκτρόδιο του πεχάμετρου στο διήθημα του δείγματος και μετράμε.

- **Χρώμα**, με τη χρήση χρωματόμετρου Miniscan XEplus.

Τοποθετείται το δείγμα (ομαδοποιημένα φιλέτα μυϊκού ιστού) σε λευκή επιφάνεια μέχρι της πλήρης κάλυψης του φακού του χρωματόμετρου. Έπειτα, λαμβάνονταν η ένδειξη στη ψηφιακή οθόνη, όπου για τους συντελεστές είχαμε:

1. Συντελεστής ΔL = φωτεινότητα δείγματος (λευκό=100, μαύρο=0)
2. Συντελεστής Δa = αποχρώσεις ερυθρού-πρασίνου (ερυθρό>0, πράσινο<0)
3. Συντελεστής Δb = αποχρώσεις κίτρινου-ιώδες (κίτρινο>0, ιώδες<0)

2.6 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα της κατανάλωσης των τριών σιτηρεσιών από τα σαλιγκάρια καθώς και τα δεδομένα της αύξησης και της μεταβολής στο βάρος των σαλιγκαριών καταχωρήθηκαν σε υπολογιστικά φύλλα EXCEL όπου υπολογίστηκαν τα περιγραφικά στατιστικά. Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της Ανάλυσης της Διακύμανσης Μονής Κατεύθυνσης (one-way ANOVA) όπου ελέγχθηκαν οι διαφορές ανάμεσα στις διατροφικές ομάδες για τον παράγοντα «**Σιτηρέσιο**». Οι επιμέρους διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων εξετάστηκαν

με τη δοκιμασία Tukey, για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Για τις παραπάνω αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο MINITAB.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κλιματολογικές συνθήκες

Για τις ανάγκες του πειράματος, γίνονταν η καταγραφή των κλιματολογικών συνθηκών, δηλαδή μέτρηση της θερμοκρασίας του αέρα και της σχετικής υγρασίας τόσο στο εσωτερικό των κλωβών, όσο και εξωτερικά τους.

Πίνακας 5. Οι κλιματολογικές συνθήκες (Θερμοκρασία αέρα και Σχετική υγρασία) σε μέγιστες και ελάχιστες τιμές και τιμές στιγμής τόσο εσωτερικά όσο και εξωτερικά για τους κλωβούς για όλες τις θέσεις των κλωβών. (Οι τιμές αφορούν μέσους όρους μετρήσεων για τις 60 ημέρες του πειράματος).

<u>Κλιματολογικές συνθήκες</u>			<u>Θέση</u>		
			(a)	(b)	(c)
Εντός κλωβού	Θερμοκρασία (°C)	Στιγμής (18:00-20:00)	20,9	19,7	22,3
		max	27,4 ^B	25,2 ^B	34,3 ^A
		min	14,1 ^B	14,4 ^B	15,2 ^A
	Σχετική Υγρασία (%)	Στιγμής (18:00-20:00)	72	71,3	64,1
		max	86,8 ^A	80 ^A	83,1 ^A
		min	55,4 ^A	57,8 ^A	37,7 ^B
Εκτός κλωβού	Θερμοκρασία (°C)	Στιγμής (18:00-20:00)	20,6	20	22,8
		max	23,6 ^B	23,5 ^B	28,5 ^A
		min	15,7 ^B	15,1 ^B	16,8 ^A
	Σχετική Υγρασία (%)	Στιγμής (18:00-20:00)	72,1	71,3	64,2
		max	86,7 ^A	80,1 ^A	82,9 ^A
		min	56,3 ^A	57,6 ^A	37,8 ^B

Από τον Πίνακα 5, προέκυψε ότι, συγκριτικά για όλους τους κλωβούς οι υψηλότερες και οι χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας, ταυτόχρονα, παρουσιάστηκαν στο εσωτερικό των κλωβών σε σύγκριση με το εξωτερικό τους. Από τις τρεις επαναλήψεις αποδείχθηκε ότι η θέση «c» παρουσίασε διαφοροποίηση ($P < 0,05$)

θερμοκρασιακά σε σχέση με τις άλλες δύο. Για την παράμετρο της υγρασίας, προέκυψε ότι τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό του κλωβού δεν υπήρξε καμία διαφοροποίηση ($P>0,05$) όσον αφορά το ποσοστό της, πλην της ελάχιστης τιμής για την επανάληψη «c» όπου έδειξε σημαντική διαφορά ($P<0,05$).

3.2 Συνολική Θνησιμότητα

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, εκτιμήθηκε ο αριθμός των νεκρών σαλιγκαριών και του ποσοστού της θνησιμότητας.

Πίνακας 6. Η συνολική θνησιμότητα (N / 30) και το ποσοστό της (επί τοις %) των πειραματικών μεταχειρίσεων του πειράματος. (Στις παρενθέσεις με «a, b, c» δηλώνεται η επανάληψη του κάθε σιτηρεσίου).

Πειραματικές Μεταχειρίσεις	Συνολική Θνησιμότητα	Ποσοστό Θνησιμότητας (%)
M (a)	1 / 30	3,33
M (b)	16 / 30	53,33
M (c)	6 / 30	20,00
Σ1 (a)	2 / 30	6,67
Σ1 (b)	2 / 30	6,67
Σ1 (c)	8 / 30	26,67
Σ2 (a)	4 / 30	13,33
Σ2 (b)	6 / 30	20,00
Σ2 (c)	0 / 30	0,00

Παρατηρήθηκε ότι, κατά τη διάρκεια του πειράματος, το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας παρουσίασε η πειραματική μεταχείριση M(b) με ποσοστό 53,33%, δηλαδή περίπου τα μισά σαλιγκάρια πέθαναν. Αντίθετα, το μικρότερο ποσοστό παρατηρήθηκε από την πειραματική μεταχείριση Σ2(c), όπου το συγκεκριμένο ποσοστό ήταν μηδενικό.

3.3 Βάρη σαλιγκαριών

Για το διατροφικό πείραμα, έγιναν μετρήσεις στα ατομικά βάρη των σαλιγκαριών τόσο σε αρχικές, όσο και σε τελικές τιμές, καθώς επίσης και ενδιάμεσες μετρήσεις ανά 15 ημέρες για την καλύτερη αξιολόγηση στην μεταβολή του βάρους τους και την αύξηση τους. Από τις ατομικές μετρήσεις αυτές προέκυψε ο μέσος όρος για την κάθε διατροφική ομάδα και για κάθε μία υποπερίοδο από τις τέσσερις (1^η-15^η μέρα, 16^η-30^η μέρα, 31^η-45^η μέρα, 46^η-60^η μέρα) του πειράματος, όπως παρουσιάζονται στους πίνακες 7 έως 11.

1^η ημέρα στις 14/8/2017 (Αρχικό Βάρος)

Το αρχικό βάρος των σαλιγκαριών των 9 πειραματικών μεταχειρίσεων (Πίνακας 7) δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ($F=0,23$, $P>0,05$).

Πίνακας 7. Τα μέσα βάρη σε γραμμάρια (g) των πειραματικών μεταχειρίσεων την 1^η ημέρα (Αρχικό Βάρος) του πειράματος. (Στις παρενθέσεις με «a,b,c» αναφέρεται η επανάληψη του κάθε σιτηρεσίου και με «A» η στατιστική διαφορά. Ο μέσος όρος \pm τυπ. απόκλιση προέκυψε από 30 σαλιγκάρια για την κάθε μεταχείριση).

<u>Πειραματικές Μεταχειρίσεις</u>	<u>Μέσο (Αρχικό) Βάρος (g)</u>
M (a)	1,77 \pm 0,47 ^A
M (b)	1,79 \pm 0,50 ^A
M (c)	1,81 \pm 0,52 ^A
Σ1 (a)	1,72 \pm 0,43 ^A
Σ1 (b)	1,82 \pm 0,48 ^A
Σ1 (c)	1,85 \pm 0,47 ^A
Σ2 (a)	1,85 \pm 0,45 ^A
Σ2 (b)	1,83 \pm 0,50 ^A
Σ2 (c)	1,78 \pm 0,43 ^A

15^η ημέρα στις 28/8/2017

Για την 1^η δειγματοληψία βάρους (15^η ημέρα πειράματος), παρουσιάστηκε σημαντική στατιστική διαφορά ($P<0,05$) στα μέσα βάρη των σαλιγκαριών για τον

παράγοντα «Επανάληψη Σιτηρεσίου». Πιο συγκεκριμένα, όλα τα σαλιγκάρια της επανάληψης «c» και για τα τρία σιτηρέσια [M(c), Σ1(c), Σ2(c)], καθώς επίσης και όλα τα σαλιγκάρια της επανάληψης «b» του Σ2 σιτηρεσίου, έδειξαν μειωμένα ποσά στο βάρος τους σε σύγκριση με τα σαλιγκάρια των υπολοίπων επαναλήψεων. Το μεγαλύτερο βάρος παρουσίασε η μεταχείριση M(a) με τιμή $3,57 \pm 0,85$ g, ενώ αντίστοιχα το μικρότερο βάρος παρουσίασε η μεταχείριση M(c) με τιμή $2,40 \pm 0,53$ g. Όσον αφορά το βάρος για τις τρεις επαναλήψεις του κάθε σιτηρεσίου, προέκυψε ότι, για τα σιτηρέσια M (μάρτυρας) και Σ1 (μάρτυρας με προσθήκη 7% αλεύρου στέμφυλων) η επανάληψη «c» διέφερε στατιστικά σε σχέση με τις άλλες δύο επαναλήψεις και για τα δύο σιτηρέσια εμφανίζοντας μικρότερες τιμές μέσου βάρους. Για το σιτηρέσιο Σ2 (μάρτυρας με προσθήκη 14% αλεύρου στέμφυλων), η επανάληψη «a» διαφοροποιήθηκε σε σχέση με τις άλλες δύο επαναλήψεις, εμφανίζοντας μεγαλύτερη τιμή μέσου βάρους.

Πίνακας 8. Τα μέσα βάρη σε γραμμάρια (g) των πειραματικών μεταχειρίσεων την 15^η ημέρα του πειράματος. (Στις παρενθέσεις με «a,b,c» αναφέρεται η επανάληψη του κάθε σιτηρεσίου και με «A,B» η στατιστική διαφορά. Ο μέσος όρος \pm τυπ. απόκλιση προέκυψε από 30 σαλιγκάρια για την κάθε μεταχείριση).

<u>Πειραματικές Μεταχειρίσεις</u>	<u>Μέσο Βάρος (g)</u>
M (a)	$3,57 \pm 0,85^A$
M (b)	$3,60 \pm 0,90^A$
M (c)	$2,40 \pm 0,53^B$
Σ1 (a)	$3,34 \pm 0,90^A$
Σ1 (b)	$3,45 \pm 0,95^A$
Σ1 (c)	$2,76 \pm 0,80^B$
Σ2 (a)	$3,32 \pm 0,74^A$
Σ2 (b)	$2,75 \pm 0,88^B$
Σ2 (c)	$2,44 \pm 0,58^B$

30^η ημέρα στις 15/9/2017

Για την 2^η δειγματοληψία βάρους (30^η ημέρα πειράματος), παρουσιάστηκε σημαντική στατιστική διαφορά ($F=10,08$, $P<0,05$) στα μέσα βάρη των σαλιγκαριών για τον παράγοντα «**Επανάληψη Σιτηρεσίου**». Ειδικότερα, τα μεγαλύτερα βάρη από όλες τις διατροφικές ομάδες παρουσίασαν η μεταχείριση M(a) και η μεταχείριση Σ2(a), με τιμές $7,79 \pm 2,16$ g και $7,58 \pm 2,35$ g, αντίστοιχα. Αντίθετα, τα μικρότερα βάρη παρουσίασαν οι μεταχειρίσεις M(c) και Σ2(b), με τιμές $5,34 \pm 1,25$ g και $5,15 \pm 1,57$ g, αντίστοιχα. Ενδιάμεσες τιμές βάρους παρουσίασαν οι υπόλοιπες πειραματικές μεταχειρίσεις [M(b), Σ1(a), Σ1(b), Σ1(c), Σ2(c)]. Όσον αφορά το βάρος για τις τρεις επαναλήψεις του κάθε σιτηρεσίου, προέκυψε ότι, για τα σιτηρέσια M (μάρτυρας) και Σ2 (μάρτυρας με προσθήκη 14% αλεύρου στέμφυλων), αυτά διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους ($F=4,27$, $P<0,05$), ενώ αντίθετα για το σιτηρέσιο Σ1 (μάρτυρας με προσθήκη 7% αλεύρου στέμφυλων) δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών επαναλήψεων του.

Πίνακας 9. Τα μέσα βάρη σε γραμμάρια (g) των πειραματικών μεταχειρίσεων την 30^η ημέρα του πειράματος. (Στις παρενθέσεις με «a,b,c» αναφέρεται η επανάληψη του κάθε σιτηρεσίου και με «A,B,C» η στατιστική διαφορά. Ο μέσος όρος \pm τυπ. απόκλιση προέκυψε από 30 σαλιγκάρια για την κάθε μεταχείριση).

<u>Πειραματικές Μεταχειρίσεις</u>	<u>Μέσο Βάρος (g)</u>
M (a)	$7,79 \pm 2,16^A$
M (b)	$6,94 \pm 2,80^B$
M (c)	$5,34 \pm 1,25^C$
Σ1 (a)	$6,28 \pm 2,17^B$
Σ1 (b)	$6,38 \pm 2,66^B$
Σ1 (c)	$5,92 \pm 1,66^B$
Σ2 (a)	$7,58 \pm 2,35^A$
Σ2 (b)	$5,15 \pm 1,57^C$
Σ2 (c)	$5,85 \pm 1,34^B$

45^η ημέρα στις 29/9/2017

Για την 3^η δειγματοληψία βάρους (45^η ημέρα πειράματος), παρουσιάστηκε σημαντική στατιστική διαφορά ($F=5,56$, $P<0,00$) στα βάρη των σαλιγκαριών των πειραματικών ομάδων. Ομοίως με την προηγούμενη δειγματοληψία (2^η), προέκυψε ότι βαρύτερα ήταν τα σαλιγκάρια των μεταχειρίσεων M(a) και Σ2(a), με μέσο βάρος $11,49 \pm 3,05$ g και $12,16 \pm 3,18$ g, αντίστοιχα. Τις μικρότερες τιμές παρουσίασαν οι μεταχειρίσεις M(c) ($8,90 \pm 2,19$ g), Σ2(b) ($8,84 \pm 2,57$ g) και Σ2(c) ($8,99 \pm 1,82$ g). Όσον αφορά το βάρος για τις τρεις επαναλήψεις του κάθε σιτηρεσίου, προέκυψε ότι για το σιτηρέσιο M (μάρτυρας), αυτά διέφεραν συγκριτικά μεταξύ τους, ενώ αντίθετα για το σιτηρέσιο Σ1 (μάρτυρας με προσθήκη 7% αλεύρου στέμφυλων) δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών επαναλήψεων του. Για το σιτηρέσιο Σ2 (μάρτυρας με προσθήκη 14% αλεύρου στέμφυλων) στατιστική διαφορά έδειξε μόνο η πειραματική μεταχείριση Σ2(a) σε σχέση με τις άλλες δύο.

Πίνακας 10. Τα μέσα βάρη σε γραμμάρια (g) των πειραματικών μεταχειρίσεων την 45^η ημέρα του πειράματος. (Στις παρενθέσεις με «a,b,c» αναφέρεται η επανάληψη του κάθε σιτηρεσίου και με «A,B,C» η στατιστική διαφορά. Ο μέσος όρος \pm τυπ. απόκλιση προέκυψε από 30 σαλιγκάρια για την κάθε μεταχείριση).

<u>Πειραματικές Μεταχειρίσεις</u>	<u>Μέσο Βάρος (g)</u>
M (a)	$11,49 \pm 3,05^A$
M (b)	$10,54 \pm 3,68^B$
M (c)	$8,90 \pm 2,19^C$
Σ1 (a)	$9,96 \pm 3,42^B$
Σ1 (b)	$9,88 \pm 4,10^B$
Σ1 (c)	$9,47 \pm 2,28^B$
Σ2 (a)	$12,16 \pm 3,18^A$
Σ2 (b)	$8,84 \pm 2,57^C$
Σ2 (c)	$8,99 \pm 1,82^C$

60^η ημέρα στις 13/10/2017 (Τελικό Βάρος)

Για την 4^η (τελική) δειγματοληψία βάρους (60^η ημέρα πειράματος), παρουσιάστηκε σημαντική στατιστική διαφορά ($P < 0,05$) στα βάρη των σαλιγκαριών για τον παράγοντα «**Επανάληψη Σιτηρεσίου**». Το μεγαλύτερο τελικό βάρος παρουσίασαν οι μεταχειρίσεις M(a), M(b) και Σ2(a) με τιμές $12,76 \pm 3,40$ g, $12,39 \pm 3,45$ g και $13,05 \pm 3,52$ g, αντίστοιχα. Ενδιάμεσες τιμές βάρους παρουσίασαν οι μεταχειρίσεις [M(c), Σ1(a), Σ1(b), Σ1(c), Σ2(c)], ενώ τη μικρότερη τιμή βάρους παρουσίασε η μεταχείριση Σ2(b) με $9,49 \pm 2,92$ g. Για το σιτηρέσιο M (μάρτυρας) η επανάληψη «c» διαφοροποιήθηκε σε σχέση με τις άλλες δύο, για το σιτηρέσιο Σ1 (μάρτυρας με προσθήκη 7% αλεύρου στέμφυλων) καμία επανάληψη δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ενώ για το σιτηρέσιο Σ2 (μάρτυρας με προσθήκη 14% αλεύρου στέμφυλων) και οι τρεις επαναλήψεις διαφοροποιήθηκαν συγκριτικά μεταξύ τους ($F=1,01$, $P > 0,05$).

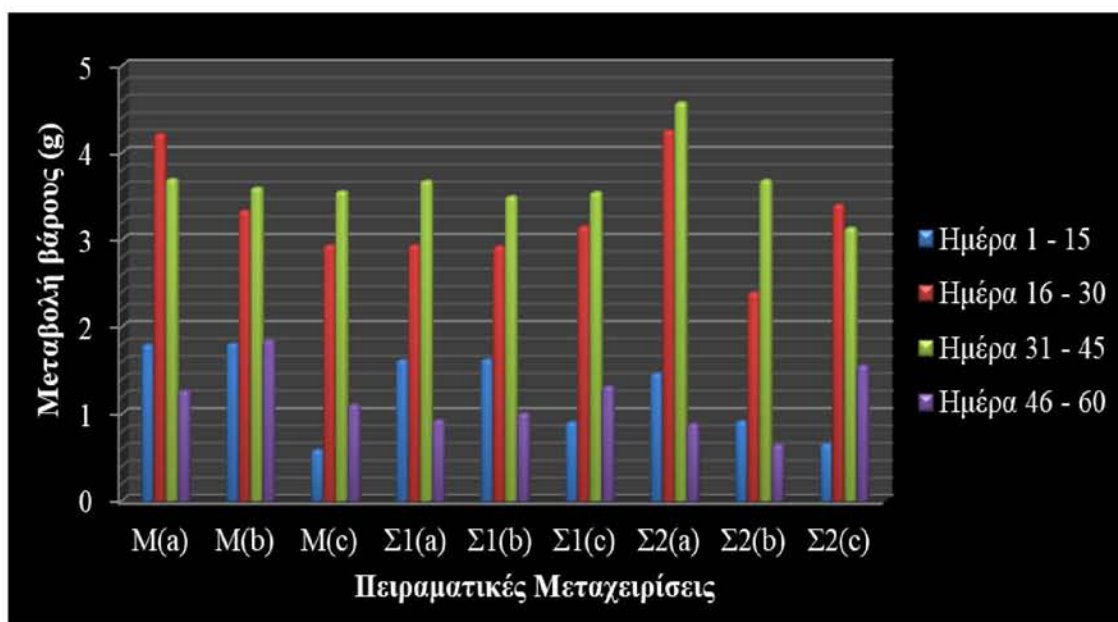
Πίνακας 11. Τα μέσα βάρη σε γραμμάρια (g) των πειραματικών μεταχειρίσεων την 60^η ημέρα (Τελικό Βάρος) του πειράματος. (Στις παρενθέσεις με «a,b,c» αναφέρεται η επανάληψη του κάθε σιτηρεσίου και με «A,B,C» η στατιστική διαφορά. Ο μέσος όρος \pm τυπ. απόκλιση προέκυψε από 30 σαλιγκάρια για την κάθε μεταχείριση).

<u>Πειραματικές Μεταχειρίσεις</u>	<u>Μέσο (Τελικό) Βάρος (g)</u>
M (a)	$12,76 \pm 3,40^A$
M (b)	$12,39 \pm 3,45^A$
M (c)	$10,01 \pm 3,40^B$
Σ1 (a)	$10,89 \pm 3,68^B$
Σ1 (b)	$10,89 \pm 3,43^B$
Σ1 (c)	$10,79 \pm 3,35^B$
Σ2 (a)	$13,05 \pm 3,52^A$
Σ2 (b)	$9,49 \pm 2,92^C$
Σ2 (c)	$10,55 \pm 2,26^B$

3.4 Μεταβολή βάρους σαλιγκαριών

Εκτιμήθηκε η επιμέρους μεταβολή βάρους για τα σαλιγκάρια συνολικά για όλη την διάρκεια του πειράματος καθώς και για τις 4 υποπεριόδους (Σχήμα 2).

Η μεγαλύτερη μεταβολή στο βάρος όλων των μεταχειρίσεων παρατηρήθηκε κατά την 2^η και 3^η υποπερίοδο, δηλαδή από την 16^η ως και την 45^η μέρα του πειράματος. Αντίθετα, η μικρότερη μεταβολή στο βάρος όλων των μεταχειρίσεων παρατηρήθηκε κατά την αρχή (1^η υποπερίοδος) και το τέλος (4^η υποπερίοδος) του πειράματος, δηλαδή από την 1^η έως την 15^η ημέρα και από την 46^η έως την 60^η ημέρα.



Σχήμα 2. Η επιμέρους μεταβολή του βάρους σε γραμμάρια (g) των σαλιγκαριών των 9 πειραματικών μεταχειρίσεων για τις 4 υποπεριόδους του πειράματος. (Στις παρενθέσεις με «a,b,c» δηλώνεται η επανάληψη του κάθε σιτηρεσίου).

Αντίστοιχα, έγινε και ο υπολογισμός του ποσοστού της μεταβολής του βάρους των πειραματικών μεταχειρίσεων για τις ίδιες υποπεριόδους του πειράματος (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Το ποσοστό της μεταβολής βάρους (επί τοις %) των πειραματικών μεταχειρίσεων για τις 4 υποπεριόδους του πειράματος. (Στις παρενθέσεις με «a,b,c» δηλώνεται η επανάληψη του κάθε σιτηρεσίου).

Πειραματικές Μεταχειρίσεις	Ημέρα 1 – 15 (%)	Ημέρα 16 – 30 (%)	Ημέρα 31 – 45 (%)	Ημέρα 46 – 60 (%)
M (a)	16,38	38,40	33,67	11,56
M (b)	17,08	31,51	33,96	17,45
M (c)	7,20	35,85	43,41	13,54
Σ1 (a)	17,67	32,06	40,13	10,14
Σ1 (b)	17,97	32,30	38,59	11,14
Σ1 (c)	10,18	35,35	39,71	14,77
Σ2 (a)	13,13	38,04	40,89	7,95
Σ2 (b)	12,01	31,33	48,17	8,49
Σ2 (c)	7,53	38,88	35,80	17,79

Το μεγαλύτερο ποσοστό μεταβολής βάρους για όλες τις μεταχειρίσεις εμφανίστηκε κατά τη 2^η και 3^η υποπερίοδο (16^η έως 45^η ημέρα) του πειράματος, με ποσοστά περίπου 30-45%. Αντίθετα, το μικρότερο ποσοστό μεταβολής για όλες τις μεταχειρίσεις εμφανίστηκε κατά την 1^η και 4^η υποπερίοδο (1^η έως 15^η ημέρα και από 46^η έως 60^η ημέρα) και κυμάνθηκε από 7 έως 18%.

3.5 Αύξηση βάρους

Από την μεταβολή του βάρους των σαλιγκαριών για κάθε πειραματική μεταχείριση, προέκυψε η μέση αύξηση στο βάρος καθώς επίσης και η μέση αύξηση του κάθε σιτηρεσίου του πειράματος (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Η αύξηση για κάθε πειραματική μεταχείριση και για κάθε σιτηρέσιο. (Στις παρενθέσεις με «a,b,c» δηλώνεται η επανάληψη του κάθε σιτηρεσίου και με «A,B,C» η στατιστική διαφορά).

Πειραματικές Μεταχειρίσεις	Τελικό – Αρχικό Βάρος (g)	Αύξηση για κάθε Σιτηρέσιο (g)
M (a)	10,99 ± 4,13 ^A	9,93 ± 3,84 ^A
M (b)	10,6 ± 3,90 ^A	
M (c)	8,2 ± 3,47 ^C	
Σ1 (a)	9,17 ± 3,48 ^B	9,06 ± 3,50 ^A
Σ1 (b)	9,07 ± 3,40 ^B	
Σ1 (c)	8,94 ± 3,62 ^B	
Σ2 (a)	11,2 ± 4,50 ^A	9,21 ± 3,75 ^A
Σ2 (b)	7,66 ± 3,18 ^C	
Σ2 (c)	8,77 ± 3,59 ^B	

Όπως προκύπτει και από τον Πίνακα 13, παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$) στην αύξηση των σαλιγκαριών για τον παράγοντα «**Επανάληψη Σιτηρεσίου**». Τις μεγαλύτερες τιμές αύξησης των σαλιγκαριών παρουσίασαν οι μεταχειρίσεις M(a), M(b) και Σ2(a) με $10,99 \pm 4,13$ g, $10,6 \pm 3,90$ g και $11,2 \pm 4,50$ g, αντίστοιχα. Αντίθετα οι μικρότερες τιμές αύξησης παρουσιάστηκαν από τις μεταχειρίσεις M(c) και Σ2(b) με $8,2 \pm 3,47$ g και $7,66 \pm 3,18$ g, αντίστοιχα. Ενδιάμεσες τιμές αύξησης παρουσίασαν οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Όσον αφορά την αύξηση βάρους για τις τρεις επαναλήψεις του κάθε σιτηρεσίου, προέκυψε ότι, για το σιτηρέσιο M (μάρτυρα) η επανάληψη «c» διέφερε στατιστικά με τις άλλες δύο, για το σιτηρέσιο Σ1 (μάρτυρα με προσθήκη αλεύρου στέμφυλων 7 %) καμία επανάληψη δεν διέφερε σε σχέση με τις άλλες δύο, ενώ για το σιτηρέσιο Σ2 (μάρτυρα με προσθήκη αλεύρου στέμφυλων 14 %) και οι τρεις επαναλήψεις διαφοροποιήθηκαν συγκριτικά μεταξύ τους ($F=0,25$, $P > 0,05$). Εν κατακλείδι, τα σαλιγκάρια που διατράφηκαν με τα τρία σιτηρέσια δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($F=0,08$, $P > 0,05$),

αποτέλεσμα που δηλώνει πως δεν επηρεάστηκε ο ρυθμός αύξησης των σαλιγκαριών από την επιλογή του σιτηρεσίου αλλά μόνο από την θέση του κλωβού.

3.6 Αναλύσεις στη σύσταση σιτηρεσίων

Από την στατιστική ανάλυση των τριών σιτηρεσίων (Πίνακας 4, παράγραφος 2.1), προέκυψε ότι παρουσιάστηκε σημαντική διαφορά ($P < 0,05$) μόνο ως προς τις ολικές αζωτούχες ενώσεις που περιείχαν τα σιτηρέσια, δηλαδή δεν ήταν ισοπρωτεϊνικά, καθώς το σιτηρέσιο M (μάρτυρας) περιείχε μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης (20,33%) σε σύγκριση με τα άλλα δύο σιτηρέσια ($\Sigma 1 = 19,08\%$ και $\Sigma 2 = 18,64\%$). Όσον αφορά τα ολικά λιπαρά οξέα, τους υδατάνθρακες, την ολική ενέργεια, την υγρασία καθώς και την ανόργανη ουσία, δεν υπήρξε ουδεμία διαφοροποίηση ($P > 0,05$) στο ποσοστά τους και για τα τρία σιτηρέσια. Από την ανάλυση των τριών σιτηρεσίων ως προς τη μέση περιεκτικότητα τους σε γαλλικό οξύ που εκφράστηκε σε υγρό βάρος (πολυφαινόλες), παρουσιάστηκε σημαντική διαφορά ($F = 4373,68$, $P < 0,05$), μεταξύ τους, με αποτελέσματα από το μικρότερο προς το μεγαλύτερο με τη σειρά, για το σιτηρέσιο M = $37,3 \pm 3,2$ mg GAE/kg, για το $\Sigma 1 = 289,5 \pm 7,2$ mg GAE/kg και για το $\Sigma 2 = 629 \pm 11$ mg GAE/kg.

Ομοίως, αντίστοιχες εργαστηριακές αναλύσεις με εκείνες των σιτηρεσίων ακολουθήθηκαν και για την σύσταση του μυϊκού ιστού των 3 πειραματικών μεταχειρίσεων που διατράφηκαν με τα 3 σιτηρέσια (παράγραφος 3.8).

3.7 Κατανάλωση τροφής

Κατά τη διάρκεια των 60 ημερών του διατροφικού πειράματος, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις κατανάλωσης σιτηρεσίου. Εκτιμήθηκαν η κατανάλωση σιτηρεσίου, η ίδια παράμετρος εκφρασμένη ανά μία ημέρα και ανά σαλιγκάρι, καθώς και η τελευταία παράμετρος για κάθε σιτηρέσιο.

Πίνακας 14. Η κατανάλωση σιτηρεσίου σε γραμμάρια (g) για τις πειραματικές μεταχειρίσεις του πειράματος, και η ίδια παράμετρος εκφρασμένη ανά ημέρα και ανά σαλιγκάρι για την κάθε επανάληψη όπως και για κάθε σιτηρέσιο. (Στις παρενθέσεις με «a,b,c» δηλώνεται η επανάληψη του κάθε σιτηρεσίου και με «A,B,C» η στατιστική διαφορά).

Πειραματική Μεταχείριση	Μέση Κατανάλωση (g / 2 ημέρες - τάισμα)	Μέση Κατανάλωση (g / ημέρα / σαλιγκάρι)	Μέση Κατανάλωση για κάθε Σιτηρέσιο (g / ημέρα / σαλιγκάρι)
M (a)	7,52 ± 2,51 ^A	0,13 ± 0,04 ^A	0,10 ± 0,02 ^A
M (b)	4,85 ± 1,57 ^C	0,08 ± 0,04 ^C	
M (c)	4,89 ± 1,50 ^C	0,08 ± 0,02 ^C	
Σ1 (a)	7,02 ± 1,94 ^A	0,12 ± 0,03 ^A	0,11 ± 0,01 ^A
Σ1 (b)	6,20 ± 2,34 ^B	0,10 ± 0,04 ^B	
Σ1 (c)	5,80 ± 2,12 ^B	0,10 ± 0,03 ^B	
Σ2 (a)	7,35 ± 2,34 ^A	0,12 ± 0,04 ^A	0,11 ± 0,01 ^A
Σ2 (b)	6,29 ± 2,46 ^B	0,10 ± 0,04 ^B	
Σ2 (c)	6,81 ± 2,97 ^A	0,11 ± 0,05 ^A	

Για τις παραμέτρους της μέσης κατανάλωσης σιτηρεσίου ανά κλωβό και στο σύνολο των ημερών του πειράματος και της ίδιας παραμέτρου εκφρασμένης ανά σαλιγκάρι και ανά ημέρα, παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($F=4,26$, $P<0,05$) για τον παράγοντα «**Επανάληψη Σιτηρεσίου**». Τις μεγαλύτερες τιμές μέσης κατανάλωσης παρουσίασε η επανάληψη «a» των τριών σιτηρεσίων [M(a), Σ1(a), Σ2(a)] καθώς και η πειραματική μεταχείριση Σ2(c). Για τη ίδια παράμετρο, τις ενδιάμεσες και μικρότερες τιμές παρουσίασαν οι μεταχειρίσεις Σ1(b), Σ1(c), Σ2(b) και M(b), M(c), αντίστοιχα. Για την παράμετρο της κατανάλωσης σιτηρεσίου / σαλιγκάρι / ημέρα, παρουσιάστηκαν τα ίδια στατιστικά αποτελέσματα. Όσον αφορά τη μέση κατανάλωση για το κάθε σιτηρέσιο, όπως αυτή προέκυψε από τις τρεις

επαναλήψεις (ανεξαρτήτως θέσης κλωβού) εκφρασμένο ανά σαλιγκάρι και ανά ημέρα, δεν παρουσιάστηκε ουδεμία στατιστική διαφορά ($P>0,05$) για τον παράγοντα «**Σιτηρέσιο**». Και για τα τρία σιτηρέσια παρουσιάστηκε συνολικά μέση κατανάλωση περίπου ίση με 0,1 g / ημέρα / σαλιγκάρι. Ειδικότερα, για το σιτηρέσιο M (μάρτυρας) παρουσιάστηκε μέση τιμή κατανάλωσης ανά ημέρα και ανά σαλιγκάρι ίση με $0,10 \pm 0,02$ g, ενώ για τα άλλα δύο σιτηρέσια παρουσιάστηκε η ίδια μέση τιμή που ανήλθε σε $0,11 \pm 0,01$ g.

3.8 Σύσταση μυϊκού ιστού

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακές αναλύσεις στο μυϊκό ιστό των σαλιγκαριών των πειραματικών μεταχειρίσεων, τόσο όσον αφορά τη θρεπτική του σύσταση, όσο και την χημική ανάλυση του.

Πίνακας 15. Η θρεπτική σύσταση του μυϊκού ιστού σαλιγκαριών των 3 πειραματικών μεταχειρίσεων. (Οι τιμές προέκυψαν από μέσους όρους 3 επαναλήψεων. Με «A,B» παρουσιάζεται η στατιστική διαφορά).

<u>Είδος αναλύσεων</u>	<u>Μυϊκός ιστός σαλιγκαριών</u>		
	M	Σ1	Σ2
Υγρασία (%)	78,86 ^A	78,65 ^A	75,86 ^B
Ολικές Αζωτούχες Ενώσεις (%)	13,91 ^A	13,23 ^A	13,06 ^A
Ολικά Λιπαρά Οξέα (%)	0,62 ^A	0,58 ^A	0,55 ^A
Υδατάνθρακες / Σάκχαρα (% Brix)	2,4 ^A	2,1 ^A	2,2 ^A
Ανόργανη Ουσία (%)	6,46 ^A	6,67 ^A	6,84 ^A
Ολική Ενέργεια (KJ/g)	20,95 ^A	20,57 ^A	20,52 ^A

Από τη στατιστική ανάλυση της θρεπτικής σύστασης του μυϊκού ιστού των σαλιγκαριών που διατράφηκαν με τα τρία σιτηρέσια, προέκυψε ότι, δεν παρουσιάστηκε καμία διαφοροποίηση ($P>0,05$) στα ποσοστά μεταξύ των συστατικών τους, δηλαδή τις ολικές αζωτούχες ενώσεις, τα ολικά λιπαρά οξέα, τους υδατάνθρακες, την ανόργανη ουσία και την ολική ενέργεια. Αντίθετα, το επίπεδο της υγρασίας των μυϊκών ιστών των σαλιγκαριών παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά ($P<0,05$). Ειδικότερα, τα σαλιγκάρια που διατράφηκαν με τα σιτηρέσια Μ (μάρτυρας) και Σ1 (μάρτυρας με προσθήκη αλεύρου στέμφυλων 7%) παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά υγρασίας (78,86% και 78,65%, αντίστοιχα) σε σχέση με τα σαλιγκάρια που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο Σ2 (μάρτυρας με προσθήκη αλεύρου στέμφυλων 14%), που παρουσίασε ποσοστό 75,86%.

Πίνακας 16. Χημική ανάλυση της ποιότητας του μυϊκού ιστού των πειραματικών μεταχειρίσεων. (Οι τιμές προέκυψαν από μέσους όρους 3 επαναλήψεων. Με «A,B,C» παρουσιάζεται η στατιστική διαφορά).

<u>Είδος αναλύσεων</u>	<u>Μυϊκός ιστός σαλιγκαριών</u>		
	Μ	Σ1	Σ2
Πολυφαινόλες (mg GAE/kg)	<17	18.5 ± 3.2 ^B	44.9 ± 4.1 ^A
Οργανικά Οξέα (οξύτητα)	0,26	0,19	0,21
pH	8,92	8,75	8,78
Χρώμα	ΔL=55,83 ^A Δa=3,08 ^B Δb=12 ^C	ΔL=54,66 ^A Δa=2,77 ^B Δb=11,13 ^C	ΔL=54,62 ^A Δa=2,53 ^B Δb=13,03 ^C

Για τον παράγοντα του χρώματος του μυϊκού ιστού των σαλιγκαριών προέκυψε πως δεν υπήρξε καμία διαφοροποίηση ($P>0,05$) σε κανέναν από τους συντελεστές μεταξύ τους (ΔL, Δa, Δb) και για τα σαλιγκάρια που διατράφηκαν με τα τρία σιτηρέσια. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν για τους παράγοντες της οξύτητας και του pH μεταξύ των τριών μυϊκών ιστών των σαλιγκαριών. Για τον

παράγοντα των πολυφαινολών στον μυϊκό ιστό των τριών μεταχειρίσεων, δηλαδή η μέση περιεκτικότητα τους σε γαλλικό οξύ που εκφράστηκε σε υγρό βάρος, παρουσιάστηκε σημαντική διαφορά ($F=92,11$, $P<0,05$), με μεγαλύτερη περιεκτικότητα να εμφανίζεται για το $\Sigma 2 = 44.9 \pm 4.1$ mg GAE/kg, που διέφερε και με τις άλλες δύο ομάδες σαλιγκαριών ($M < 17$ mg GAE/kg και $\Sigma 1 = 18.5 \pm 3.2$ mg GAE/kg).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες στις διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού οδήγησαν στην παραγωγή υγιεινών τροφίμων με ευχάριστη γεύση και εμφάνιση, ώστε να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις των καταναλωτών. Επιπλέον, η βιομηχανία τροφίμων αναζητά συνεχώς νέες μεθόδους ώστε να βελτιώσει την ποιότητα και να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του τροφίμου χωρίς να τεθεί σε κίνδυνο η ασφάλεια του τροφίμου και κατ'επέκταση η ασφάλεια του καταναλωτή.

Η σύγχρονη επιστημονική έρευνα μελετά τις δυνατότητες χρήσης υποπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων, όπως της ελαιουργίας και της οινοποιίας, που θα προστίθενται στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων και θα φθάνουν δια της μεταβολικής οδού στα παραγόμενα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, με σκοπό την παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας, με συγκεκριμένες οργανοληπτικές ιδιότητες, υψηλή διατροφική αξία και ισχυρισμούς υγείας. Η χρήση των στέμφυλων στη διατροφή παραγωγικών ζώων ενισχύει παραμέτρους ποιότητας όπως είναι η σύσταση, η υφή, το χρώμα.

Η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ιδιότητα των στέμφυλων ενισχύουν τη θέση τους στη βιομηχανία τροφίμων. Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι μια διαδικασία η οποία έχει σημαντικές συνέπειες για τη βιομηχανία τροφίμων διότι μπορεί να υποβαθμίσει την ποιότητα των τροφίμων όπως είναι η τάγγιση, η γεύση και η οσμή του προϊόντος. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τη χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών στη διατροφή ζώων καθώς και στην προσθήκη τους στο κρέας και τα προϊόντα του. Επιστημονικά ευρήματα σχετικά με την αρνητική επίδραση των συνθετικών αντιοξειδωτικών όπως BHA και BHT στην ανθρώπινη υγεία καθιστούν αναγκαία τη χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών (Garcia-Lomillo &

Gonzalez-San Jose 2016). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των στέμφυλων έχει επιβεβαιωθεί τόσο κατά την προσθήκη τους στη διατροφή των ζώων όσο και κατά τη συντήρηση του κρέατος και προϊόντων κρέατος. Για τη δράση των πολυφαινολών στον οργανισμό, υποστηρίζεται ότι αυτές έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με άλλα διαφορετικά μόρια, όπως είναι οι πρωτεΐνες. Κατά τους Goni *et al.* (2007) και Brenes *et al.* (2008), η φαινομένη ειλεακή πεπτικότητα των πρωτεϊνών και των απαραίτητων και μη απαραίτητων αμινοξέων, δεν επηρεάζονται. Αυτή η έλλειψη αποτελεσματικής επίδρασης, θα μπορούσε να αποδοθεί στη χαμηλή περιεκτικότητα πολυφαινολών. Για το λόγο αυτό, η καταλληλότερη δόση των φαινολών στο διαιτολόγιο των ζώων πρέπει προηγουμένως να υπολογιστεί.

Τα τελευταία χρόνια γίνονται έρευνες σε παγκόσμια κλίμακα σχετικά με τη χρήση στέμφυλων οινοποιίας στη διατροφή πουλερικών και χοίρων (Carpenter *et al.* 2007, Goni *et al.* 2007). Ο λόγος που στρέφονται οι έρευνες σε αυτά τα είδη ζώων είναι ότι το κρέας τους είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και επομένως κατά τη συντήρησή τους είναι περισσότερο ευαίσθητα στην οξείδωση. Το σταφύλι και τα υποπροϊόντα του είναι σημαντικά πηγές αντιοξειδωτικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην τη βιομηχανία μεταποίησης τροφίμων και την ζωική παραγωγή. Οι Bertol *et al.* (2017) επιβεβαίωσαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των στέμφυλων όταν αυτά προστέθηκαν στο εμπλουτισμένο με ω-3 λιπαρά οξέα σιτηρέσιο χοίρων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η λιπιδική υπεροξείδωση επιβραδύνεται λόγω των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα στέμφυλα και της αντιοξειδωτικής τους ικανότητα.

Η ασφάλεια του τροφίμου εξαρτάται και από τη συντήρησή του. Η βιομηχανία τροφίμων στοχεύει στην επιμήκυνση της διάρκειας ζωής του τροφίμου καθώς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η έκθεση στο φως και στην ατμόσφαιρα τείνουν να

την περιορίσουν. Από πολλές μελέτες είναι γνωστό ότι τα στέμφυλα έχουν τη δυνατότητα περιορισμού της οξειδωσης των ιχθυελαίων της σάρκας των ψαριών, του κρέατος των πουλερικών και χοίρων (Pazos *et al.* 2005, Mielnik *et al.* 2006, Goni *et al.* 2007, Brenes *et al.* 2010, Ryu *et al.* 2014). Συμπληρώματα διατροφής με αντιοξειδωτικά, αυξάνουν την συγκέντρωση της βιταμίνη E στους μυς, ενισχύοντας έτσι την οξειδωτική σταθερότητα του κρέατος στη διάρκεια της συντήρησής του στην ψύξη (Brenes *et al.*, 2008). Πιο συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων που περιέχονται στα στέμφυλα αποδείχθηκε ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του κρέατος από τη οξειδωση. Τόσο σε πειράματα με έτοιμα προϊόντα αποτελούμενα από σάρκα πέστροφας (Gai *et al.*, 2014) όσο και με σάρκα του είδους *Trauchurus trauchurus* (Pazos *et al.*, 2005) επιβεβαιώθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των στέμφυλων κατά τη συντήρηση. Τέλος, σημαντική είναι και η αντιμικροβιακή δράση των στέμφυλων καθώς δρουν ενάντια στην ανάπτυξη μικροοργανισμών και ενισχύουν την ασφάλεια του τροφίμου.

Η εκτενής βιβλιογραφία σχετικά με τη χρήση των στέμφυλων σε εφαρμογές της βιομηχανίας τροφίμων είναι ιδιαίτερος ενθαρρυντική για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων. Ενώσεις που περιέχονται στα στέμφυλα όπως οι φαινολικές ενώσεις, τα φλαβονοειδή, οι ανθοκυανίνες και οι ταννίνες μπορούν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή καινοτόμων τροφίμων που θα φέρουν ισχυρισμούς υγείας (Dimou & Koutelidakis 2016). Επιστημονικές μελέτες έδειξαν (Shi *et al.*, 2003) ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα της προανθοκυανιδίνης, είναι 20 φορές μεγαλύτερη από τη βιταμίνη E και 50 φορές μεγαλύτερη από τη βιταμίνη C. Οι πιο πλούσιες σε φαινόλες ενώσεις που έχουν απομονωθεί από εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού είναι οι κατεχίνες, οι επικατεχίνες, η προκυανιδίνη και μερικά διμερή και τριμερή (Yilmaz and Toledo 2004, Xia *et al.* 2010).

Στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας και της προσπάθειας για μείωση κόστους και περιβαλλοντικής επιβάρυνσης, μελετάται έντονα η αξιοποίηση των υποπροϊόντων της βιομηχανίας κρασιού στη βιομηχανία τροφίμων (Lavelli *et al.*, 2016).

Τα τρία σιτηρέσια με τα οποία διατράφηκαν τα σαλιγκάρια ήταν ισοενεργειακά αλλά όχι ισοπρωτεϊνικά, καθώς το σιτηρέσιο M (μάρτυρας) είχε ελαφρώς υψηλότερο επίπεδο στο ποσοστό πρωτεΐνης του (20,33%) σε σχέση με τα άλλα δύο σιτηρέσια (Σ1-μάρτυρας με προσθήκη 7% αλεύρου στέμφυλων = 19,08% και Σ2-μάρτυρας με προσθήκη 14% αλεύρου στέμφυλων = 18,64%). Η θρεπτική σύσταση των σιτηρεσίων ήταν όμοια στα υπόλοιπα συστατικά (ολικά λιπαρά οξέα, τους υδατάνθρακες, ανόργανη ουσία, την υγρασία).

Οι κλιματικές συνθήκες στο διχτυοκήπιο ήταν κατάλληλες για την πάχυνση των σαλιγκαριών με εξαίρεση την μία από τις τρεις θέσεις όπου τοποθετήθηκαν οι κλωβοί των επαναλήψεων για τον έλεγχο των συνθηκών (θέση «c») στο διχτυοκήπιο η οποία παρουσίασε διαφοροποίηση θερμοκρασιακά σε σχέση με τις άλλες δύο. Πιθανότατα στο αποτέλεσμα αυτό να οφείλεται και το ότι επηρεάστηκε, αλλά όχι σημαντικά, η παράμετρος της κατανάλωσης σιτηρεσίου για την εν λόγω επανάληψη.

Το ποσοστό θνησιμότητας ανήλθε για σχεδόν όλες τις πειραματικές μεταχειρίσεις σε σχετικά μικρό εύρος (από 0% έως 26,67%), εκτός της μεταχείρισης M(b) όπου ανήλθε σε 53,33%.

Στην τελική δειγματοληψία υπήρξαν διαφοροποιήσεις σε σχέση με τις προηγούμενες δειγματοληψίες όσον αφορά τα μέσα βάρη των ομάδων. Τα σαλιγκάρια όλων των διατροφικών ομάδων έφτασαν στο εμπορικό τους μέγεθος μετά την πάροδο των δύο μηνών του πειράματος, καθώς με το πέρας του τα σαλιγκάρια έφτασαν σχεδόν στο δεκαπλάσιο του αρχικού τους βάρους. Τα μεγαλύτερα μέσα τελικά βάρη παρουσίασαν οι ομάδες M(a), M(b) και Σ2(a) με τιμές $12,76 \pm 3,40$ g,

12,39 ± 3,45 g και 13,05 ± 3,52 g, αντίστοιχα, ενώ τη μικρότερη τιμή μέσου βάρους παρουσίασε η ομάδα Σ2(b) με 9,49 ± 2,92 g. Όσον αφορά το μέσο βάρος για τις τρεις επαναλήψεις του κάθε σιτηρεσίου, προέκυψε ότι, για το σιτηρέσιο M η επανάληψη «c» διαφοροποιήθηκε σε σχέση με τις άλλες δύο, για το σιτηρέσιο Σ1 καμία επανάληψη δεν διέφερε στατιστικά και συγκριτικά με τις άλλες δύο, ενώ για το σιτηρέσιο Σ2 και οι τρεις επαναλήψεις διαφοροποιήθηκαν συγκριτικά μεταξύ τους (Πίνακες 5-9). Η μεγαλύτερη μεταβολή στο βάρος όλων των μεταχειρίσεων παρατηρήθηκε κατά την 2^η και 3^η υποπερίοδο, δηλαδή από την 16^η ως και την 45^η μέρα του πειράματος, ημέρες που συνέπιπταν και με τη βέλτιστη περίοδο όσον αφορά τις κλιματολογικές συνθήκες για την σίτιση και αύξηση των σαλιγκαριών. Αντίθετα, η μικρότερη μεταβολή στο βάρος όλων των μεταχειρίσεων παρατηρήθηκε κατά την αρχή (1^η υποπερίοδος) και το τέλος (4^η υποπερίοδος) του πειράματος. Εν κατακλείδι, δεν επηρεάστηκε η αύξηση των σαλιγκαριών από το σιτηρέσιο.

Στην παρούσα μελέτη και κατά τη διάρκεια των 60 ημερών του διατροφικού πειράματος, η κατανάλωση τροφής / ημέρα / σαλιγκάρι ήταν όμοια και για τα τρία σιτηρέσια με συνολικό μέσο όρο 0,1 g / ημέρα / σαλιγκάρι. Ειδικότερα, για το σιτηρέσιο Μάρτυρα η τιμή ήταν ίση με 0,10 ± 0,02 g, ενώ για τα άλλα δύο σιτηρέσια ελαφρά υψηλότερη σε 0,11 ± 0,01 g. Στις τιμές αυτές δεν συνυπολογίζεται η κατανάλωση ανθρακικού ασβεστίου που στο συγκεκριμένο πείραμα χορηγήθηκε ανεξάρτητα.

Οι Ragni *et al.* (2013), συμπέραναν ότι, η προσθήκη του αλεύρου σπόρων σταφυλιού στις ζωοτροφές για αμνούς πάχυνσης προκάλεσε αύξηση στην πρόσληψη τροφής σε σύγκριση με την ομάδα μάρτυρα, δείχνοντας έτσι το άλευρο είναι εύγευστο. Επίσης σε αμνούς πάχυνσης, οι Bahrami *et al.* (2010), απέδειξαν ότι η προσθήκη αλεύρου στέμφυλων στην τροφή σε ποσοστό 5-10% δεν είχε αρνητική

επίδραση στην ανάπτυξη των ζώων. Σε παρόμοια μελέτη για βοοειδή, οι Moate *et al.* (2014) κατέδειξαν ότι με τη χρήση στέμφυλων (σε ξηρή και ενσιρώμενη τροφή) στη διαίτα των ζώων υπήρξε σημαντική μείωση της απόδοσης μεθανίου από αυτές σε σχέση με το μάρτυρα (20.2 και 21.5 g CH₄ / kg τροφής, σε αντίθεση με τα 26.1 g CH₄ / kg για το μάρτυρα).

Η θρεπτική σύσταση του μυϊκού ιστού των σαλιγκαριών που διατράφηκαν με τα τρία σιτηρέσια, ήταν όμοια με εξαίρεση το επίπεδο της υγρασίας για τα σαλιγκάρια που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο Σ2 που ήταν πιο υψηλό.

Η μέση περιεκτικότητα των τριών σιτηρεσίων σε πολυφαινόλες (εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος ανά kg δείγματος) ήταν διαφορετική και ανάλογη της προσθήκης αλεύρου στέμφυλων σε αυτά, ενώ για το μυϊκό ιστό των σαλιγκαριών υπήρξε διαφοροποίηση μόνο για εκείνα που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο Σ2 που περιείχε 44.9 ± 4.1 mg GAE/kg σε σχέση εκείνα που διατράφηκαν με τα άλλα δύο σιτηρέσια ($M < 17$ mg GAE/kg και $\Sigma 1 = 18.5 \pm 3.2$ mg GAE/kg).

Η χρήση των στέμφυλων στη βιομηχανία τροφίμων και ιδιαίτερα στα ζωικής προέλευσης τρόφιμα μπορεί να επηρεάσει και άλλες παραμέτρους της ποιότητας όπως το χρώμα, το pH, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Selani *et al.*, 2011) αλλά και τη σύσταση. Από τους συντελεστές του χρώματος του μυϊκού ιστού των σαλιγκαριών προέκυψε ότι και για τα σαλιγκάρια που διατράφηκαν με προσθήκη αλεύρου στέμφυλων παρατηρήθηκε ελάχιστη και μη σημαντική μείωση στη φωτεινότητα του μυϊκού ιστού (γκριζωπό χρώμα), σε σχέση με εκείνα που είχαν διατραφεί με το σιτηρέσιο M (μάρτυρα), αποτέλεσμα που δηλώνει πως δεν μεταβλήθηκε το χρώμα στο φιλέτο των σαλιγκαριών εξαιτίας και της χαμηλής προσθήκης του σε εκείνα. Εν αντιθέσει, στην εργασία των Bertol *et al.* (2017) στην οποία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των στέμφυλων τα οποία

προστέθηκαν στο σιτηρέσιο χοίρων, το έντονο κόκκινο χρώμα που παρατηρήθηκε στο κρέας συσχετίστηκε με τη αντιοξειδωτική ικανότητα των στέμφυλων.

Σε πείραμα εκτροφής χοίρων στους οποίους χορηγήθηκε σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με στέμφυλα παρατηρήθηκε στο κρέας τους μείωση κορεσμένων λιπαρών οξέων όπως παλμιτικό, στεατικό και αραχιδονικό οξύ και αύξηση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το λινολεϊκό οξύ (Sayago-Ayedi *et al.*, 2009). Το ενδιαφέρον των ερευνητών για τις πολυφαινόλες των στέμφυλων, προέρχεται από το γεγονός ότι έχουν αφ' ενός μεν, ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, δηλαδή έχουν την ιδιότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες που παράγονται μέσα στον ζωικό οργανισμό κατά τον μεταβολισμό των λιπιδίων, αφετέρου δε, προσφέροντας ένα ατομικό υδρογόνο, να γαλακτοματοποιούν τα ιόντα μετάλλων, όπως του σιδήρου (Rodrigo *et al.*, 2011). Όμως υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες για τον βαθμό πεπτικότητας εντός του οργανισμού και την βιοδιάσπαση των πολυφαινολών του σταφυλιού. Τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την απορρόφηση και τον μεταβολισμό των πολυφαινολών, δείχνουν αμελητέα βιοδιαθεσιμότητα των πολυμερών.

Το κρέας των εδώδιμων χερσαίων γαστερόποδων (σαλιγκάρια) είναι μία σημαντική διατροφική πρόταση για τους καταναλωτές καθώς είναι μία θρεπτική τροφή με ιδιαίτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά. Η χρήση των στέμφυλων στη διατροφή ζώων και στη συντήρηση των κρεάτων και προϊόντων κρέατος αποδεικνύεται σημαντική. Αντιθέτως, δεν έχει μελετηθεί ακόμη η επίδραση της χρήσης των στέμφυλων στην ποιότητα του κρέατος των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών. Η χρήση των στέμφυλων οινοποιίας στη σαλιγκαροτροφία θα μπορούσε να δώσει μία νέα διάσταση στον κλάδο και να οδηγήσει στην παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας με θετικό πρόσημο για την οικονομία.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Το άλευρο στέμφυλων που παρασκευάστηκε για τις ανάγκες της παρούσας έρευνας από συγκεκριμένη ποικιλία στέμφυλων οινοποίησης ενσωματώθηκε επιτυχώς σε εμπορική σαλιγκαροτροφή.
- Με βάση τον αρχικό σχεδιασμό, η περιεκτικότητα πολυφαινολών (mg γαλλικού οξέος ανά kg δείγματος) στα σιτηρέσια ήταν διαφορετική (37,3, 289,5 και 629 mg GAE/kg για το M, το Σ1 και το Σ2, αντίστοιχα) και ανάλογη της προσθήκης αλεύρου στέμφυλων σε αυτά.
- Τα σαλιγκάρια *Helix aspersa maxima* (σε διχτυοκήπιο πάχυνσης στο Ν. Μαγνησίας) έφτασαν σε εμπορεύσιμο μέγεθος σε χρονικό διάστημα δύο μηνών (Αύγουστος – Οκτώβριος 2017), δεκαπλασιάζοντας το αρχικό τους βάρος.
- Δεν επηρεάστηκαν ο ρυθμός αύξησης των σαλιγκαριών και η κατανάλωση τροφής από την επιλογή του σιτηρεσίου.
- Επηρεάστηκε ο ρυθμός αύξησης των σαλιγκαριών από τη θέση του κλωβού καθώς οι μικροκλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία και σχετική υγρασία) ήταν διαφορετικές.
- Η θρεπτική σύσταση των σιτηρεσίων (εκτός της πρωτεΐνης) και η θρεπτική σύσταση του μυϊκού ιστού των σαλιγκαριών των διατροφικών ομάδων ήταν όμοια (και στην πρωτεΐνη) αποδεικνύοντας η θετική επίδραση του αλεύρου στέμφυλων στη διατροφή των σαλιγκαριών.
- Στη κεφαλοποδική μάζα (μυϊκός ιστός – φιλέτο) των σαλιγκαριών υπήρξε διαφοροποίηση στην περιεκτικότητα των πολυφαινολών παρά μόνο για εκείνα που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο με προσθήκη αλεύρου στέμφυλων 14%.
- Εν κατακλείδι, από την παρούσα έρευνα προκύπτει πως μπορεί να συμπεριληφθεί άλευρο στέμφυλων σε ποσοστό μέχρι 14 % σε κοινό σιτηρέσιο

χωρίς να επηρεαστεί η επιβίωση, η αύξηση και η θρεπτική σύσταση των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών, και έχοντας θετική επίδραση στην χημική σύσταση της εδώδιμης σάρκας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1990). Official Methods of Analysis. AOAC, Arlington, USA, pp 684.
- Alonso A.M., Guillé D.A., Barroso C.G., Puertas B., García A. (2002). Determination of antioxidant activity of wine-byproducts and its correlation with polyphenolic content. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5832–5836.
- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S.J., Das D.K., Ray S.D., Kuszynski C.A., Joshi S.S., Pruess H.G. (2000), Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology.* 148:187-197.
- Bahrami Y., Foroozandeh A.D, Zamani F., Modarresi M., Saeid S.E, Saeid C.A (2010). Effect of diet with varying levels of dried grape pomace on dry matter digestibility and growth performance of male lambs. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 2010. Vol. 6, Issue 1: 605- 610.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products. Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chem.*, 99, p. 191-203.
- Bertol T.M., Ludke J.V., Lemes de Campos R.M., Kawski V.L., Cunha Junior A. and Pereira de Figueiredo E.A. (2017). Inclusion of grape pomace in the diet of pigs on pork quality and oxidative stability of omega-3 enriched fat. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.47: 04, e20150358.
- Brenes A., Viveros A., Goñi I., Centeno C., Sáyago-Ayerdy S.G., Arija I. and Saura-Calixto F. (2008): Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. *Poultry Science* 87: 307-316.
- Brenes A., Viveros A., Goñi I., *et al.* (2010). Effect of grape seed extract on growth performance, protein and polyphenol digestibilities, and antioxidant activity in chickens. *Span. J. Agric. Res.* 8: p. 326–333.
- Brenes A., Viveros A., Chamorro S., Arija I. (2015). Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Anim. Feed Science and Technology*, 211, 1-17.
- Bonnemain B. (2005). Helix and drugs: snails for health care from Antiquity to these days. *Rev Hist Pharm*, (Paris), Vol 51(No 338), 211-218.
- Bonnet J.C., Aupinel P., Vrillon J.L. (1990). L'escargot *Helix aspersa*, biologie-élevage. Paris: INRA Editions.
- Carpenter R., O'Grady M.N., O'Callaghan Y.C., O'Brien N.M. and Kerry J.P. (2007). Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Sci.* 76: 604.

- Conzales-Paranas A., Esteban-Ruano S., Santo-Buelga C., *et al.* (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery products. *J. Agric. Food Chem.* 52, p. 234-239.
- De Beer D., Joubert E., Gelderblom W.C., Manley M. (2003). Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *J Agric Food Chem.* 51:902- 909.
- Delaney K., Gelperin A. (1986). Post – ingestive food –aversion learning to amino and deficient diets by the terrestrial slug *Limax maximus*. *Journal Comparative Physiology* 159:281-295.
- Dimou C. & Koutelidakis A. (2016). Grape Pomace: A Challenging Renewable Resource of Bioactive Phenolic Compounds with Diversified Health Benefits. *MOJ Food process Technol* 2016, 3(1): 00065.
- FAO (2001). FAO Statistical Data-base, <http://www.fao.org/faostat/en/#data>.
- FAO (2012). FAO Statistical Data-base, <http://www.fao.org/faostat/en/#data>.
- Gai F., Ortoffi M., Giancotti V., Medana C. and Peiretti P.G. (2014). Effect of Red Grape Pomace Extract on the Shelf Life of Refrigerated Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Minced Muscle. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24:468–480.
- Garcia-Lomillo J. & Gonzalez-San Jose M. (2016). Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Vol.16.
- Georgiev V., Ananga A., Tsoleva V. (2014). Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients* 6, 391–415.
- Goni I., Brenes A., Centeno C., Viveros A., Saura-Calixto F., Rebole A., Arija I. and Estevez R. (2007). Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poultry Science*, v.86, n.3, p.508-516.
- Landrault N., Poucheret P., Ravel P., Gasc F., Cros G., Teissedre P.L. (2001), Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J Agric Food Chem.* 49:3341-3348.
- Lavelli V., Torri L., Zeppa G., Fiori L. and Spigno G. (2016). Recovery of winemaking by-products for innovative food applications. *Ital. J. Food Sci.*, vol 28, 542-564.
- Mielnik M.B., Olsen E., Vogt G., *et al.* (2006). Grape seeds extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT-Food Sci. Tehnol.*, 39, p. 191-198.
- Milinsk M.C., Pandre R., Hayashi C., Souza N., Matsushita M. (2003). Influence of diets enriched with different vegetable oils on the fatty acid profiles of snail *Helix aspersa maxima*. *Food Chemistry*, 82:553-558

- Moate P. J., S. R. O. Williams, V. A. Torok, M. C. Hannah, B. E. Ribaux M. H. Tavendale R. J. Eckard J. L. Jacobs M. J. Auldish and W. J. Wales (2014). Grape marc reduces methane emissions when fed to dairy cows. *Dairy Sci.* 97:5073–5087.
- Murthy K.N.C., Singh R.P., Jayaprakasha G.K. (2002). Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *J Agric Food Chem.* 50:5909-5914.
- Nicodemus N., García J., Carabano R., De Blas J.C. (2007). Effect of substitution of a soybean hull and grape seed meal mixture for traditional fiber sources on digestion and performance of growing rabbits and lactating does. *J. Anim. Sci.* 85, 181–187.
- Pazos M., Gallardo J. M., Torres J. L., and Medina I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chem.* 92: 547–557.
- Perumalla A., Hettiarachchy N. (2011). Green tea and grape seed extracts Potential applications in food safety and quality. Review Article. *Food Res.Int.*, V.44, p. 827-839.
- Piccioni M. (1965). *Dictionnaire des aliments pour les animaux.* Bologna.
- Pinelo M., Arnous A., Meyer A. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 579-590
- Ragni M., Vicenti A., Melodia L., Marsico G. (2013). Use of Grape Seed Flour in Feed for Lambs and Effects on Performance and Meat Quality. *APCBEE Procedia* 8, 59 – 64.
- Ryu K., Shim K.S. and Shin D. (2014). Effect of Grape Pomace Powder Addition on TBARS and Color of Cooked Pork Sausages during Storage. *Korean J. Food Sci. An.* Vol. 34, No. 2, pp. 200~206.
- Rodrigo R., Miranda A. Vergara L. (2011). Modulation of endogenous system by wine polyphenols in human disease. *Cl. Chim. Acta.* V.412. p. 410-424.
- Sayago-Ayerdi S., Brenes A., Goni I. (2009). Antioxidative effect of dietary grape pomace concentrate on lipid oxidation of chilled and long-term frozen stored chicken patties. *Meat Sci.* 83, p. 528-533.
- Sebranek J., Bacus J. (2007). Natural and organic cured meat products: Regulatory manufacturing, marketing, quality and safety issues. American Meat Science Association White Paper Series 1, Available from: http://www.meat-science.org/pubs/White%20Papers/wp_001_2007_Natural_Organic_Cured_Meat.pdf (retrieved 24.03.09).
- Selani M.M., Contreras-Castillo C.J., Shirahigue L.D., Gallo C.R., Plata-Oviedo M. and Montes-Villanueva N.D. (2011). Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat Sci.* 88: 397.

- Shi J., Yu J., Pohorly E., *et al.* (2003). Polyphenolics in grape seeds – Biochemistry and functionality. *J. Med. Food.* 6, p. 291-299.
- Teissedre P.L., Landrault N. (2000). Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Res Int.* 33:461-467.
- Torres J.L., Varela B., García M.T., Carilla J., Matito C., Centelles J.J., Cascante M., Sort X., Bobet R. (2002). Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7548–7555.
- Tsoutsos D., Kakagia D., Tamparopoulos K. (2009). The efficacy of *Helix aspersa* Müller extract in the healing of partial thickness burns: A novel treatment for open burn management protocols. *J. Dermatol. Treat.* Vol 20, 219-222.
- Viveros A., Chamorro S., Pizarro M., Arija I., Centeno C., Brenes A. (2011). Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poult. Sci.* 90, 566–578.
- Xia E., Deng Q., Guo G., *et al.* (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *Review. Intern. J. Molec. Sci.*, 11, p.622-646.
- Yilmaz Y., Toledo R.T.I. (2004). Major flavonoids in grape sees and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *J. Agri. Food Chem.*, 52, p. 255-260.
- Zhao J, Wang J, Chen Y, Agarwal R. (1999). Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis.* 20:1737-1745.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Καλαισάκης Π. (1975). Βρωματολογία, Αθήνα. Εκδόσεις Σταμούλη, σελ. 308.
- Σαββαΐδης Ι., Ακρίδα Κ., Δεμερτζής Π., Ρηγανάκος Κ. (2014). «Προχωρημένα Μαθήματα Επεξεργασίας και Συντήρησης Τροφίμων. Αλκοολούχα αποστάγματα». Έκδοση: 1.0. Ιωάννινα. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1072>.
- Σπαής Α. Β., Φλώρου-Πανέρη Π., Χρηστάκη Ε. (2002). Ζωοτροφές και σιτηρέσια», Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη, ISBN: 978-960-357-055-9, σελ. 364.
- Χατζιωάννου Μ. (2015). Ασφάλεια και Προστασία σαλγκαροτροφικών εκμεταλλεύσεων. [Book Chapter]. In Chatziioannou, M., Staikou, A. 2015. Biology and Snail Farming. [ebook] Athens:Hellenic Academic Libraries Link. Chapter 10, 155-173. Available Online at: <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/5869>

ABSTRACT

In the last years, there is a wide interest in the use of natural antioxidants in the diets of farmed animals and their addition to meat and their products. Winery byproducts (grape marc) are widely spread throughout the Mediterranean countries and can be a source of them.

A dietary experiment took place for 60 days in a net-covered greenhouse of a snail farm in Central Greece with the purpose of obtaining data on adding grape marc flour to the feeds of farmed snails, the effect on the production performance of snails and the quality of their meat. A total number of 270 snails were divided into 9 experimental treatments (3 feeds, 3 different climatic conditions), placed in climatologically controlled boxes and were fed for every two days. Parameters of weight change every 15 days, total gained weight and feed consumption / day / snail were evaluated. In addition, an estimation of the polyphenol content was conducted in the muscle tissue of the snails and the feeds that were fed.

The results of the present study showed that no differences in the nutrient constituents (excluding proteins) of the feeds and the nutritional content of the muscle tissue of the fed snails were found. The estimation of the average final weight, showed that all snails from the experimental treatments reached their commercial size after the two month experiment, as by the end of it they had reached almost ten times their original body weight. The average gained weight in snails was not affected by the selection of the feed, but by the position of the box. From the analysis of polyphenols (average content expressed in mg of gallic acid per kg of sample) resulted for the feeds there was a differentiation among them depending on the addition of grape marc flour, while for the muscular tissues of snails there was differentiation only for those fed with the S2 feed (control feed with the addition of

14% grape marc flour) compared to those fed with the other two feeds (M = control feed and S1 = control with the addition of 7% grape marc flour). The color of the muscle tissue was not affected.

In conclusion, the results from the present study proved that grape marc flour up to 14% may be included in a common snail feed without affecting the survival, the growth of the snails and the quality of their edible muscle tissue, but having a positive effect on the chemical composition of the muscle tissue.

Key-words: *Nutrition, grape marc, polyphenols, gained weight, muscle tissue composition*