ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως & Διατροφής

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΡΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ

Γ. Παπαδομιχελάκης, Επίκ. Καθηγητής

Αθήνα 2013

Πρόλογος

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο_____Εισαγωγή 5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο_____ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΤΑΚΤΙΚΗ WEENDE 9
2.1. Βασική αρχή της αναλυτικής τακτικής Weende 9
2.2. Προσδιορισμός υγρασίας 10
2.2.1. Αρχή προσδιορισμού 10
2.2.2. Πεδίο εφαρμογής 10
2.2.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός 11
2.2.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)* 11
2.2.5. Διαδικασία προσδιορισμού 11
2.2.6. Υπολογισμοί 12
2.2.7. Διασφάλιση ποιότητας αποτελεσμάτων 12
2.2.8. Παρατηρήσεις – Παραλλαγές διαδικασίας 13
2.3. Προσδιορισμός ολικής τέφρας (Τ) 16
2.3.1. Αρχή προσδιορισμού 16
2.3.2. Πεδίο εφαρμογής 16
2.3.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός 16
2.3.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)* 17
2.3.5. Διαδικασία προσδιορισμού 17
2.3.6. Υπολογισμοί 17
2.3.7. Διασφάλιση ποιότητας αποτελεσμάτων 18
2.3.8. Παρατηρήσεις – Παραλλαγές διαδικασίας 18
2.4. Προσδιορισμός ολικών αζωτούχων ουσιών (ΟΑΟ) 19
2.4.1. Αρχή προσδιορισμού 19
2.4.2. Πεδίο εφαρμογής 20
2.4.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός 20
2.4.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)* 20
2.4.5. Διαδικασία προσδιορισμού 20
2.4.6. Υπολογισμοί 21
2.4.7. Διασφάλιση ποιότητας αποτελεσμάτων 22
2.4.8. Παρατηρήσεις – Παραλλαγές διαδικασίας 22
2.5. Προσδιορισμός ολικών λιπαρών ουσιών (ΟΛΟ) 24
2.5.1. Αρχή προσδιορισμού 24
2.5.2. Πεδίο εφαρμογής 24
2.5.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός 24
2.5.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)* 25
2.5.5. Διαδικασία προσδιορισμού 25

2.5.6. Υπολογισμοί 27
2.5.7. Διασφάλιση ποιότητας αποτελεσμάτων 27
2.5.8. Παρατηρήσεις – Παραλλαγές διαδικασίας 27
2.6. Προσδιορισμός ινωδών ουσιών (ΙΟ) 29
2.6.1. Αρχή προσδιορισμού 29
2.6.2. Πεδίο εφαρμογής 29
2.6.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός 29
2.6.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)* 30
2.6.5. Διαδικασία προσδιορισμού 30
2.6.6. Υπολογισμοί 31
2.6.7. Διασφάλιση ποιότητας αποτελεσμάτων 31
2.6.8. Παρατηρήσεις – Παραλλαγές διαδικασίας 32
2.7. Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα αναλυτικής τακτικής WEENDE 33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο_____ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΤΑΚΤΙΚΗ VAN SOEST 34
3.1. Γενικά 34
3.1.1. Τα συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων 34
3.1.2. Μέθοδοι προσδιορισμού των συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων 36
3.2. Διαδοχικός προσδιορισμός των κλασμάτων NDF, ADF και ADL 40
3.2.1. Αρχή προσδιορισμού 40
3.2.2. Πεδίο εφαρμογής 40
3.2.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός 40
3.2.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)* 41
3.2.5. Διαδικασία προσδιορισμού 41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο Εισαγωγή

Η **Βρωματολογία** ασχολείται με την κατάταξη και τη διαιτητική εκτίμηση των απλών ζωοτροφών, που χρησιμοποιούνται στην εφαρμοσμένη διατροφή των ζώων. Η ορθή διατροφή από φυσιολογικής, οικονομικής και φιλικής προς το περιβάλλον άποψης, καθορίζει κατά κύριο λόγο τη βέλτιστη παραγωγικότητα των ζώων. Προκειμένου να χορηγηθούν στα ζώα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την κάλυψη των αναγκών τους (συντήρηση, ανάπτυξη, κυοφορία και παραγωγή προϊόντων), τη διασφάλιση της υγείας τους, τη βελτίωση της ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος και την ελαχιστοποίηση των εκπομπών στο περιβάλλον, πρέπει να είναι γνωστή με ακρίβεια η διαιτητική αξία των χρησιμοποιούμενων ζωοτροφών. Οι περισσότερες ζωοτροφές, όπως οι χονδροειδείς, τα υποπροϊόντα των βιομηχανιών τροφίμων και παραγωγής βιοκαυσίμων χαρακτηρίζονται από ευρεία παραλλακτικότητα στη σύστασή τους, γεγονός που καθιστά απαραίτητες τις χημικές αναλύσεις. Καθώς οι ανάγκες των ζώων σε θρεπτικά συστατικά προκύπτουν από τυποποιημένες πειραματικές μεθόδους, είναι εξαιρετικά σημαντικό η περιεκτικότητα των ζωοτροφών σε θρεπτικά συστατικά να προκύπτει από ανάλογες πρότυπες μεθόδους χημικών αναλύσεων, ώστε να γίνεται κατάρτιση των πλέον ορθολογιστικών σιτηρεσίων για κάθε κατηγορία ή παραγωγικό στάδιο.

Τα θρεπτικά συστατικά που περιέχονται στις ζωοτροφές είναι πολυάριθμα (πίν. 1) και ο προσδιορισμός όλων, αν και εφικτός με ειδικές αναλυτικές τεχνικές, δεν κρίνεται πάντα σκόπιμος και αναγκαίος. Σε ερευνητικό επίπεδο απαιτείται πολλές φορές ο λεπτομερής προσδιορισμός πολλών θρεπτικών συστατικών ή και χημικών ενώσεων, ανάλογα με το στόχο που έχει τεθεί (π.χ. επίδραση κάποιων θρεπτικών συστατικών στην ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος). Η εκτίμηση όμως της θρεπτικής αξίας των ζωοτροφών, που χρησιμοποιείται πάντα κατά την κατάρτιση των σιτηρεσίων των παραγωγικών ζώων, επιδιώκεται να γίνει με τη διεξαγωγή περιορισμένου αριθμού χημικών αναλύσεων που αφορούν κυρίως σε κατηγορίες χημικών ενώσεων. Για το σκοπό αυτό έχουν επινοηθεί διάφορα συστήματα ανάλυσης των ζωοτροφών, εκ των οποίων θα περιγραφούν με λεπτομέρεια στο παρόν εγχειρίδιο τα δύο βασικότερα. Το **πρώτο** σύστημα επινοήθηκε από τους Henneberg και Stohmann το 1859 και καθιερώθηκε σαν αναλυτική τακτική **Weende**, από την ομώνυμη περιοχή της Γερμανίας όπου βρίσκεται το ερευνητικό ινστιτούτο. Μετά την καθιέρωση της τακτικής Weende, τα κυριότερα χημικά συστατικά των ζωοτροφών αναλύονται με εμπειρικές μεθόδους, όπως π.χ. η υγρασία, η ολική τέφρα, οι ολικές αζωτούχες, οι ολικές λιπαρές και οι ινώδεις ουσίες, ενώ το υπολειπόμενο κλάσμα των ελεύθερων αζώτου εκχυλισματικών ουσιών υπολογίζεται εκ διαφοράς. Το **δεύτερο** σύστημα, γνωστό σαν μέθοδος **Van Soest-Moore**, παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1963 και αφορούσε κυρίως στις χονδροειδείς ζωοτροφές και στον ακριβή χαρακτηρισμό της φύσης των κυτταρικών τους τοιχωμάτων. Μεταγενέστερα όμως (1991), η μέθοδος αυτή τροποποιήθηκε, καθιστώντας δυνατή την εφαρμογή της και σε πλήρη μείγματα απλών ζωοτροφών, αλλά και σε συμπυκνωμένες ζωοτροφές και παρέμεινε γνωστή σαν μέθοδος **Van Soest**. Σήμερα λοιπόν χρησιμοποιούνται, ή καλύτερα συνδυάζονται, δύο αναλυτικές τακτικές που αντιπροσωπεύουν διαφορετικές κατηγορίες χημικών ενώσεων (πίν. 1).

Πίνακας 1. *Προσδιοριζόμενες κατηγορίες χημικών ενώσεων με βάση τις αναλυτικές τακτικές* ***Weende*** *και* ***Van Soest*** *και τα επί μέρους συστατικά αυτών (τα επί μέρους συστατικά προσδιορίζονται με ειδικές αναλυτικές τεχνικές).*

Τακτική Weende	**Κατηγορίες χημικών ενώσεων**					**Τακτική Van Soest**	
Υγρασία (Υ)	Νερό						
Ολικές αζωτούχες ουσίες (ΟΑΟ)	Ξηρά ουσία (ΞΟ)	Οργανική ουσία (ΟΟ)	Πρωτεϊνικής φύσης		Απαραίτητα αμινοξέα *(Αργινίνη, Βαλίνη, Θρεονίνη, Ισολευκίνη, Ιστιδίνη, Λευκίνη, Λυσίνη, Μεθειονίνη, Κυστίνη, Τρυπτοφάνη, Φαινυλαλανίνη, Τυροσίνη)*	Ουσίες διαλυτές στο διάλυμα ουδέτερης αντίδρασης (NDS) της αναλυτικής τακτικής	
					Μη απαραίτητα αμινοξέα (Γλουταμινικό οξύ, αλανίνη, σερίνη, προλίνη κλπ.)		
			Μη πρωτεϊνικής φύσης *(ελεύθερα αμινοξέα, αμμωνιακά και νιτρικά άλατα, βεταΐνες, , ουρία, άλλες οργανικές αζωτούχες βάσεις κλπ.)*				
Ολικές λιπαρές ουσίες (ΟΛΟ)			Λιπίδια *(ουδέτερα λίπη, έλαια, ελεύθερα λιπαρά οξέα)*		Απαραίτητα λιπαρά οξέα *(Λινελαϊκό, Λινολενικό, Αραχιδονικό οξύ)*		
					Μη απαραίτητα λιπαρά οξέα *(Λοιπά κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα)*		
			Λιποδιαλυτές ουσίες *[βιταμίνες (A, D, E, K), χρωστικές, αιθέρια έλαια, κηροί, σύνθετα λιπίδια, μη σαπωνοποιήσιμη ουσία κλπ.]*				
Ελεύθερες αζώτου εχκυλισματικές ουσίες (ΕΝΕΟ)			Οργανικά οξέα (φουμαρικό, μηλικό, γαλακτικό οξύ κλπ.)				
			Υδατοδιαλυτές βιταμίνες (βιταμίνες του συμπλέγματος Β κ.ά.)				
			Αποθηκευτικοί πολυσακχαρίτες	Σάκχαρα *(μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες κλπ.)*			
				Άμυλο *[πολυμερής πολυσακχαρίτης σχηματιζόμενος από ευθείες (αμυλόζη) ή/και διακλαδισμένες (αμυλοπηκτίνη) αλυσίδες α-D-γλυκόζης]*			
			Δομικοί πολυσακχαρίτες	Πηκτίνες *(πολυσακχαρίτες από γαλακτουρονικά οξέα που είναι διακλαδισμένα με ουδέτερα σάκχαρα)*			
Ινώδεις ουσίες (ΙΟ)				Ημικυτταρίνες *(ευρεία ομάδα πολυσακχαριτών σχηματιζόμενων από μόρια β-D-γλυκόζης με μικρό βαθμό πολυμερισμού)*		Κλάσμα **ADF** *(Acid Detergent Fibre)*	Κλάσμα **NDF** *(Neutral Detergent Fibre)*
				Κυτταρίνη *(πολυμερές σχηματιζόμενο από ευθείες αλυσίδες β-D-γλυκόζης)*			
				Λιγνίνη *(μη πολυσακχαριδικό πολυμερές φαινολικών κυρίως οξέων)*			
				Δεσμευμένο άζωτο *(N που είναι δεσμευμένο στους δομικούς πολυσκχαρίτες)*			
Ολική τέφρα (Τ)		Ανόργανη ουσία	Αδιάλυτη τέφρα		Πυριτικά άλατα *(SiO_2 κλπ.)*		
			Διαλυτή τέφρα		Πλαστικά στοιχεία *(Ca, Mg, P, K, Na, Cl, S)*		
					Ιχνοστοιχεία *(Fe, Cu, Mn, Zn, Co, J, Se, Mo, F, Cr)*		
					Λοιπά στοιχεία *(Cu, Se, Mo, F, As, Pb, Cd, Ni, V, Si, As, Cd, Sn)*		

Εν συντομία, ο προσδιορισμός της υγρασίας (Υ) που ακολουθείται από αυτόν της ολικής τέφρας (Τ) στις ζωοτροφές, έχει ως αποτέλεσμα την εκτίμηση της οργανικής ουσίας (ΟΟ), η οποία περιέχει τα περισσότερα θρεπτικά συστατικά για τα ζώα. Η ολική τέφρα αποτελείται από την αδιάλυτη τέφρα, μη χρήσιμη για το ζώο και τη διαλυτή, που περιέχει όλα τα απαραίτητα μακροστοιχεία (πλαστικά) και μικροστοιχεία (ιχνοστοιχεία). Το ασβέστιο και ο φωσφόρος είναι δύο πολύ σημαντικά πλαστικά στοιχεία για την ανάπτυξη των οστών των ζώων, αλλά και για την παραγωγή γάλακτος και αυγών. Άλλα σημαντικά πλαστικά στοιχεία είναι το μαγνήσιο, το νάτριο και το κάλιο. Κάποια από τα ιχνοστοιχεία (σημαντικότερα των οποίων είναι ο σίδηρος, ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο, το κοβάλτιο, το ιώδιο και το σελήνιο) είναι απαραίτητα για τις ενζυμικές αντιδράσεις στο σώμα των ζώων και η βιοδιαθεσιμότητά τους παραλλάσει σημαντικά, ενώ άλλα ιχνοστοιχεία είναι πιθανώς απαραίτητα ή ακόμα και άνευ σημασίας για τα ζώα. Υπό ορισμένες δε συνθήκες, κάποια ιχνοστοιχεία (απαραίτητα ή μη) μπορούν να καταστούν τοξικά.

Οι ολικές αζωτούχες ουσίες προσδιορίζονται ως άζωτο και αντιπροσωπεύουν τόσο τις πραγματικές πρωτεΐνες (κυρίως αμινοξέα και πεπτίδια), όσο και τις μη πρωτεϊνικής φύσης (ΜΠΦΝ) αζωτούχες ουσίες (αμμωνία, ουρία, τα νιτρικά άλατα, αμίνες κλπ.). Οι πρώτες είναι τα άμεσα δομικά στοιχεία για το σχηματισμό των ζωικών πρωτεϊνών, ενώ οι ΜΠΦΝ μπορούν να αξιοποιηθούν για το σκοπό αυτό μόνο από τα μηρυκαστικά ζώα (παραγωγή μικροβιακής πρωτεΐνης από τα βακτήρια της μεγάλης κοιλίας).

Οι ολικές λιπαρές ουσίες (ΟΛΟ) περιέχουν κυρίως λιπαρά οξέα που παρέχουν ενέργεια, δομικά στοιχεία για το σχηματισμό του ζωικού λίπους και αποτελούν πηγή βιταμινών, ενώ μερικές φορές συμπεριλαμβάνουν και λιποδιαλυτές ουσίες (βιταμίνες, χρωστικές ουσίες, κηρούς κλπ.), περισσότερο ή λιγότερο ανάλογα με τη ζωοτροφή.

Το μεγαλύτερο κλάσμα στις περισσότερες ζωοτροφές αποτελούν οι υδατάνθρακες (πολυσακχαρίτες), οι οποίοι επίσης παρέχουν ενέργεια και παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλη διαφοροποίηση ως προς τη φύση τους. Μία γενική κατάταξη διακρίνει τους πολυσακχαρίτες ανάμεσα σε αποθηκευτικούς (μη δομικούς) και δομικούς. Οι αποθηκευτικοί (ή αποθησαυριστικοί) αποτελούν τη μορφή με την οποία τα φυτά αποθηκεύουν την ενέργεια που χρειάζονται στο κυτταρόπλασμά τους και περιλαμβάνουν σύνθετους πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο (αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη) στους δημητριακούς καρπούς ή οι ινουλίνες (γνωστές και ως φρουκτάνες ή φρουκτοζάνες) σε ρίζες, βολβούς, αλλά και απλά σάκχαρα. Οι δομικοί (ή ερειστικοί) αποτελούν μία πιο πολύπλοκη, ως προς τη σύστασή της, κλάση πολυσακχαριτών. Ένας πρώτος γενικός χαρακτηρισμός των δομικών πολυσακχαριτών μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας την τακτική Weende, με την οποία προσδιορίζονται οι ινώδεις ουσίες. Οι ινώδεις ουσίες αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη και λιγνίνη και μπορεί να περιλαμβάνουν μέρος των ημικυτταρινών (και σπανιότερα πηκτινών) που περιέχονται στις ζωοτροφές. Ένας δεύτερος, πιο αναλυτικός χαρακτηρισμός των δομικών πολυσακχαριτών επιτυγχάνεται με την τακτική Van Soest. Σύμφωνα με αυτή προσδιορίζονται τρία κλάσματα δομικών πολυσακχαριτών: α) το NDF που αντιπροσωπεύει το σύνολο των κυτταρικών τοιχωμάτων που είναι αδιάλυτα στο διάλυμα ουδέτερης αντίδρασης (NDS) της μεθόδου και περιλαμβάνει την κυτταρίνη, τις ημικυτταρίνες και τη λιγνίνη, β) το ADF που αντιπροσωπεύει το

σύνολο των κυτταρικών τοιχωμάτων που είναι αδιάλυτα στο διάλυμα όξινης αντίδρασης (ADS) της μεθόδου και περιλαμβάνει την κυτταρίνη και τη λιγνίνη, και γ) το ADL που περιλαμβάνει μόνο τη λιγνίνη. Στη συνέχεια, οι διαφορές NDF-ADF και ADF-ADL αποτελούν μέτρο εκτίμησης των ημικυτταρινών και της κυτταρίνης, αντίστοιχα. Η σημασία του διαχωρισμού αυτού με την τακτική Van Soest (γνωστή και ως κλασμάτωση ινωδών ουσιών) έγκειται στη διαφορετική αξιοποίηση των κλασμάτων των πολυσακχαριτών από τα ζώα. Οι ημικυτταρίνες και η κυτταρίνη πέπτονται σε ικανοποιητικό βαθμό από τα μηρυκαστικά, αλλά είναι σχεδόν άπεπτες για τα περισσότερα μονογαστρικά ζώα, ενώ η λιγνίνη είναι παντελώς άπεπτη για όλα τα είδη ζώων. Οι δε πηκτίνες πέπτονται σε μεγάλο βαθμό, αλλά δεν εκτιμώνται με καμία από τις δύο τακτικές και απαιτείται ως εκ τούτου ειδική αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό τους. Επιπλέον, το ADF κλάσμα (που έχει επικρατήσει ως το «άπεπτο» κλάσμα των ζωοτροφών) μπορεί να περιέχει σημαντικές ποσότητες αζώτου (αποτέλεσμα της μετουσίωσης πρωτεϊνών με αντιδράσεις Maillard), υποβιβάζοντας την απορρόφησή του και την αζωτούχο θρέψη των ζώων. Συνεπώς ο αναλυτικός προσδιορισμός των παραπάνω κλασμάτων των δομικών πολυσακχαριτών, δίνει πολύτιμες πληροφορίες για το βαθμό αξιοποίησης, άρα τη θρεπτική αξία, των διαφόρων ζωοτροφών.

Οι βασικές αρχές των αναλυτικών συστημάτων Weende και Van Soest, καθώς και οι τεχνικές προσδιορισμού των κατηγοριών χημικών ενώσεων, που κάθε ένα περιλαμβάνει θα περιγραφούν αναλυτικά στη συνέχεια. Η περιγραφή είναι προσαρμοσμένη στις πλέον σύγχρονες αναλυτικές συσκευές που υπάρχουν επί του παρόντος, στα περισσότερα ερευνητικά κέντρα. Οι εξειδικευμένες τεχνικές προσδιορισμού των επί μέρους θρεπτικών συστατικών, που περιέχονται στις κατηγορίες των χημικών ενώσεων, είναι όπως προαναφέρθηκε πολυάριθμες και στην πλειοψηφία τους ξεφεύγουν από τον σκοπό του παρόντος εγχειριδίου. Κάποιες όμως από αυτές κρίνονται αναγκαίες και εξαιρετικής σημασίας και θα παρουσιαστούν λεπτομερώς σε ιδιαίτερο κεφάλαιο.

Βασική προϋπόθεση για την ορθή διεξαγωγή των χημικών αναλύσεων της τακτικής Weende, αποτελεί η ενδεδειγμένη δειγματοληψία (λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος, οι αρχές της οποίας δεν αναλύονται εδώ) και η κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος. Η προετοιμασία του δείγματος αποσκοπεί α) στην επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής ομοιογένειας, ώστε να εξασφαλίζεται η επαναληψιμότητα των μετρήσεων, στοιχείο που είναι ιδιαίτερα σημαντικό λόγω του ότι οι περισσότερες αναλύσεις απαιτούν μικρές ποσότητες δείγματος και β) στην έκθεση της μεγαλύτερης δυνατής επιφάνειας του δείγματος, καταστρέφοντας ουσιαστικά τη δομή του, στα χρησιμοποιούμενα χημικά αντιδραστήρια και τις εφαρμοζόμενες συνθήκες, ανάλογα με την φύση της ανάλυσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικοί εργαστηριακοί μύλοι άλεσης των ζωοτροφών, με τους οποίους το δείγμα λαμβάνει λεπτή αλευρώδη υφή, πολύ υψηλής ομοιογένειας.

2.1. Βασική αρχή της αναλυτικής τακτικής Weende

Με την αναλυτική τακτική Weende προσδιορίζεται η υγρασία και πέντε κατηγορίες χημικών ενώσεων σε κάθε ζωοτροφή (πίν. 1). Από το κατάλληλα προετοιμασμένο δείγμα της κάθε ζωοτροφής ζυγίζονται πέντε διαφορετικά δείγματα (Δ1-Δ5) εις διπλούν. Στο Δ1 προσδιορίζεται η υγρασία (Υ) και συνεπώς η ξηρά ουσία (ΞΟ), ενώ κατά σειρά στα υπόλοιπα η τέφρα (Τ) και κατ' επέκταση η οργανική ουσία (ΟΟ), οι ολικές αζωτούχες ουσίες (ΟΑΟ), οι ολικές λιπαρές ουσίες (ΟΛΟ) και οι ινώδεις ουσίες (ΙΟ). Η πέμπτη κατηγορία χημικών ενώσεων, οι ελεύθερες αζώτου εκχυλισματικές ουσίες (ΕΝΕΟ), προσδιορίζονται έμμεσα από τη διαφορά ΞΟ-(Τ+ΟΑΟ+ΟΛΟ+ΙΟ) ή από τη διαφορά ΟΟ-(ΟΑΟ+ΟΛΟ+ΙΟ).

Οι αρχές και οι τεχνικές διεξαγωγής των προσδιορισμών των κατηγοριών των χημικών ενώσεων περιγράφεται στα ακόλουθα κεφάλαια. Ταυτόχρονα θα δίνονται τα αναγκαία για τους υπολογισμούς στοιχεία, κατά περίπτωση ζωοτροφής και ανάλογα με την ανάλυση. Τα βασικά όργανα, συσκευές, σκεύη και ο γενικότερος εργαστηριακός εξοπλισμός καθώς και τα απαιτούμενα αντιδραστήρια για την πραγματοποίηση των προσδιορισμών, δίνονται κατά περίπτωση ανάλυσης.

2.2. Προσδιορισμός υγρασίας

Ο προσδιορισμός της υγρασίας και κατ' επέκταση της συμπληρωματικής (στα εκατό της ζωοτροφής) ξηράς ουσίας, αν και αποτελεί μία από τις απλούστερες αναλύσεις των ζωοτροφών, εντούτοις είναι εξαιρετικής σημασίας και πραγματοποιείται πριν από κάθε άλλη ανάλυση. Η σημασία του προσδιορισμού της ΞΟ έγκειται στο ότι:

α) στην ΞΟ περιέχονται όλα τα θρεπτικά συστατικά των ζωοτροφών που μας ενδιαφέρουν (αζωτούχες, λιπαρές και ελεύθερες αζώτου εκχυλισματικές ουσίες, ανόργανα στοιχεία κλπ.). Άρα υψηλή τιμή ΞΟ (συνεπώς χαμηλή υγρασία) σε μία ζωοτροφή, συνεπάγεται κατά κανόνα υψηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά και υψηλή θρεπτική αξία, σε σύγκριση με μία όμοια ζωοτροφή χαμηλότερης ΞΟ. Πέραν της θρεπτικής αξίας, το γεγονός αυτό έχει και οικονομικές προεκτάσεις. Έστω δύο όμοιες ζωοτροφές Α και Β (π.χ. δύο διαφορετικές παρτίδες καρπού αραβοσίτου) που έχουν την ίδια τιμή αγοράς στο εμπόριο. Έστω ότι η Α έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία και άρα υψηλότερη ΞΟ από την αντίστοιχη Β. Αυτό αμέσως σημαίνει ότι η αγορά της Α είναι οικονομικά συμφέρουσα, διότι απλά στην ίδια τιμή αγοράζονται περισσότερα θρεπτικά συστατικά και ενέργεια.

β) χαμηλές τιμές ΞΟ σημαίνουν υψηλή περιεκτικότητα μίας ζωοτροφής σε υγρασία, γεγονός που υπό συνθήκες συνεπάγεται δυσκολίες στην αποθήκευσή τους (ευρωτιάσεις κλπ.), ιδιαίτερα για κάποιες κατηγορίες ζωοτροφών όπως είναι οι δημητριακοί καρποί.

γ) η ΞΟ αποτελεί μέτρο σύγκρισης μεταξύ ζωοτροφών της ίδιας κατηγορίας, ως προς την περιεκτικότητά τους σε θρεπτικά συστατικά. Για το λόγο αυτό, τα αποτελέσματα των υπολοίπων χημικών αναλύσεων εκφράζονται κατά κανόνα ως επί % της ΞΟ της ζωοτροφής (όχι ως επί % της νωπής).

2.2.1. Αρχή προσδιορισμού

Ο προσδιορισμός της υγρασίας στηρίζεται στην αρχή της ξήρανσης του δείγματος της ζωοτροφής, σε θερμοκρασία 103°C και ατμοσφαιρική πίεση περιβάλλοντος (1 Atm), μέχρι σταθερού βάρους. Η απώλεια του βάρους εκφράζει την περιεκτικότητα σε υγρασία και αντίστροφα, το βάρος που απομένει εκφράζει την περιεκτικότητα σε ΞΟ.

2.2.2. Πεδίο εφαρμογής

Η αρχή αυτή βρίσκει εφαρμογή σε απλές, σύνθετες ζωοτροφές και σε χονδροειδείς ή άλλες ζωοτροφές που έχουν ξηρανθεί μερικώς (και έχουν περίπου 85 % ΞΟ) με χαμηλή περιεκτικότητα σε άλλες πτητικές ουσίες ή σε σάκχαρα. Σε περιπτώσεις:

α) ζωοτροφών που περιέχουν πτητικές ενώσεις (π.χ. πτητικά λιπαρά οξέα, πτητικές βάσεις) ή ουσίες (π.χ. σάκχαρα), που διασπώνται σε θερμοκρασία 103°C

ή

β) ζωοτροφών που δεν αφήνουν το νερό να εξατμιστεί εύκολα στους 103°C (π.χ. κρυσταλλικό νερό ανόργανων αλάτων)

εφαρμόζονται άλλες μέθοδοι ή παραλλαγές της μεθόδου προσδιορισμού της ΞΟ. Αυτό γιατί στην περίπτωση **α** υπολογίζονται σαν υγρασία όλα τα πτητικά συστατικά και οι διασπώμενες ουσίες, με αποτέλεσμα η υγρασία να εμφανίζεται πλασματικά υψηλότερη και η ΞΟ μικρότερη της πραγματικής (το δε σφάλμα του προσδιορισμού είναι ανάλογο της παρουσίας αυτών των ενώσεων στη ζωοτροφή) και στην περίπτωση **β** προσδιορίζονται πλασματικά υψηλότερες τιμές ΞΟ λόγω αδυναμίας απομάκρυνσης του νερού.

2.2.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός που απαιτείται για τον προσδιορισμό της υγρασίας περιλαμβάνει:

- Εργαστηριακούς μύλους άλεσης ζωοτροφών (εικόνα 1, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό ζυγό ακρίβειας 0,1 mg (εικόνα 2, Παράρτημα Α)
- Γυάλινα (πυρίμαχα) φιαλίδια ζυγίσεως με κάλυμμα. Εμβαδόν βάσης 3 cm^2/g τροφής (εικόνα 3, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό κλίβανο ξήρανσης ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (50-150°C) με θερμοστάτη ακρίβειας τουλάχιστον ±5°C (εικόνα 4, Παράρτημα Α)
- Ξηραντήρα με πλάκα πορσελάνης, κάτω από την οποία τοποθετείται ξηραντικό μέσο ($CaCl_2$ ή gel σιλικόνης) (εικόνα 5, Παράρτημα Α)
- Λαβίδες μεταφοράς (εικόνα 6, Παράρτημα Α)

Πέραν αυτού του εξοπλισμού, για τις περιπτώσεις που αναφέρονται στο 2.2.8 θα απαιτηθούν επιπλέον:

- Ανοξείδωτα σκαφίδια (30×15×5 cm) ζυγίσεως (εικόνα 7, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακός ζυγός ακρίβειας 10 mg και ικανότητας ζύγισης μεγάλου βάρους (>500 g)
- Εργαστηριακός κλίβανος ξήρανσης κενού (τουλάχιστον 100 Torrs), ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας με θερμοστάτη ακρίβειας τουλάχιστον ±2°C (εικόνα 8, Παράρτημα Α)
- Ειδική συσκευή απόσταξης και συλλογής νερού από τις ζωοτροφές (εικόνα 9, Παράρτημα Α)
- Κωνικές φιάλες (φιάλες Erlenmeyer) των 100 ml (εικόνα 10, Παράρτημα Α)

2.2.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)*

Δεν χρησιμοποιούνται χημικά αντιδραστήρια κατά τον προσδιορισμό της υγρασίας, με εξαίρεση τα όσα αναφέρονται στο 2.2.8, όπου απαιτούνται:

- Τολουόλη καθαρή για ανάλυση (p.a.)
- Απόλυτη αιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη) καθαρότητας 95-97%
- Διάλυμα 0,1N NaOH (4,0 g 99,9% NaOH σε 1000 ml απεσταγμένο H_20/20°C)
- Δείκτης φαινολοφθαλεΐνης

2.2.5. Διαδικασία προσδιορισμού

- Τα γυάλινα φιαλίδια με τα καλύμματά τους πλένονται, καθαρίζονται και ξεπλένονται με απιονισμένο νερό επιμελώς, και ξηραίνονται στον κλίβανο στους 103°C για 2 τουλάχιστον ώρες.

- Μεταφέρονται στον ξηραντήρα με τα καλύμματα κλειστά και ψύχονται μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Δεν επιτρέπεται η παραμονή τους στον ξηραντήρα για διάστημα μεγαλύτερο των 3 ωρών.
- Ζυγίζονται καλυμμένα (W0) με ακρίβεια 0,1 mg, μεταφέροντας ένα κάθε φορά από τον ξηραντήρα και διατηρώντας κλειστό τον ξηραντήρα μεταξύ των φιαλιδίων. Η μεταφορά πρέπει να γίνεται με λαβίδες (όχι με γυμνά χέρια διότι αφενός υπάρχει κίνδυνος εγκαυμάτων κατά τη μεταφορά των φιαλιδίων από τον κλίβανο, αφετέρου αφήνουν υγρασία στα φιαλίδια).
- Προστίθενται περίπου 3 g του κατάλληλα προετοιμασμένου δείγματος σε κάθε φιαλίδιο. Καταγράφεται το μεικτό βάρος φιαλιδίου και δείγματος (W1) με ακρίβεια 0,1 mg. Το φιαλίδιο ανακινείται για να απλωθεί το δείγμα στον πυθμένα και να εκτεθεί η μεγαλύτερη δυνατή επιφάνεια για ξήρανση.
- Τα φιαλίδια τοποθετούνται (με το κάλυμμα δίπλα και όχι πάνω) σε κλίβανο προθερμασμένο στους 103±2°C και ξηραίνονται μέχρι σταθερού βάρους (8 ώρες είναι αρκετές).
- Στη συνέχεια μεταφέρονται στον ξηραντήρα, κλείνονται με το κάλυμμά τους και ψύχονται μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Δεν επιτρέπεται η παραμονή τους στον ξηραντήρα για διάστημα μεγαλύτερο των 3 ωρών.
- Ζυγίζεται το μικτό βάρος φιαλιδίου και ξηρού δείγματος (W2) με ακρίβεια 0,1 mg.

2.2.6. Υπολογισμοί

Η ΞΟ ως επί % του δείγματος υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\Xi O\ (\%) = \frac{(W2 - W0) \times 100}{W1 - W0}$$

Όπου:

W0= βάρος κενού φιαλιδίου με το κάλυμμα (g)
W1= μικτό βάρος φιαλιδίου και δείγματος (g) και
W2= μικτό βάρος φιαλιδίου και δείγματος μετά την ξήρανση (g)

Η % υγρασία του δείγματος υπολογίζεται ως: Υ(%)= 100 – (ΞΟ%)

2.2.7. Διασφάλιση ποιότητας αποτελεσμάτων

- Ο προσδιορισμός της υγρασίας στηρίζεται σε σταθμική μέθοδο (δηλαδή στην καταγραφή βάρους των δειγμάτων και των χρησιμοποιούμενων υλικών). Κατά συνέπεια η ποιότητα των αποτελεσμάτων εξαρτάται από την ακρίβεια των ζυγών, η οποία πρέπει να ελέγχεται περιοδικά. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση πρότυπων βαρών. Οι σύγχρονοι αναλυτικοί ζυγοί ακριβείας φέρουν πρότυπα βάρη στο εσωτερικό τους για βαθμονόμηση. Επιπλέον, λόγω της ευαισθησίας τους οι ζυγοί πρέπει να είναι τοποθετημένοι σε σταθερά σημεία, μακριά από ρεύματα αέρα και να μη μετακινούνται χωρίς σοβαρό λόγο.
- Σε κάθε παρτίδα δειγμάτων συνιστάται η ανάλυση ενός δείγματος ελέγχου (ΔΕ). Το δείγμα αυτό μπορεί να παρασκευαστεί από κάποια ζωοτροφή παρόμοιας φύσης με αυτές θα αναλυθούν στο εργαστήριο. Λαμβάνονται 3-4 kg του επιλεχθέντος ΔΕ, αλέθονται (κόσκινο διαμέτρου 1 mm,

όπως και τα προς ανάλυση δείγματα) και φυλάσσονται σε δροσερό και ξηρό μέρος. Το ΔΕ αναλύεται 15-20 φορές όπως περιγράφει η διαδικασία της μεθόδου. Υπολογίζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και οριοθετείται ένα 2% ως μέγιστη επιτρεπτή απόκλιση από το μέσο όρο.

- Ο προσδιορισμός της υγρασίας πρέπει να εκτελείται σε δύο παράλληλα δείγματα, αμέσως μετά το άνοιγμα της συσκευασίας της κάθε ζωοτροφής. Η διαφορά μεταξύ των δύο παράλληλων προσδιορισμών της ΞΟ στο ίδιο δείγμα ζωοτροφής, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,2% σε απόλυτη τιμή ΞΟ (%ΞΟα - %ΞΟβ≤0,2%). Αν αυτό συμβεί (δηλ. %ΞΟα - %ΞΟβ>0,2%), πρέπει να επαναληφθεί η ανάλυση.

2.2.8. Παρατηρήσεις – Παραλλαγές διαδικασίας

2.2.8.1. Προσδιορισμός ΞΟ σε ζωοτροφές που απαιτούν προξήρανση

Ζωοτροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία (διάφορα είδη χλωρής φυτικής ύλης και καρποί ή υποπροϊόντα με υγρασία πάνω από 20%) παρουσιάζουν δυσκολία στην άλεση (συνεπώς στη δημιουργία ομοιογενούς δείγματος) και για το λόγο αυτό πρέπει να προξηραίνονται.

Ζυγίζεται μία ποσότητα περίπου 50 g (με ακρίβεια 10 mg) του μη αλεσμένου δείγματος σε προζυγισμένο ανοξείδωτο σκαφίδιο (εικ. 7, παράρτ. Α), το οποίο τοποθετείται σε κλίβανο με θερμοκρασία 60-70°C και αφήνεται για ξήρανση μέχρις ότου η περιεχόμενη υγρασία να κατέλθει στο 8-12%. Στη συνέχεια ψύχεται στον αέρα και ζυγίζεται με ακρίβεια 10 mg, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η απώλεια της υγρασίας. Κατόπιν αλέθεται γρήγορα και προσδιορίζεται η ΞΟ, όπως περιγράφεται στο 2.2.5. Ο τελικός υπολογισμός της υγρασίας γίνεται με τον τύπο:

$$\text{Υγρασία (\%)} = 100 * (1 - \frac{W1 \times w1}{W \times w})$$

Όπου:
W= αρχικό βάρος (g) δείγματος για προξήρανση
W1= βάρος (g) δείγματος μετά την προξήρανση
w= βάρος (g) δείγματος για ξήρανση
w1= βάρος (g) δείγματος μετά την ξήρανση

Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ειδικοί μύλοι άλεσης (εικ. 1, παράρτ. Α), οι οποίοι διαθέτουν ειδικό ψυχόμενο θάλαμο και λεπίδες (ειδικά διαμορφωμένες) για την άλεση, που εξασφαλίζουν τον ομοιόμορφο λεπτό τεμαχισμό και ομογενοποίηση των δειγμάτων, παρεμποδίζοντας την προσκόλληση της υγρασίας στα τοιχώματα. Επομένως, σε περίπτωση που υπάρχει διαθέσιμος ο συγκεκριμένος εξοπλισμός, τα δείγματα (ανάλογα με τη φύση τους) μπορούν να προετοιμαστούν για τον απευθείας τελικό προσδιορισμό της ΞΟ, χωρίς να απαιτείται προξήρανση.

2.2.8.2. Προσδιορισμός ΞΟ σε δημητριακούς καρπούς

Για τον προσδιορισμό της ΞΟ σε δημητριακούς καρπούς, η ξήρανση (του αλέσματος) πρέπει να γίνεται στους 135±2°C για 2 ώρες, εφαρμόζοντας κατά τα άλλα τη διαδικασία 2.2.5.

2.2.8.3. Προσδιορισμός ΞΟ σε ενσιρώματα ζωοτροφών

Τα ενσιρώματα έχουν κατά κανόνα υψηλή περιεκτικότητα σε πτητικά οργανικά οξέα τα οποία παράγονται από τους μικροοργανισμούς κατά την αναερόβια ζύμωση της χλωρής φυτικής ύλης και κατά περίπτωση σε αμμωνία (πτητική βάση) και επομένως η εφαρμογή της διαδικασίας 2.2.5 θα οδηγήσει σε πλασματικά χαμηλότερες τιμές ΞΟ. Ο προσδιορισμός λοιπόν της ΞΟ σε ενσιρωμένες ζωοτροφές μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

α) με ξήρανση δείγματος 4-7 g σε κλίβανο (όπως περιγράφεται στο 2.2.5) με παράλληλο ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών οργανικών οξέων (οξικό, προπιονικό, γαλακτικό, βουτυρικό) και της αμμωνίας σε άλλο δείγμα της ίδιας ζωοτροφής. Αυτά αφαιρούνται από την προσδιοριζόμενη υγρασία και διορθώνεται το σφάλμα στον υπολογισμό της ΞΟ.

β) με απόσταξη του δείγματος σε ειδική συσκευή. Κατά τη μέθοδο αυτή, ποσότητα (70 g) του δείγματος βράζεται με 400 ml τολουόλης με σταθερό ρυθμό επί 90 min μέχρι ο όγκος του νερού που αποστάζεται να είναι σταθερός (αυτό εκτιμάται όταν αρχίσει και η απόσταξη μόνο τολουόλης, που διακρίνεται από το σχηματισμό δύο φάσεων λόγω διαφορετικού ειδικού βάρους). Όταν παρατηρηθεί αυτό, διακόπτεται ο βρασμός και μετριέται ο όγκος (V) της υδαρούς φάσης με ακρίβεια 0,1 ml. Λαμβάνονται 10 ml από αυτή και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη (Erlenmeyer) των 100 ml με 40 ml αιθανόλης. Τιτλοδοτούνται με 0,1N NaOH χρησιμοποιώντας ως δείκτη εξουδετέρωσης τη φαινολοφθαλεΐνη. Τα πτητικά οργανικά οξέα δεσμεύονται στην τολουόλη, ενώ υπολείμματά τους στην υδαρή φάση προσδιορίζονται με την τιτλοδότηση ώστε να διορθωθούν τα σφάλματα στον υπολογισμό της ΞΟ. Ουσιαστικά δηλαδή με τη μέθοδο αυτή, προσδιορίζεται ο όγκος του αποστάγματος (νερού) που περιέχεται στο ενσίρωμα, ο οποίος διορθώνεται ως προς την ύπαρξη πτητικών οργανικών οξέων (αυτά αφαιρούνται από τον όγκο του αποστάγματος) και η ΞΟ τελικά του ενσιρώματος δίνεται από τον τύπο:

$$\text{ΞΟ}\ (\%) = 100 - \frac{99{,}8 \times \mathrm{V}}{\mathrm{W}} \times (1 - \frac{\mathrm{f} \times \mathrm{t}}{10})$$

Όπου:
V= όγκος αποστάγματος
W= βάρος (g) του δείγματος ενσιρώματος
t= ml 0,1N NaOH που απαιτήθηκαν κατά την τιτλοδότηση
f= σταθερός συντελεστής ίσος με 0,00555

2.2.8.4. Προσδιορισμός ΞΟ σε ζωοτροφές με πτητικές βάσεις, σάκχαρα ή κρυσταλλικό νερό

Για τον προσδιορισμό της ΞΟ σε απλές ή σύνθετες ζωοτροφές με:

α) περιεκτικότητα >4% σε σακχαρόζη ή λακτόζη (περιέχουν δηλαδή σάκχαρα που διασπώνται σε θερμοκρασία 103°C) ή

β) περιεκτικότητα >25 % σε άλατα (κρυσταλλικό νερό) ή

γ) υψηλή περιεκτικότητα σε πτητικές βάσεις (π.χ. αμμωνία κλπ.)

όπως είναι τα ξυλοκέρατα, φύτρα βύνης, στέμφυλα σακχαροτεύτλων, συμπυκνωθέντα υγρά συμπίεσης ιχθύων, μελάσα κλπ. χρησιμοποιείται διαφορετική διαδικασία από αυτήν της

παραγράφου 2.2.5. Τα δείγματα πρέπει να ξηραίνονται σε κλίβανο (εικ. 8, παράρτ. Α) κενού (κενό 100 torrs) για 4 ώρες στους 80-85°C (ή σε ξηρό και θερμό ρεύμα αέρα ή με την παρουσία ξηραντικής ουσίας). Έπειτα ο κλίβανος φέρεται σε ατμοσφαιρική πίεση και τα δείγματα ζυγίζονται, εφαρμόζοντας κατά τα άλλα τη διαδικασία 2.2.5. Η ξήρανση επαναλαμβάνεται στο ίδιο φιαλίδιο με τις ίδιες συνθήκες για 30 min επιπλέον και γίνεται επαναζύγιση. Αν η διαφορά μεταξύ των δύο αυτών ζυγίσεων υπερβαίνει το 0,1%, τότε ο προσδιορισμός της ΞΟ επαναλαμβάνεται από την αρχή. Αυτό ισχύει για όλες τις κατηγορίες ζωοτροφών που περιγράφονται στην παρούσα παράγραφο.

2.3. Προσδιορισμός ολικής τέφρας (Τ)

Ο προσδιορισμός της τέφρας χρησιμοποιείται α) για τον έμμεσο προσδιορισμό της οργανικής ουσίας (ΟΟ) και των ελεύθερων αζώτου εκχυλισματικών ουσιών (ΕΝΕΟ) της ζωοτροφής και β) για την εκτίμηση (με καλή προσέγγιση για πρακτικούς σκοπούς) της περιεκτικότητας του οστεαλεύρου και των ζωοτροφών ζωικής προέλευσης (κρεατάλευρα, ιχθυάλευρα) σε Ca και P, επειδή η τέφρα τους έχει σχετικά σταθερή σύσταση. Στις φυτικής προέλευσης ζωοτροφές η σύσταση της τέφρας σε ανόργανα στοιχεία παρουσιάζει πολύ μεγάλη παραλλακτικότητα και επομένως η ολική τέφρα χρησιμοποιείται μόνο για τον έμμεσο προσδιορισμό της ΟΟ και των ΕΝΕΟ. Υψηλές τιμές όμως τέφρας σε φυτικής προέλευσης ζωοτροφές είναι ένδειξη ρύπανσης με γαιώδεις προσμίξεις, οπότε επιβάλλεται ο προσδιορισμός της αδιάλυτης σε υδροχλωρικό οξύ τέφρας (βλ. 4.1).

2.3.1. Αρχή προσδιορισμού

Ο προσδιορισμός της ολικής τέφρας στηρίζεται στην αρχή της πυράκτωσης (αποτέφρωσης) του δείγματος της ζωοτροφής, σε υψηλή θερμοκρασία για καύση της ΟΟ. Η απώλεια του βάρους εκφράζει την περιεκτικότητα σε ΟΟ ή αντίστροφα, το μη πτητικό ανόργανο τμήμα που μένει αποτελεί την τέφρα.

2.3.2. Πεδίο εφαρμογής

Η αρχή αυτή βρίσκει εφαρμογή σε απλές και σύνθετες ζωοτροφές. Δεν βρίσκει εφαρμογή:

α) σε μείγματα ανόργανων ζωοτροφών (π.χ. ισορροπιστές πλαστικών στοιχείων ή ιχνοστοιχείων)

β) στην περίπτωση όπου πρόκειται να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός των ανόργανων στοιχείων που περιέχονται στην τέφρα, με επιπλέον ειδικές αναλυτικές τεχνικές. Ο λόγος είναι ότι κατά την αποτέφρωση της ζωοτροφής μερικά ανόργανα στοιχεία (π.χ. Se, J, P) μετατρέπονται σε πτητικά και χάνονται, με αποτέλεσμα τον εσφαλμένο προσδιορισμό τους. Όταν λοιπόν επιδιώκεται ο προσδιορισμός των τελευταίων ανόργανων στοιχείων ή της ολικής τέφρας με μεγαλύτερη ακρίβεια εφαρμόζεται η υγρή αποτέφρωση.

2.3.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός που απαιτείται για τον προσδιορισμό της τέφρας περιλαμβάνει:

- Εργαστηριακούς μύλους άλεσης ζωοτροφών (εικόνα 1, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό ζυγό ακρίβειας 0,1 mg (εικόνα 2, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό κλίβανο ξήρανσης (εικόνα 4, Παράρτημα Α)
- Κάψες (χωνευτήρια) πορσελάνης (εικόνα 11, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό κλίβανο αποτέφρωσης ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (100-900°C) με θερμοστάτη ακρίβειας τουλάχιστον ±20°C (εικόνα 12, Παράρτημα Α)
- Ξηραντήρα με πλάκα πορσελάνης, κάτω από την οποία τοποθετείται ξηραντικό μέσο ($CaCl_2$ ή gel σιλικόνης) (εικόνα 5, Παράρτημα Α)

- Λαβίδες μεταφοράς (εικόνα 6, Παράρτημα Α)

Πέραν αυτού του εξοπλισμού, για τις περιπτώσεις που αναφέρονται στο 2.3.8 θα απαιτηθούν επιπλέον:

- Ημοί κυπαρίνης ελεύθεροι τέφρας (εικόνα 13, Παράρτημα Α)

2.3.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)*

Δεν χρησιμοποιούνται χημικά αντιδραστήρια κατά τον προσδιορισμό της τέφρας, με εξαίρεση τα όσα αναφέρονται στο 2.3.8, όπου απαιτείται:

- Διάλυμα 20% (w/v) NH_4NO_3 [20,0 g NH_4NO_3 (p.a.) σε 100 ml απεσταγμένο H_20/20°C]

2.3.5. Διαδικασία προσδιορισμού

- Οι κάψες καθαρίζονται και ξηραίνονται στον κλίβανο στους 103°C για 2 τουλάχιστον ώρες.
- Μεταφέρονται στον ξηραντήρα και ψύχονται μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Δεν επιτρέπεται η παραμονή τους στον ξηραντήρα για διάστημα μεγαλύτερο των 3 ωρών.
- Ζυγίζονται (W0) με ακρίβεια 0,1 mg, μεταφέροντας μία κάθε φορά από τον ξηραντήρα και διατηρώντας κλειστό τον ξηραντήρα μεταξύ των καψών. Η μεταφορά πρέπει να γίνεται με λαβίδες.
- Προστίθενται περίπου 2 g του κατάλληλα προετοιμασμένου δείγματος σε κάθε κάψα. Καταγράφεται το μεικτό βάρος κάψας και δείγματος (W1) με ακρίβεια 0,1 mg.
- Οι κάψες τοποθετούνται σε κλίβανο αποτέφρωσης στους 550±20°C και πυρακτώνονται για 5-6 ώρες. Η τέφρα πρέπει να έχει γκρίζο χρωματισμό και να έχει ελευθερωθεί πλήρως από μη απανθρακωμένα τεμαχίδια (οπτικός έλεγχος).
- Στη συνέχεια μεταφέρονται στον ξηραντήρα και ψύχονται μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Δεν πρέπει να μεταφέρονται στον ξηραντήρα με θερμοκρασία <200°C, διότι απορροφούν υγρασία. Δεν επιτρέπεται η παραμονή τους στον ξηραντήρα για διάστημα μεγαλύτερο των 2 ωρών. Προσοχή στο άνοιγμα του ξηραντήρα (πρέπει να γίνεται ήπια) για να μην σκορπιστεί η τέφρα.
- Ζυγίζεται το μικτό βάρος κάψας και τέφρας (W2) με ακρίβεια 0,1 mg.

2.3.6. Υπολογισμοί

Η ολική τέφρα (Τ) ως επί % του δείγματος υπολογίζεται από τον τύπο:

$$T\ (\%) = \frac{(W2 - W0) \times 100}{W1 - W0}$$

Όπου:

W0= βάρος κενής κάψας (g)
W1= μικτό βάρος κάψας και δείγματος (g) και
W2= μικτό βάρος κάψας και δείγματος μετά την αποτέφρωση (g)

Η % οργανική ουσία του δείγματος υπολογίζεται ως: ΟΟ(%)= 100 – Τ(%)

2.3.7. Διασφάλιση ποιότητας αποτελεσμάτων

- Σε κάθε παρτίδα δειγμάτων συνιστάται η ανάλυση ενός δείγματος ελέγχου (ΔΕ). Το δείγμα αυτό μπορεί να παρασκευαστεί από κάποια ζωοτροφή παρόμοιας φύσης με αυτές θα αναλυθούν στο εργαστήριο. Λαμβάνονται 3-4 kg του επιλεχθέντος ΔΕ, αλέθονται (κόσκινο διαμέτρου 1 mm, όπως και τα προς ανάλυση δείγματα) και φυλάσσονται σε δροσερό και ξηρό μέρος. Το ΔΕ αναλύεται 15-20 φορές όπως περιγράφει η διαδικασία της μεθόδου. Υπολογίζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και οριοθετείται ένα 2% ως μέγιστη επιτρεπτή απόκλιση από το μέσο όρο.
- Ο προσδιορισμός της τέφρας πρέπει να εκτελείται σε δύο παράλληλα δείγματα. Η διαφορά μεταξύ των δύο παράλληλων προσδιορισμών δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,2% σε απόλυτη τιμή (%Τα - %Τβ≤0,2%) για περιεκτικότητες ολικής τέφρας<10% και το 2% σε σχετική τιμή (ως προς την υψηλότερη τιμή) για περιεκτικότητες ολικής τέφρας≥10% (περίπου 0,5% διαφορά σε απόλυτη τιμή). Σε κάθε άλλη περίπτωση πρέπει να επαναληφθεί η ανάλυση.

2.3.8. Παρατηρήσεις – Παραλλαγές διαδικασίας

- Αν το υπόλειμμα της τέφρας μετά την αποτέφρωση περιέχει μη απανθρακωμένα τεμαχίδια, γίνεται διαβροχή με απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια εξατμίζεται το νερό με προσοχή στους 103±2°C και αποτεφρώνεται το δείγμα για 1 ώρα ακόμα στους 550±20°C.
- Ουσίες που αποτεφρώνονται πολύ δύσκολα, υποβάλλονται σε αρχική καύση τουλάχιστον 3 ώρες, ψύχονται και στη συνέχεια προστίθενται μερικές σταγόνες διαλύματος 20% νιτρικού αμμωνίου. Τα δείγματα ξηραίνονται σε κλίβανο (103±2°C) και επανατοποθετούνται στον αποτεφρωτήρα (550±20°C) μέχρι την πλήρη αποτέφρωση, εφαρμόζοντας κατά τα άλλα τη διαδικασία 2.3.5. Αν η αποτέφρωση δεν είναι πλήρης, η διαδικασία επαναλαμβάνεται
- Για τον προσδιορισμό της τέφρας σε λίπη και έλαια, ζυγίζεται δείγμα περίπου 25 g σε κάψα ανάλογου μεγέθους. Το λίπος καίγεται εντός ηθμού (ελεύθερου τέφρας), ώστε να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος της ΟΟ και το υπόλειμμα υγραίνεται με απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια αποτεφρώνεται (2.3.5).

2.4. Προσδιορισμός ολικών αζωτούχων ουσιών (ΟΑΟ)

Το αζωτούχο κλάσμα των ζωοτροφών (πιν. 1) περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες και τις μη πρωτεϊνικής φύσης αζωτούχες ουσίες (ΜΠΦΝ). Η αναλογία του αζώτου (N) των πρωτεϊνών προς υπόλοιπο N (το ΜΠΦΝ δηλαδή) εξαρτάται από το είδος της ζωοτροφής και την κατηγορία στην οποία ανήκει (χονδροειδής ή συμπυκνωμένη, φυτικής ή ζωικής προέλευσης). Οι πρωτεΐνες έχουν περιεκτικότητα σε N που κυμαίνεται από 16-19%. Οι δε ΜΠΦΝ χαρακτηρίζονται από περισσότερο ευρεία περιεκτικότητα σε N (π.χ. ουρία: 46,65%, βεταΐνη: 11,95%). Από τις πρωτεΐνες, μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε N έχουν εκείνες των ελαιούχων σπερμάτων (βαμβακόσπορος και λιναρόσπορος 18,9%, φοινικοειδή σπέρματα 18,3%), ενώ μικρότερη οι ζωικής προέλευσης (γάλακτος 15,8%, αυγού και σάρκας 16%). Οι διαφορές αυτές οφείλονται στη διαφορετική αναλογία συμμετοχής των αμινοξέων στο μόριο της πρωτεΐνης, τα οποία διαφέρουν ως προς την περιεκτικότητα του μορίου τους σε N (πιν. 2).

Πίνακας 2. *Περιεκτικότητα (%) των αμινοξέων σε άζωτο (N).*

	Αμινοξύ	**Μοριακό βάρος**	**N (%)**
Απαραίτητα	Αργινίνη	174,14	32,18
	Βαλίνη	117,09	11,96
	Θρεονίνη	19,08	11,74
	Ισολευκίνη	131,11	10,69
	Ιστιδίνη	155,09	27,09
	Λευκίνη	131,11	10,69
	Λυσίνη	146,20	19,16
	Μεθειονίνη	149,15	9,39
	Τρυπτοφάνη	204,11	13,72
	Φαινυλαλανίνη	165,19	8,48
Μη απαραίτητα	Αλανίνη	89,09	15,72
	Ασπαραγίνη	132,12	21,20
	Ασπαραγινικό οξύ	133,07	10,53
	Γλυκόκολλα	75,07	18,66
	Γλουταμίνη	146,15	19,17
	Γλουταμινικό οξύ	147,08	9,50
	Κυστεΐνη	121,16	11,56
	Προλίνη	115,08	12,17
	Σερίνη	105,06	13,33
	Τυροσίνη	181,19	7,73

2.4.1. Αρχή προσδιορισμού

Στην αναλυτική τακτική Weende, προσδιορίζεται N των ζωοτροφών με τη μέθοδο Kjeldahl. Το N των πρωτεϊνών και των ΜΠΦΝ ουσιών των ζωοτροφών μετατρέπεται σε ανόργανο N [θειικό αμμώνιο-$(NH_4)_2SO_4$] με πυκνό θειικό οξύ παρουσία καταλύτη. Στη συνέχεια, το $(NH_4)_2SO_4$ μετατρέπεται σε θειικό νάτριο (Na_2SO_4) με καυστικό νάτριο (40% NaOH) και απελευθερώνεται αμμωνία (NH_3), η οποία συλλέγεται με απόσταξη σε ειδικό διάλυμα βορικού οξέος (receiver solution) και τιτλοδοτείται με

διάλυμα HCl γνωστής κανονικότητας. Για τον υπολογισμό των ΟΑΟ, το προσδιοριζόμενο άζωτο πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 6,25 (ή άλλο κατάλληλο συντελεστή, βλ. 2.5.6)

2.4.2. Πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή σε όλες τις απλές και σύνθετες ζωοτροφές.

2.4.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός που απαιτείται για τον προσδιορισμό των ΟΑΟ περιλαμβάνει:

- Εργαστηριακούς μύλους άλεσης ζωοτροφών (εικόνα 1, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό ζυγό ακρίβειας 0,1 mg (εικόνα 2, Παράρτημα Α)
- Σωλήνες Kjeldahl των 250 ml (εικόνα 15, Παράρτημα Α)
- Εστίες καύσης για σωλήνες Kjeldahl με πολλαπλό απαγωγό (εικόνα 16, Παράρτημα Α)
- Αυτόματη συσκευή απόσταξης-τιτλοδότησης Kjeldahl (εικόνα 17, Παράρτημα Α). Σε λιγότερο εξελιγμένες συσκευές η απόσταξη και η τιτλοδότηση γίνονται ξεχωριστά.
- Δοσομετρική αντλία (5-20 ml) ακρίβειας 0,2 ml (εικόνα 18, Παράρτημα Α)

2.4.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)*

- Πυκνό H_2SO_4 (96-98%) (p.a.)
- Δισκία καταλύτη Kjeldahl (κάθε δισκίο περιέχει περίπου 3,5 g K_2SO_4 και 0,4 g $CuSO_4.5H_2O$ ή και άλλες ποσότητες ανάλογα με την προμηθεύτρια εταιρία). Ο καταλύτης μπορεί να παρασκευασθεί και στο εργαστήριο.
- Διάλυμα υποδοχής (receiver solution) που αποτελείται από 100 g βορικό οξύ (HBO_3), 70 ml δείκτη ερυθρού του μεθυλίου (100 mg/100 ml μεθανόλης), 100 ml δείκτη πράσινου της βρωμοκρεζόλης (100 mg/100 ml μεθανόλης) και 5 ml 0,1N NaOH (έτοιμο εμπορικό σκεύασμα) σε 10 lt απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα 40% (w/v) NaOH [περίπου 810,0 g NaOH (p.a.) σε 2000 ml απεσταγμένο $H_20/20^oC$]
- Διάλυμα 0,1N HCl (από έτοιμες αμπούλες 1N HCl του εμπορίου, ακρίβειας 0,0001N)

2.4.5. Διαδικασία προσδιορισμού

2.4.5.1. Καύση (ή πέψη)

- Ζυγίζεται 0,5 g δείγματος ζωοτροφής (W) με ακρίβεια 0,1 mg, σε καθαρό σωλήνα Kjeldahl των 250 ml (εικ. 15). Σε κάθε παρτίδα αναλύσεων πρέπει να συμπεριλαμβάνεται και ένας άδειος (χωρίς δείγμα) σωλήνας που χρησιμεύει σαν τυφλή δοκιμή (τυφλό δείγμα). Τα τυφλά δείγματα αποσκοπούν στην ανίχνευση παρουσίας NH_3 που δεν οφείλεται στο δείγμα.
- Μετά τη ζύγιση προστίθεται σε κάθε σωλήνα ένα δισκίο καταλύτη Kjeldahl και 13 ml πυκνού H_2SO_4 (96-98%) με τη χρήση δοσομετρικής αντλίας (εικ. 18). Με ελαφρή ανακίνηση αναδεύεται το περιεχόμενο του σωλήνα.

- Οι σωλήνες μεταφέρονται στην εστία καύσης με ειδικό στατό, συνδέονται με τον πολλαπλό απαγωγό (για την ασφαλή απομάκρυνση των ατμών του οξέος κατά την καύση) και θερμαίνονται στους 420±10°C για 1 ώρα.
- Μετά το πέρας της καύσης οι σωλήνες απομακρύνονται από την εστία και ψύχονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (με τον απαγωγό, για περίπου 30-45 min).

2.4.5.2. Απόσταξη και τιτλοδότηση

Η διαδικασία που ακολουθεί, περιγράφει την απόσταξη και τιτλοδότηση στην αυτόματη συσκευή (AutoKjeltec, Foss, Tecator) που υπάρχει στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και ο χρόνος απόσταξης-τιτλοδότησης καθορίζονται με προγραμματισμό της συσκευής. Για κάθε άλλη συσκευή, πρέπει να εφαρμόζονται πιστά οι οδηγίες του κατασκευαστή.

- Μετά την ψύξη, ο κάθε σωλήνας μεταφέρεται στην αυτόματη συσκευή, τοποθετείται σε ειδική θέση και σφραγίζεται.
- Μέσα στο σωλήνα προστίθενται αυτόματα 80 ml κρύου απιονισμένου νερού (για την διαλυτοποίηση των θειικών αλάτων) και 50 ml διαλύματος 40% NaOH.
- Στη συνέχεια μέσω ατμογεννήτριας εισέρχεται στο σωλήνα ατμός, ο οποίος αναδεύει το μείγμα και υποβοηθάει στην αντίδραση του $(NH_4)_2SO_4$ με το NaOH για τη γρήγορη απελευθέρωση της NH_3.
- Η εκλυόμενη NH_3 συμπυκνώνεται και υγροποιείται στον ψυκτήρα της συσκευής και συλλέγεται σε ειδικό δοχείο, στο οποίο έχουν προστεθεί αυτόματα 30 ml διαλύματος υποδοχής (receiver solution).
- Με την είσοδο της NH_3 στο διάλυμα υποδοχής σχηματίζεται πράσινο χρώμα. Στη συνέχεια γίνεται αυτόματη τιτλοδότηση με διάλυμα 0,1N HCl (μέσω ενσωματωμένης δοσομετρικής αντλίας), μέχρις πλήρους εξουδετέρωσης της NH_3 η οποία καθορίζεται από ένα γκρίζο-ελαφρά ερυθρό χρωματισμό (λόγω των δεικτών) στο δοχείο (ο χρωματισμός ανιχνεύεται αυτόματα από ειδικό φασματοφωτόμετρο στη βάση του δοχείου). Καταγράφεται ο όγκος του οξέος (με ακρίβεια 0,001 ml) που χρησιμοποιήθηκε για το τυφλό δείγμα (V_T) και για το κάθε δείγμα (V_δ).

2.4.6. Υπολογισμοί

Ο υπολογισμός του N (%) γίνεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$\mathrm{N}\ (\%) = \frac{(V\delta - \mathrm{V}\tau) \times 0{,}1 \times 1{,}4}{\mathrm{W} \times 10}$$

Όπου:
V_δ= όγκος (ml) 0,1N HCl που απαιτήθηκε για το δείγμα
V_T = όγκος (ml) 0,1N HCl που απαιτήθηκε για το τυφλό δείγμα
0,1= η κανονικότητα του διαλύματος HCl
1,4= τα mg αζώτου που αντιστοιχούν σε κάθε ml 0,1N HCl για την τιτλοδότηση της NH_3
10= συντελεστής μετατροπής από mg/g σε %
W= βάρος δείγματος (g)

Πως προκύπτουν οι παραπάνω αριθμοί:

- *Κάθε 1 ml 0,1N HCl που χρησιμοποιήθηκε κατά την τιτλοδότηση (δηλ. αντέδρασε με την NH_3 για να σχηματίσει NH_4Cl), αντιστοιχεί σε 1,7 mg NH_3 ή αλλιώς σε 1,7×0,822 (περιεκτικότητα NH_3 σε N= 82,2%)= 1,4 mg N (ή 0,0014 g N).*
- *Αν λοιπόν έχουν χρησιμοποιηθεί V (= V_δ-V_T) ml 0,1N HCl, τότε η ποσότητα N που υπήρχε στα W g δείγματος θα είναι: V×0.0014×0.1(N HCl) g N, άρα το % N της ζωοτροφής θα ισούται με: V×0.00014×100/W ή V×0.014/W (όπως φαίνεται και στον παραπάνω τύπο).*

- Το %N μετατρέπεται σε ΟΑΟ, ως εξής: %ΟΑΟ= %N×F.

  Όπου ενδεικτικά: F= 6,25 για χονδροειδείς και άλλες απλές ή σύνθετες ζωοτροφές

  F= 5,70 για δημητριακούς καρπούς

  F= 5,29 για τα ελαιούχα σπέρματα

  F= 6,38 για το γάλα και τα υποπροϊόντα του και
- Οι ΟΑΟ μπορούν στη συνέχεια να εκφραστούν ως % της ΞΟ της ζωοτροφής: ΟΑΟ (% ΞΟ)= ΟΑΟ (%)×100/ΞΟ (%)

Οι παραπάνω υπολογισμοί πραγματοποιούνται αυτόματα από τη συσκευή (AutoKjeltec Unit), αφού προηγουμένως (στην αρχή της ανάλυσης) έχει εισαχθεί στη συσκευή το ακριβές βάρος του δείγματος και κατά περίπτωση ο κατάλληλος συντελεστής F. Στην οθόνη της συσκευής παρουσιάζεται το τελικό αποτέλεσμα της ανάλυσης (% ΟΑΟ).

2.4.7. Διασφάλιση ποιότητας αποτελεσμάτων

- Σε κάθε παρτίδα δειγμάτων συνιστάται η ανάλυση ενός δείγματος ελέγχου (ΔΕ). Το δείγμα αυτό μπορεί να παρασκευαστεί από κάποια ζωοτροφή παρόμοιας φύσης με αυτές θα αναλυθούν στο εργαστήριο. Λαμβάνονται 3-4 kg του επιλεχθέντος ΔΕ, αλέθονται (κόσκινο διαμέτρου 1 mm, όπως και τα προς ανάλυση δείγματα) και φυλάσσονται σε δροσερό και ξηρό μέρος. Το ΔΕ αναλύεται 15-20 φορές όπως περιγράφει η διαδικασία της μεθόδου. Υπολογίζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και οριοθετείται ένα 2% ως μέγιστη επιτρεπτή απόκλιση από το μέσο όρο.
- Πρέπει να χρησιμοποιείται επιπλέον, μία πρότυπη ουσία για τον έλεγχο όλης της διαδικασίας. Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι: υψηλής καθαρότητας (>99,7%) ξηρή υδροχλωρική λυσίνη, ακετανιλίδιο ή τρυπτοφάνη. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμμωνιακά άλατα, αλλά μόνο τον έλεγχο της απόσταξης-τιτλοδότησης.
- Ο προσδιορισμός των ΟΑΟ πρέπει να εκτελείται σε δύο παράλληλα δείγματα. Η διαφορά μεταξύ των δύο παράλληλων προσδιορισμών δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,2% σε απόλυτη τιμή για περιεκτικότητες σε ΟΑΟ<20%, το 1% σε σχετική τιμή (ως προς την υψηλότερη τιμή) για περιεκτικότητες σε ΟΑΟ από 20-40% και το 0,4% σε απόλυτη τιμή για περιεκτικότητες σε ΟΑΟ>40%. Σε κάθε άλλη περίπτωση πρέπει να επαναληφθεί η ανάλυση.

2.4.8. Παρατηρήσεις – Παραλλαγές διαδικασίας

- Για δείγματα με σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, πρέπει να χρησιμοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος.
- Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης για τον προσδιορισμό της αμμωνίας σε ενσιρώματα. Στην περίπτωση αυτή παραλείπεται το στάδιο της καύσης του δείγματος.
- το N της NH_3 πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 6,25 (100:16= 6,25), ο οποίος το εκφράζει σαν πρωτεΐνη ζωικής προέλευσης (αυγού, σάρκας). Η έκφραση αυτή είναι εντελώς συμβατική, διότι προϋποθέτει ότι όλο το N της ζωοτροφής είναι πρωτεϊνικής και μάλιστα άριστης φύσης. Επειδή αυτή η υπόθεση δεν είναι αληθινή, το αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού αποκαλείται «ολικές

αζωτούχες ουσίες» για να υπονοείται ότι η τιμή N×6,25 δεν είναι καθαρή πρωτεΐνη, αλλά συμβατική πρωτεϊνική έκφραση των αζωτούχων ουσιών πρωτεϊνικής και μη πρωτεϊνικής φύσης. Καλό είναι να χρησιμοποιείται ο κατάλληλος συντελεστής κατά περίπτωση ζωοτροφής, όπως δίνεται στο 2.5.6.

- Σε περίπτωση όμως που μία ζωοτροφή είναι πλούσια σε ΜΠΦΝ, πρέπει να πραγματοποιείται ο προσδιορισμός τους με ειδικές αναλυτικές τεχνικές, ώστε να είναι γνωστή η πραγματική περιεκτικότητα της ζωοτροφής σε πρωτεΐνη. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα μονογαστρικά ζώα, τα οποία δε μπορούν να αξιοποιήσουν το ΜΠΦΝ (όπως συμβαίνει στα μηρυκαστικά).
- Για εγκυκλοπαιδικούς σκοπούς θα αναφερθεί μία διαφορετική μέθοδος προσδιορισμού του N στις ζωοτροφές, η μέθοδος Dumas (η οποία δεν αναλύεται στο παρόν σύγγραμμα). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ολική καύση του δείγματος στους 950˚C παρουσία οξυγόνου σε υψηλή πίεση. Το N του δείγματος μετατρέπεται σε NOx (νιτρώδη και νιτρικά) αέρια. Αυτά ανάγονται στη συνέχεια σε N, το οποίο προσδιορίζεται σε ειδικό δοχείο θερμικής αγωγιμότητας. Οι ΟΑΟ υπολογίζονται πολλαπλασιάζοντας με τον κατάλληλο συντελεστή (βλ. 2.5.6).

2.5. Προσδιορισμός ολικών λιπαρών ουσιών (ΟΛΟ)

Τα ουδέτερα λίπη αποτελούν το κύριο συστατικό του αιθερικού εκχυλίσματος για το σύνολο των ζωοτροφών και είναι το κυριότερο κλάσμα για τη θρέψη των ζώων. Έχουν υψηλή θερμότητα καύσης και μεγάλη πεπτικότητα. Για το λόγο αυτό η μεγαλύτερη περιεκτικότητα μίας ζωοτροφής σε ουδέτερα λίπη αυξάνει την ενεργειακή της αξία. Τα υπόλοιπα συστατικά του αιθερικού εκχυλίσματος απαντώνται σε μικρή αναλογία και με εξαίρεση τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τις λιποδιαλυτές βιταμίνες (A, D, E, K) δεν κατατάσσονται στα θρεπτικά συστατικά. Αν μάλιστα περιέχονται σε μεγάλα ποσοστά, υποβιβάζεται η θρεπτική αξία της ζωοτροφής.

Στη αναλυτική τακτική Weende χρησιμοποιείται η μέθοδος Soxhlet κατά την οποία δε γίνεται διαιτητικός διαχωρισμός των ουσιών του αιθερικού εκχυλίσματος και για αυτό τους δίνεται η ονομασία ολικές λιπαρές ουσίες.

2.5.1. Αρχή προσδιορισμού

Ο προσδιορισμός των ΟΛΟ στηρίζεται στην εκχύλιση του κλάσματος εκείνου της ζωοτροφής, το οποίο περιέχει ουδέτερα λίπη (γλυκερίδια λιπαρών οξέων), ελεύθερα λιπαρά οξέα, λιποδιαλυτές χρωστικές και βιταμίνες, αιθέρια έλαια, ρητίνες, στερόλες και άλλες ουσίες, με χρήση οργανικού διαλύτη. Ο διαλύτης αποστάζεται και το υπόλειμμα ξηραίνεται, ζυγίζεται και αντιπροσωπεύει τις ΟΛΟ. Οι ΟΛΟ μπορούν προσδιοριστούν με ή χωρίς προηγούμενη υδρόλυση των δειγμάτων με υδροχλωρικό οξύ. Η εφαρμογή της υδρόλυσης οδηγεί κατά κανόνα σε υψηλότερες τιμές ΟΛΟ, ειδικά κατά την ανάλυση ζωοτροφών που έχουν υποστεί θερμική κατεργασία ή ζωοτροφών ζωικής προέλευσης.

2.5.2. Πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή σε απλές και σύνθετες ζωοτροφές με περιεκτικότητα σε ΟΛΟ<20%. Για ζωοτροφές με μεγαλύτερη περιεκτικότητα (π.χ. ελαιούχα σπέρματα) εφαρμόζονται τα όσα αναφέρονται στο 2.6.8.

2.5.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός που απαιτείται για τον προσδιορισμό των ΟΛΟ περιλαμβάνει:

- Εργαστηριακούς μύλους άλεσης ζωοτροφών (εικόνα 1, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό ζυγό ακρίβειας 0,1 mg (εικόνα 2, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό κλίβανο ξήρανσης ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (50-150°C) με θερμοστάτη ακρίβειας τουλάχιστον ±5°C (εικόνα 4, Παράρτημα Α)
- Ξηραντήρα με πλάκα πορσελάνης, κάτω από την οποία τοποθετείται ξηραντικό μέσο ($CaCl_2$ ή gel σιλικόνης) (εικόνα 5, Παράρτημα Α)
- Αυτόματη συσκευή εκχύλισης Soxhlet (Soxtec Avanti, Foss, Tecator).
- Φυσίγγια κυτταρίνης και ποτήρια αλουμινίου για τη συσκευή Soxhlet (εικόνα 19, Παράρτημα Α)

- Ποτήρια ζέσης, ογκομετρικές φιάλες, φιάλες Erlenmeyer και ογκομετρικοί κύλινδροι διαφόρων όγκων (εικόνα 20, Παράρτημα Α)
- Δοσομετρική αντλία (0-60 ml) ακρίβειας 0,5 ml (εικόνα 21, Παράρτημα Α)
- Χωνιά Buchner εφαρμοσμένα σε σύστημα κενού (εικόνα 22, Παράρτημα Α)
- Προαιρετικά, ειδική συσκευή υδρόλυσης (εικόνα 23, Παράρτημα Α)
- Λίθοι βρασμού (γυάλινα σφαιρίδια ή θραύσματα καρβιδίου σιλικόνης)
- Ηθμοί κυπταρίνης ελεύθεροι λιπαρών ουσιών.

2.5.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)*

- Άνυδρος πετρελαϊκός αιθέρας (με σημείο ζέσης 40-60°C) (p.a.). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ο αποσταζόμενος κατά τη διαδικασία αιθέρας, υπό την προϋπόθεση ότι τα υπολείμματα ΟΛΟ σε αυτόν δεν υπερβαίνουν τα 20 mg/lt.
- Άνυδρο θειικό νάτριο (p.a.)
- Πυκνό HCl (γνωστό και ως ατμίζον HCl 36-37%)
- Διάλυμα 3N HCl (257 ml πυκνού HCl σε 1000 ml απεσταγμένο H_20/20°C)
- Γη διατόμων
- Τετραχλωράνθρακας p.a. (CCl_4)

2.5.5. Διαδικασία προσδιορισμού

Η διαδικασία που ακολουθεί, περιγράφει την εκχύλιση στην αυτόματη συσκευή (Soxtec Avanti, Foss, Tecator) που υπάρχει στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής. Για κάθε άλλη συσκευή, πρέπει να εφαρμόζονται πιστά οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Αν πρόκειται να προηγηθεί υδρόλυση των δειγμάτων ακολουθείται η διαδικασία από το 2.6.5.1. Αν όχι, η διαδικασία εφαρμόζεται από το σημείο 2.6.5.2 και μετά

2.5.5.1. Υδρόλυση

Για: *θερμικά κατεργασμένες ζωοτροφές, ζωικής προέλευσης ζωοτροφές, γλουτένη, αποξηραμένα στέμφυλα γεωμήλων, αποξηραμένα υπολείμματα ζυθοποιίας και οινοπνευματοποιίας, ζύμες, γαλακτοκομικά προϊόντα και τροφές που περιέχουν τουλάχιστον 40% από αυτά, καθώς και σύνθετες τροφές εμπλουτισμένες με λίπος.*

- Ζυγίζονται 5 g δείγματος με ακρίβεια 0,1 mg και τοποθετούνται σε φιάλη Erlenmeyer των 300 ml.
- Προσθέτονται 100 ml HCl 3N και μερικοί λίθοι βρασμού. Εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και η φιάλη φέρεται σε ήπιο βρασμό για 1 ώρα. Αναδεύονται κάθε 10 min για να παρεμποδιστεί η προσκόλληση του λίπους στα τοιχώματα.
- Στη συνέχεια ψύχεται και προστίθεται επαρκής ποσότητα γης διατόμων (πυριτικά άλατα) ή άλλο παρόμοιο υλικό για πρόληψη απωλειών λίπους κατά τη διήθηση.
- Το μείγμα διηθείται σε χωνί Buchner με διπλό ηθμό υπό κενό.
- Το υπόλειμμα της φιάλης πλένεται με κρύο απεσταγμένο νερό επί του ηθμού, μέχρις ότου το διήθημα να γίνει ουδέτερο (ελέγχεται με pHμετρικό χαρτί).

- Το διήθημα ελέγχεται για παρουσία λιπαρών ουσιών. Αν διαπιστωθεί η παρουσία τους, πρέπει η ζωοτροφή να υποστεί εκχύλιση με αιθέρα πριν την υδρόλυση.
- Στη συνέχεια ο διπλός ηθμός με το υδρολυμένο υπόλειμμα τοποθετείται σε γυαλί ρολογιού και ξηραίνεται σε κλίβανο στους 80°C για 1,5 ώρα.
- Κατόπιν τοποθετείται σε φυσίγγιο και υποβάλλεται σε εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα, όπως περιγράφεται ακολούθως στο 2.6.5.2. Το γυαλί ρολογιού ξεπλένεται με πετρελαϊκό αιθέρα (για την παραλαβή υπολειμμάτων λίπους), ο οποίος προστίθεται στο ποτήρι αλουμινίου πριν την έναρξη της εκχύλισης.

2.5.5.2. Εκχύλιση

- Ζυγίζονται 0,5 g δείγματος με ακρίβεια 0,1 mg (W_1) και μεταφέρονται στο φυσίγγιο κυτταρίνης με τη μεταλλική στεφάνη, το οποίο πωματίζεται με τεμάχιο βαμβακιού. Το βήμα αυτό εφαρμόζεται μόνο όταν δεν πραγματοποιείται υδρόλυση των δειγμάτων. Τόσο το φυσίγγιο, όσο και το βαμβάκι πρέπει να είναι ελεύθερα από λιπαρές ουσίες.
- Στη συνέχεια τα φυσίγγια ξηραίνονται για μισή ώρα σε κλίβανο (στους 103°C), ώστε να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος της υγρασίας, διότι δυσχεραίνει την εκχύλιση.
- Ζυγίζεται (W_0) το ειδικό ποτήρι από αλουμίνιο, το οποίο προηγουμένως έχει προξηρανθεί (στους 103°C για 1 ώρα) και ψυχθεί μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος εντός ξηραντήρα.
- Τα φυσίγγια αναρτώνται στη συσκευή εκχύλισης Soxhlet με τη χρήση ειδικών στατό (6 κάθε φορά) σε ειδικές θέσεις με μαγνήτη.
- Πάνω στην εστία θέρμανσης που βρίσκεται κάτω από τα αναρτημένα φυσίγγια, τοποθετούνται τα ποτήρια αλουμινίου με τη χρήση ειδικών στατό (6 κάθε φορά), βυθίζονται μέσα σε αυτά τα φυσίγγια και ταυτόχρονα σφραγίζουν με την εφαρμογή κάθετου ψυκτήρα, με τρόπο ώστε να προκύπτει σύστημα ερμητικά κλειστό.
- Μέσω ειδικής βαλβίδας του συστήματος, προστίθενται περίπου 55-60 ml πετρελαϊκού αιθέρα με χρήση δοσομετρικής αντλίας σε κάθε ποτήρι. Η ποσότητα αυτή είναι αρκετή για να διατηρήσει όλο τον όγκο του δείγματος εμβαπτισμένο στον αιθέρα.
- Στη συνέχεια γίνεται βρασμός στους 80°C για 20 min, κατά τη διάρκεια του οποίου εκχυλίζονται οι ΟΛΟ μέσα στα ποτήρια. Ο εξατμιζόμενος αιθέρας ψύχεται και συμπυκνώνεται στον κάθετο ψυκτήρα και επανέρχεται στα ποτήρια.
- Μετά την πάροδο των 20 min, τα φυσίγγια εξέρχονται από τον αιθέρα και παραμένουν αναρτημένα για 15 min. Στη διάρκεια αυτή, ο βρασμός συνεχίζει και ο ανακυκλούμενος αιθέρας περνάει από τα φυσίγγια, συλλέγει και τα τελευταία υπολείμματα ΟΛΟ (γίνεται δηλαδή έκπλυση των φυσιγγίων) μεταφέροντάς τα στο ποτήρι.
- Μετά τα 15 min έχει ολοκληρωθεί η εκχύλιση, ο αιθέρας απομακρύνεται από τα ποτήρια με απόσταξη (κλείνει μία ειδική βαλβίδα που επιτρέπει την είσοδό του στο ποτήρι) και συλλέγεται σε ειδικό δοχείο της συσκευής για επαναχρησιμοποίηση.
- Η απόσταξη διαρκεί περίπου άλλα 10 min και υποβοηθείται από αντλία κενού ενσωματωμένη στη συσκευή.

- Τα ποτήρια με το υπόλειμμα των ΟΛΟ μεταφέρονται σε κλίβανο, όπου ξηραίνονται στους 75°C για 30 min.
- Στη συνέχεια ψύχονται σε ξηραντήρα και ζυγίζεται το μεικτό βάρος τους με ακρίβεια 0,1 mg (W_2).

2.5.6. Υπολογισμοί

Ο υπολογισμός των ΟΛΟ (%) γίνεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{ΟΛΟ (\%)} = \frac{(W2 - W0) \times 100}{W1}$$

Όπου:
W0= βάρος κενού ποτηριού (g)
W1= βάρος δείγματος (g) και
W2= βάρος ποτηριού και λίπους (g)

Οι ΟΛΟ μπορούν στη συνέχεια να εκφραστούν ως % της ΞΟ της ζωοτροφής, ως ακολούθως:
ΟΛΟ (% ΞΟ)= ΟΛΟ (%)×100/ΞΟ (%)

2.5.7. Διασφάλιση ποιότητας αποτελεσμάτων

- Σε κάθε παρτίδα δειγμάτων συνιστάται η ανάλυση ενός δείγματος ελέγχου (ΔΕ). Το δείγμα αυτό μπορεί να παρασκευαστεί από κάποια ζωοτροφή παρόμοιας φύσης με αυτές θα αναλυθούν στο εργαστήριο (π.χ. άλεσμα υποπροϊόντος σπορελαιουργίας). Λαμβάνονται 3-4 kg του επιλεχθέντος ΔΕ, αλέθονται (κόσκινο διαμέτρου 1 mm, όπως και τα προς ανάλυση δείγματα) και φυλάσσονται σε δροσερό και ξηρό μέρος. Το ΔΕ αναλύεται 15-20 φορές όπως περιγράφει η διαδικασία της μεθόδου. Υπολογίζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και οριοθετείται ένα 2% ως μέγιστη επιτρεπτή απόκλιση από το μέσο όρο.
- Ο προσδιορισμός των ΟΛΟ πρέπει να εκτελείται σε δύο παράλληλα δείγματα. Η διαφορά μεταξύ των δύο παράλληλων προσδιορισμών δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,25% σε απόλυτη τιμή όταν δε γίνεται υδρόλυση και το 0,50% όταν γίνεται υδρόλυση των δειγμάτων.

2.5.8. Παρατηρήσεις – Παραλλαγές διαδικασίας

- Ζωοτροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε ΟΛΟ δεν αλέθονται εύκολα και δημιουργείται πρόβλημα στη λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος για ανάλυση. Σε τέτοιες περιπτώσεις είτε χρησιμοποιούνται ειδικοί μύλοι άλεσης, οι οποίοι διαθέτουν ειδικό ψυχόμενο θάλαμο άλεσης που εμποδίζει την προσκόλληση του λίπους στα τοιχώματα και διευκολύνει την άλεση (βλ. 2.2.8.1) με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε ΟΛΟ, είτε εφαρμόζεται διπλή απόσταξη.
- Κατά τη διπλή απόσταξη, ζυγίζονται 20 g ζωοτροφής με ακρίβεια 1 mg, αναμιγνύονται με 10 g άνυδρο θειικό νάτριο και υποβάλλονται σε βρασμό (εκχύλιση) με πετρελαϊκό αιθέρα. Γίνεται διήθηση και το διήθημα αραιώνεται στα 500 ml με τετραχλωράνθρακα και ομογενοποιείται. Λαμβάνονται 50 ml και μεταφέρονται σε μικρή, προξηραμένη και προζυγισμένη φιάλη. Απομακρύνονται οι διαλύτες με απόσταξη και υπολογίζεται η περιεκτικότητα του διηθήματος σε ΟΛΟ από τη διαφορά του απόβαρου από το μεικτό βάρος της τελευταίας φιάλης. Το στερεό

υπόλειμμα της ζωοτροφής μετά την εκχύλιση, απαλλάσσεται από το διαλύτη και αλέθεται σε απλό εργαστηριακό μύλο. Μετά την άλεση λαμβάνεται τυπικό δείγμα (0,5 g με ακρίβεια 1 mg) και υποβάλλεται σε κανονική εκχύλιση όπως περιγράφεται στο 2.6.5

Ο υπολογισμός των ΟΛΟ σε αυτή την περίπτωση γίνεται με τον τύπο:

$$\text{ΟΛΟ (\%)} = \frac{100}{W1} \times [10 \times \alpha 1 + (W1 - 10 \times a1) \times \frac{a2}{W2}]$$

Όπου:

W1= βάρος (g) αρχικού δείγματος (περίπου 20 g)
W2= g αλεσμένου δείγματος που εκχυλίστηκε
A1= g ΟΛΟ στα 50 ml διηθήματος
A2= g ΟΛΟ στα W2 g δείγματος

2.6. Προσδιορισμός ινωδών ουσιών (ΙΟ)

Οι υδατάνθρακες που απαντώνται στις φυτικής προέλευσης ζωοτροφές μπορούν να καταταγούν στους μονοσακχαρίτες (κυρίως πεντόζες και εξόζες), τους δισακχαρίτες (κυρίως σακχαρόζη και μαλτόζη), τους τρισακχαρίτες (κυρίως ραφινόζη) και τους πολυσακχαρίτες. Οι τελευταίοι διακρίνονται στους αποθησαυριστικούς (ή αποθηκευτικούς) όπως το άμυλο και οι ινουλίνες και τους ερειστικούς (ή δομικούς), όπως είναι η κυτταρίνη, οι ημικυτταρίνες (κυρίως πεντοζάνες και εξοζάνες) και οι πηκτινικές ύλες (πίν. 1). Οι δομικοί υδατάνθρακες μετέχουν στη δόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων σε διαφορετικά ποσοστά, ανάλογα με την ηλικία του φυτού και τη θέση του κυττάρου στους φυτικούς ιστούς. Στη δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων συμμετέχει επίσης και η λιγνίνη (πολυμερής ένωση κυρίως φαινολικών οξέων), η οποία ενώνεται με φυσικούς δεσμούς με την κυτταρίνη και σχηματίζει ένα σύμπλοκο, τη λιγνινοκυτταρίνη. Η συμμετοχή της λιγνίνης στη δομή των τοιχωμάτων ποικίλει ανάλογα με την ηλικία και το είδος του φυτού. Για την περιγραφή των δομικών πολυσακχαριτών με την τακτική Weende, έχει επικρατήσει ο γενικός όρος **«ινώδεις ουσίες»**.

2.6.1. Αρχή προσδιορισμού

Κατά την αναλυτική τακτική Weende, το δείγμα της ζωοτροφής υποβάλλεται σε διαδοχικό βρασμό (πέψη) με αραιό διάλυμα H_2SO_4 και NaOH, κατόπιν εκχύλισης με αιθέρα (για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών) με σκοπό το διαχωρισμό των ενώσεων της ζωοτροφής σε δύο κατηγορίες. Την κατηγορία των ΟΑΟ και ΕΝΕΟ που εκχυλίζονται και απομακρύνονται κατά τη μεταχείριση της τροφής με τα αντιδραστήρια και την κατηγορία των ινωδών ουσιών (μετά την αποτέφρωση του δείγματος) που είναι ινώδους υφής και μετέχουν στη δόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Τα αντιδραστήρια της μεθόδου επιδρούν και στις δύο αυτές κατηγορίες ενώσεων κατά τρόπο μεταβλητό (βλ. 2.6.8).

2.6.2. Πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή σε απλές και σύνθετες ζωοτροφές με περιεκτικότητα σε ΙΟ από 0 έως 100%. Αν τα δείγματα περιέχουν ΟΛΟ>10%, τότε πρέπει να προηγηθεί εκχύλιση του λίπους πριν την έναρξη της διαδικασίας.

2.6.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός που απαιτείται για τον προσδιορισμό των ΟΛΟ περιλαμβάνει:

- Εργαστηριακούς μύλους άλεσης ζωοτροφών (εικόνα 1, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό ζυγό ακρίβειας 0,1 mg (εικόνα 2, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό κλίβανο ξήρανσης ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (50-150°C) με θερμοστάτη ακρίβειας τουλάχιστον ±5°C (εικόνα 4, Παράρτημα Α)
- Ξηραντήρα με πλάκα πορσελάνης, κάτω από την οποία τοποθετείται ξηραντικό μέσο ($CaCl_2$ ή gel σιλικόνης) (εικόνα 5, Παράρτημα Α).
- Εργαστηριακό κλίβανο αποτέφρωσης ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (100-900°C) με θερμοστάτη ακρίβειας τουλάχιστον ±20°C (εικόνα 12, Παράρτημα Α)

- Συσκευή πέψης (ANKOM^{200}, ANKOM Technology) με θερμοκρασία λειτουργίας 100±0,5°C και πίεσης 10-25 psi, η οποία φέρει ενσωματωμένο αναδευτήρα (≈ 65 rpm) (εικόνα 24, Παράρτημα Α).
- Σακίδια-ηθμούς για τη συσκευή πέψης (εικόνα 25, Παράρτημα Α).
- Συσκευή θερμοσυγκόλλησης σακιδίων (εικόνα 26, Παράρτημα Α)
- Ποτήρια ζέσης, ογκομετρικές φιάλες και ογκομετρικοί κύλινδροι διαφόρων όγκων (εικόνα 20, Παράρτημα Α)

2.6.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)*

- Διάλυμα 0,255N H_2SO_4 [14,1 ml (ή 26 g) πυκνού (96-98%) H_2SO_4 σε 2000 ml απεσταγμένο H_20/20°C]
- Διάλυμα 0,313N NaOH (25,0 g 99,9% NaOH σε 2000 ml απεσταγμένο H_20/20°C)

Με βάση τα όσα αναφέρονται στο 2.6.8, θ απαιτηθεί επιπλέον:

- Διάλυμα 0,5N HCl (43 ml πυκνού HCl σε 1000 ml απεσταγμένο H_20/20°C)

2.6.5. Διαδικασία προσδιορισμού

Η διαδικασία που ακολουθεί, περιγράφει τον προσδιορισμό των ΙΟ στη συσκευή ANKOM^{200} που υπάρχει στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής. Για κάθε άλλη συσκευή, πρέπει να εφαρμόζονται πιστά οι οδηγίες του κατασκευαστή.

- Ζυγίζονται τα σακίδια (W1) με ακρίβεια 0,1 mg, αφού προηγουμένως έχουν σημανθεί με ανεξίτηλο μαρκαδόρο. Τα σακίδια δεν χρειάζονται ξήρανση.
- Στη συνέχεια ζυγίζονται 0,95-1,00 g δείγματος (W2) με ακρίβεια 0,1 mg, απευθείας μέσα στα σακίδια. Έπειτα τα σακίδια θερμοσυγκολλούνται (σφραγίζονται ανά ένα) στα 4 περίπου mm από την πάνω (ανοικτή) πλευρά.
- Ζυγίζεται ένα άδειο σακίδιο (τυφλό δείγμα) για να ελεγχθεί η διαδικασία (βλ. 2.6.7).
- Τα σακίδια εμβαπτίζονται σε πετρελαϊκό αιθέρα εντός ποτηριού ζέσης των 250 ml για 10 min. Στη συνέχεια ξηραίνονται στον αέρα και ανακινούνται για να απλωθεί ομοιόμορφα το δείγμα εντός του σακιδίου (και να αποφευχθεί σβόλιασμα).
- Τα σακίδια τοποθετούνται ανά 3 σε 8 ειδικές θήκες (μέγιστο 24 σακίδια) και τοποθετούνται στη συσκευή. Πάνω στις θήκες τοποθετείται ειδικό βαρίδι για να κρατάει τα δείγματα εντός του χρησιμοποιούμενου διαλύματος. Προστίθενται περίπου 1800-1900 ml δμ 0,255N H_2SO_4 (ελάχιστος όγκος διαλύματος= 1500 ml, ανεξαρτήτως αριθμού δειγμάτων).
- Η συσκευή σφραγίζεται και ενεργοποιείται η ανάδευση και η θέρμανση (100°C). Τα δείγματα παραμένουν (πέπτονται) για 40 min συνολικά.
- Έπειτα απενεργοποιείται η συσκευή, απομακρύνεται το διάλυμα από ειδική βαλβίδα, η συσκευή ανοίγεται και τα σακίδια ξεπλένονται 3 φορές με 1900 ml θερμού (90-95°C) απιονισμένου νερού.
- Ακολούθως προστίθενται περίπου 1800-1900 ml δμ 0,313N NaOH (ελάχιστος όγκος διαλύματος= 1500 ml, ανεξαρτήτως αριθμού δειγμάτων), η συσκευή σφραγίζεται, ενεργοποιείται η ανάδευση

και η θέρμανση (100°C) και τα δείγματα πέπτονται για άλλα 40 min. Ακολουθούν εκπλύσεις με θερμό νερό, όπως και στην πρώτη φάση.

- Τα σακίδια βγαίνουν από τη συσκευή, πιέζονται ελαφρά για να απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα νερού και εμβαπτίζονται σε ακετόνη εντός ποτηριού ζέσης των 250 ml για 10 min. Στη συνέχεια ξηραίνονται στον κλίβανο (103°C) για 2 έως 5 ώρες.
- Τα σακίδια ψύχονται σε ξηραντήρα μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος και καταγράφεται το μικτό βάρος με ακρίβεια 0,1 mg.
- Έπειτα τοποθετούνται σε προξηραμένες κάψες, καταγράφεται το μικτό βάρος κάψας και σακιδίου (α1) και αποτεφρώνονται στους 550±20°C για 5-6 ώρες (ή στους 600±20°C για 2 ώρες). Οι κάψες ψύχονται σε ξηραντήρα μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος και καταγράφεται το μικτό βάρος (α2) με ακρίβεια 0,1 mg.

2.6.6. Υπολογισμοί

Ο υπολογισμός των ΙΟ (%) γίνεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{IO (\%)} = \frac{[(\alpha 1 - \alpha 2)] - \text{W1} \times C) \times 100}{\text{W2}}$$

Όπου:
W1= βάρος κενού σακιδίου (g)
W2= βάρος δείγματος (g)
α1= μικτό βάρος κάψας και σακιδίου (g)
α2= μικτό βάρος κάψας και τέφρας (g) και
C= συντελεστής διόρθωσης σακιδίου (απώλεια βάρους στην αποτέφρωση/αρχικό βάρος σακιδίου)

Οι ΙΟ μπορούν στη συνέχεια να εκφραστούν ως % της ΞΟ της ζωοτροφής, ως ακολούθως:
ΙΟ (% ΞΟ)= ΙΟ (%)×100/ΞΟ (%)

2.6.7. Διασφάλιση ποιότητας αποτελεσμάτων

- Σε κάθε παρτίδα δειγμάτων συνιστάται η ανάλυση ενός δείγματος ελέγχου (ΔΕ). Το δείγμα αυτό μπορεί να παρασκευαστεί από κάποια ζωοτροφή παρόμοιας φύσης με αυτές θα αναλυθούν στο εργαστήριο (π.χ. άλεσμα υποπροϊόντος σπορελαιουργίας). Λαμβάνονται 3-4 kg του επιλεχθέντος ΔΕ, αλέθονται (κόσκινο διαμέτρου 1 mm, όπως και τα προς ανάλυση δείγματα) και φυλάσσονται σε δροσερό και ξηρό μέρος. Το ΔΕ αναλύεται 15-20 φορές όπως περιγράφει η διαδικασία της μεθόδου. Υπολογίζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και οριοθετείται ένα 2% ως μέγιστη επιτρεπτή απόκλιση από το μέσο όρο.
- Σε κάθε παρτίδα δειγμάτων χρησιμοποιείται ένα κενό σακίδιο για να γίνει διόρθωση στον υπολογισμό των ΙΟ. Το κενό σακίδιο εξυπηρετεί ως δείκτης απώλειας δείγματος από τα σακίδια. Συντελεστής διόρθωσης C μεγαλύτερος του 1,0000, δείχνει ότι λεπτά τεμαχίδια έχουν διαφύγει από τα σακίδια των δειγμάτων και έχουν εναποτεθεί στο κενό σακίδιο. Σε αυτή την περίπτωση υπάρχει σφάλμα στον προσδιορισμό των ΙΟ. Αν παρατηρηθεί ότι C>1,000 τότε πρέπει να γίνουν

αλλαγές στη διαδικασία άλεσης των δειγμάτων (π.χ. χρήση μεγαλύτερου κόσκινου) για να περιοριστεί η δημιουργία πολύ λεπτών συστατικών.

- Ο προσδιορισμός των ΙΟ πρέπει να εκτελείται σε δύο παράλληλα δείγματα. Η διαφορά μεταξύ των δύο παράλληλων προσδιορισμών δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,3% σε απόλυτη τιμή για περιεκτικότητες ΙΟ<10% και το 3% σε σχετική τιμή (ως προς την υψηλότερη τιμή) για περιεκτικότητες ΙΟ≥10%.

2.6.8. Παρατηρήσεις – Παραλλαγές διαδικασίας

- Με την εφαρμογή της παραπάνω μεθοδολογίας, δε γίνεται πλήρης διαχωρισμός των χημικών ενώσεων στις 2 (ΙΟ και ΕΝΕΟ) κατηγορίες. Ο λόγος είναι ότι η κυτταρίνη είναι περισσότερο ανθεκτική στα αντιδραστήρια της μεθόδου και μπορεί να παραμείνει εξολοκλήρου στις ΙΟ (πίν. 3), ανάλογα με το είδος της ζωοτροφής που αναλύεται. Η λιγνίνη και οι ημικυτταρίνες υδρολύονται μερικώς (ιδιαίτερα με το δμ NaOH) και απαντώνται και στις ΙΟ και στις ΕΝΕΟ σε ποσότητες που παραλλάσσουν ευρέως, ανάλογα με το είδος της ζωοτροφής. Αυτό δείχνει ότι οι ΙΟ δεν αποτελούν αξιόπιστη μέθοδο περιγραφής του συνόλου των κυτταρικών τοιχωμάτων των ζωοτροφών. Παρόλα αυτά ο προσδιορισμός τους κρίνεται ακόμα σκόπιμος, διότι αποτελούν ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ζωοτροφών που καθορίζει την καταλληλότητα και το βαθμό συμμετοχής τους στα σιτηρέσια των ζώων.

Πίνακας 3. *Αποτελέσματα επίδρασης των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται κατά τον προσδιορισμό των ΙΟ, στην αναλυτική τακτική Weende*

Κατηγορία συστατικών	**Υδρόλυση και εκχύλιση από βρασμό**	
	με 0,255N H_2SO_4	**με 0,313N NaOH**
Ολικές αζωτούχες ουσίες	Μερική	Πλήρης
Σάκχαρα και άμυλο	Πλήρης	-
Κυτταρίνη	Ασθενής	Ασθενής
Ημικυτταρίνες	Μεταβλητή	Εκτεταμένη, μεταβλητή
Λιγνίνη	Ασθενής	Εκτεταμένη, μεταβλητή

- Ζωοτροφές με περιεκτικότητα σε ανθρακικά άλατα (εκφρασμένα ως $CaCO_3$) μεγαλύτερη του 5% πρέπει να υφίστανται κατεργασία με HCl για την απομάκρυνσή τους, διότι μειώνουν την κανονικότητα του δμ 0,255N H_2SO_4 και κατά συνέπεια τη δραστικότητά του. Για το σκοπό αυτό, το δείγμα εκπλύνεται 3 φορές με 30 ml δμ 0,5N HCl σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά από κάθε προσθήκη HCl, το δείγμα αφήνεται για 1 min, διηθείται και εκπλύνεται με 30 ml κρύο απεσταγμένο νερό.

2.7. Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα αναλυτικής τακτικής WEENDE

Όπως κάθε αναλυτική τακτική, έτσι και η Weende έχει πλεονεκτήματα, αλλά και μειονεκτήματα, όσον αφορά στον προσδιορισμό της χημικής σύστασης των ζωοτροφών.

Στα πλεονεκτήματα της τακτικής μπορούν να συμπεριληφθούν:

- Ο σχετικά απλός και μικρής αξίας απαιτούμενος εξοπλισμός, τον οποίο σήμερα διαθέτουν τα περισσότερα εργαστήρια ποιοτικού ελέγχου ζωοτροφών.
- Η σε πρώτο βαθμό εκτίμηση της θρεπτικής αξίας των ζωοτροφών. Η υψηλή περιεκτικότητα σε ΙΟ και η μικρή σε ΟΛΟ χαρακτηρίζουν μία ζωοτροφή ως χαμηλής θρεπτικής αξίας γενικά.
- Η σύσταση των περισσότερων ζωοτροφών που αναφέρεται σε διάφορες βάσεις δεδομένων παγκοσμίως, έχει βασιστεί σε μεγάλο μέρος στην αναλυτική τακτική Weende. Στις βάσεις αυτές στηρίζεται η κατάρτιση των σιτηρεσίων των ζώων.

Τα δε μειονεκτήματα της τακτικής περιλαμβάνουν:

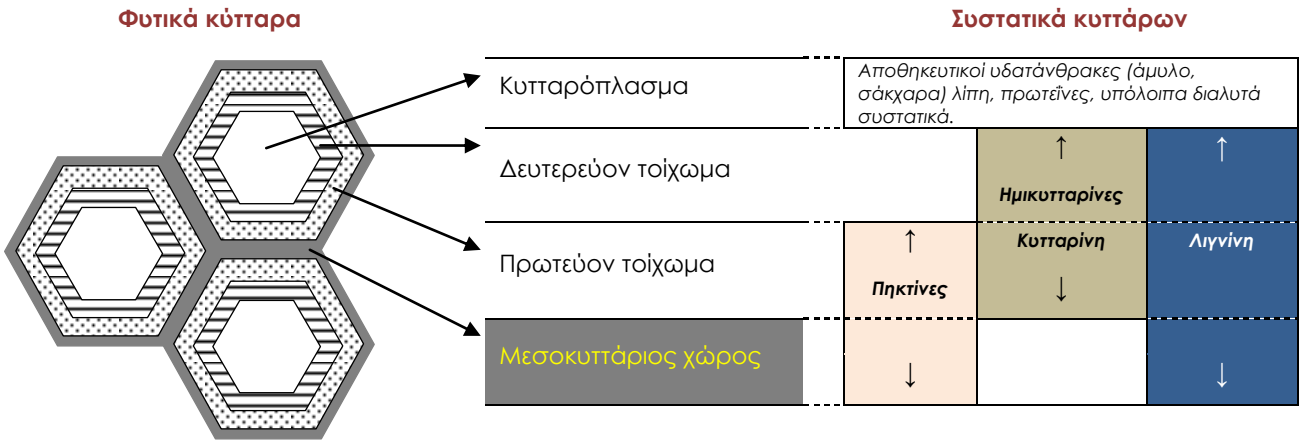
- Την αδυναμία προσδιορισμού των επί μέρους θρεπτικών συστατικών των ζωοτροφών. Με την τακτική προσδιορίζονται κατηγορίες χημικών ενώσεων, κάθε μία εκ των οποίων αποτελείται από πολλά διαφορετικά θρεπτικά συστατικά.
- Τη χαμηλή ακρίβεια των προσδιορισμών. Ενώσεις όπως οι ΟΑΟ, αποτελούν αδρή εκτίμηση της πρωτεΐνης που περιέχεται στις ζωοτροφές.
- Τη μη παροχή στοιχείων για τα άπεπτα ή τα άνευ σημασίας θρεπτικά συστατικά. Για παράδειγμα οι στερόλες και οι χρωστικές στο αιθερικό εκχύλισμα, καθώς και η μερική υδρόλυση της άπεπτης λιγνίνης, οδηγούν σε υπερεκτίμηση ή υποεκτίμηση της θρεπτικής αξίας των ζωοτροφών.
- Το χρονοβόρο της διαδικασίας των προσδιορισμών. Αν και οι περισσότερες από τις σύγχρονες αναλυτικές συσκευές διευκολύνουν σε πολύ μεγάλο τις χημικές αναλύσεις, οι επανειλημμένες ζυγίσεις και χειρισμοί αυξάνουν το κόστος εργασίας.

3.1. Γενικά

3.1.1. Τα συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων

Αρχικά, οι ινώδεις ουσίες (ή φυτικές ίνες στην ορολογία της διατροφής του ανθρώπου) είχαν οριστεί ως τα σκελετικά υπολείμματα των φυτικών κυττάρων τα οποία δεν υδρολύονται από τα ενδογενή ένζυμα του πεπτικού συστήματος του ανθρώπου και των ζώων. Μετέπειτα δόθηκαν διάφοροι άλλοι ορισμοί πλησιέστεροι στη δομή του φυτικού κυττάρου, που λάμβαναν υπόψη μόνο τους δομικούς πολυσακχαρίτες και τη λιγνίνη. Παρά την έρευνα που έχει διεξαχθεί, δεν έχει βρεθεί ακόμα ένας κοινά αποδεκτός ορισμός για τις ινώδεις ουσίες. Αυτό οφείλεται στο ότι: α) τα κυτταρικά τοιχώματα χαρακτηρίζονται από μία πολύπλοκη δομή (πολλά διαφορετικά πολυμερή υδατανθράκων), β) τα πολυμερή που απαρτίζουν τα κυτταρικά τοιχώματα είναι πολύ συχνά συνδεδεμένα με άλλες ουσίες του φυτικού κυττάρου, όπως είναι οι αζωτούχες ουσίες και γ) η χημική δομή και η οργάνωση των πολυσακχαριτών στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα παραλλάσει ευρέως, ανάλογα με την προέλευση του φυτού (π.χ. χόρτα, σανοί, ή σπέρματα ψυχανθών κλπ.).

Τα φυτικό κυτταρικό τοίχωμα συντίθεται κατά βάση από μικροϊνίδια κυτταρίνης, τα οποία σχηματίζουν ένα ισχυρό δίκτυο που δίνει ακαμψία στο φυτό. Αυτά τα μικροϊνίδια είναι ενσωματωμένα μέσα σε ένα δίκτυο λιγνίνης (προπαν-φαινολικές μονάδες), το οποίο συγκρατεί στη θέση τους, άλλους πολυσακχαρίτες (αλλά και γλυκοπρωτεΐνες), όπως είναι οι ημικυτταρίνες (αραβοξυλάνες, ξυλογλυκάνες κλπ.) και οι πηκτινικές ύλες. Όλα αυτά τα προαναφερθέντα πολυμερή απαντώνται σε διαφορετικές αναλογίες, ανάλογα με το τμήμα του τοιχώματος (σχήμα 1). Για παράδειγμα, καθώς αυξάνεται η ηλικία του φυτού, το δίκτυο της λιγνίνης επεκτείνεται από το δευτερεύον (ώριμο τμήμα) στο πρωτεύον (νεαρό τμήμα) κυτταρικό τοίχωμα, με τρόπο τέτοιο ώστε να καλύπτει τα μικροϊνίδια της κυτταρίνης, αυξάνοντας έτσι τη συνοχή του φυτικού ιστού.



Σχήμα 1. *Παρουσίαση των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων και των κύριων συστατικών τους.*

Η παραλλακτικότητα της σύστασης των κυτταρικών τοιχωμάτων καθιστά δύσκολη την κατανόηση των δομικών πολυσακχαριτών. Προκειμένου λοιπόν να διευκολυνθεί η διερεύνησή τους, οι αποκαλούμενες με το γενικό όρο ινώδεις ουσίες (δηλ. οι δομικοί πολυσακχαρίτες) μπορούν να ταξινομηθούν σε 5 κύρια κλάσματα, ανάλογα με τη χημική τους δομή και τις φυσικές τους ιδιότητες (σχήμα 2): 4 κλάσματα μη υδατοδιαλυτών πολυμερών (λιγνίνη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνες και πηκτινικές ύλες) και ένα κλάσμα διάφορων υδατοδιαλυτών πολυμερών (πολυσακχαριτών και ολιγοσακχαριτών). Η αναλυτική παρουσίαση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων αυτών των κλασμάτων κρίνεται χρήσιμη για την περαιτέρω κατανόηση της αναλυτικής τακτικής Van Soest.

Ινώδεις ουσίες (ΙΟ)	Μη πολυσακχαρίτες	Λιγνίνη		**Μη υδατοδιαλυτά πολυμερή**
	Μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες (ΜΑΠ)[1]	Κυτταρίνη		
		Ημικυτταρίνες		
		Πηκτινικές ύλες		
		Υδατοδιαλυτοί ΜΑΠ (βατερσόλη, πηκτίνες, β-γλυκάνες, αραβοξυλάνες)		**Υδατοδιαλυτά πολυμερή**

[1] *Οι δομικοί πολυσακχαρίτες αποκαλούνται και μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες.*

Σχήμα 2. *Ταξινόμηση των ινωδών ουσιών σε πέντε κύρια κλάσματα.*

Η ***λιγνίνη*** (ή ακριβέστερα οι λιγνίνες) αποτελεί το μοναδικό μη πολυσακχαριδικό πολυμερές των κυτταρικών τοιχωμάτων. Μπορεί να χαρακτηριστεί ως πολυδιακλαδισμένο και πολυσύνθετο δίκτυο (μεγάλου μοριακού βάρους), που δομείται από 3 κυρίως προπαν-φαινολικές μονάδες (κονυφερυλικό, κουμαρυλικό και σιναπυλικό οξύ). Τα δίκτυα των λιγνινών συγκρατούν τα υπόλοιπα πολυμερή στη θέση τους, εμποδίζουν τη διείσδυση του νερού, καθιστούν τα κυτταρικά τοιχώματα πιο ισχυρά και κατά συνέπεια πιο ανθεκτικά έναντι διάφορων παραγόντων (π.χ. πίεση, κρούση, βακτηριακά ένζυμα κλπ.). Η λιγνίνη ουσιαστικά δεν διαλύεται σε βάσεις ή οξέα (υπάρχει όμως μία μεταβλητή έκταση υδρόλυσης) και από βιολογικής άποψης δεν αποτελεί αξιοποιήσιμη ουσία για κανένα είδος ζώου.

Η ***κυτταρίνη*** είναι ο κυριότερος δομικός πολυσακχαρίτης των κυτταρικών τοιχωμάτων. Αποτελεί ένα ομοπολυμερές που σχηματίζεται από ευθείες αλυσίδες μονάδων γλυκόζης (συνδεδεμένες με β1-4 δεσμούς), γνωστές και ως γλυκάνες. Ο βαθμός πολυμερισμού είναι συνήθως μεταξύ 8000 και 10000 μονάδων γλυκόζης. Οι μεμονωμένες αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και σχηματίζουν μικροϊνίδια, τα οποία χρησιμεύουν στη στήριξη του φυτικού ιστού. Η κυτταρίνη είναι διαλυτή μόνο σε ισχυρά οξέα. Μπορεί να υδρολυθεί από την επίδραση βακτηριακών ενζύμων (τα οποία μπορούν να διασπάσουν τους β1-4 δεσμούς), ενώ δεν επηρεάζεται σχεδόν καθόλου από τα

ενδογενή ένζυμα του πεπτικού συστήματος των ζώων. Λόγω του τελευταίου, η αξιοποίηση της κυτταρίνης είναι μερική στα μηρυκαστικά και πολύ χαμηλή στα υπόλοιπα είδη ζώων.

Οι ***ημικυτταρίνες*** περιλαμβάνουν διάφορους πολυσακχαρίτες με μικρότερο βαθμό πολυμερισμού σε σύγκριση με την κυτταρίνη. Βασικά, αποτελούνται από δομικές μονάδες ξυλόζης (συνδεδεμένες με β1-4 δεσμούς), μαννόζης ή γλυκόζης που μπορούν να συνδεθούν (με δεσμούς υδρογόνου) με την κυτταρίνη σε μεγάλη έκταση. Τόσο οι εκάστοτε δομικές μονάδες, όσο και ο τρόπος αλλά και η έκταση της σύνδεσης, ποικίλει ανάλογα με την προέλευση του φυτού. Για παράδειγμα, στα δικοτυλήδονα φυτά (στελέχη και σπέρματα) οι ξυλογλυκάνες αποτελούν τον κυρίαρχο πολυσακχαρίτη του πρωτεύοντος κυτταρικού τοιχώματος, ενώ στους δημητριακούς καρπούς απαντώνται κυρίως γλυκάνες μικτής σύνδεσης (β1-3,4) και αραβινοξυλάνες. Εκτός των παραπάνω, οι ημικυτταρίνες περιλαμβάνουν και άλλα διακλαδισμένα ετεροπολυμερή (δομικές μονάδες συνδεδεμένες με β1-3, β1-6, α1-4, α1-3 δεσμούς) όπως οι αραβινογαλακτάνες (σόγια), οι γαλακτομαννάνες (σπέρματα ψυχανθών), οι γλυκομαννάνες και πολλές άλλες κατηγορίες. Οι ημικυτταρίνες παρουσιάζουν μεταβλητή διαλυτότητα σε ασθενείς βάσεις ή καυτά αραιωμένα οξέα, ενώ κάποιες από αυτές είναι υδατοδιαλυτές, ανάλογα με τη δομή τους. Από βιολογικής άποψης, αξιοποιούνται σε μέτριο βαθμό από τα μηρυκαστικά και σε χαμηλό βαθμό στα υπόλοιπα είδη ζώων.

Οι ***πηκτίνες*** αποτελούν το ένα κλάσμα των αποκαλούμενων **πηκτινικών υλών** ή **ουσιών**. Πρόκειται ουσιαστικά για ομάδα διαφόρων πολυσακχαριτών που σχηματίζονται κατά βάση από ευθείες αλυσίδες γαλακτουρονικών οξέων (σακχαρικά οξέα όπως το D-γλυκουρονικό, το D-γαλακτουρονικό, το D-μαννουρονικό και το L-ιδουρονικό οξύ), διακλαδισμένων πάντα με ουδέτερα σάκχαρα (κυρίως αραβινόζη και γαλακτόζη). Από θέση σε θέση του μορίου τους, οι αλυσίδες των γαλακτορουνικών οξέων διακόπτονται από μία μονάδα L-ραμνόζης, με αποτέλεσμα την παρέκκλισή τους (ραμνο-γαλακτουράνες). Το άλλο κλάσμα των πηκτινικών υλών περιλαμβάνει τους **ουδέτερους πολυσακχαρίτες** (αραβινάνες, γαλακτάνες, αραβινογαλακτάνες). Οι πηκτινικές ύλες απαντώνται στη μεσοκυττάρια ουσία και είναι στενά συσχετισμένες με το πρωτεύον κυτταρικό τοίχωμα (νεαροί ιστοί). Χρησιμεύουν στην συγκόλληση των φυτικών κυττάρων μεταξύ τους. Διαλύονται εύκολα σε αραιά οξέα και βάσεις, ενώ κάποιες κατηγορίες πηκτινικών υλών είναι υδατοδιαλυτές.

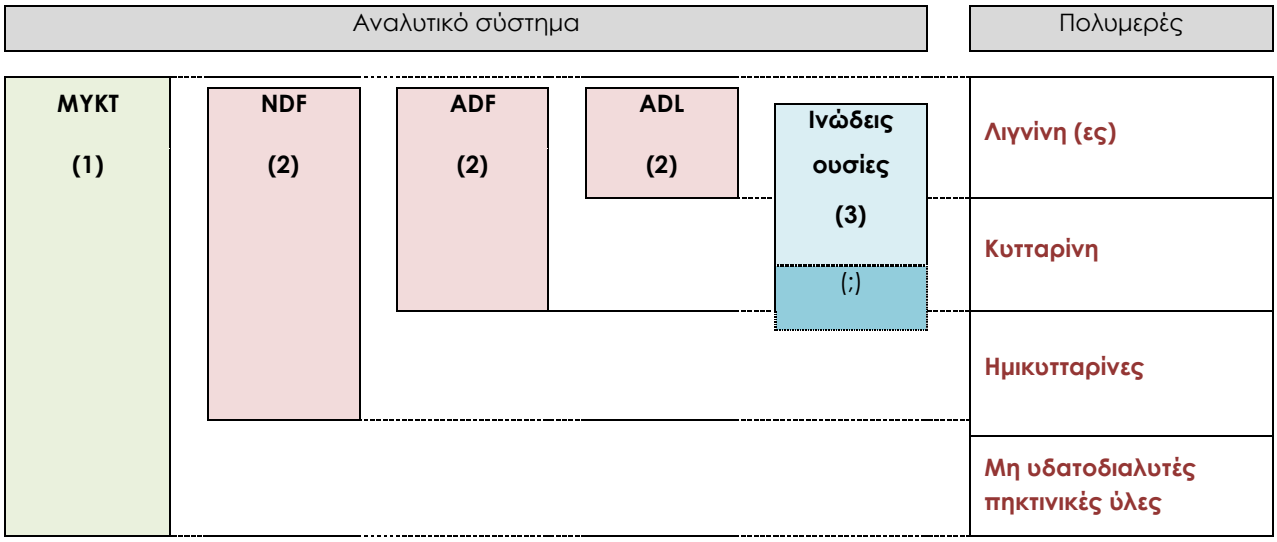
Τα **υδατοδιαλυτά πολυμερή** περιλαμβάνουν διάφορες κατηγορίες δομικών υδατανθράκων με μικρό βαθμό πολυμερισμού (15-2000 μονάδες γλυκόζης) σε σύγκριση με την κυτταρίνη (β-γλυκάνες). Τα υδατοδιαλυτά πολυμερή απαντώνται κατά κανόνα σε μικρές ποσότητες στις ζωοτροφές και σε αυτά συμπεριλαμβάνονται οι διαλυτές ημικυτταρίνες (όπως οι αραβινοξυλάνες και οι β-γλυκάνες), διάφοροι ολιγοσακχαρίτες (όπως οι α-γαλακτοσίδες) και διάφορες διαλυτές πηκτινικές ύλες.

3.1.2. Μέθοδοι προσδιορισμού των συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων

Για τον προσδιορισμό της σύστασης των κυτταρικών τοιχωμάτων έχουν επινοηθεί κατά καιρούς διάφορα αναλυτικά συστήματα. Πρακτικά, η επιλογή κάποιου ή κάποιων από αυτά πρέπει να γίνεται με συγκεκριμένα κριτήρια, τα οποία δε σχετίζονται απαραίτητα με την ακριβέστερη δυνατή βιοχημική ανάλυση των συστατικών (ή κλασμάτων) των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η μέθοδος που θα επιλεγεί πρέπει:

α) να έχει πρακτική διατροφική σημασία για τα ζώα ή να παίζει σημαντικό ρόλο στην εκτίμηση ή πρόβλεψη της θρεπτικής αξίας των ζωοτροφών (π.χ. στην εκτίμηση της πεπτής ενέργειας) και
β) να μπορεί να εφαρμόζεται ως ανάλυση ρουτίνας, με υψηλή επαναληψιμότητα (και χαμηλό κόστος), ώστε να είναι δυνατή ανά πάσα στιγμή η κατάρτιση των πλέον ισόρροπων σιτηρεσίων.

Σήμερα, κανένα από τα υπάρχοντα αναλυτικά συστήματα δεν είναι βιοχημικά (ως προς τον προσδιορισμό των συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων) ακριβές. Κάποια από αυτά όμως πληρούν τα παραπάνω αναφερόμενα κριτήρια και χρησιμοποιούνται ως μέθοδοι ρουτίνας, όπως ο προσδιορισμός των ινωδών ουσιών κατά Weende (Henneberg and Stohmann, 1859), ο προσδιορισμός τριών κλασμάτων (NDF, ADF και ADL) των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά τη διαδοχική μέθοδο Van Soest (1991) και ο προσδιορισμός των μη υδατοδιαλυτών κυτταρικών τοιχωμάτων κατά Carré και Brillouet (1989). Μία γρήγορη σύγκριση αυτών των αναλυτικών συστημάτων (σχήμα 3) δείχνει ότι προσδιορίζουν ουσιαστικά διαφορετικά συστατικά (πολυμερή των πολυσακχαριτών) των κυτταρικών τοιχωμάτων.



Σχήμα 3. *Αναλυτικά συστήματα για τον προσδιορισμό της σύστασης των κυτταρικών τοιχωμάτων. (1) ΜΥΚΤ= μη υδατοδιαλυτά κυτταρικά τοιχώματα κατά Carré και Brillouet (1989). (2) κλάσματα κυτταρικών τοιχωμάτων κατά Van Soest (1991). (3) ινώδεις ουσίες κατά Henneberg and Stohmann, 1859.*

Η μέθοδος Weende είναι γρήγορη, απλή, χαμηλού κόστους και χρησιμοποιείται ευρέως σε όλο τον κόσμο. Ουσιαστικά προσδιορίζει ένα υπόλειμμα κυτταρικών τοιχωμάτων που περιλαμβάνει εν μέρει πολυμερή, όπως η κυτταρίνη, η λιγνίνη, η κουτίνη και η σουβερίνη. Κύριο περιορισμό της μεθόδου αποτελεί το ότι ο όρος ινώδεις ουσίες είναι πολύ σφαιρικός και περιλαμβάνει διαφορετικές ποσότητες πολυμερών ανάλογα με την πρώτη ύλη που αναλύεται κάθε φορά [30-100% κυτταρίνη, 14-20% πεντοζάνες (κατηγορία ημικυτταρινών) και 16-90% λιγνίνη]. Συνεπώς δεν αποτελεί επαρκώς

αξιόπιστη μέθοδο για την περιγραφή των κυτταρικών τοιχωμάτων, που είναι απαραίτητη για κάποια είδη ζώων (π.χ. κουνέλια).

Ο προσδιορισμός των μη υδατοδιαλυτών κυτταρικών τοιχωμάτων κατά Carré και Brillouet, αναλύει ένα κλάσμα (όπως και στη Weende) που περιέχει όλα σχεδόν τα συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων, αλλά είναι πιο ακριβής εκτίμηση από την αντίστοιχη της μεθόδου Weende διότι περιλαμβάνει και τις μη υδατοδιαλυτές πηκτίνες (σχήμα 3). Η τεχνική αυτή αρχικά αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε στα πτηνά διότι δίνει ένα απλό κριτήριο για την πρόβλεψη της μεταβολιστέας ενέργειας και στη συνέχεια επεκτάθηκε και στα υπόλοιπα είδη μονογαστρικών ζώων.

Η τακτική Van Soest αποσκοπεί στον προσδιορισμό κλασμάτων (κατηγορίες πολυμερών) των συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων, τα οποία είναι κατά το δυνατόν απαλλαγμένα από άλλα συστατικά των ζωοτροφών (όπως π.χ. οι πρωτεΐνες) απομακρύνοντας με κατάλληλα διαλύματα το κυτταρικό περιεχόμενο. Η μέθοδος αναπτύχθηκε αρχικά για τις χονδροειδείς ζωοτροφές (Van Soest-Moore, 1963), στη συνέχεια όμως τροποποιήθηκε με την προσθήκη πρωτεολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων στη διαδικασία, για τη χρησιμοποίησή της και στις συμπυκνωμένες ζωοτροφές (Van Soest et al., 1991). Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι προσδιορίζονται 3 κλάσματα (ομάδες) των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων (σχήμα 3):

- Το **NDF** κλάσμα μετά από βρασμό του δείγματος σε διάλυμα ουδέτερης αντίδρασης-NDS, για την έκπλυση του κυτταρικού περιεχομένου. Το **NDF** περιλαμβάνει τη λιγνίνη, την κυτταρίνη και τις ημικυτταρίνες,
- Το **ADF** κλάσμα μετά από βρασμό του δείγματος σε διάλυμα όξινης αντίδρασης-ADS για την απομάκρυνση των ημικυτταρινών (οι οποίες είναι διαλυτές σε ασθενή οξέα, βλ. 3.1.1). Συνεπώς, το **ADF** περιλαμβάνει τη λιγνίνη και την κυτταρίνη και
- Το **ADL** κλάσμα μετά από μεταχείριση του δείγματος με 72% H_2SO_4, για την απομάκρυνση της κυτταρίνης (η οποία είναι διαλυτή σε πυκνά οξέα, βλ. 3.1.1) και το οποίο αντιπροσωπεύει τη λινγίνη,

με τα οποία μπορούν να εκτιμηθούν εκ διαφοράς οι **ημικυτταρίνες** (= NDF-ADF) και η **κυτταρίνη** (= ADF-ADL).

Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που περιορίζουν την ακρίβειά της:

- Το NDF μπορεί να έχει δεσμευμένο άζωτο (N-NDF) που παραλλάσει ευρέως (1-20% στις συμπυκνωμένες ζωοτροφές). Μπορεί να περιέχει επίσης υπολείμματα αμύλου ή πηκτινών,
- Οι πηκτινικές ουσίες και οι υδατοδιαλυτοί μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες απομακρύνονται (μαζί με το κυτταρικό περιεχόμενο) με το NDS αντιδραστήριο κατά τον προσδιορισμό του NDF,
- Η προσθήκη πρωτεολυτικών και αμυλολυτικών ενζύμων στη διαδικασία δεν είναι ακόμα επαρκώς τυποποιημένη και
- Κάποια ποσότητα ημικυτταρινών μπορεί να βρεθεί στο ADF κλάσμα.

Τα παραπάνω μειονεκτήματα είναι ιδιαίτερα έντονα όταν δεν χρησιμοποιούνται ένζυμα κατά τη διαδικασία κλασμάτωσης και όταν η μέθοδος δεν εφαρμόζεται διαδοχικά, αλλά χρησιμοποιούνται 2 ξεχωριστά δείγματα (ένα για το NDF και ένα για το ADF). Παρά τα μειονεκτήματα αυτά, η διαδοχική μέθοδος Van Soest (ανάλυση κλασμάτων στο ίδιο δείγμα) χρησιμοποιείται σήμερα σε πολύ μεγάλη

έκταση, διότι η τεχνική της είναι σχετικά απλή, γρήγορη και δίνει καλύτερη εικόνα και περισσότερες πληροφορίες για τη σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων, σε σύγκριση με τη Weende ή την Carré και Brillouet.

3.2. Διαδοχικός προσδιορισμός των κλασμάτων NDF, ADF και ADL

3.2.1. Αρχή προσδιορισμού

Κατά τη διαδοχική μέθοδο Van Soest, το ίδιο δείγμα της ζωοτροφής (κατόπιν εκχύλισης με αιθέρα) υποβάλλεται σε διαδοχικό βρασμό (πέψη) αρχικά με το διάλυμα ουδέτερης αντίδρασης (NDS), στη συνέχεια με το διάλυμα όξινης αντίδρασης (ADS) και τέλος υφίσταται την επίδραση πυκνού διαλύματος H_2SO_4 (σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Σκοπός της αναλυτικής τακτικής είναι: α) η απομάκρυνση του κυτταρικού περιεχομένου με το NDS διάλυμα και β) ο προσδιορισμός των κλασμάτων των δομικών πολυσακχαριτών (NDF, ADF) και της λιγνίνης (ADL) που αποτελούν συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων (μετά την αποτέφρωση του δείγματος για την απομάκρυνση της αδιάλυτης στα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια ανόργανης ουσίας).

3.2.2. Πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή σε απλές και σύνθετες ζωοτροφές με περιεκτικότητα σε NDF, ADF ή ADL πάνω από 1%. Αν τα δείγματα περιέχουν ΟΛΟ>5%, τότε πρέπει να προηγηθεί εκχύλιση του λίπους πριν την έναρξη της διαδικασίας. Αν οι ζωοτροφές περιέχουν άμυλο (π.χ. δημητριακοί καρποί ή σύνθετες ζωοτροφές με συμμετοχή δημητριακών καρπών ή άλλων αμυλούχων πρώτων υλών) πρέπει να χρησιμοποιείται θερμοάντοχη αμυλάση μαζί με το διάλυμα NDS (δηλ. μόνο κατά τον προσδιορισμό του NDF). Αλλιώς το άμυλο διαλυτοποιείται και δεν απομακρύνεται επαρκώς, με αποτέλεσμα οι τιμές NDF να παρουσιάζονται πλασματικά υψηλότερες.

3.2.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός που απαιτείται για τον προσδιορισμό των ΟΛΟ περιλαμβάνει:

- Εργαστηριακούς μύλους άλεσης ζωοτροφών (εικόνα 1, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό ζυγό ακρίβειας 0,1 mg (εικόνα 2, Παράρτημα Α)
- Εργαστηριακό κλίβανο ξήρανσης ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (50-150°C) με θερμοστάτη ακρίβειας τουλάχιστον ±5°C (εικόνα 4, Παράρτημα Α)
- Ξηραντήρα με πλάκα πορσελάνης, κάτω από την οποία τοποθετείται ξηραντικό μέσο ($CaCl_2$ ή gel σιλικόνης) (εικόνα 5, Παράρτημα Α).
- Συσκευή πέψης (ANKOM^{200}, ANKOM Technology) με θερμοκρασία λειτουργίας 100±0,5°C και πίεσης 10-25 psi, η οποία φέρει ενσωματωμένο αναδευτήρα (≈ 65 rpm) (εικόνα 24, Παράρτημα Α).
- Σακίδια-ηθμούς για τη συσκευή πέψης (εικόνα 25, Παράρτημα Α).
- Συσκευή θερμοσυγκόλλησης σακιδίων (εικόνα 26, Παράρτημα Α)
- Ποτήρια ζέσης, ογκομετρικές φιάλες και ογκομετρικοί κύλινδροι διαφόρων όγκων (εικόνα 20, Παράρτημα Α)

3.2.4. Χημικά αντιδραστήρια *(σημαντικό: βλ. Παράρτημα Β)*

- Καθαρή ακετόνη
- Διάλυμα ουδέτερης αντίδρασης (NDS) [30 g δωδεκακυλθειικού νατρίου, 18,61 g ένυδρου αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού νατρίου, 6,81 g ένυδρου τετραβορικού νατρίου ($Na_2B_4O_7.10\ H_2O$), 4.56 g άνυδρου όξινου φωσφορικού νατρίου (Na_2HPO_4) ή 5.72 g ένυδρου όξινου φωσφορικού νατρίου ($Na_2HPO_4.H_2O$) και 10 ml 2-αίθοξυ-αιθανόλης (τριαιθυλενογλυκόλη) σε 1000 ml απεσταγμένο H_20/εύρος pH 6,9-7,1].
- α-αμυλάση θερμοάντοχη (έτοιμο εμπορικό διάλυμα βακτηριακής θερμοάντοχης α-αμυλάσης με ενεργότητα 17400 U/ml) ή εναλλακτικά διαλύονται 2.5 mg θερμοάντοχης α-αμυλάσης σε 60.6 ml 0.1 M άνυδρου όξινου φωσφορικού νατρίου (Na_2HPO_4) και 39.2 ml 0.1 δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH2PO4).
- Άνυδρο θειώδες νάτριο (Na_2SO_3).
- Διάλυμα όξινης αντίδρασης (ADS) [20 g κετυλ-τριμέθυλο-αμμωνίο-βρωμιδίου (CTAB) σε 1000 ml διαλύματος 1.00N H_2SO_4].
- Διάλυμα 72% (w/w) H_2SO_4 [652 ml (ή 1200 g) πυκνού (96-98%) H_2SO_4 σε 350 ml απεσταγμένο H_20], διορθωμένο στα 1634 g/lt στους 20°C.

3.2.5. Διαδικασία προσδιορισμού

Η διαδικασία που ακολουθεί, περιγράφει τον προσδιορισμό των NDF και ADF στη συσκευή ANKOM^{200} που υπάρχει στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψης και Διατροφής. Για κάθε άλλη συσκευή, πρέπει να εφαρμόζονται πιστά οι οδηγίες του κατασκευαστή.

- Ζυγίζονται τα σακίδια (W1) με ακρίβεια 0,1 mg, αφού προηγουμένως έχουν σημανθεί με ανεξίτηλο μαρκαδόρο. Τα σακίδια δεν χρειάζονται ξήρανση.
- Στη συνέχεια ζυγίζονται 0,45-0,55 g δείγματος (W2) με ακρίβεια 0,1 mg, απευθείας μέσα στα σακίδια. Έπειτα τα σακίδια θερμοσυγκολλούνται (σφραγίζονται ανά ένα) στα 4 περίπου mm από την πάνω (ανοικτή) πλευρά.
- Ζυγίζεται ένα άδειο σακίδιο (τυφλό δείγμα) για να ελεγχθεί η διαδικασία (βλ. 3.2.7).
- Αν τα δείγματα περιέχουν ΟΛΟ>5%, τα έτοιμα σακίδια εμβαπτίζονται σε ακετόνη εντός ποτηριού ζέσης των 250 ml για 10 min. Στη συνέχεια ξηραίνονται στον αέρα και ανακινούνται για να απλωθεί ομοιόμορφα το δείγμα εντός του σακιδίου (και να αποφευχθεί σβόλιασμα).
- Τα σακίδια τοποθετούνται ανά 3 σε 8 ειδικές θήκες (μέγιστο 24 σακίδια) και τοποθετούνται στη συσκευή. Πάνω στις θήκες τοποθετείται ειδικό βαρίδι για να κρατάει τα δείγματα εντός του χρησιμοποιούμενου διαλύματος.
- Προστίθενται στο δοχείο της συσκευής περίπου 1800-1900 ml NDS διαλύματος (ελάχιστος όγκος διαλύματος= 1500 ml, ανεξαρτήτως αριθμού δειγμάτων), 20 g θειώδους νατρίου (0,5 g/50 ml NDS) και 4 ml θερμοάντοχης α-αμυλάσης (σε περίπτωση που τα δείγματα περιέχουν άμυλο, βλ. 3.2.2).
- Η συσκευή σφραγίζεται και ενεργοποιείται η ανάδευση και η θέρμανση (100°C). Τα δείγματα παραμένουν (πέπτονται) για 75 min συνολικά.

- Έπειτα απενεργοποιείται η συσκευή, απομακρύνεται το διάλυμα από ειδική βαλβίδα, η συσκευή ανοίγεται και τα σακίδια ξεπλένονται 3 φορές με 1900 ml θερμού (70-90°C) απιονισμένου νερού. Η ανάδευση πρέπει να είναι ενεργοποιημένη κατά τις εκπλύσεις. Στις δύο πρώτες εκπλύσεις προστίθενται 4 ml θερμοάντοχης α-αμυλάσης (σε περίπτωση που τα δείγματα περιέχουν άμυλο, βλ. 3.2.2).
- Τα σακίδια βγαίνουν από τη συσκευή, πιέζονται ελαφρά για να απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα νερού και εμβαπτίζονται σε ακετόνη εντός ποτηριού ζέσης των 250 ml για 3-5 min. Στη συνέχεια ξηραίνονται στον αέρα και αφού έχει εξατμιστεί η ακετόνη, σε κλίβανο (103°C) για 2 έως 4 ώρες.
- Έπειτα, τα σακίδια ψύχονται σε ξηραντήρα μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος και καταγράφεται το μικτό βάρος (W3) με ακρίβεια 0,1 mg.
- Ακολούθως, τα σακίδια τοποθετούνται ξανά στις ειδικές θήκες της συσκευής και προστίθενται στο δοχείο περίπου 1800-1900 ml ADS διαλύματος (ελάχιστος όγκος διαλύματος= 1500 ml, ανεξαρτήτως αριθμού δειγμάτων).
- Η συσκευή σφραγίζεται και ενεργοποιείται η ανάδευση και η θέρμανση (100°C). Τα δείγματα παραμένουν (πέπτονται) για 60 min συνολικά.
- Έπειτα απενεργοποιείται η συσκευή, απομακρύνεται το διάλυμα από ειδική βαλβίδα, η συσκευή ανοίγεται και τα σακίδια ξεπλένονται 3 φορές (ή μέχρι το διήθημα να είναι ουδέτερο) με 1900 ml θερμού (70-90°C) απιονισμένου νερού. Η ανάδευση πρέπει να είναι ενεργοποιημένη κατά τις εκπλύσεις.
- Τα σακίδια βγαίνουν από τη συσκευή, πιέζονται ελαφρά για να απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα νερού και εμβαπτίζονται σε ακετόνη εντός ποτηριού ζέσης των 250 ml για 3-5 min. Στη συνέχεια ξηραίνονται στον αέρα και αφού έχει εξατμιστεί η ακετόνη, σε κλίβανο (103°C) για 2 έως 4 ώρες.
- Έπειτα, τα σακίδια ψύχονται σε ξηραντήρα μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος και καταγράφεται το μικτό βάρος (W4) με ακρίβεια 0,1 mg.
- Στη συνέχεια τα σακίδια τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσης των 3 lt και προστίθεται αρκετή ποσότητα 72% H_2SO_4 για να καλύψει τα σακίδια (περίπου 250-300 ml/24 σακίδια). ***Προσοχή:*** τα σακίδια πρέπει να είναι τελείως στεγνά (αν όχι, το H_2SO_4 θα αντιδράσει έντονα με την υγρασία και α) τα σακίδια θα μαυρίσουν, β) λόγω της εξώθερμης αντίδρασης, μέρος της λιγνίνης μπορεί να διαλυτοποιηθεί δίνοντας λανθασμένα αποτελέσματα)
- Στη συνέχεια τοποθετείται ποτήρι ζέσης των 2 lt μέσα σε αυτό των 3 lt, για να κρατάει τα σακίδια βυθισμένα μέσα στο οξύ. Τα σακίδια πιέζονται με κατακόρυφες κινήσεις ανά 30 min για 3 ώρες.
- Μετά από 3 ώρες τα οξύ αδειάζεται και τα σακίδια εκπλύνονται με κρύο νερό μέχρις ότου απομακρυνθούν όλα τα ίχνη του.
- Τα σακίδια βγαίνουν από το ποτήρι, πιέζονται ελαφρά για να απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα νερού και εμβαπτίζονται σε ακετόνη εντός ποτηριού ζέσης των 250 ml για 3 min. Στη συνέχεια, αφού έχει εξατμιστεί η ακετόνη, ξηραίνονται στον κλίβανο (103°C) για 2 έως 5 ώρες.

- Τα σακίδια ψύχονται σε ξηραντήρα μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος και καταγράφεται το μικτό βάρος (W5) με ακρίβεια 0,1 mg.

  Έπειτα τοποθετούνται σε προξηραμένες κάψες, καταγράφεται το μικτό βάρος κάψας και σακιδίου (α1) και αποτεφρώνονται στους 550±20°C για 3 ώρες. Οι κάψες ψύχονται σε ξηραντήρα μέχρις θερμοκρασίας περιβάλλοντος και καταγράφεται το μικτό βάρος (α2) με ακρίβεια 0,1 mg.