



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ: ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Παραγωγή, χαρακτηρισμός και εφαρμογές ανασυνδυασμένων
πεπτικών πρωτεασών της τσιπούρας (*Sparus aurata*)

ΤΑΓΑΡΙΔΗ ANNA

ΛΑΡΙΣΑ, 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7343/1
Ημερ. Εισ.: 03-08-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
597
ΤΑΓ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087203

Παραγωγή, χαρακτηρισμός και εφαρμογές
ανασυνδυασμένων πεπτικών πρωτεασών της τσιπούρας
(*Sparus aurata*)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Μούτου Κατερίνα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π. Θ.
- Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π. Θ.
- Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π. Θ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ένα θερμό ευχαριστώ στην Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του τμήματος, Μούτου Κατερίνα, ως επιβλέπουσα αυτής της εργασίας για την πολύτιμη βοήθεια της τόσο στο πειραματικό στάδιο της εργασίας όσο και κατά την διεξαγωγή της συγγραφή της.

Ένα ιδιαίτερα θερμό ευχαριστώ στην Λέκτορα Μοριακής Γενετικής του τμήματος Βιοχημείας, Θεολογία Σαραφίδου, για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε σε αυτή τη προσπάθεια. Χωρίς τις εύστοχες παρατηρήσεις της, την υποστήριξη της και την υπομονή της δεν θα φτάναμε μέχρι και σήμερα στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Farag Abusdeg για την εύρυθμη συνεργασία του μαζί μου σε ένα μεγάλο κομμάτι της εργασίας καθώς και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Στέλλα Γεωργίου τόσο για τη πολύ καλή συνεργασία μας όσο και για τη φιλία που αναπτύξαμε.

Δεν θα μπορούσα τέλος να παραλείψω να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Κώστα Σταμάτη καθώς και όλους τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους παραβρεθήκαμε την ίδια περίοδο στο εργαστήριο και όλα φαινόταν να είναι πιο εύκολα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Η ΤΣΙΠΟΥΡΑ *Sparus aurata*
- 1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΘΡΕΨΗΣ
- 1.3 ΑΛΚΑΛΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ
- 1.4 ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ
- 1.5 ΧΥΜΟΘΡΥΨΙΝΗ
- 1.6 ΘΡΥΨΙΝΗ
- 1.7 Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ
- 1.8 ΧΙΜΑΙΡΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ
- 1.9 ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
ΣΕ ΣΥΝΤΗΞΗ ΜΕ ΤΗΝ GST
- 1.10 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΨΑΡΙΩΝ- ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ
- 1.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2.1.1 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ
- 2.1.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ
- 2.1.3 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ
- 2.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΚΑΙ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥΣ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ
- 2.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ
- 2.2.2 ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
- 2.2.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
- 2.2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
- 2.2.5 ΕΚΛΟΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- 2.2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS-PAGE)
- 2.2.7 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ
- 2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
- 2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ
- 2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *IN VITRO*
 - 2.5.1 ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ *IN VITRO*
- 2.6 ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΗ ΤΡΟΦΗ
 - 2.6.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΙΤΗΡΕΣΙΩΝ
 - 2.6.2 ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΤΟΎΔΡΟΛΥΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΙΤΗΡΕΣΙΩΝ
 - 2.6.3 ΕΚΤΡΟΦΗ
- 2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 3.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ
 - 3.1.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD
- 3.2 ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ (K_m , V_{max}) ΤΩΝ TRPII, CHTRI, CHTRII
- 3.3 ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ *IN VITRO* – ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΜΙΚΤΑ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ
- 3.4 ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΗ ΤΡΟΦΗ
 - 3.4.1 ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ (*SGR*)
 - 3.4.2 ΡΥΘΜΟΣ ΑΥΤΟΎΔΡΟΛΥΣΗΣ ΣΙΤΗΡΕΣΙΩΝ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΑ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- 4.1 ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΒΕΛΤΙΩΘΟΥΝ ΟΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ?
- 4.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ (K_m , V_{max}) ΤΩΝ TRPII, CHTRI, CHTRII ΜΕ ΑΛΛΩΝ ΕΙΔΩΝ. ΜΠΟΡΟΥΜΕ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕ ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΣΧΕΔΙΑΣΤΕΙ ΓΙΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ?
- 4.3 ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ *IN VITRO*
- 4.4 ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕ ΤΑ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΑ ΑΝΤΙ ΤΩΝ ΜΙΚΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕ ΑΥΤΗ ΤΗ ΣΤΙΓΜΗ?
- 4.5 ΠΟΙΕΣ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ?
- 4.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΤΣΙΠΟΥΡΑ *Sparus aurata*

Βασίλειο: Ζώα (Animalia)

Φύλο: Χορδωτά (Chordata)

Κλάση: Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)

Τάξη: Περκόμορφα (Perciformes)

Οικογένεια: Sparidae

Γένος: *Sparus*

Είδος: *Sparus aurata*



Η τσιπούρα *Sparus aurata* (Σχήμα 1.1) ανήκει στην οικογένεια Sparidae (Perciformes, Actinopterygii). Άλλοι γνωστοί αντιπρόσωποι της οικογένειας Sparidae είναι η γόπα (*Boops boops*), η συναγρίδα (*Dentex dentex*) και η μουρμούρα (*Lithognathus*

mormyrus). Το σώμα του ψαριού είναι ατρακτοειδές ελαφρώς ωοειδές- κυκλικό και έχει αργυροκίτρινο χρωματισμό στον οποίο διακρίνονται κάθετες λεπτές γκριζες γραμμές. Το στόμα της τσιπούρας έχει ισχυρά χείλη, οι σιαγόνες στο πρόσθιο τμήμα τους χαρακτηρίζονται από την παρουσία 6 κυνοειδούς μορφής δοντιών, ενώ πλευρικά υπάρχουν στην άνω σιαγόνα 4-5 γομφιοειδούς μορφής δόντια και στην κάτω 3-4 σειρές ίδιου τύπου. Στο άνω μέρος του βραγχιακού επικαλύμματος υπάρχει μια κηλίδα στο χρώμα σκουριάς. Το ραχιαίο πτερύγιο είναι μακρύ, αρχίζει από τη βάση σχεδόν των θωρακικών και τελειώνει πριν από το τέλος του εδρικού. Εξωτερικά η τσιπούρα καλύπτεται ως επί το πλείστον από μικρά λεπτά λέπια. Η διάταξή τους γίνεται με μερική αλληλοεπικάλυψη.

Στον Ατλαντικό απαντάται στη Μεγάλη Βρετανία, στις ακτές της Πορτογαλίας, από το Στενό του Γιβραλτάρ ως το Πράσινο Ακρωτήριο και γύρω από τα Κανάρια Νησιά, έως τη

Σενεγάλη, ενώ απαντάται στη Μεσόγειο και στη Μαύρη θάλασσα (Σχήμα 1.2). Στην Ελλάδα συναντάται κυρίως στο Αιγαίο, από το Πόρτο Λάγος έως τα Δωδεκάνησα, καθώς και σε κόλπους όπως ο Θερμαϊκός, ο Σαρωνικός, ο Κορινθιακός, ο Πατραϊκός και τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογίου.



Σχήμα 1.2: Εξάπλωση του είδους *Sparus aurata* (KGSMAPPER med map and North sea.htm)

Είναι ψάρι ευρύθερμο και ευρύαλο. Λόγω των ευρύαλων και ευρύθερμων συνηθειών του το είδος βρίσκεται τόσο στο θαλάσσιο χώρο αλλά και σε υφάλμυρες παράκτιες λιμνοθάλασσες και σε εκβολές ποταμών. Συχνάζει συνήθως σε βραχώδη βυθό με φύκη αλλά μπορεί να το συναντήσουμε και σε αμμώδη μέρη. Απαντάται σε βάθη από 1-30 μέτρα, ενώ ενήλικα έχουν βρεθεί σε βάθη ως και 150 μέτρα.

Κατά τον Barnabe (1990) και σύμφωνα με παρατηρήσεις κατά την εκτροφή, οι ανεκτοί παράγοντες του περιβάλλοντος για το είδος οι οποίοι επηρεάζουν την εξάπλωση του είδους είναι :

Θερμοκρασία. Ως ψυχρόαιμα ζώα, τα ψάρια εξαρτώνται σχεδόν ολοκληρωτικά από την θερμοκρασία του νερού για να ρυθμίσουν τη θερμοκρασία του σώματός τους. Μέσα στο

ωφέλιμο θερμοκρασιακό εύρος, κάθε είδος εμφανίζει τεράστια διαφορά στον ρυθμό αύξησης. Η τσιπούρα εμφανίζει ταχύτερους ρυθμούς αύξησης σε θερμοκρασία 25 °C (Barnabé, 1990). Συναντιέται το χειμώνα σε θερμοκρασίες 5 °C – 6 °C και το καλοκαίρι σε θερμοκρασίες έως 25 °C – 27 °C. Μέγιστη θερμοκρασία επιβίωσης είναι 34 °C ενώ η ελάχιστη 5 °C.

Αλατότητα. Σαν ευρύαλο είδος η τσιπούρα, απαντάται σε νερά με αλατότητα 7 psu έως και 42 psu . Πάντως οι ιδανικές συνθήκες είναι μεταξύ 25 psu και 42 psu.

Διαλυμένο οξυγόνο. Καθώς στη θάλασσα το οξυγόνο βρίσκεται σχεδόν πάντα κοντά στο επίπεδο κορεσμού, σπανίως παρατηρούνται μαζικοί θάνατοι του είδους από πτώση του διαλυμένου οξυγόνου στο φυσικό περιβάλλον. Το γεγονός αυτό φυσικά δεν ισχύει στις λιμνοθάλασσες. Πάντως σε συνθήκες εκτροφής έχουν μετρηθεί συγκεντρώσεις οξυγόνου μέχρι το λιγότερο 3,5mg/l, σε θερμοκρασία γύρω στους 25 °C χωρίς να παρουσιαστούν θάνατοι. Σε κάθε περίπτωση το ιδανικό επίπεδο κορεσμού του νερού σε διαλυμένο οξυγόνο σε συνάρτηση με την θερμοκρασία είναι το 90% (Barnabe, 1990).

Θολρότητα. Η τσιπούρα δε φαίνεται να προτιμά τα θολά νερά των εκβολών των ποταμών ή των παράκτιων περιοχών κατά τις θαλασσοταραχές.

Είναι σαρκοφάγο είδος που τρέφεται στις μικρές ηλικίες κυρίως με πολύχαιτους και μικρού μεγέθους καρκινοειδή, ενώ στις μεγαλύτερες ηλικίες με μύδια, γαστερόποδα, μικρά ψάρια και καρκινοειδή. Η τσιπούρα είναι στατικό ψάρι και ζει είτε απομονωμένο είτε σε μικρές συναθροίσεις στο φυσικό περιβάλλον. Μεταναστεύει την άνοιξη προς τις υφάλμυρες παράκτιες λιμνοθάλασσες στην αναζήτηση άφθονης τροφής και των ηπιότερων θερμοκρασιών (τροφική μετανάστευση).

Είναι είδος ιδιαίτερης σημασίας για την αλιεία και τις ιχθυοκαλλιέργειες, καθώς και για την ερασιτεχνική αλιεία. Σύμφωνα με την πρόσφατη έκθεση της Ομοσπονδίας Ευρωπαϊκών Υδατοκαλλιεργητών (Production and price reports of the member associations of the Federation of European Aquaculture Producers, 2001-2008):

- Η Ελλάδα είναι η υπ' αριθμόν ένα παραγωγός τσιπούρας στην Ευρώπη, με ετήσια αύξηση παραγωγής 7,3%.
- Το 2008 η ελληνική ιχθυοπαραγωγή ανήλθε στους 95.000 τόνους, 60.000 από τους οποίους ήταν τσιπούρα.
- Σε ευρωπαϊκή κλίμακα, η ιχθυογέννηση τσιπούρας ανήλθε σε 500.000.000 ιχθύδια και τζίρο 112,5 εκατομμυρίων ευρώ το 2008.

1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΘΡΕΨΗΣ

Τα ψάρια έχουν την ικανότητα να προσαρμόζουν την διαίτα τους σε μια μεγάλη διατροφική ποικιλία, προσπαθώντας κάθε φορά να εκμεταλλευτούν με τον αποτελεσματικότερο τρόπο τη διαθέσιμη τροφή στο ενδιαίτημα τους (Moyle & Cech, 1982). Είναι δε χαρακτηριστική η παρουσία των περισσότερων πεπτικών ενζύμων σε όλα τα είδη ψαριών, ανεξάρτητα των διατροφικών τους συνηθειών (Chakrabarti et al., 1995; Hidalgo et al., 1999). Παρόλα αυτά, όπως και τα υπόλοιπα σπονδυλωτά, τα ψάρια παραδοσιακά κατατάσσονται σε φυτοφάγα, σαρκοφάγα, παμφάγα και νεκροφάγα με βάση τις ευρύτερες διατροφικές τους συνήθειες και κάθε ομάδα παρουσιάζει ορισμένα γενικά χαρακτηριστικά. Π.χ. τα σαρκοφάγα ψάρια φέρουν ένα κοντό έντερο, το οποίο συχνά έχει τη μορφή ενός ευθύ σωλήνα, που συνδέει το στομάχι με την έδρα, ενώ τα φυτοφάγα είδη έχουν σαφώς μακρύτερο πεπτικό σωλήνα για την καλύτερη αξιοποίηση των φυτικών τροφών που καταναλώνουν (Karoor et al., 1975; Moyle & Cech, 1982; Ferraris & Ahearn, 1984; Halver, 1989; Buddington et al., 1997).

Ο πεπτικός σωλήνας στη τσιπούρα αρχίζει από το στόμα και τη στοματική κοιλότητα, συνεχίζει στο φάρυγγα και τον οισοφάγο, το στομάχι, τα τέσσερα πυλωρικά τυφλά, το έντερο και το απευθυσμένο, για να καταλήξει στην έδρα (Σχήμα 1.3). Η διαδικασία της πέψης αρχίζει από το στόμα και το φάρυγγα, με τη μηχανική διάσπαση των τροφών και συνεχίζεται στον οισοφάγο με την παραγωγή βλέννας από τα επιθηλιακά κύτταρα. Ο ρόλος της βλέννας έχει αποδοθεί τόσο στη καλύτερη διαλυτοποίηση της τροφής (λιπαντικός ρόλος) όσο και στη προστασία των τοιχωμάτων του οισοφάγου. Τέλος, έχει διευκρινισθεί ο ρόλος των ιστολογικών χαρακτηριστικών του οισοφάγου στην διαδικασία της οσμωρύθμισης στη τσιπούρα μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την σκληρότητα του θαλασσινού νερού (Buddington et al., 1997, Buddington & Krogdahl, 2004). Στα παραπάνω τμήματα του πεπτικού σωλήνα δεν έχει διαπιστωθεί μέχρι σήμερα καμία έκκριση πεπτικών ενζύμων.



Σχήμα 1.3: Σχηματικό διάγραμμα του πεπτικού σωλήνα, όπου επισημαίνονται τα επιμέρους τμήματα.

Μετά τον οισοφάγο η τροφή εισέρχεται στο καλά διαμορφωμένο στομάχι με το χαρακτηριστικό σχήμα Y. Οι λειτουργίες του στομάχου είναι η προσωρινή αποθήκευση, ανάμειξη και πρωτογενής πέψη της τροφής. Το στομάχι διαχωρίζεται μορφολογικά και λειτουργικά στη καρδιακή μοίρα η οποία αποτελείται από λεπτά ελαστικά τοιχώματα και στη πυλωρική μοίρα με παχιά μυώδη τοιχώματα. Η πυλωρική μοίρα τελειώνει με τον πυλωρικό σφιγκτήρα που αποτελεί την είσοδο για το άνω τμήμα του εντέρου. Η ενζυμική πέψη ξεκινά από το στομάχι με τη δράση της πεψίνης σε όξινο περιβάλλον. Οι πεψίνες εκκρίνονται ως ανενεργά ζυμογόνα, τα οποία ενεργοποιούνται σε όξινες συνθήκες pH μικρότερες του 6. Αποτελούν ενδοπεπτιδάσες, οι οποίες υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ αρωματικών και δικαρβοξυλικών αμινοξέων. Συνεπώς οι πεψίνες διασπών πολύ λίγους από τους δεσμούς μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας καταλήγοντας σε μικρότερα πεπτίδια που χρήζουν δράσης άλλων πρωτεασών (Jobling et al, 1995).

Μετά το στομάχι το όξινο μίγμα εισέρχεται στο έντερο, το οποίο καλύπτεται από επιθηλιακά και βλεννογόνα κύτταρα και είναι σχετικά κοντό με μήκος να κυμαίνεται μεταξύ 0,5-0,6 ως προς το συνολικό μήκος του πεπτικού σωλήνα. Ο εντερικός σωλήνας της τσιπούρας αποτελείται από τέσσερις τυφλές απολήξεις στο πάνω μέρος κοντά στο πυλωρικό άνοιγμα που ονομάζονται πυλωρικά τυφλά. Η κύρια λειτουργία τους είναι η αύξηση της επιφάνειας απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών, ειδικευμένη απορρόφηση λιπών και υδρογονανθράκων και έκκριση πεπτικών ενζύμων. Το μεγαλύτερο μέρος της ενζυμικής πέψης πραγματοποιείται καθώς η τροφή περνά από τα πυλωρικά τυφλά και κατά μήκος του εντερικού αυλού. Τα ένζυμα που συμμετέχουν σ' αυτή προέρχονται κυρίως από το πάγκρεας, τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου, αλλά και από την εντερική χλωρίδα (Karoor et al., 1975). Το πάγκρεας παράγει τη μεγαλύτερη ποικιλία και ποσότητα πεπτικών ενζύμων (πρωτεάσες, αμυλάσες, λιπάσες), ενώ βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο φυσιολογικών διαδικασιών που συνδέονται

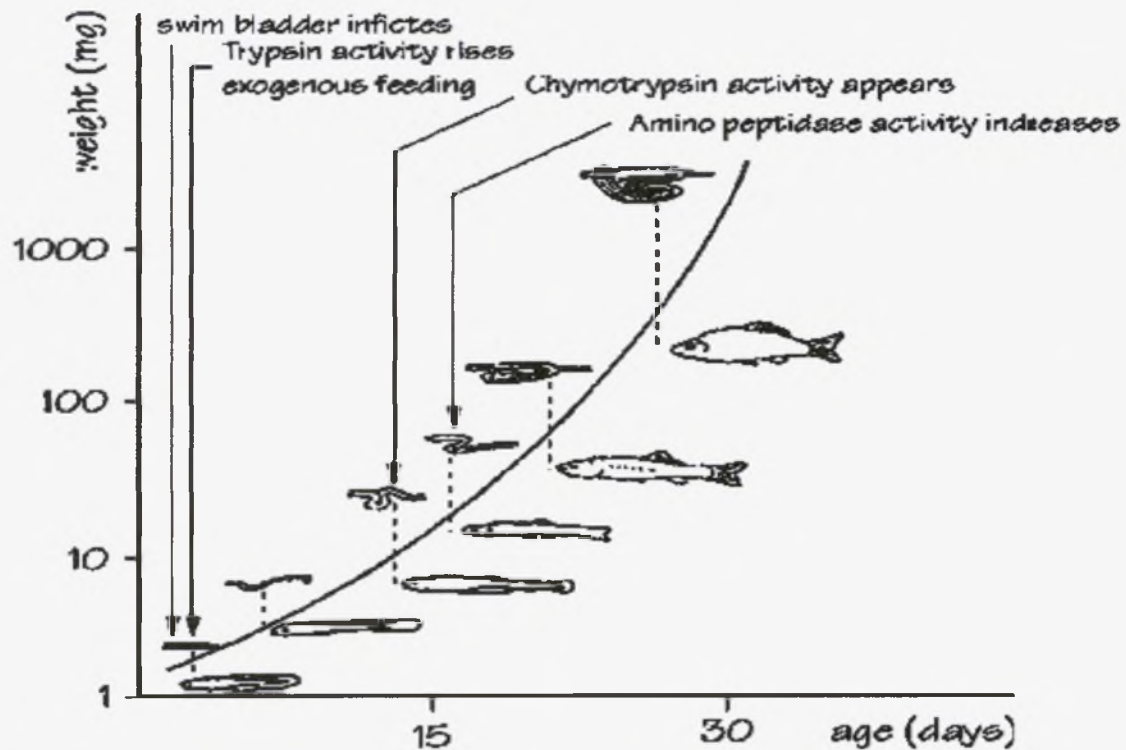
με το διατροφικό καθεστώς, το εξωτερικό περιβάλλον, το φύλο και την ηλικία. Οι παγκρεατικές εκκρίσεις περιέχουν επίσης δικαρβονικά ιόντα, τα οποία σε συνεργασία με τα χολικά υγρά, δρουν προς εξουδετέρωση των οξέων που προέρχονται από το στομάχι (Karoo et al., 1975; Kurakawa & Suzuki, 1995). Η διάσπαση της τροφής ολοκληρώνεται με τη δράση των πεπτικών ενζύμων, που εκκρίνονται από το εντερικό επιθήλιο και συγκεντρώνονται κυρίως στην περιοχή των λαχνών, δίνοντας τα τελικά προϊόντα της πέψης (δισακχαρίτες, δι- και τρι- πεπτίδια, μονοσακχαρίτες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα) που απορροφούνται και μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω των εντεροκυττάρων (Karoo et al., 1975; Moyle & Cech, 1982; Halver, 1989).

Στην τσιπούρα, έχει αναγνωριστεί η ύπαρξη ενός αριθμού πεπτικών ενζύμων τα οποία και έχουν απομονωθεί, όπως η αμυλάση (Munilla-Morán & Sabonino-Rey, 1996a; Hidalgo et al., 1999; Deguara et al., 2003), η πεψίνη (Alarcón et al., 1998; Deguara et al., 2003), η θρυψίνη (Alarcón et al., 1998; Deguara et al., 2003), η χυμοθρυψίνη (Alarcón et al., 1998; Deguara et al., 2003), η καρβοξυπεπτιδάση A (Deguara et al., 2003), η καρβοξυπεπτιδάση B (Deguara et al., 2003) και η ελαστάση (Psohiou et al. 2007).

Κατά τη διάρκεια των πρώτων αναπτυξιακών σταδίων των ψαριών, το πεπτικό σύστημα εμφανίζεται εξαιρετικά ανώριμο (Kolkovski, 2001). Συγκεκριμένα για την τσιπούρα, η ανάπτυξη του πεπτικού σωλήνα περιλαμβάνει πέντε επιμέρους φάσεις: I (ημέρα εκκόλαψης), ο λεκιθικός σάκος εμφανίζεται μεγάλος και ο πεπτικός σωλήνας αδιαφοροποιήτος, II (ημέρα 2-3), ανοίγει η έδρα και διαφοροποιούνται ο οισοφάγος, το στομάχι και το έντερο, ενώ η τροφοληψία εξακολουθεί να είναι αποκλειστικά ενδογενής, III (ημέρα 4-7), ανοίγει το στόμα, αρχίζει η απορρόφηση του λεκιθικού σάκου και το έντερο διαιρείται σε δύο επιμέρους περιοχές, IV (ημέρα 8-59), ο λεκιθικός σάκος έχει απορροφηθεί και η τροφοληψία είναι πλέον αποκλειστικά εξωγενής, V (ημέρα 60-69), διαφοροποιούνται τα πυλωρικά τυφλά και οι γαστρικοί αδένες (Sarasquete et al., 1993; Sarasquete et al., 1995; Elbal et al., 2004).

Είναι επίσης γνωστό πως η ανάπτυξη του πεπτικού συστήματος υποδεικνύει και τη δυνατότητα των ψαριών για αφομοίωση των τροφών που λαμβάνονται. Πέρα από ένα όχι καλά διαμορφωμένο πεπτικό σύστημα στα αρχικά τους στάδια παρατηρείται και απουσία βασικών λειτουργικών πεπτικών ενζύμων (Σχήμα 1.4). Επομένως η διατροφή τους θα πρέπει να στηρίζεται σε εύπεπτα υλικά με χαρακτηριστική την απουσία των σύνθετων

πρωτεϊνικών μορίων χωρίς όμως να στερούνται τα θρεπτικά συστατικά που θεωρούνται απαραίτητα για την ανάπτυξη τους.



Σχήμα 1.4: Παρουσία ενζύμων στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια στη τσιπούρα (Dabrowski, 1984)

1.3 ΑΛΚΑΛΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ

Όπως ήδη έχει αναφερθεί η πέψη της τροφής ολοκληρώνεται τελικά στο έντερο με τη βοήθεια των αλκαλικών πρωτεασών που συντίθενται στο πάγκρεας. Οι αλκαλικές πρωτεάσες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες :

- τις καρβοξυπεπτιδάσες που ανήκουν στην οικογένεια των μεταλλοπρωτεασών, απαιτούν ένα ιόν ψευδαργύρου για την καταλυτική τους δράση και διακρίνονται σε καρβοξυπεπτιδάση Α και καρβοξυπεπτιδάση Β
- τις πρωτεάσες της σερίνης που είναι ένζυμα που σχηματίζουν ομοιοπολικά σύμπλοκα. Στην ομοιοπολική κατάλυση γενικά, το ενεργό κέντρο του ενζύμου περιέχει μια ενεργό ομάδα, συνήθως ένα ισχυρό πυρηνόφιλο το οποίο στη πορεία της κατάλυσης προσωρινά τροποποιείται ομοιοπολικά. Η ομάδα αυτή των πρωτεολυτικών ενζύμων συγκεντρώνει και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον κατά την

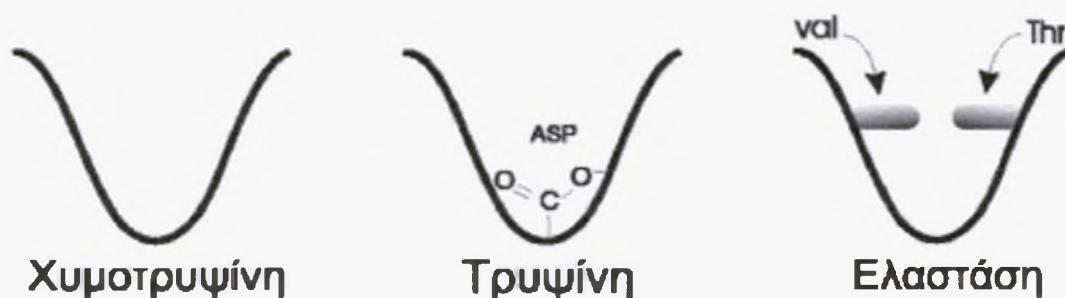
ενζυμική πέψη με πρωταγωνιστές τη θρυψίνη και την χυμοθρυψίνη. Ο καταλυτικός τους μηχανισμός περιλαμβάνει την νουκλεόφιλη προσβολή του πεπτιδικού δεσμού από την υδροξυλομάδα ενός κατάλοιπου σερίνης. Η πιο σημαντική οικογένεια είναι η S1 της ομάδας PA(S) που περιλαμβάνει τη θρυψίνη και την χυμοθρυψίνη.

1.4 ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ

Οι πρωτεάσες της σερίνης βρίσκονται μεταξύ των πρώτων καλά μελετημένων ενζύμων και αποτελούν ενδοπρωτεάσες που φέρουν το αμινοξύ της σερίνης στο ενεργό κέντρο τους. Τρία από τα σημαντικότερα πεπτικά ένζυμα, η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η ελαστάση, ανήκουν στην οικογένεια S1 της ομάδας PA των πρωτεασών, η οποία περιλαμβάνει τις πρωτεάσες της σερίνης και οι οποίες προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο. Εμφανίζουν, δε, ένα μηχανισμό δράσης που στηρίζεται στην ύπαρξη μιας καταλυτικής τριάδας (His57 – Asp102– Ser195), αλλά και στην παρουσία συγκεκριμένων αμινοξέων στην επιφάνεια των ενζύμων (Hartley, 1964; Neurath, 1984; Barrett et al., 2004; Polgar, 2005). Μελέτες με ειδικούς αναστολείς του ενεργού κέντρου της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης, έδειξαν την παρουσία ομάδας ιστιδίνης κοντά στην ενεργή περιοχή του κάθε ενζύμου, η οποία αποδείχθηκε ότι συμμετέχει στο μηχανισμό δράσης αυτών. Η ομάδα της ιστιδίνης δρα σα βάση και μετατρέπει την υδροξυλομάδα της σερίνης σε πιο δραστικό πυρηνόφιλο. Κοντά στον μιδαζολικό δακτύλιο της ιστιδίνης υπάρχει ένα ασπαραγινικό οξύ, το οποίο δρα και αυτό σα βάση, απομακρύνει ένα πρωτόνιο από την ιστιδίνη και έτσι διευκολύνει τη δράση της ιστιδίνης στην πόλωση της -OH της σερίνης. Ο συνδυασμός των τριών αυτών αμινοξέων μπορεί να θεωρηθεί σα μεταφορά του αρνητικού φορτίου από το μόριο του ασπαραγινικού στην ομάδα της σερίνης και είναι γνωστός σαν σύστημα μεταφοράς φορτίου (charge-relay system).

Οι πεπτικές πρωτεάσες της σερίνης απελευθερώνονται από το πάγκρεας ως ανενεργά ζυμογόνα. Η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η ελαστάση παρουσιάζουν παρόμοια τρισδιάστατη δομή και αλληλουχία αμινοξέων, και έχουν εξελιχθεί μέσω μιας διαδικασίας διπλασιασμού και μετάλλαξης των γονιδίων (Perona & Craik, 1997; Suzuki et al., 2002; Barrett et al., 2004). Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των τριών ενζύμων παρατηρείται ως προς την εξειδίκευση του υποστρώματος και οφείλεται στην ύπαρξη μικρών διαφορών στην περιοχή πρόσδεσης του (Σχήμα 1.5). Η θρυψίνη διασπά

πεπτιδικούς δεσμούς στα αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη, η χυμοθρυψίνη σε αμινοξέα με αρωματική ή ογκώδη μη πολική πλευρική αλυσίδα, ενώ η εξειδίκευση της ελαστάσης κατευθύνεται προς μικρότερες αφόρτιστες πλευρικές αλυσίδες. Στη χυμοθρυψίνη η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος αποτελείται από μια μη πολική κοιλότητα, ενώ στη θρυψίνη η Ser189 έχει αντικατασταθεί από το Asp102 που σχηματίζει έναν ισχυρό ηλεκτροστατικό δεσμό με τη θετικά φορτισμένη Lys ή Arg. Στην ελαστάση, δύο αμινοξέα γλυκίνης, που υπάρχουν στη χυμοθρυψίνη, έχουν αντικατασταθεί από τα πιο ογκώδη βαλίνη και θρεονίνη (Perona & Craik, 1997; Berg et al., 2002; Suzuki et al. 2002; Barrett et al., 2004).

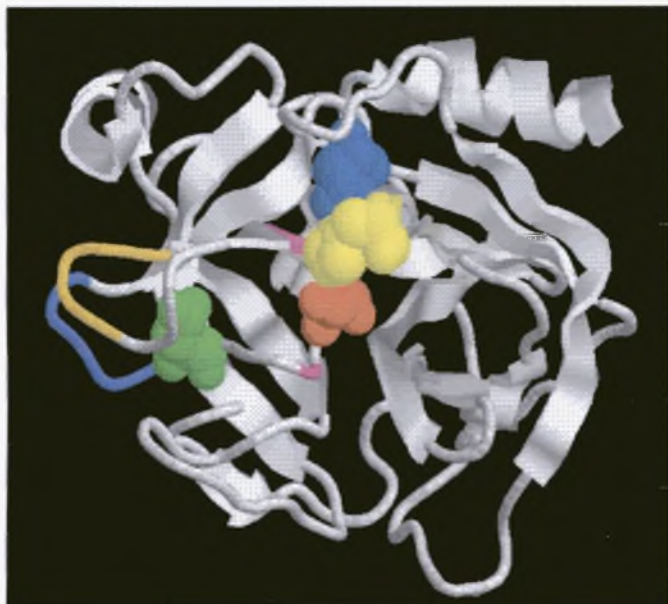


Σχήμα 1.5: Απλοποιημένη αναπαράσταση της περιοχής πρόσδεσης του υποστρώματος των τριών κυριότερων πρωτεασών της σερίνης (Berg et al, 2002).

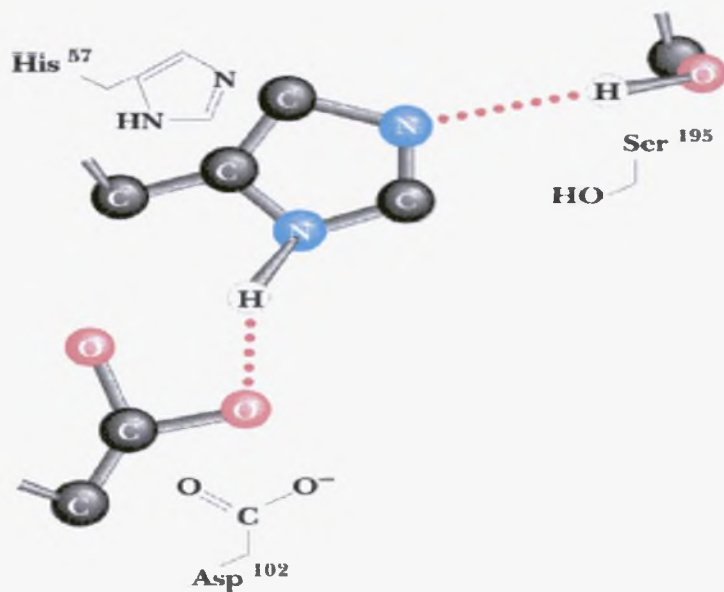
1.5 ΧΥΜΟΘΡΥΨΙΝΗ

Είναι μια πρωτεΐνη τριών πολυπεπτιδικών αλυσίδων ενωμένων με δισουλφιδικούς δεσμούς, σχήματος σφαιρικού (Σχήμα 1.6) και μοριακού βάρους 25 KDa. Είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο με έντονη παρουσία στο πεπτικό τμήμα των ζωντανών οργανισμών διευκολύνοντας έτσι την υδρόλυση των πεπτικών δεσμών. Συντίθεται ως ανενεργό πρόδρομο μόριο μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας που ονομάζεται χυμοθρυψινογόνο το οποίο ενεργοποιείται από την πρωτεολυτική διάσπαση του πεπτιδίου και διακρίνεται σε χυμοθρυψινογόνο I και II. Το χυμοθρυψινογόνο I εκφράζεται στο οπίσθιο έντερο της τσιπούρας ενώ το χυμοθρυψινογόνο II στο πρόσθιο (Psochiou et al, 2007). Μετατρέπεται σε ένα πλήρως ενεργό ένζυμο όταν ο πεπτιδικός δεσμός που ενώνει την αργινίνη 15 και την ισολευκίνη 16 (Arg15-Ile16) διασπαστεί από τη θρυψίνη. Η καταλυτική τριάδα της χυμοθρυψίνης αποτελείται από τα αμινοξέα His57, Asp102 και Ser195 (Σχήμα 1.7) και είναι απαραίτητη για τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού. Η υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών πραγματοποιείται με την προσβολή του καρβονυλικού ατόμου του άνθρακα από

το άτομο οξυγόνου της υδροξυλομάδας της σερίνης (Ser195) της καταλυτικής τριάδας του ενζύμου. Τα κύρια υποστρώματα του ενζύμου περιλαμβάνουν την θρυπτοφάνη, την τυροσίνη, τη φαινυλαλανίνη καθώς και τη μεθειονίνη.



Σχήμα 1.6: Τρισδιάστατη δομή της χυμοθρυψίνης



Σχήμα 1.7: Η καταλυτική τριάδα της χυμοθρυψίνης

Έτσι κατά τη διαδικασία της υδρόλυσης σχηματίζεται αρχικά ένα σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος και στη συνέχεια ένα ενδιάμεσο άκυλο-ένζυμο. Στο πρώτο βήμα της αντίδρασης η ομάδα υδροξυλίου της παρά πολύ ενεργούς Ser195 προσβάλλει την καρβονυλική ομάδα του υποστρώματος απελευθερώνοντας την αλκοόλη π-νιτροφαινόλη. Στο δεύτερο βήμα της αντίδρασης το ενδιάμεσο άκυλο-ένζυμο υδρολύεται με σκοπό να απελευθερώσει την ομάδα καρβοξυλικού οξέος του υποστρώματος και να αναπαραγάγει το ελεύθερο ένζυμο α-χυμοθρυψίνη. Έτσι η υδρόλυση από τη χυμοθρυψίνη λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια την ακυλίωση ακολουθούμενη από την αποακυλίωση.

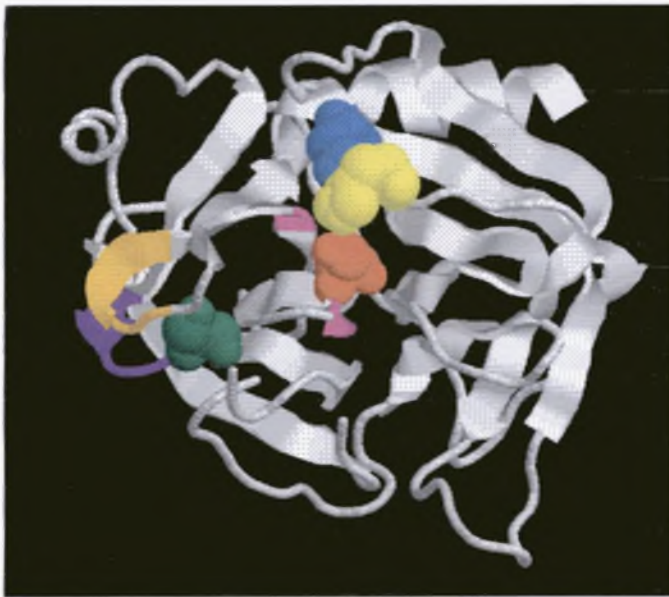
1.6 ΘΡΥΨΙΝΗ

Είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 25 KDA, συντίθεται στο πάγκρεας ως ανενεργό θρυψινογόνο II και εκφράζεται στη τσιπούρα σε υψηλά επίπεδα σε όλο το μήκος του πεπτικού σωλήνα και του όξινου στομάχου (Psochίου et al, 2007). Το σχήμα της θρυψίνης είναι σφαιρικό (Σχήμα 1.8). Η πέψη των πρωτεϊνών απαιτεί την ταυτόχρονη δράση αρκετών πρωτεολυτικών ενζύμων διότι καθένα από αυτά είναι ειδικό για περιορισμένο αριθμό πλευρικών αλυσίδων. Η θρυψίνη έχει το ρόλο του κοινού ενεργοποιητή όλων των παγκρεατικών ζυμογόνων (χυμοθρυψινογόνο, θρυψινογόνο, προελατάση, προκαρβοξυπεπτιδάση) ώστε να δράσουν ταυτόχρονα. Έτσι η παραγωγή της από το θρυψινογόνο οδηγεί και στην ενεργοποίηση άλλων ζυμογόνων.

Το ένζυμο της θρυψίνης πρωτεολύει τον πεπτιδικό δεσμό μετά από κατάλοιπα Arg ή Lys σε αλκαλικές συνθήκες (pH 8). Το ενεργό μόριο στη θρυψίνη αποτελείται από μια και μοναδική πολυπεπτιδική αλυσίδα. Όπως και στην υπόλοιπη οικογένεια των πρωτεασών της σερίνης η καταλυτική τριάδα His57-Asp102-Ser195 παίζει σημαντικό ρόλο. Ο καταλυτικός μηχανισμός είναι ο ίδιος με τη χυμοθρυψίνη δηλαδή το οξυγόνο της Ser195 προσβάλλει πυρηνόφιλα το υπόστρωμα δημιουργώντας ένα ενδιάμεσο άκυλο-ένζυμο. Με υδρόλυση του ενδιάμεσου συμπλόκου αναπαραγάγεται το ελεύθερο ένζυμο.

Οι αμινοξικές αλληλουχίες πολλών ισομορφών θρυψινογόνου έχουν καθοριστεί για ένα μεγάλο αριθμό σπονδυλωτών. Διαφορετικές ισομορφές συνεπάγεται και διαφορετικές

κινητικές ιδιότητες ενώ τα ένζυμα της θρυψίνης χαρακτηρίζονται ως κατιονικά ή ανιονικά ανάλογα με το φορτίο τους σε ουδέτερες συνθήκες του pH.



Σχήμα 1.8 : Τρισδιάστατη δομή της θρυψίνης

1.7 Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

Με τη γενετική μηχανική και την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA είναι εφικτή η κλωνοποίηση οποιουδήποτε τμήματος DNA σε βακτηριακούς φορείς, η αλληλούχησή του και τελικά η παραγωγή πρωτεϊνών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο γενετικός κώδικας είναι καθολικός με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη που παράγεται να καθορίζεται από το cDNA που κλωνοποιήθηκε.

Το χρωμοσωμικό DNA στα βακτήρια έχει κυκλική ελικωμένη μορφή. Πέραν όμως του χρωμοσωμικού αυτού υλικού υπάρχουν και τα πλασμίδια, μικρά κυκλικά δίκλιωνα μόρια DNA, τα οποία αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό DNA και υπάρχουν σε ένα έως εκατοντάδες αντίγραφα. Τα πλασμίδια περιέχουν γονίδια, που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (π.χ. Αμπικιλίνη (Amp^r), τετρακυκλίνη (Tet^r)). Τα πλασμίδια είναι εύκολο να απομονωθούν, να κλωνοποιήσουμε τμήματα DNA και να επαναεισαχθούν στο βακτήριο εφόσον δεν τους επηρεάζει το ένθεμα. Ο μετασχηματισμός για την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου επιτυγχάνεται μέσω θερμικού σοκ ή ηλεκτροσόκ και κατ' αυτήν το πλασμιδιακό DNA εισέρχεται μέσω πόρων στο βακτήριο. Η ικανότητα εισαγωγής DNA μέσω των μεμβρανικών πόρων ποικίλει ανάλογα με τη φύση του βακτηρίου. Το βακτήριο *Escherichia coli* είναι ο πιο

διαδομένος μετασχηματιζόμενος οργανισμός, επειδή αναπτύσσεται εύκολα κάτω από εργαστηριακές συνθήκες, αναπαράγεται κάθε 20' και τα βιοχημικά και γενετικά χαρακτηριστικά του έχουν μελετηθεί εκτενέστατα. Έτσι μεταξύ των πολλών διαθέσιμων συστημάτων για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών το Gram⁻ βακτήριο *E. coli* παραμένει ένα από τα πιο ελκυστικά. Ο τεμαχισμός του πλασμιδίου για την εισαγωγή του εξωγενούς DNA επιτυγχάνεται με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού που αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη νουκλεοτιδική ακολουθία και πλέον υπάρχουν διαθέσιμα περισσότερα από 700 τέτοια ένζυμα που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί. Τα ένζυμα αυτά δεσμεύονται στην συγκεκριμένη ακολουθία και καταλύουν τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Για τον σχηματισμό του ανασυνδυασμένου DNA προστίθεται το ένζυμο λιγάση (ligase) που δημιουργεί τον φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ των 3'- και 5'- άκρων των γειτονικών μορίων σακχάρων.

Η χρήση των ανασυνδυασμένων ενζύμων έχει αυξηθεί πολύ τα τελευταία χρόνια, καθώς έχουν αυξηθεί και οι γνώσεις για τις τεχνικές παραγωγής άλλα και τα διαθέσιμα προϊόντα στο εμπόριο που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό τους. Η επιλογή του κατάλληλου ξενιστή παίζει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο για τη έκφραση της πρωτεΐνης όσο και για τον τρόπο με τον οποίο αυτή θα απομονωθεί και στη συνέχεια θα καθαριστεί. Σημαντικό ρόλο επίσης παίζει και η επιλογή του κατάλληλου φορέα κλωνοποίησης ο οποίος συνήθως φέρει έναν ισχυρό υποκινητή που επιτρέπει την ισχυρή μεταγραφή και τη συσσώρευση πολυπεπτιδίων σε υψηλές ποσότητες στο κύτταρο. Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες σειρές στο εμπόριο ενώ η επιλογή της κατάλληλης καθορίζεται από τη φύση του πειράματος και τη φύση της ετερόλογης πρωτεΐνης. Υπόψη θα πρέπει να ληφθεί και το αν η πρωτεΐνη απαιτεί μεγάλο αριθμό σπάνιων κωδικονίων. Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να εκφραστεί σε βακτήρια στα οποία υπερ-εκφράζονται tRNA για αυτά τα σπάνια κωδικόνια. Για παράδειγμα το στέλεχος *E.coli DH5a* θεωρείται ιδανικό για την τεχνική της κλωνοποίησης αφού φέρει τις μεταλλαγές *recA1* και *endA1* που αυξάνουν τη σταθερότητα των ενθεμάτων, καταστέλλουν τον ανασυνδυασμό και βελτιώνουν την ποιότητα του πλασμιδιακού DNA. Ενώ το *E.coli BL21* είναι ιδανικό για την έκφραση υψηλών επιπέδων πρωτεΐνης αφού ο μετασχηματισμός είναι εύκολος.

1.8 ΧΙΜΑΙΡΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Η δημιουργία χιμαιρικών πρωτεϊνών αποτελεί μια σχετικά νέα τεχνική που έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα. Κατ' αυτήν, κλωνοποιούμε το επιθυμητό cDNA στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το cDNA μιας πρωτεΐνης την οποία μπορούμε εύκολα να απομονώσουμε ή με ένα τεχνητό ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας αλληλουχίας ομοίων αμινοξέων όπως ιστιδίνη, αργινίνη κτλ. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι:

- Αυξημένη σταθερότητα της πρωτεΐνης
- Βελτίωση εκείνων των ιδιοτήτων της πρωτεΐνης που επιτρέπουν την απομόνωση της από το εκχύλισμα της καλλιέργειας
- Γρηγορότερη απομόνωση

Πρωτεΐνες που επιλέγονται για σύντηξη με τα επιθυμητά γονίδια είναι κατά κανόνα εκείνες που αναγνωρίζονται από πολύ εξειδικευμένους προσδέτες (ligants), έτσι ώστε να μπορούν εύκολα να απομονωθούν. Ως παράδειγμα πρωτεΐνης σύντηξης που χρησιμοποιείται ευρέως είναι το ένζυμο τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST).

1.9 ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΣΥΝΤΗΞΗ ΜΕ ΤΗΝ GST

Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται για την έκφραση και την απομόνωση χιμαιρικών πρωτεϊνών που παράγονται στην *E.coli*. Βασίζεται στην επαγωγή και σε υψηλά επίπεδα έκφραση γονιδίων ή τμημάτων τους σε σύντηξη με την GST του *Schistosoma japonicum*. Οι παραγόμενες χιμαιρικές πρωτεΐνες φέρουν την GST στο αμινοτελικό άκρο και την επιθυμητή πρωτεΐνη στο καρβοξυτελικό άκρο. Η GST είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 26kDa που μπορεί να εκφραστεί στο *E.coli* με πλήρη ενζυμική δραστηριότητα. Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες απομονώνονται από τα βακτηριακά εκχυλίσματα με χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση γλουταθειόνης ακινητοποιημένης σε σφαιρίδια αгарόζης ή σεφαρόζης. Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες «αιχμαλωτίζονται» λόγω της συγγενείας της γλουταθειόνης με τη GST και οι προσμίξεις απομακρύνονται με εκπλύνσεις. Η διαδικασία καθαρισμού διατηρεί την αντιγονικότητα και λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρήση χρωματομετρικών ή ανοσολογικών μεθόδων. Το σύστημα αυτό έχει επιτυχώς χρησιμοποιηθεί σε πολλές

εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων μοριακής ανοσολογίας, εμβολίων και μελετών που περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή DNA-πρωτεΐνης. Η έκφραση των χημικών πρωτεϊνών είναι υπό τον έλεγχο του υποκινητή *tac*, ο οποίος επάγεται από το ανάλογο της λακτόζης, το isopropyl β-D thiogalactoside (IPTG). Οι φορείς που χρησιμοποιούνται φέρουν το γονίδιο *lacIa*, το προϊόν του οποίου είναι μια πρωτεΐνη καταστολέας που προσδένεται στην περιοχή του χειριστή του υποκινητή, εμποδίζοντας την έκφραση μέχρι αυτή να επαχθεί από το IPTG. Έτσι, διατηρείται αυστηρός έλεγχος στην έκφραση του προϊόντος. Το στέλεχος της *E.coli* που συνήθως χρησιμοποιείται είναι το BL21 γιατί είναι ελαττωματικό ως προς την παραγωγή πρωτεασών OmpT και Lon και έχουν καλή απόδοση στην παραγωγή.

1.10 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΨΑΡΙΩΝ-ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Ένα γεγονός που δεν έχει επισημανθεί και προβληθεί στο κοινό όσο πρέπει είναι ότι η ιχθυοκαλλιέργεια είναι ίσως ο πιο δυναμικός κλάδος πρωτογενούς παραγωγής στην Ελλάδα αλλά και στην Ευρώπη. Η υψηλού επιπέδου τεχνογνωσία που έχει αποκτηθεί, η εντατική έρευνα, πειραματισμός και ανάπτυξη στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς έχουν οδηγήσει σε αύξηση της αποδοτικότητας, σε μείωση του κόστους παραγωγής και του κόστους κεφαλαίου ανά παραγόμενη μονάδα, ενισχύοντας περαιτέρω την ανταγωνιστικότητα του κλάδου. Στην περίοδο 1990 – 1997 η κατανάλωση αλιευμάτων αυξήθηκε κατά 31%, ενώ η προσφορά από την συλλεκτική αλιεία αυξήθηκε μόνο κατά 9%, με επακόλουθο να ενταθεί η πίεση στους αλιείς που μεταφράστηκε σε υπεραλίευση πολλών εμπορικών ειδών (FAO 2000). Για να καλύψει την αυξανόμενη ζήτηση για αλιεύματα η υδατοκαλλιέργεια επεκτάθηκε και είναι σήμερα η πιο γρήγορα αναπτυσσόμενη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων παγκοσμίως. Εκτιμάται ότι μέχρι το 2030 οι μισές ποσότητες αλιευμάτων που θα καταναλώνονται από τον παγκόσμιο πληθυσμό θα παράγονται από υδατοκαλλιέργειες.

Οι μελέτες για τη διατροφή των υδρόβιων οργανισμών παραμένουν απαραίτητες κυρίως για την κερδοφόρα υδατοκαλλιέργεια. Η αποτελεσματική σίτιση εξαρτάται από τη γνώση για το πώς οι οργανισμοί χρησιμοποιούν τα διάφορα συστατικά της τροφής. Στην υδατοκαλλιέργεια, πολλές δοκιμές σίτισης έχουν χρησιμοποιηθεί για να μετρήσουν τη θρεπτική αξία που παρέχουν οι τροφές στην ανάπτυξη των ψαριών. Εντούτοις, αυτές οι

μέθοδοι είναι ακριβές, χρονοβόρες και τα αποτελέσματα επηρεάζονται αισθητά από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Τα εκτρεφόμενα ψάρια ταΐζονται αρχικά με ζωντανή τροφή. Συγκεκριμένα όταν περάσει το προνυμφικό στάδιο, και ο γόνος σταματήσει να τρέφεται από τον λεκιθικό σάκο, εκτρέφεται με τροχόζωα (*Branchionus plicatilis*). Στην συνέχεια η διατροφή τους εμπλουτίζεται με *Artemia* -από την 11^η έως την 20^η ημέρα με ναύπλιους και μεταναύπλιους και συνεχίζουν έως την 30^η ημέρα με μεταναύπλιους. Τα τροχόζωα που χρησιμοποιούνται για την διατροφή των ψαριών καλλιεργούνται στην μονάδα και είναι εμπλουτισμένα με γαλακτώματα (λίπη, πρωτεΐνες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά).

Η ζωντανή τροφή πολύ σύντομα αντικαθίσταται από σύνθετη, αδρανή βιομηχανοποιημένη ιχθυοτροφή, η οποία συνίσταται από θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για το ψάρι όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα, λιπαρά, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Η σύνθετη τροφή δίδεται υπό την μορφή συμπύκνων τα οποία προέρχονται από ανάμειξη ιχθυάλευρου, ιχθυελαίου, σόγιας, αλευριού και ανόργανων συστατικών. Έτσι επιτυγχάνεται η δημιουργία εύγεστης τροφής η οποία έχει πλούσια θρεπτική αξία.

Οι τροφές αποτελούν σημαντικό μέρος του κόστους παραγωγής και μία από τις αιτίες είναι το υψηλό ποσοστό πρωτεΐνης σε αυτές (40% - 50%) που προέρχεται από πηγές πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται και στην διατροφή του ανθρώπου, με υψηλό κόστος παραγωγής, συγκέντρωσης και αγοράς. Η κριτική έχει επικεντρωθεί στη χρήση ιχθυαλεύρου. Το ιχθυάλευρο είναι η σημαντικότερη πηγή πρωτεΐνης στις ιχθυοτροφές, λαμβάνοντας όμως υπόψη το κόστος του, οι ερευνητικές προσπάθειες κατευθύνθηκαν σε αξιολόγηση συστατικών ως υποκατάστατα του στη τροφή ψαριών (Alexis et al 1985). Η αναζήτηση τους αποτελεί μία παλαιά προτεραιότητα της έρευνας στην υδατοκαλλιέργεια (Alexis et al 1985), προκειμένου για την ελαχιστοποίηση του κόστους εκτροφής. Ως εναλλακτικές πηγές ιχθυάλευρου με επαρκή πρωτεϊνική σύσταση θα μπορούσαν να αποτελέσουν τόσο οι ζωικές πρώτες ύλες (κρεατάλευρα) όσο και οι φυτικές (σόγια όσπρια, δημητριακά, αραβόσιτος).

Οι ερευνητικές προσπάθειες έχουν στραφεί επίσης στη προσθήκη ενζύμων στη τροφή των ψαριών ώστε να υδρολύονται οι διατροφικές πρωτεΐνες ευκολότερα. Η υδρόλυση

της πρωτεΐνης μπορεί να βελτιώσει την εντερική απορρόφηση κυρίως στα πρώτα στάδια ανάπτυξης. Αποτελεί μια ερευνα μεγάλης σπουδαιότητας που μπορεί να βελτιώσει τις φυσικοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες της πρωτεΐνης χωρίς αλλαγές στη θρεπτική τους αξία. Όταν περίπου 100 εκατομμύρια τόνοι των ψαριών το χρόνο αλιεύονται, εκ των οποίων 29.5% μετασχηματίζεται σε ιχθυάλευρο (Rebeca et al., 1991), η εφαρμογή της ενζυμικής τεχνολογίας για να ανακτηθεί και να τροποποιηθεί η διατροφική πρωτεΐνη στα ψάρια μπορεί ίσως να δώσει τη λύση. Με έναν εντυπωσιακά αυξανόμενο παγκόσμιο πληθυσμό και τον κίνδυνο της υπερβολικής εκμετάλλευσης, υπάρχει μεγάλη ανάγκη να χρησιμοποιηθούν οι θαλάσσιοι πόροι με μεγαλύτερη νοημοσύνη και πρόβλεψη.

1.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Με τον όρο πεπτικότητα εννοούμε το ποσοστό των θρεπτικών συστατικών της τροφής που παραμένουν διαθέσιμα στον οργανισμό και δεν αποβάλλονται με τα περιττώματα. Η διαδικασία της πέψης στους υδρόβιους οργανισμούς επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων όπως η περιβαλλοντική θερμοκρασία, το μέγεθος του γεύματος, το διατροφικό επίπεδο και το στάδιο ανάπτυξης του ψαριού.

Μια μεγάλη ποικιλία δοκιμών *in vitro* για την μέτρηση της πεπτικότητας έχει αναπτυχθεί εδώ και χρόνια, που χαρακτηρίζονται από διαφορές τόσο στον τύπο των χρησιμοποιούμενων ενζύμων όσο και στους όρους της υδρόλυσης καθώς και στη μέθοδο για την ανάκτηση των τελικών προϊόντων (Haard, 1992). Οι δοκιμές *in vitro* έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στις μελέτες για τα ζώα (Boissen & Eggum, 1991) αλλά μόνο πρόσφατα έχουν εφαρμοστεί στους υδρόβιους οργανισμούς (Bassompierre et al, 1997, Alarcon et al, 1999a). Η δυσκολία στη χρήση τους στους υδρόβιους οργανισμούς συνδέεται άμεσα με το πολύπλοκο βιοχημικά και ανατομικά πεπτικό σύστημα τους, που διαφέρει σημαντικά με αυτό των θηλαστικών (Haard, 1992). Ένα πεπτικό ένζυμο στα ψάρια παρουσιάζει ευκρινείς φυσικοχημικές διαφορές από το ομόλογό του στα θηλαστικά. Για παράδειγμα το ένζυμο της θρυψίνης που εμφανίζεται στο στομάχι των ψαριών δείχνει να έχει μεγαλύτερη καταλυτική δράση σε σχέση με αυτό των θηλαστικών και άλλων οργανισμών. Επίσης η θρυψίνη στα ψάρια παρουσιάζει ένα πιο σταθερό χαρακτήρα σε αλκαλικό pH από ότι παρουσιάζει το ένζυμο στα θηλαστικά. Γενικά έχει βρεθεί πως τα πεπτικά ένζυμα των ψυχρόαιμων υδρόβιων οργανισμών ανταποκρίνονται

διαφορετικά σε θερμοκρασιακές αλλαγές, έχοντας υψηλότερη μοριακή δραστικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες συγκριτικά με τα αντίστοιχα πεπτικά ένζυμα των θερμόαιμων οργανισμών.

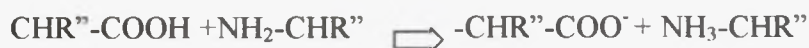
Οι μέθοδοι *in vitro* για την μέτρηση της πρωτεϊνικής πεπτικότητας είναι απαραίτητες κυρίως επειδή είναι ταχύτερες και πιο οικονομικές σε σύγκριση με τις μεθόδους *in vivo* που χρησιμοποιούν ζωντανούς οργανισμούς και επιτρέπουν ίσως μια πιο λεπτομερή αξιολόγηση της υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών (Grabner, 1985). Η χρήση μιας pH-stat μεθόδου για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας των διατροφικών πρωτεϊνών *in vitro* προσφέρει μερικά πλεονεκτήματα: (1) το σταθερό pH κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πέψης (2) το ποσοστό πρωτεϊνικής υδρόλυσης που μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πέψης με την αξιολόγηση της αυτόματα καταγραμμένης καμπύλης τιτλοδότησης (Pedersen & Eggum, 1983). Η τιτλοδότηση που χρησιμοποιεί το pH-stat είναι μια μέθοδος που καθορίζει το βαθμό υδρόλυσης της πρωτεΐνης (DH) *in vitro* χρησιμοποιώντας απομονωμένα πεπτικά ένζυμα. Οι Dimes και Haard (1994) ανέπτυξαν μια μέθοδο *in vitro* χρησιμοποιώντας ένζυμα από το πυλωρικό τμήμα πεστροφών και υπολόγισαν την πρωτεϊνική πεπτικότητα από μια pH-stat δοκιμή. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος ήταν ένας ακριβής τρόπος να υπολογιστεί η πρωτεϊνική πεπτικότητα των εναλλακτικών πρωτεϊνικών πηγών στις τροφές για σολομοειδή.

Η λειτουργία της μεθόδου του pH stat στηρίζεται :

1. Στη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών με τη βοήθεια ενζύμων



2. Στην αυθόρμητη ανταλλαγή πρωτονίου μεταξύ της ελεύθερης καρβοξυλομάδας και αμινομάδας



3. Στη στοιχειομετρική ανάλυση των αμινοξέων που ελευθερώνονται μέσω της τιτλοδότησης της αμινομάδας



1.12 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί :

1. Στην ανάπτυξη κατάλληλων μοριακών μεθόδων για την παραγωγή υψηλών ποσοτήτων ανασυνδυασμένων πεπτικών πρωτεασών της τσιπούρας και συγκεκριμένα της χυμοθρυψίνης I και II και της θρυψίνης II (CHTRI, CHTRII, TRPII)
2. Στο χαρακτηρισμό της ενζυμικής δραστηριότητας των ανασυνδυασμένων αυτών πεπτικών πρωτεασών με τη χρήση συνθετικών υποστρωμάτων
3. Στη χρήση των ανασυνδυασμένων πρωτεασών για τη μέτρηση της πεπτικότητας διατροφικών πρωτεϊνών *in vitro* αντί φυσικών ενζυμικών εκχυλισμάτων
4. Στη χρήση των ανασυνδυασμένων πρωτεασών για τη βελτίωση της διατροφικής αξίας και επίδοσης τεχνητών σιτηρεσίων στην τσιπούρα.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 ANTIBIOTIKA

- Αμπικιλλίνη ($C_T=100$ $\mu\text{g/ml}$).
- Χλωραμφαινικόλη ($C_T=34$ $\mu\text{g/ml}$).

2.1.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ

- LB BROTH (Sigma) (18 g/L)
- LB-Agar (Scharlaw) (30 g/L)

2.1.3 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

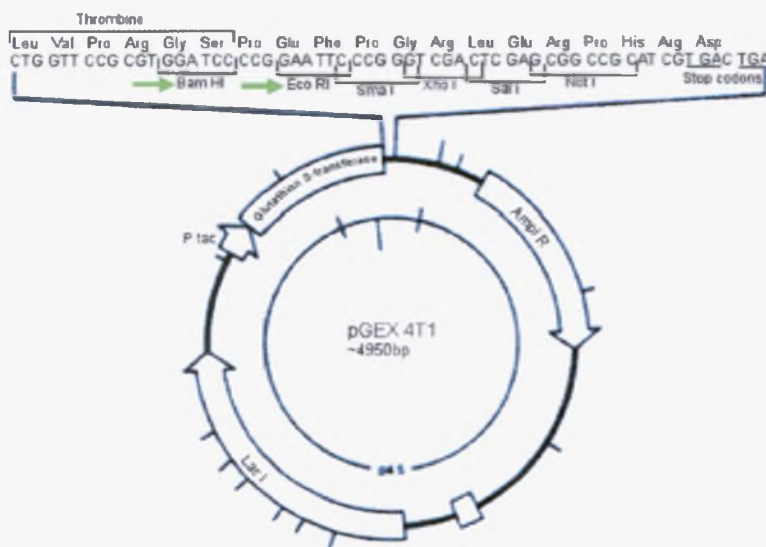
- N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester, BTEE (Sigma B1625)
- Na-benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide, BAPNA (Sigma B3279)
- N-tosil-L-arginin methyl ester, TAME (SigmaT4626)
- N-suc-Ala-Ala- Pro-Phe-p-nitroaniline (Sigma S7388)

2.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥΣ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Κατά την κλωνοποίηση πραγματοποιείται εισαγωγή ενός τμήματος DNA σε ένα αυτόνομα πολλαπλασιαζόμενο γενετικό στοιχείο, το πλασμίδιο. Οι πλασμιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται είναι μικρά κυκλικά μόρια δίκλωνου DNA, που μπορούν να αναπτύσσονται αυτόνομα σε βακτήρια και φέρουν γονίδια που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Τόσο ο πλασμιακός φορέας, όσο και το τμήμα του DNA που πρόκειται να εισαχθεί σε αυτόν, επωάζονται με τις ίδιες ή με συμβατές ενδονουκλεάσες περιορισμού και στη συνέχεια, επανακυκλοποιούνται συνδεόμενα ομοιοπολικά στα άκρα τους με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού, αντίδραση που καταλύεται από την T4 DNA λιγάση.

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές με ενθέματα τα μόρια cDNA των γονιδίων χυμοθρυψινογόνων (CHTRI, CHTRII) και θρυψινογόνου (TRPII) της τσιπούρας που είχαν απομονωθεί από βιβλιοθήκη cDNA ήπατος και συγκεκριμένα το τμήμα του cDNA που αντιστοιχεί στην ενεργή μορφή των ενζύμων. Ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο pGEX 4T-1 (*EcoRI-BamHI*), ένας φορέας έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια σχεδιασμένος έτσι ώστε τα ανασυνδυασμένα πολυπεπίδια να φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο την πρωτεΐνη της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST) (Σχήμα 2.1). Τα ενθέματα παρήχθησαν με PCR με εκκινητές σχεδιασμένους κατάλληλα ώστε το ένθεμα να κλωνοποιηθεί στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την GST (Filipe A., 2007).

Για την παραγωγή των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E.coli* στελέχους BL21 codon plus που μετασχηματίστηκαν με τις πλασμιδιακές κατασκευές.



Σχήμα 2.1: Ο φορέας pGEX 4T-1 απεικονίζεται το γονίδιο της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST), ο polylinker (θέσεις κλωνοποίησης ενθεμάτων) και το πλαίσιο ανάγνωσης. Τα πράσινα βέλη υποδεικνύουν τα ένζυμα περιορισμού *BamHI* and *EcoRI* που χρησιμοποιήθηκαν κατά την κλωνοποίηση.

2.2.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Χρησιμοποιήθηκε υγρό και στερεό θρεπτικό υλικό LB BROTH τελικής συγκέντρωσης 15g/L και 30g/L LB Agar αντίστοιχα. Για την παρασκευή τους, οι αντίστοιχες ποσότητες θρεπτικών διαλύθηκαν σε νερό και ακολούθησε αποστείρωση στους 100°C για 20min. Ύστερα από την αποστείρωση και αφού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να επανέλθουν σε θερμοκρασία ~50°C προστέθηκαν τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη. Η αμπικιλίνη προστίθεται επειδή ο φορέας pGEX φέρει το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας και η χλωραμφαινικόλη επειδή τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν στελέχους *codon plus*, δηλαδή έφεραν πλασμίδιο, με το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας, που περιείχε γονίδια tRNA που πιθανώς χρειάζονται όταν εκφράζονται ετερόλογες πρωτεΐνες σε βακτήρια.

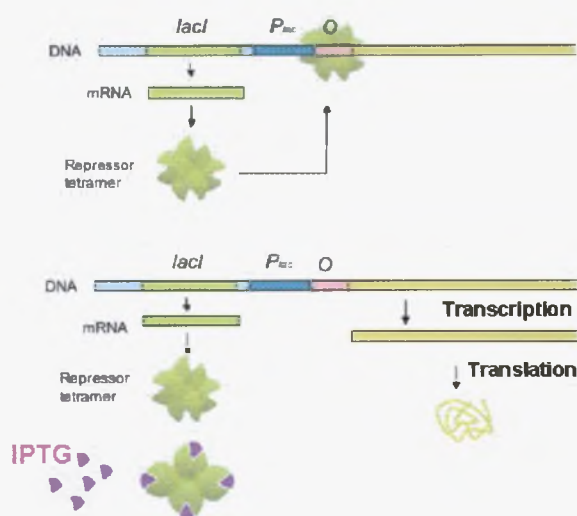
Στη συνέχεια, το στερεό θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό μεταφέρθηκε σε τρυβλία όπου και στερεοποιήθηκε. Πριν χρησιμοποιηθούν, τα τρυβλία επώαστηκαν για μισή ώρα στους 37°C, ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία ενώ αν δεν χρησιμοποιηθούν άμεσα, φυλάσσονται στους 4°C. Εναλλακτικά, είναι δυνατόν το αντιβιοτικό να προστεθεί μετά τη στερεοποίηση του θρεπτικού υλικού. Έτσι, στην περίπτωση καλλιέργειας βακτηρίων στελέχους BL21 *codon plus*, η χλωραμφαινικόλη προστίθονταν εκ των υστέρων σε τελική συγκέντρωση 34μg/ml. Στην περίπτωση ανανέωσης των αποικιών της στερεής καλλιέργειας, από προηγούμενο τρυβλίο ή από καλλιέργεια-στοκ που φυλάσσονταν στους -80°C (stab) γίνονταν μεταφορά αποικιών με μικροβιολογικό κρίκο υπό στείρες συνθήκες. Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με επώαση ολονύχτια στους 37°C. Τα τρυβλία με τις αποικίες φυλάσσονταν στους 4 °C.

Σε περίπτωση υγρής καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του υγρού θρεπτικού μέσου με μια αποικία κυττάρων BL21(DE3) και η καλλιέργεια επώαστηκε υπό ανάδευση στις 200 rpm ολονύκτια. Από την καλλιέργεια που προέκυψε, εμβολιάστηκαν τρεις μεγαλύτερες φλάσκες που περιείχαν 300 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB με τα αντίστοιχα αντιβιοτικά και επώαστηκαν μέχρις ότου η απορρόφηση του αιωρήματος των κυττάρων να φτάσει σε οπτική πυκνότητα OD_{600} 0,65-0,7, ένδειξη ότι τα βακτήρια βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης.

2.2.2 Επαγωγή της παραγωγής πρωτεΐνης

Κατά την εκθετική φάση της καλλιέργειας, η επαγωγή της παραγωγής της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0,1 mM IPTG (ισοπρόπυλο-β-D-θειογαλακτοσίδιο) και επώαση στις βέλτιστες συνθήκες παραγωγής. Στο συγκεκριμένο πείραμα, καθώς είχαν ήδη ταυτοποιηθεί οι βέλτιστες συνθήκες (Filipe A., 2007), η επαγωγή πραγματοποιούνταν για 20 ώρες σε θερμοκρασία 13⁰ C.

Στην παραγωγή των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη BL21 τα οποία δεν παράγουν ενδογενώς πρωτεάσες, που θα μπορούσαν να καταστρέψουν τις παραγόμενες χιμαιρικές πρωτεΐνες. Τα μετασηματισμένα βακτήρια, αναπτύσσονται σε συνθήκες καλλιέργειας, και όταν στο θρεπτικό μέσο προστεθεί ο παράγοντας IPTG τότε επάγεται η παραγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών. Αυτό συμβαίνει διότι στις πλασμιδιακές κατασκευές η έκφραση των χιμαιρικών γονιδίων ελέγχεται από τον υποκινητή *tac* ο οποίος επάγεται από το IPTG. Φυσιολογικά, από το φορέα παράγεται το προϊόν του γονιδίου *lacIq* που αποτελεί καταστολέα του υποκινητή *tac* (προσδένεται στο χειριστή) και εμποδίζει την έκφραση προϊόντων που ρυθμίζονται από αυτόν. Με την προσθήκη του επαγωγέα IPTG ενεργοποιείται ο υποκινητής *tac* και έτσι παράγονται οι χιμαιρικές πρωτεΐνες (Σχήμα 2.2). Η προσθήκη του IPTG ευνοεί την έκφραση της πρωτεΐνης σύντηξης σε σχέση με άλλες κυτταρικές λειτουργίες.



Σχήμα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση της επαγόμενης από το IPTG μεταγραφής του γονιδίου από τον υποκινητή *tac*

2.2.3 Συλλογή κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση για 30min στις 3000 rpm στους 4°C. Μετά την απόχυση του υπερκείμενου, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 1mM, NP-40 0,1%). Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 8 με Tris-HCL γιατί η λυσοζύμη που προστίθεται στη συνέχεια δε λειτουργεί αποτελεσματικά σε pH διαλύματος μικρότερο αυτού. Ακολούθησε προσθήκη λυσοζύμης τελικής συγκέντρωσης 100 µg/ml (stock:10mg/ml), ένζυμο το οποίο καταστρέφει το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων και επώαση στους 4°C ο/ν. Μετά τη προσθήκη της λυσοζύμης το διάλυμα γίνεται ιξώδες λόγω απελευθέρωσης νουκλεϊκών οξέων και δεν μπορούμε να το επεξεργαστούμε. Έτσι ακολούθησε προσθήκη Dithiothreitol (DTT) τελικής συγκέντρωσης 5 mM, που βοηθάει στο να σπάσουν οι δισουλφιδικοί δεσμοί που δημιουργούνται από τις πρωτεΐνες και απορρυπαντικό N-laurylsarcosine (sarkosyl) τελικής συγκέντρωσης 1,5%. Το αιώρημα επώαστηκε σε πάγο για 30 min και ακολούθησε καταστροφή των συσσωματωμάτων και σπάσιμο των νουκλεϊκών οξέων με υπέρηχους (sonication) για 5 χρονικά διαστήματα των 20 sec, ενώ ενδιάμεσα μεσολαβούσε κάθε φορά μία παύση 40 sec, ενώ το δείγμα διατηρούνταν συνέχεια σε πάγο, ώστε να αποφεύγεται η υπερθέρμανση (LABSONIC, Sartorius Stedium). Το τελικό αιώρημα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 12000 rpm στους 4°C και λαμβάνονταν το υπερκείμενο εκχύλισμα των πρωτεϊνών (Frangioni et al, 1992).

2.2.4 Απομόνωση χιμαιρικών πρωτεϊνών

Η απομόνωση των χιμαιρικών πρωτεϊνών επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας σφαιρίδια αгарόζης που περιέχουν καθηλωμένη γλουταθειόνη. Κατά συνέπεια, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών από το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα γίνεται εφικτός λόγω της σύνδεσης της GST με τη γλουταθειόνη (υπόστρωμα της GST), με αποτέλεσμα την καθήλωσή της στα σφαιρίδια. Η διαδικασία που εφαρμόστηκε είναι η ακόλουθη:

- Τοποθέτηση των σφαιριδίων αгарόζης σε eppendorfs των 2 ml. Η ποσότητα των σφαιριδίων εξαρτάται από το ποσό της πρωτεΐνης προς απομόνωση. Γενικά 1 ml σφαιριδίων είναι αρκετό για την σύνδεση 5mg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.
- Εξισορρόπηση των σφαιριδίων στο ρυθμιστικό διάλυμα φυγοκεντρώντας τα στις 1000 rpm για 2 min στους 4°C.

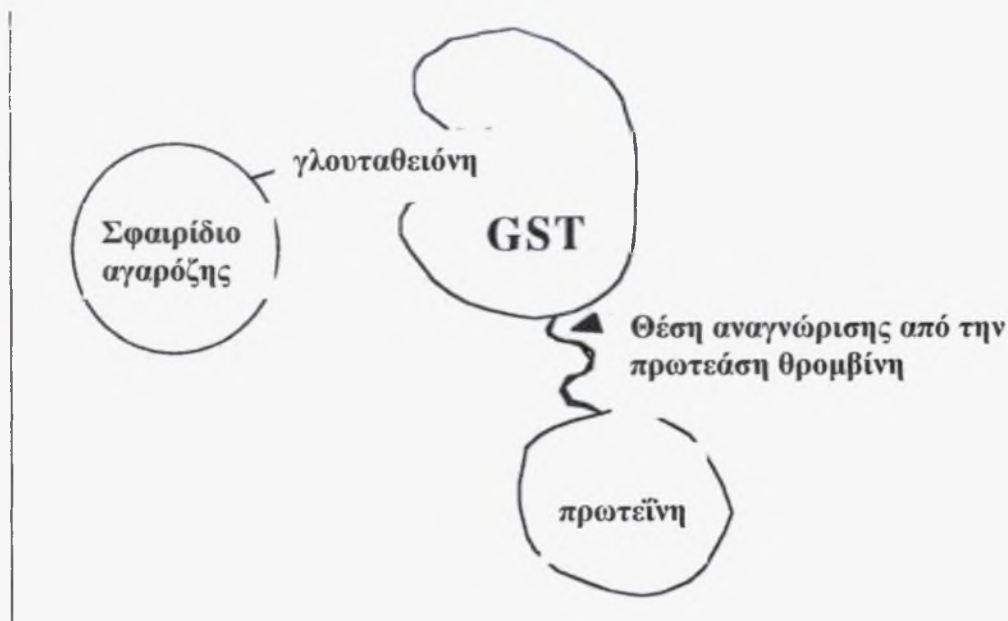
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου αφήνοντας μια μικρή ποσότητα στην οποία και επαναιωρούταν τα σφαιρίδια και προστίθονταν στο εκχύλισμα των πρωτεϊνών.
- Επώαση του μείγματος με ήπια περιστροφική ανάδευση στους 4⁰C ο/ν.

2.2.5 Έκλυση των πρωτεϊνών

Η έκλυση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια γίνεται με την προσθήκη διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης σε περίσσεια. Η γλουταθειόνη, καθώς είναι σε περίσσεια στο διάλυμα, συνδέεται με την GST των χμαιοικών πρωτεϊνών και έτσι τις απομακρύνει εκλεκτικά από τα σφαιρίδια (Σχήμα 2.3). Με αυτόν τον τρόπο, αφενός μεν είναι δυνατή η εύκολη και ποσοτική ανάκτηση της πρωτεΐνης, αφετέρου δε οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται είναι πολύ ήπιες, έτσι ώστε ο κίνδυνος αλλαγών στη δομή και τη δράση της χμαιοικής πρωτεΐνης να είναι μηδαμινός. Η διαδικασία που εφαρμόστηκε είναι η ακόλουθη:

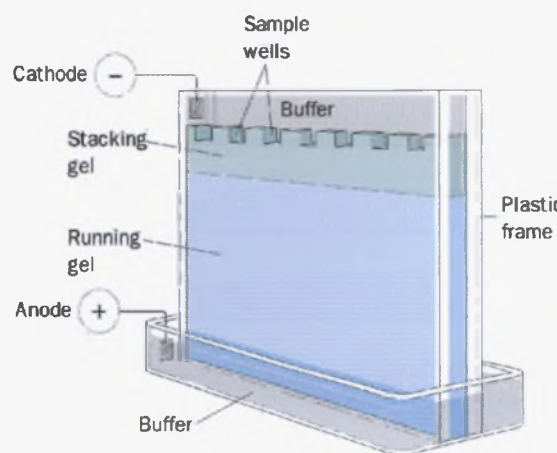
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 1000 rpm για 2 min στους 4⁰C και συλλογή του υπερκείμενου
- Προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (50mM glutathione, 100mM NaCl, 50mM Tris pH 8,5)
- Ακολουθούσε περιστροφική ανάδευση στους 4⁰C ο/ν
- Φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 1 min
- Συλλογή του υπερκείμενου στο οποίο περιέχεται τελικά η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

Η αποθήκευση των πρωτεϊνών γίνεται στους -80⁰C.



Σχήμα 2.3 Σχηματική απεικόνιση έκλυσης πρωτεΐνης από σφαιρίδια αγαρόζης με την προσθήκη γλουταθειόνης σε περίσσεια

2.2.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)



Κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, τα μόρια διαχωρίζονται βάσει του μοριακού τους μεγέθους. Αυτό οφείλεται στην παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού SDS στο πήκτωμα, στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης και στο διάλυμα Laemmli που προστίθεται στα δείγματα (Σχήμα 2.4). Τα πολυπεπτίδια προσδέουν SDS, σε ποσότητα ανάλογη

με το

Σχήμα 2.4 Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε SDS PAGE

μέγεθός τους, φορτίζονται αρνητικά και παρουσία ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται προς την άνοδο. Επιπλέον, το SDS διασπά τους υδρογονικούς δεσμούς, τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και ουσιαστικά αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες. Πλήρης αποδιάταξη επιτυγχάνεται αφενός με την επίδραση της μερκαπτοαιθανόλης (συστατικό του

διαλύματος Laemmli) αφετέρου με τη θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C. Το πήκτωμα αποτελείται από δύο φάσεις: την ανώτερη στην οποία πραγματοποιείται η ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών σε ενιαίο μέτωπο και την υποκείμενη, δηλαδή το πήκτωμα διαχωρισμού. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του πηκτώματος ευθυγράμμισης είναι: 4,5% ακρυλαμίδη/δισακρυλαμίδη (29:1), 0,125M Tris-Cl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,2% TEMED και του πηκτώματος διαχωρισμού 0,375M Tris.Cl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,05% TEMED ενώ η συγκέντρωσή του σε ακρυλαμίδη/δισακρυλαμίδη κυμαίνεται μεταξύ 8% και 12% και επιλέγεται βάσει των μοριακών μεγεθών των πολυπεπτιδίων. Τα πρωτεϊνικά δείγματα αποδιατάσσονται με προσθήκη διαλύματος 5xLaemmli (5x: 250mM Tris-Cl pH 6,8, 10% SDS, 50% γλυκερόλη, 25% μερκαπτοαιθανόλη, 0,5% bromophenol blue) και θέρμανση στους 100°C για 10min. Όλα τα πηκτώματα που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν πάχος 1,5mm και διαστάσεις 8 x 7,3cm. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (10x: 250mM Tris, 1,92M γλυκίνη, 1% SDS, ρύθμιση του pH στο 8,3 με HCl) με σταθερή ένταση πεδίου 35-45mA και μετά το πέρας της ακολουθούσε χρώση.

2.2.7 Χρώση πηκτωμάτων

Η χρώση και η μονιμοποίηση των πολυπεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με διάλυμα Coomassie brilliant blue [45% v/v μεθανόλη, 10% v/v οξικό οξύ, 0,25% χρωστικής Coomassie Brilliant blue R250 (διαλυτή σε μεθανόλη)], που ανιχνεύει 30-100ng πρωτεΐνης. Μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα τοποθετείται στο διάλυμα της χρωστικής και είτε αναδεύεται ήπια από 2h έως ολονύκτια σε RT. Στη συνέχεια το πήκτωμα ξεπλένεται με νερό και μεταφέρεται σε διάλυμα αποχρωματισμού (30% v/v μεθανόλη, 10% v/v οξικό οξύ) όπου και επωάζεται από 2h έως ολονύκτια, ώστε να απομακρυνθεί η χρωστική που δεν έχει δεσμευτεί στα πολυπεπτίδια.

2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας των ανασυνδυασμένων ενζύμων (CHTRI, CHTRII και TRPII) χρησιμοποιήθηκαν γενικά υποστρώματα πρωτεασών (καζεΐνη - αιμοσφαιρίνη) καθώς και συνθετικά, ειδικά για τις διάφορες κατηγορίες

πρωτεασών (N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester, BTEE - Na-benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide, BAPNA – N-tosil-L-arginin methyl ester, TAME - N-suc-Ala-Ala- Pro-Phe-p-nitroaniline, Suc-AAPF-pNA). Όλοι οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν με φασματοφωτόμετρο CARY 50 BIO σε θερμοκρασία 25⁰C. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 1 ml και η ποσότητα του ενζύμου 50pmol. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (5, 10, 20, 50, 100 nM) και σε τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα εκφράστηκε ως U/mg protein.

Το υπόστρωμα BTEE χρησιμοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 44,4mM Tris-HCl pH=7,8 που περιείχε 55,5mM CaCl₂ σύμφωνα με τους Asgeirsson & Bjarnason (1991). Η υδρόλυση του υποστρώματος μετρήθηκε στα 256 nm. Η μονάδα (unit) ενζυμικής δραστηριότητας, ορίστηκε ως 1 nmol BTEE που υδρολύεται κάθε min με τη χρήση ενός ειδικού συντελεστή απορρόφησης $\epsilon=964\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Το υπόστρωμα BAPNA χρησιμοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCL, pH=8,2 που περιέχει 10mM CaCl₂ (Alarcon et al, 1998). Η απορρόφηση προσδιορίστηκε στα 405nm, και η μονάδα (unit) ενζυμικής δραστηριότητας ορίστηκε ως το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1μmol p-νιτροανιλίνης / min. Ο ειδικός συντελεστής απορρόφησης της p-νιτροανιλίνης είναι $8800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Το υπόστρωμα TAME χρησιμοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 46 mM Tris-HCl, pH=8,1 που περιείχε 11 mM CaCl₂ (Hummel, 1959). Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 247nm και η μονάδα (unit) ενζυμικής δραστηριότητας, ορίστηκε ως 1 nmol TAME που υδρολύεται κάθε min με τη χρήση ενός ειδικού συντελεστή απορρόφησης $\epsilon=540\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Το υπόστρωμα N-suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroaniline(Suc-AAPF-pNA) χρησιμοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 Tris-HCL, pH=8 που περιέχει 1mM CaCl₂ . Η απορρόφηση προσδιορίστηκε στα 410 nm και η μονάδα (unit) ενζυμικής δραστηριότητας ορίστηκε ως το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1μmol p-νιτροανιλίνης / min. Ο ειδικός συντελεστής απορρόφησης της p-νιτροανιλίνης είναι $8800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ

Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των ενζυμικών παρασκευασμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Η δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue στα βασικά κυρίως αμινοξέα των πρωτεϊνών αποτελεί τη βάση αυτής της μεθόδου. Η δέσμευση αυτή είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης και μετατοπίζει το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από τα 470 nm στα 595 nm. Το χρώμα του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερό για μια ώρα περίπου και έχει υψηλό μοριακό συντελεστή απορρόφησης που συνεπάγεται υψηλή ευαισθησία στις ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων. Με τη βοήθεια διαλυμάτων αλβουμίνης ορού βοός (BSA) γνωστών συγκεντρώσεων, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη από την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνη.

2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *IN VITRO*

Ο προσδιορισμός της πεπτικότητας των διατροφικών πρωτεϊνών αποτελεί ένα από τα κύρια βήματα για την αξιολόγηση της θρεπτικής αξίας ενός σιτηρεσίου. Η σύνθεση πρωτεϊνικών αμινοξέων καθώς και ο ρυθμός με τον οποίο αυτά πέπτονται αποτελούν κριτήριο για την ποσότητα απορρόφησης τους και ως εκ τούτου και της απαραίτητης ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε οργανισμό.

Για τη μέτρηση της πεπτικότητας χρησιμοποιήθηκε το pH titrator TitroLine alpha plus (Schott). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10 ml. Αιώρημα αλεσμένης τροφής σε αποσταγμένο νερό, σε συνεχή ανάδευση και σταθερή θερμοκρασία 25°C, ρυθμίζονταν σε pH 8 με προσθήκη διαλύματος NaOH 0.1N. Ακολουθούσε η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ενζυμικού εκχυλίσματος ισοδύναμου με 1U πρωτεάσης και η έναρξη συνεχούς προσθήκης διαλύματος NaOH κατά τρόπο ώστε το pH να διατηρείται σταθερό στην τιμή 8.0 για 60 min. Ο όγκος του NaOH ήταν ανάλογος του ρυθμού υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών.

Για τον υπολογισμό του βαθμού αυτοϋδρόλυσης χρησιμοποιήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία χωρίς την προσθήκη του ενζυμικού εκχυλίσματος.

Ο υπολογισμός του βαθμού της υδρόλυσης – αυτοϋδρόλυσης έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση (Diniz & Martin, 1996):

$$DH(\%) = h / h_{tot} \times 100$$

όπου h_{tot} είναι ο συνολικός αριθμός πεπτιδικών δεσμών στο υπόστρωμα που δοκιμάζεται και εκτιμάται από την άθροιση των mmols κάθε αμινοξέως ανά γραμμάριο πρωτεΐνης, και

$$h = (B \times (1/\alpha) \times N_b) / (M \times (S/100))$$

όπου

B= ml του NaOH που καταναλώθηκαν

N_b = η κανονικότητα του NaOH

M= η ποσότητα (g) της τροφής

S(%)= η περιεκτικότητα της τροφής σε πρωτεΐνη

$$\alpha = 10^{pH-pK} / (1 + 10^{pH-pK})$$

όπου το pK μεταβάλλεται με την θερμοκρασία της αντίδρασης και υπολογίζεται σύμφωνα με τους Steinhardt & Beychok (1964) ως εξής :

$$pK = 7.8 + [(298 - T) / (298 * T)] * 2400,$$

όπου T η θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin.

2.5.1 Χρήση ανασυνδυσμένων ενζύμων για μετρήσεις πεπτικότητας *in vitro*

Η υδρόλυση των πρωτεϊνών ενός πρότυπου σιτηρεσίου, που περιείχε μόνο ιχθυάλευρο ως πηγή πρωτεΐνης, προσδιορίστηκε *in vitro* με τη μέθοδο pH-stat και η δράση των ανασυνδυσμένων πρωτεασών συγκρίθηκε με αυτή φυσικού ενζυμικού εκχυλίσματος που απομονώθηκε από τα πυλωρικά τυφλά ατόμων τσιπούρας. Σε κάθε περίπτωση η υδρόλυση πραγματοποιούνταν παρουσία 1U πρωτεάσης, είτε ενζυμικού εκχυλίσματος είτε ανασυνδυσμένου ενζύμου. Ο προσδιορισμός της πεπτικότητας έγινε για αυξανόμενες αναλογίες ποσότητας διατροφικής πρωτεΐνης/U πρωτεάσης (0,50-10,0 mg/U), προκειμένου να προσομοιωθούν οι συνθήκες *in vivo* και να μελετηθεί πως μεταβάλλεται ο ρυθμός πεπτικότητας σε σχέση με την ποσότητα τροφής. Η μεταβολή του ρυθμού πεπτικότητας σε σχέση με την ποσότητα τροφής περιγράφηκε με εξισώσεις τύπου

$$y=a \cdot x^b$$

όπου

y, ο ρυθμός πεπτικότητας (DH)

x, η ποσότητα διατροφικής πρωτεΐνης ανά μονάδα ολικών αλκαλικών πρωτεασών (mg/U).

2.6 ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΗ ΤΡΟΦΗ

2.6.1 Προετοιμασία πειραματικών σιτηρεσίων

Η διαδικασία παρασκευής των τροφών συνίσταται στο άλεσμα των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται, στην ανάμιξη τους και σε τελική φάση στη σύμπηξή τους. Στο συγκεκριμένο πείραμα παρασκευάστηκαν δύο πειραματικές τροφές η μια που αποτελούσε την τροφή μάρτυρα (Μ) και μια δεύτερη (Ε), στην οποία είχαν ενσωματωθεί επιπλέον τα ανασυνδυασμένα πεπτικά ένζυμα που παρήχθησαν στο προηγούμενο στάδιο (CHTRI, CHTRII, TRPII).

Η σύσταση και των δύο σιτηρεσίων ήταν σόγια (45%), ιχθυάλευρο (29%), αλεύρι (12,2%) καθώς και ιχνοστοιχεία με βιταμίνες μέσω ενός χημικού σκευάσματος (Premix 0,3%). Για την καλύτερη ανάμιξη των συστατικών ακολούθησε η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας H₂O καθώς και λάδι (5,3%) και η ανάδευση τους έγινε σε αναμίκτη με στρόβιλο (mixer). Στην πειραματική τροφή Ε προστέθηκαν τα τρία ανασυνδυασμένα ένζυμα CHTRI, CHTRII, TRPII σε ποσότητες 10,225 U, 36,456U και 23,727U αντίστοιχα, αφού διαλυθήκαν πρώτα σε H₂O. Μετά την ομοιογενοποίηση του μίγματος πραγματοποιήθηκε η σύμπηξη με τη βοήθεια ενός ειδικού μύλου και παρασκευή τροφής με τη μορφή «μακαρονιού». Τα παραγόμενα σύμπηκτα ξηράνθηκαν σε φούρνο με αέρα σε θερμοκρασία έως και 38⁰C για την αποφυγή καταστροφής θερμοευαίσθητων θρεπτικών συστατικών όπως πρωτεϊνών, ανασυνδυασμένων ενζύμων, βιταμινών αλλά και αποφυγή οξείδωσης λιπαρών οξέων. Τα σύμπηκτα κόπηκαν με το χέρι σε πολύ μικρές ποσότητες και διατηρήθηκαν στους 4⁰C.

Η περιεκτικότητα των δύο σιτηρεσίων σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kjeldahl.

2.6.2 Ρυθμός αυτοϋδρόλυσης πειραματικών σιτηρεσίων

Ο ρυθμός αυτοϋδρόλυσης των δύο πειραματικών σιτηρεσίων προσδιορίστηκε με το μέθοδο pH-stat όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.5.

2.6.3 Εκτροφή

Άτομα τσιπούρας μέσου βάρους 200g μοιράστηκαν τυχαία σε 4 δεξαμενές διαστάσεων 39cm πλάτος, 79cm μήκος και 50cm ύψος, σε ομάδες των 35 ψαριών. Τα ψάρια στις δύο πρώτες δεξαμενές ταιΐζόταν με την τροφή μάρτυρα (M) ενώ στις άλλες δύο με την τροφή στην οποία είχαν ενσωματωθεί επιπλέον τα ανασυνδυασμένα πεπτικά ένζυμα (E). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε για διάστημα 50 ημερών. Όλες οι τροφές προσφέρθηκαν σε ποσοστό 3% του σωματικού βάρους των ψαριών κατανεμημένο σε τρία ημερήσια γεύματα. Η θερμοκρασία του νερού ήταν 18-20°C, το οξυγόνο 14ppm, η αλατότητα 37‰ και το pH 8. Η παροχή νερού ήταν συνεχής (400ml/20sec) και η φωτοπερίοδος ήταν 8 ώρες την ημέρα. Η παροχή οξυγόνου στο πρώτο μήνα έγινε αποκλειστικά με φιάλες υγρού οξυγόνου ενώ την τελευταία εβδομάδα ενισχύθηκε με την παροχή ατμοσφαιρικού αέρα. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά τρία ζυγίσματα των ψαριών ανά 25 ημέρες και υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός αύξησης (Specific Growth Rate, SGR) σύμφωνα με την εξίσωση:

$$SGR = (\ln W_f - \ln W_0) / t * 100$$

Όπου W_f το τελικό βάρος, W_0 το αρχικό βάρος, t ο αριθμός των ημερών ανάμεσα σε δύο ζυγίσματα.

2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MS EXCEL (Office 2000), με το οποίο πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ενός και δύο παραγόντων (one-way, two-way ANOVA). Η συσχέτιση μεταξύ των μελετούμενων παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης Spearman. Τα αποτελέσματα θεωρούνταν στατιστικά σημαντικά στο επίπεδο $P < 0,05$.

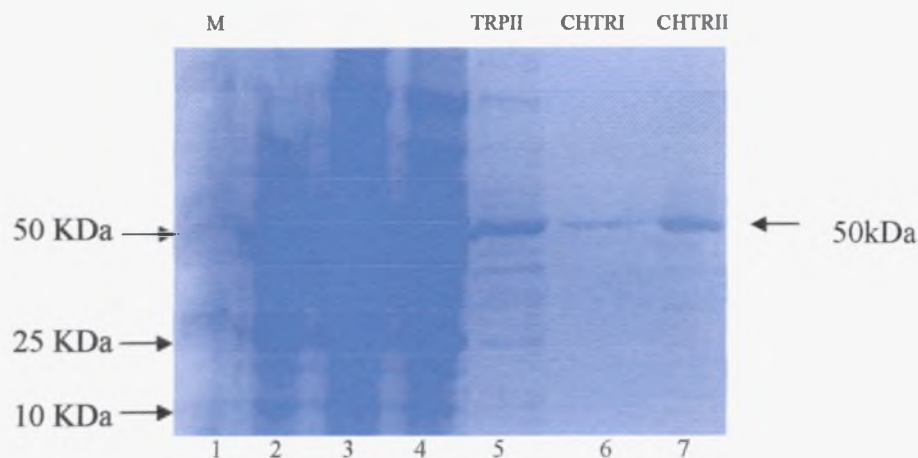
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεασών

Για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεασών χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια (pGEX-TRPII, pGEX-CHTRI και pGEX-CHTRII) που είχαν δημιουργηθεί σε προηγούμενο στάδιο του πειράματος (Alexandra Filipe, 2007) και στα οποία είχε επιβεβαιωθεί η αλληλουχία και το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης. Η παραγωγή έγινε σε βακτήρια *E. coli*, στελέχους BL21 codon plus, σε μεγάλη κλίμακα σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.

Κατά την τελική φάση της παραγωγής, προκύπτουν δύο κλάσματα: το υπερκείμενο (διαλυτά συστατικά) και το ίζημα (υπολείμματα κυττάρων και συσσωματώματα μακρομορίων). Οι επιθυμητές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες εντοπίζονταν στο υπερκείμενο και για την απομόνωσή τους χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια αγαρόζης με ομοιοπολικά συνδεδεμένα μόρια γλουταθειόνης τα οποία συνδέονται με την GST. Έτσι, έμμεσα συνδέονται και οι χιμαιρικές πρωτεΐνες (TRPII, CHTRII, CHTRI) καθώς έχουν παραχθεί σε σύντηξη με τη GST. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια ξεπλένονται και πραγματοποιείται έκλυση των χιμαιρικών πρωτεϊνών.

Τόσο τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέκυψαν (οι απομονωμένες πρωτεΐνες) όσο και τα δείγματα που προέκυψαν μετά τη λύση των κυττάρων και την επεξεργασία με υπέρηχους (συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα συγκέντρωσης 12% και χρώση με διάλυμα χρωστικής Coomassie Blue (Σχήμα 3.1.).



Σχήμα 3.1: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE χιμαιρικών πρωτεϊνών. Τα δείγματα 2,3,4 αντιστοιχούν στα συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και τα 5, 6, 7 στις απομονωμένες πρωτεΐνες TRPII, CHTRI και CHTRII αντίστοιχα. Στη πρώτη σειρά φαίνεται ο δείκτης μεγέθους πρωτεϊνών.

Το μοριακό βάρος των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών υπολογίστηκε βάσει της αμινοξικής αλληλουχίας DQ443543 σε 24,09KDa για την TRPII, DQ443541 σε 25KDa για την CHTRI, DQ443542 σε 24,77KDa για την CHTRII χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα expasy(<http://au.expasy.org>). Έτσι, συνυπολογίζοντας το μοριακό βάρος της GST (26 KD) προκύπτει ότι τα ανασυνδυασμένα μόρια έχουν θεωρητικώς αναμενόμενα μοριακά βάρη ~50 KDa. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.1 οι χιμαιρικές πρωτεΐνες έχουν μοριακά βάρη που συμφωνούν με τα θεωρητικώς αναμενόμενα (δείγματα 5, 6, 7) βάσει σύγκρισης με τον πρωτεϊνικό δείκτη (δείγμα 1). Στις σειρές 2, 3, 4 παρουσιάζονται τα συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που λήφθηκαν κατά την παραγωγή των ενζύμων TRPII, CHTRI και CHTRII αντίστοιχα στα οποία μπορούμε να διακρίνουμε μία εντονότερη ζώνη με μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στα ~50KD και που υποδηλώνει την υπερπαραγωγή των επιθυμητών πρωτεϊνών.

3.1.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα διαφορετικά παρασκευάσματα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκφράστηκε σε $\mu\text{g/ml}$ και στο Πίνακα 3.1

παρουσιάζονται τα ανασυνδυασμένα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στις επόμενες εφαρμογές.

Πίνακας 3.1: Συγκεντρώσεις καθαρών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, βάσει της μεθόδου Bradford.

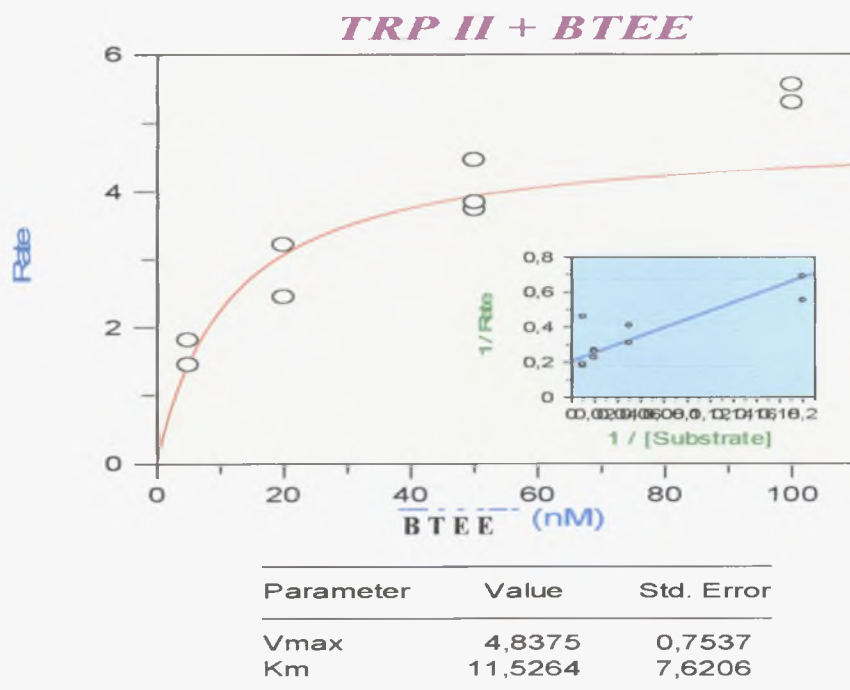
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ENZYMA	μg πρωτεΐνης/ml	ΤΕΛΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ /ml
TRPIIa	315	1,7
TRPIIb	186	1,4
CHTRIIa	4300	2,5
CHTRIIb	3120	2,3
CHTRIIa	1471	1,9

Παρατηρούμε ότι η χυμοθρυψίνη II παρήχθει σε μεγαλύτερη ποσότητα σε σχέση με τα άλλα δύο ένζυμα. Αυτό οφείλεται στο ότι κατά την καλλιέργεια τα κύτταρα αναπτύχθηκαν περισσότερο συγκριτικά με τις καλλιέργειες των άλλων ενζύμων.

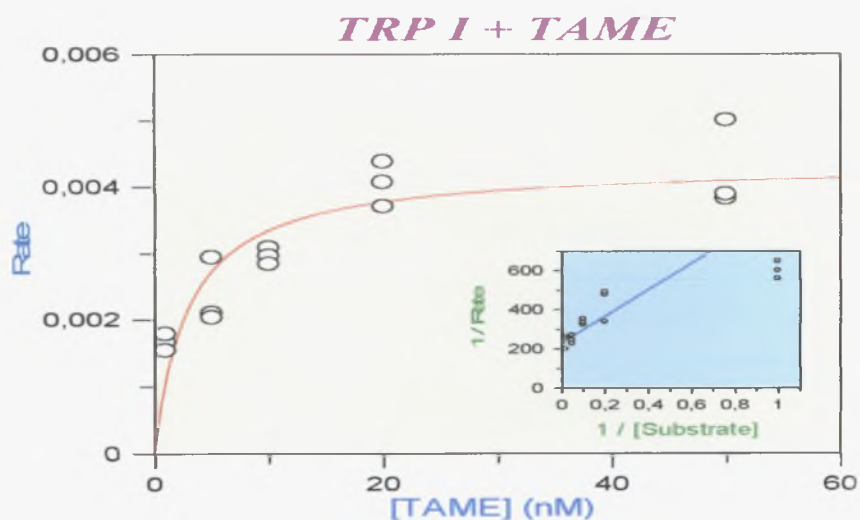
3.2 Εκλεκτικότητα και κινητικές παράμετροι (K_m , V_{max}) των TRPII, CHTRI, CHTRII

Για το βιοχημικό χαρακτηρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεασών CHTRI, CHTRII και TRPII ελέγχθηκαν μια σειρά από εκλεκτικά υποστρώματα και εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων υποστρωμάτων στη ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων. Η συγκέντρωση του ενζύμου, το pH, η θερμοκρασία και ο χρόνος της αντίδρασης παρέμεναν σταθερά ενώ ο μόνος μεταβλητός παράγοντας ήταν οι συγκεντρώσεις των συνθετικών υποστρωμάτων. Επαναλαμβάνοντας τη δοκιμή για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος ήταν δυνατό να καθιερωθεί μια σχέση μεταξύ της ταχύτητας της αντίδρασης, η οποία αντιστοιχεί στο ποσό υποστρώματος που υδρολύεται σε σχέση με το χρόνο, και το αρχικό ποσό υποστρώματος που χρησιμοποιείται στην αντίδραση. Οι κινητικές παράμετροι K_M και V_{MAX} υπολογίστηκαν με τη βοήθεια γραφικής παράστασης όπου στην τεταγμένη βάζουμε την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης και στην τεταγμένη τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος. Η καμπύλη (Michaelis-Menten) είναι μια ορθογώνια υπερβολή. Οι τιμές των παραμέτρων V_{MAX} και K_M υπολογίστηκαν από την αναστροφή της εξίσωσης Michaelis-Menten.

Από τα υποστρώματα που ελέγχθηκαν η TRPII αντέδρασε με τα υποστρώματα BTEE και TAME και οι κινητικές παράμετροι παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.1 και 3.2 αντίστοιχα. Τόσο η CHTRI όσο και η CHTRII αντέδρασε μόνο με υπόστρωμα το BTEE. Οι κινητικές παράμετροι παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.3 και 3.4 αντίστοιχα.



Σχήμα 3.1 Σχηματική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης του BTEE που υδρολύεται ανά λεπτό όταν αντιδρά με την ανασυνδιασμένη TRPII

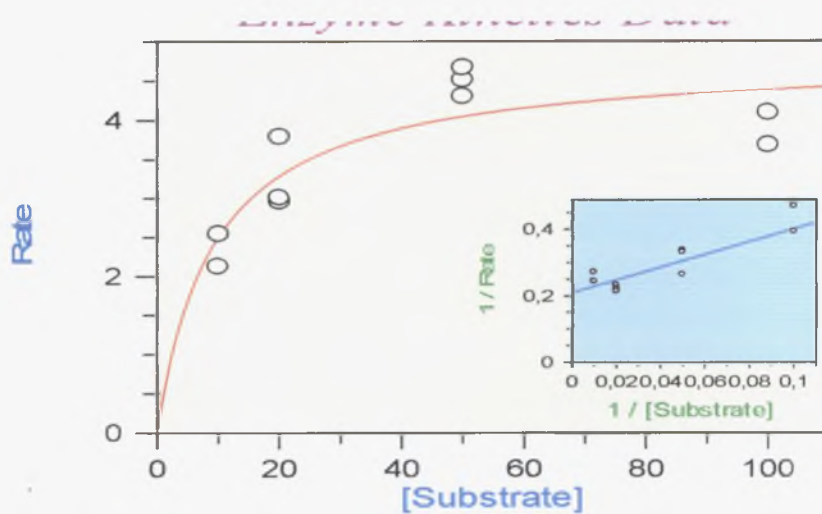


Parameter	Value	Std. Error
Vmax	0,0043	0,0003
Km	2,9327	0,8652

Σχήμα 3.2 Σχηματική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης του TAME που υδρολύεται ανά λεπτό όταν αντιδρά με την ανασυνδυασμένη TRPII

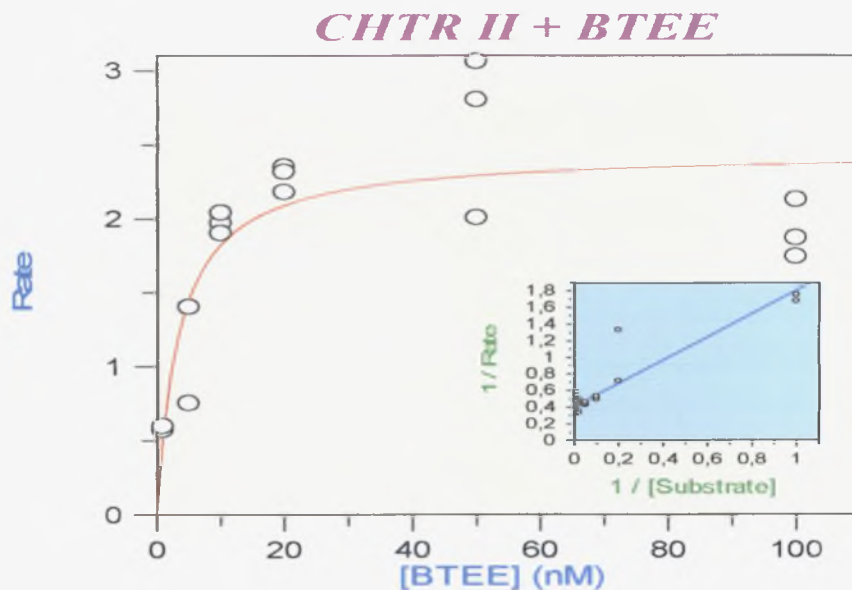
Συγκρίνοντας τις κινητικές παραμέτρους της ανασυνδυασμένης TRPII σε σχέση με τον τρόπο που αυτή αντιδρά με τα δύο υποστρώματα παρατηρούμε ότι με υπόστρωμα το TAME η αντίδραση εξελίσσεται πολύ πιο αργά. Η μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης με το TAME ($V_{MAX} = 0,0043 \text{ U/min}$) ήταν 1000 φορές μικρότερη από αυτή με υπόστρωμα το BTEE ($V_{MAX} = 4,8375 \text{ U/min}$). Αντίστροφα, η σταθερά K_M που δείχνει τη συνάφεια ενζύμου και υποστρώματος υποδεικνύει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα της TRPII στο TAME.

CHTR I + BTEE



Parameter	Value	Std. Error
Vmax	4,7885	0,3852
Km	9,1866	3,1007

Σχήμα 3.3 Σχηματική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης του BTEE που υδρολύεται ανά λεπτό όταν αντιδρά με την ανασυνδιασμένη CHTRI



Parameter	Value	Std. Error
Vmax	2,4493	0,1719
Km	3,4279	1,1616

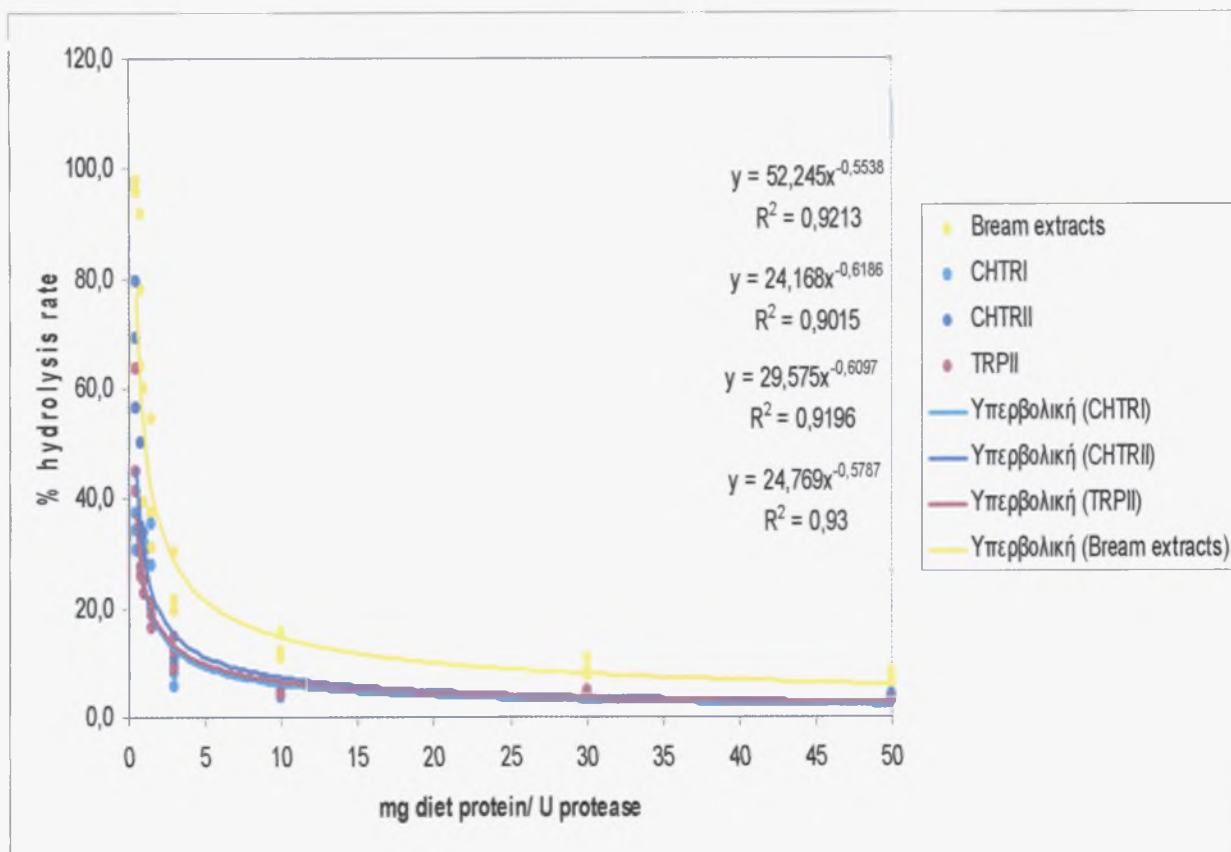
Σχήμα 3.4 Σχηματική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης του BTEE που υδρολύεται ανά λεπτό όταν αντιδρά με την ανασυνδυασμένη CHTRII

Μεταξύ των τριών ανασυνδυασμένων ενζύμων, το CHTRII παρουσίασε την υψηλότερη συνάφεια για το BTEE με $K_M=3,4279$ nM. Η ταχύτερη υδρόλυση του BTEE παρατηρήθηκε παρουσία του TRPII ($V_{MAX} = 4,88375U/min$) και σε ανάλογα επίπεδα κυμάνθηκε η ταχύτητα υδρόλυσής του και παρουσία του CHTRI ($V_{MAX}= 4,7885$ U/min). Η ταχύτητα υδρόλυσης του παρουσία CHTRII ήταν σχεδόν η μισή ($V_{MAX}=2,4493$ U/min) συγκρινόμενη με τις άλλες δύο πρωτεάσες.

3.3 Χρήση ανασυνδυασμένων ενζύμων για μετρήσεις πεπτικότητας *in vitro* – Σύγκριση με μικτά ενζυμικά εκχυλίσματα τσιπούρας

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ικανότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεασών να καταλύουν την υδρόλυση διατροφικών πρωτεϊνών προσδιορίστηκε ο ρυθμός πεπτικότητας των πρωτεϊνών ενός πρότυπου σιτηρεσίου *in vitro* με τη μέθοδο του pH stat

όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.5.1. Η δράση των τριών ανασυνδυασμένων ενζύμων (CHTRII, CHTRI, TRPII) συγκρίθηκε με αυτή μικτού ενζυμικού εκχυλίσματος που απομονώθηκε από τα πυλωρικά τυφλά απόμων τσιπούρας (Σχήμα 3.5).



Σχήμα 3.5 Γραφική απεικόνιση του ρυθμού πεπτικότητας διατροφικών πρωτεϊνών *in vitro* παρουσία των ανασυνδυασμένων ενζύμων (CHTRI, CHTRII, TRPII) καθώς και του μικτού ενζυμικού εκχυλίσματος τσιπούρας.

Είναι φανερό και αναμενόμενο πως σε μικρότερες αναλογίες ποσότητας διατροφικής πρωτεΐνης/Υ πρωτεάσης παρατηρείται ένα υψηλότερο ποσοστό υδρόλυσης κυρίως για τα μικτά ενζυμικά εκχυλίσματα της τσιπούρας. Τα τρία ανασυνδυασμένα ένζυμα παρουσίασαν σαφώς μικρότερο βαθμό υδρόλυσης σε σύγκριση με αυτό των μικτών ενζυμικών εκχυλίσμάτων, με τη CHTRII να βοηθάει λίγο περισσότερο στη πεπτικότητα και να ακολουθούν η TRPII και CHTRI.

3.4 Χορήγηση ανασυνδυασμένων ενζύμων στην τροφή

3.4.1 Ρυθμός αύξησης (SGR)

Ο ρυθμός αύξησης του σωματικού βάρους στα άτομα τσιπούρας στις τέσσερις δεξαμενές τα οποία ταΐζονταν με τις δύο τροφές που παρήχθησαν σύμφωνα με την παράγραφο 2.6.1 παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.2 Συγκριτικά μέσα βάρη και ειδικός ρυθμός αύξησης των ψαριών στα οποία χορηγούνταν σιτηρέσια με (E9,E15) και χωρίς (C10, C16) ανασυνδυασμένες πρωτεάσες

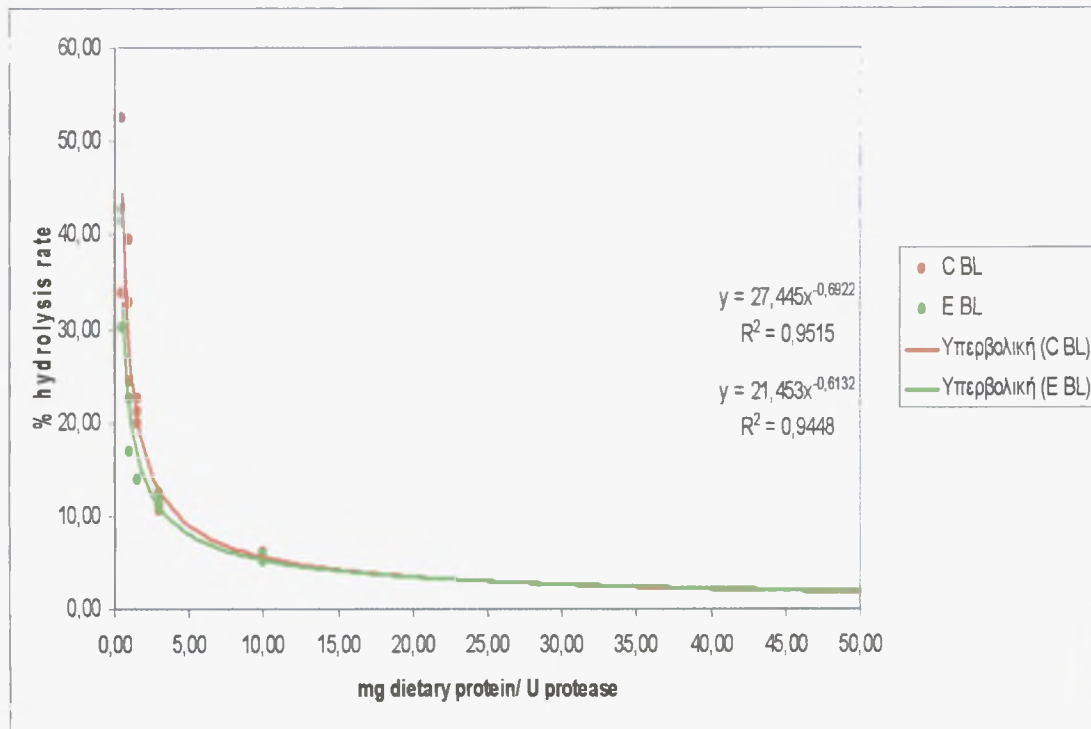
	20/11/2008	15/12/2008	9/1/2009	SGR1/25d	SGR2/25	SGRtotal/50
E9	203,4	298,9	476,8	1,54	1,87	1,70
E15	208,7	308,5	467,9	1,56	1,67	1,62
C10	218,9	327,3	505,3	1,61	1,74	1,67
C16	205,1	311,0	497,8	1,67	1,88	1,77

Ο ρυθμός αύξησης (SGR) στο συνολικό διάστημα του πειράματος δε διέφερε ανάμεσα στα άτομα που τρέφονταν με σιτηρέσιο χωρίς και με ανασυνδυασμένα ένζυμα. Ωστόσο, τις πρώτες 25 ημέρες του πειράματος τα άτομα τσιπούρας στις δεξαμενές C10, C16 στις οποίες χορηγούσαμε την τροφή μάρτυρα (M) επέδειξαν μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης σωματικού βάρους. Παρατηρήσαμε λοιπόν ότι εκείνες τις ημέρες τα άτομα τσιπούρας στις άλλες δύο δεξαμενές απέφευγαν την κατανάλωση τροφής πιθανώς λόγω δυσάρεστης γεύσης. Στο δεύτερο μισό του πειράματος, η ενισχυμένη τροφή (E) καταναλώθηκε κανονικά, οπότε και αποκαταστάθηκε ο ρυθμός αύξησης. Συνολικά, η προσθήκη ανασυνδυασμένων πρωτεασών στην τροφή δεν επέδρασε θετικά στο ρυθμό αύξησης των ψαριών.

3.4.2 Ρυθμός αυτοϋδρόλυσης σιτηρεσίων με και χωρίς ανασυνδυασμένα ένζυμα

Ο ρυθμός αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των δύο σιτηρεσίων που παρήχθησαν, δηλαδή της τροφής που αποτελούσε το μάρτυρα (M) και μιας δεύτερης (E) στην οποία είχαν ενσωματωθεί επιπλέον τα ανασυνδυασμένα πεπτικά ένζυμα (CHTRI, CHTRII, TRPII) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του pH stat. Η γραφική απεικόνιση του βαθμού υδρόλυσης των δύο αυτών σιτηρεσίων φαίνεται στο Σχήμα 3.6. Οι δύο καμπύλες

που παριστάνονται είναι υπερβολικές και μας δείχνουν το βαθμό υδρόλυσης των δύο αυτών σιτηρεσιών στις διαφορετικές ποσότητες πρωτεΐνης.



Σχήμα 3.6 Γραφική απεικόνιση του ρυθμού αυτοϋδρόλυσης των σιτηρεσιών Μ και Ε στις διαφορετικές ποσότητες πρωτεΐνης.

Παρατηρούμε ότι σε μικρότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης ο βαθμός υδρόλυσης είναι μεγαλύτερος και φτάνει έως και 40% στην τροφή μάρτυρα (Μ) ενώ σε μεγαλύτερες ποσότητες διατροφικών πρωτεϊνών ο ρυθμός υδρόλυσης μειώνεται σταδιακά, όπως εξάλλου αναμενόταν. Αξιοσημείωτο όμως είναι το γεγονός ότι η τροφή Ε παρουσιάζει ελάχιστα μικρότερο βαθμό υδρόλυσης συγκριτικά με τη τροφή Μ χωρίς παρόλα αυτά σημαντική στατιστική διαφορά. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στη μικρή περιεκτικότητα των τριών ενζύμων στη σύσταση της τροφής με αποτέλεσμα να μην επαρκεί ώστε να επηρεάσει σημαντικά την πεπτικότητα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μπορούν να βελτιωθούν οι συνθήκες παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεασών

Στην εργασία αυτή παρήχθησαν τρεις ανασυνδυασμένες πεπτικές πρωτεάσες της τσιπούρας (*Sparus aurata*) η TRPII, η CHTRI, και η CHTPII μέσω συστήματος έκφρασης και απομόνωσής τους από *E. coli*. Η ηλεκτροφόρησή τους σε SDS-PAGE, η ποσοτικοποίησή τους και οι μετρήσεις της δραστηριότητας των ενζύμων αυτών έδειξαν ότι η παραγωγή τους ήταν επιτυχής ποσοτικά και ποιοτικά καθώς αυτές διατηρούσαν την ενεργότητά τους. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες αυτές παρήχθησαν σε σύντηξη με την GST στο αμινοτελικό τους άκρο. Η GST είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 26kDa, συγκρίσιμο με αυτό των πρωτεασών, γεγονός που πιθανώς επηρεάζει τη δομή και κατά συνέπεια τη λειτουργία των παραγόμενων πρωτεϊνών. Ωστόσο, τα συστήματα σύντηξης γονιδίων με τη GST είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα με επιτυχία και μάλιστα επιφέρουν και πλεονεκτήματα όπως εύκολη και γρήγορη απομόνωση και διαλυτότητα των χιμαιρικών πρωτεϊνών (Frangioni et al, 1992). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί πως δεν επηρεάζουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών, οι οποίες όταν παράγονται στην *E.coli* διατηρούν πλήρη ενζυμική δραστηριότητα. Παρόλ' αυτά, είναι δυνατόν να επιτευχθεί περαιτέρω βελτίωση των συνθηκών παραγωγής με την απομάκρυνση μέσω πρωτεόλυσης της GST από την χιμαιρική πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, ο φορέας pGEX φέρει μία θέση αναγνώρισης από την πρωτεάση θρομβίνη (Εικ. 2.1), που εντοπίζεται ανάμεσα στη GST και την επιθυμητή πρωτεΐνη. Προκαταρκτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε (αδημοσίευτα αποτελέσματα) έδειξε ότι η πρωτεόλυση της πρωτεΐνης στη συγκεκριμένη θέση που αναγνωρίζεται από τη θρομβίνη είναι εφικτή ωστόσο η απόδοση της μεθόδου ήταν μειωμένη. Συνεπώς, το σύστημα αυτό απαιτεί βελτιστοποίηση έτσι ώστε να απομακρύνεται και όλη η ελεύθερη GST που προκύπτει κατά τη διαδικασία.

Εναλλακτικά, ένας άλλος τρόπος για την παραγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών θα ήταν να χρησιμοποιηθεί ένας φορέας έκφρασης με μικρότερο μόριο σύντηξης (tag). Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η έκφραση πρωτεϊνών που φέρουν ουρά 6 ιστιδινών (6 His) με χρήση π.χ. ενός φορέα έκφρασης που ανήκει στην οικογένεια pET.

4.2 Σύγκριση της εκλεκτικότητας και των ενζυμικών παραμέτρων (Km, Vmax) των TRPII, CHTRI, CHTRII με άλλων ειδών. Μπορούμε να χρησιμοποιούμε καθιερωμένα εκλεκτικά υποστρώματα;

Η μελέτη της κινητικής των τριών ανασυνδυασμένων πεπτικών πρωτεασών (TRPII, CHTRII, CHTRI) που πραγματοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία, με μόνο μεταβλητό παράγοντα τη συγκέντρωση τεσσάρων διαφορετικών συνθετικών υποστρωμάτων, μας οδήγησε στο βιοχημικό χαρακτηρισμό των ενζύμων. Τα ένζυμα έδειξαν να αντιδρούν με δύο από τα τέσσερα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν και έχουν σχεδιαστεί για τα θηλαστικά. Κανένα από τα ένζυμα δεν αντέδρασε με υπόστρωμα το N-suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroaniline, ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ανασυνδυασμένη TRPII δεν αντέδρασε με υπόστρωμα το BAPNA που θεωρείται εκλεκτικό για τη θρυψίνη. Αντίθετα έδειξε μια μεγαλύτερη εκλεκτικότητα στο TAME συγκριτικά με το BTEE. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως να υπάρχει μια άλλη μορφή θρυψινογόνου στο εντερικό περιεχόμενο και στα πυλωρικά τυφλά της τσιπούρας που μέχρι σήμερα αγνοούμε. Από τη άλλη πλευρά η CHTRII και η CHTRI έδειξαν προτίμηση στο BTEE που θεωρείται και το εκλεκτικό υπόστρωμα για τη χυμοθρυψίνη.

4.3 Χρήση ανασυνδυασμένων ενζύμων για μετρήσεις πεπτικότητας *in vitro*.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί η μεταβολή του ρυθμού πεπτικότητας σε σχέση με την ποσότητα τροφής (mg/U) περιγράφεται με εξισώσεις τύπου $y=a \cdot x^b$. Οι συντελεστές **a** και **b** προσφέρουν διαφορετικές πληροφορίες (Alarcon et al. 2002). Ο συντελεστής **a** συνοψίζει την επίδραση των χαρακτηριστικών των διατροφικών πρωτεϊνών (*διαλυτότητα, ρυθμιστική ικανότητα, ποσοστό αμινοξέων επιδεκτικών σε διάσπαση από αλκαλικές πρωτεάσες, θέση και προσεγγισιμότητα πεπτικών δεσμών από πρωτεάσες σύμφωνα με τη διάταξη της πρωτεΐνης*) στο ρυθμό αυτοϋδρόλυσης και πεπτικότητας. Υψηλοί συντελεστές **a** υποδεικνύουν υψηλότερους ρυθμούς υδρόλυσης. Ο συντελεστής **b** υποδεικνύει το ρυθμό μετατροπής της αυτοϋδρόλυσης και της πεπτικότητας συναρτήσει της ποσότητας της τροφής. Όσο αυξάνει ο συντελεστής **b** τόσο περισσότερο μειώνεται ο ρυθμός υδρόλυσης των πρωτεϊνών με την αύξηση της ποσότητας της τροφής. Αυτό μπορεί να οφείλεται, στον κορεσμό των πεπτικών ενζύμων, στην περιέκτικότητα αναστολέων στο σιτηρέσιο καθώς και στην παραγωγή ανασταλτικών για την υδρόλυση προϊόντων της αντίδρασης

4.4 Μπορούμε να χρησιμοποιούμε τα ανασυνδυασμένα ένζυμα αντί των μικτών ενζυμικών εκχυλισμάτων που χρησιμοποιούμε αυτή τη στιγμή;

Οι μετρήσεις πεπτικότητας *in vitro* έδειξαν τελικά την ικανότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεασών να καταλύουν την υδρόλυση διατροφικών πρωτεϊνών ούτως ώστε να μπορούν να αντικαταστήσουν τα μικτά ενζυμικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή. Βέβαια η δράση τους παρουσίασε μικρότερο βαθμό υδρόλυσης γεγονός που μας οδηγεί σε επιπλέον προσπάθειες για βελτιστοποίηση του συστήματος. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω της κανονικοποίησης στη ποσότητα της πρωτεάσης κατά την πειραματική διαδικασία. Μετρήσεις πεπτικότητας με αυξημένες ποσότητες ανασυνδυασμένων πρωτεασών θα μπορούσαν ίσως να δώσουν και μεγαλύτερη υδρόλυση διατροφικής πρωτεΐνης.

4.5 Ποιες είναι οι προοπτικές για τη βελτίωση της πεπτικότητας ιχθυοτροφών με τη χρήση ανασυνδυασμένων ενζύμων;

Η προσθήκη ενζύμων στη τροφή των ψαριών με τη βοήθεια της ανασυνδυασμένης τεχνολογίας με σκοπό την εντερική απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών φαίνεται να αποτελεί τη λύση για την αντικατάσταση του ακριβού ιχθυάλευρου στις ιχθυοτροφές. Βέβαια η ενισχυμένη τροφή που εμείς δημιουργήσαμε με την προσθήκη ανασυνδυασμένων πρωτεασών φάνηκε να μην καταναλώνεται ευχάριστα από τα άτομα τσιπούρας λόγω δυσάρεστης μυρωδιάς. Συνεπώς, κατά τη διαδικασία παραγωγής της τροφής θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένας διαλύτης που θα εμπόδιζε πιθανές δυσάρεστες οσμές και ο οποίος δεν θα προκαλούσε δυσάρεστη γεύση με αποτέλεσμα τη φυσιολογική κατανάλωση ιχθυοτροφής από τα άτομα τσιπούρας.

Παράλληλα ο ρυθμός αυτοϋδρόλυσης των δύο σιτηρεσίων με και χωρίς τα ανασυνδυασμένα ένζυμα δεν έδειξε να διαφέρει στατιστικά ενώ αναμέναμε μεγαλύτερη υδρόλυση πρωτεϊνών στην ενισχυμένη τροφή. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται και σε καταπόνηση των παραγόμενων πρωτεϊνών κατά την διαδικασία παρασκευής της τροφής με αποτέλεσμα να μειώνεται η δραστηριότητα τους. Έτσι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένας διαλύτης-σταθεροποιητής της δραστηριότητας των πρωτεασών με απώτερο στόχο τον υπολογισμό της κατάλληλης ποσότητας πρωτεασών που θα πρέπει να ενισχύεται η τροφή για μεγαλύτερη υδρόλυση.

Συμπεράσματα και μελλοντικές κατευθύνσεις

Η μελέτη των πεπτικών ενζύμων όπως είναι γνωστό αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την ακριβή εκτίμηση της πεπτικής ικανότητας των ψαριών στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια και κάτω από διαφορετικά διατροφικά καθεστάτα. Στη συγκεκριμένη εργασία διαπιστώσαμε ότι ανασυνδυασμένες πρωτεάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη διαφόρων φυσιολογικών φαινομένων αντί των ακατέργαστων ενζυμικών εκχυλισμάτων όπως η ανάπτυξη *in vitro* μεθόδων μέτρησης της πέψης των πρωτεϊνών.

Αξίζει λοιπόν να προχωρήσουμε σε επιπλέον προσπάθειες για βελτιστοποίηση στη διαδικασία παράγωγης των ανασυνδυασμένων ενζύμων έως ότου πετύχουμε μια αξιοπιστία τόσο στη ποσότητα όσο και στη ποιότητα των παραγόμενων πρωτεασών. Η αξιοπιστία στη παραγωγή θα αποτελέσει τη βάση για να υπολογίσουμε την ακριβή ποσότητα ενζύμων που επιφέρουν μεγαλύτερη υδρόλυση διατροφικής πρωτεΐνης. Αξίζει επίσης να βελτιώσουμε την ποιότητα των παραγόμενων σιτηρεσίων τόσο με την προσθήκη διαλυτών που θα αποτρέπουν δυσάρεστες οσμές όσο και με την προσθήκη σταθεροποιητών της δραστηκότητας ενζύμων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alarcón, F.J., Moyano, Díaz, M., Abellan, E., 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus Aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Biochem.* 19, 257-267
- Alarcón, F.J., Moyano, Díaz, M., 1999a. Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquat. Living Resour.* 12, 233-238.
- Alexis M., E. Papaparaskeva - Papoutsoglou & V. Theohari, 1985. Formulation of practical diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) made by partial or complete substitution of fishmeal by poultry by-products & certain plant by-products. *Aquaculture*, 50: 61-73.
- Asgeirsson, B., Bjarnason, B., 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with dovine chymotrypsin. *Comp. Biochem. Physiol.* B99, 327-335
- Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (2004) *Handbook of proteolytic enzymes*, 2nd edn, Elsevier academic press, London
- Barnabe G. (1990). *Aquaculture Vol 1 and 2* Ellis Horwood ed.
- Bassompierre, M., Borresen, T., Sandfeld, P., Ronsholdt, B., Zimmermann, W. and Mclean, E., 1997. An evaluation of open and closed systems for in vitro protein digestion of fish meal. *Aquacult. Nutr.* 3, pp. 153-159.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. Catalytic strategies. In: Berg, J. M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (Eds) *Biochemistry*, 5th ed. WH Freeman & Co, New York, pp 227-260.
- Boissen, S. and Eggum, B.O., 1991. Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple stomach animals. *Nutr. Res. Rev.* 4, pp. 141-162.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Buddington, R.K., Krogdahl, A., Bake-McKellep, A.M., 1997. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relation with diet. *Acta Physiol. Scand.* 161, 67-80.
- Buddington, R.K., Krogdahl, A., 2004. Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Comp. Biochem. Physiol. A* 139, 261-271
- Chakrabarti, I., Gani, Md. A. , Chaki, K.K., Sur, R., Misra, K.K., 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 112, 167-177
- Dabrowski, K., 1984. Ontogenetic development of cyprinid-like type of digestive tract. *Reprod. Nutr. Develop.* 24: 807-819

- **Deguara, S., Jauncey, K., Agius, C., 2003.** Enzymes activities and pH variations in the digestive track of gilthead sea bream. *J. Fish Bio.* 62, 1033-1043.
- **Dimes, L.E., Haard, F.M., 1994.** Estimation of protein digestibility: I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108 A. 349-362.
- **Diniz Fabio M. & Martin Antonio M.** Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science & Technology* Volume 31 Issue 5, Pages 419 - 426
- **Elbal, M.T., Garcia Hernandez, M.P., Lozano, M.T., Agulleiro, B., 2004.** Development of the digestive track of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture* 234, 215-238.
- **FAO, 2000.** The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome, Italy
- **Ferraris, R.P., Ahearn, G.A., 1984.** Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol.* A77,397-413
- **Filipe Alexandra 2007.** Έκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένης χυμοθρυψίνης II του *Sparus Aurata* σε *E. Coli* – εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Διπλωματική εργασία Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.
- **Frangioni V. John, Bebjamin G. Neel, 1992.** Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical Biochem.* 210, 179-187
- **Grabner, M., 1985.** An in vitro method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture* 48, 97-110.
- **Haard, N.F., 1992.** A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 1, pp. 17-35
- **Halver, J.E., 1989.** Fish nutrition. Academic Press Inc., San Diego, USA.
- **Hartley, B.S., 1964.** Amino-acid sequence of bovine chymotrypsinogen A. *Nature* 201, 1284-1287
- **Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A., 1999.** Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170,267-283
- **Hummel, B. C. W. 1959.** A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 1393-1399.
- **Jobling M. (1995)** Environmental Biology of fishes, 175-178
- **Kapoor, B.G., Smit, H., Verighina, I.A., 1975.** The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Mar. Biol.* 13, 109-239.
- **Kolkovski, S., 2001.** Digestive enzymes in fish larvae and juveniles- implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181-201.

- **Kurokawa, T., Suzuki, T., 1995.** Structure of the exocrine pancreas of flounder (*Paralichthys olivaceus*): immunological localization of zymogen granules in the digestive track using antitrypsinogen antibody. *J. Fish Biol.* 46, 292-301.
- **Moyle, P.B., Cech, J.J., 1982.** *Fishes. An introduction to ichthyology.* 5th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ
- **Munilla-Moran, R., Saborino-Rey, F.F., 1996a.** Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol.* B113, 827-834.
- **Neurath, H., 1984.** Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224, 350-357
- **Pedersen, B., Eggum, B.O., 1983.** Prediction of protein digestibility-an in vitro enzymatic pH-stat procedure. *Tierphysiol, Tietemahrg u Futtermittelkde* 49, 277-286.
- **Perona, J.J., Craik, C.S., 1997.** Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J. Biol. Chem.* 272, 29987-29990
- **Polgar, L., 2005.** The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2161-2172
- **Psochiou Eleni, Sarropoulou Elena, Mamuris Zissis, Moutou Katerina A. ,** Sequence analysis and tissue expression pattern of *Sparus aurata* chymotrypsinogens and trypsinogen *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 147 (2007) 367–377
- **Rebeca, B. D.; Pena-Vera, M. T., Diaz-Castaneda, M.** Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; Yield and nutritional value. *J. Food. Sci.* 1991, 56, 309-314.
- **Sarasquete ,M.C., Polo, A., Gonzales de Canales, M.L., 1993.** A histochemical and immunoistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* ., *Histochem. J.* 25, 430-437.
- **Sarasquete ,M.C., Polo, A., Yufera, M., 1995.** Histochemistry and histology of the development of the digestive system of larval sea bream, *Sparus aurata* L.. *Aquaculture* 130, 79-92.
- **Steinhardt J, Beychok S, 1964.** *The Proteins - Academic Press, New York & London, Vol. II, Chap. 8*
- **Suzuki, T., Sivastava, A. S., Kurokawa, T., 2002.** cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine proteases from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 131, 63-70.

