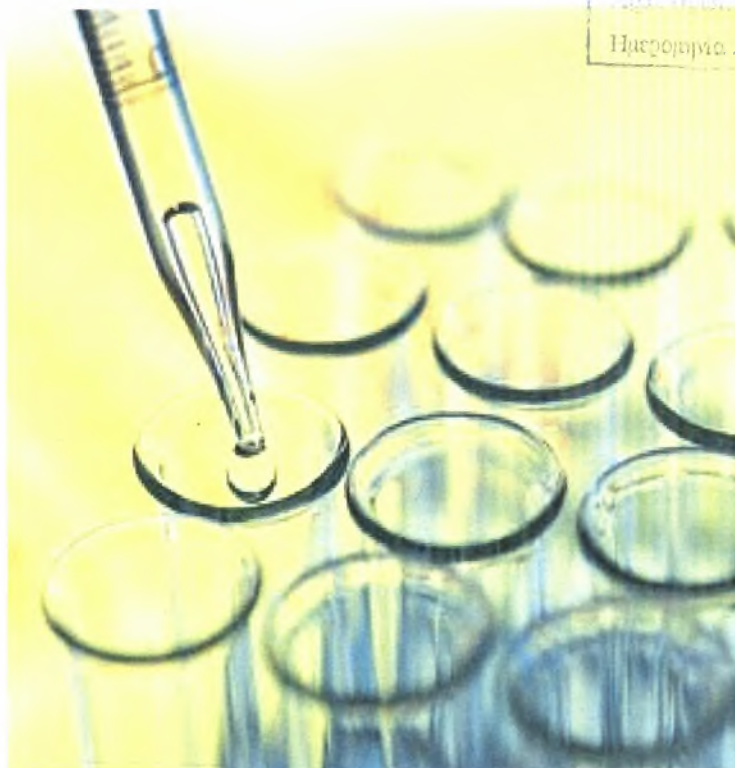


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΗ
ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΤΕΡΙΚΗ
ΧΛΩΡΙΔΑ ΤΟΥ ΛΑΥΡΑΚΙΟΥ (*Dicentrarchus labrax* L.)

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: ΜΠΙΡΜΠΙΛΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ





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

Αριθ. Εισ.: 8151/1
Ημερ. Εισ.: 28-04-2010
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2010
ΜΠΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087083

Το εργαστηριακό- πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας με τίτλο: «απομόνωση βακτηριακών στελεχών με αυξημένη δραστηριότητα γλυκοσιδασών από την εντερική χλωρίδα του ευρωπαϊκού λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*) » πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2009 – Ιανουάριος 2010.

Οι επιβλέποντες καθηγητές της πτυχιακής εργασίας είναι η επίκουρος καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Μούτου Αικατερίνη και ο λέκτορας του Τμήματος κ. Μόσιαλος Δημήτριος.

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής είναι:

- Μούτου Αικατερίνη: επίκουρος καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Μόσιαλος Δημήτριος: Λέκτορας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Κοντού Μαρία: Λέκτορας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στους επιβλέποντες καθηγητές μου, κ. Μούτου Κατερίνα και κ. Μόσιαλο Δημήτρη για την πολύτιμη βοήθεια και την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπο μου, αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο ερευνητικό έργο, προσφέροντας μου την ευκαιρία να αποκτήσω την σημαντική αυτή εργαστηριακή εμπειρία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Γεωργίου Στέλλα και την πτυχιούχο Τόσκα Ελένη για την πολύτιμη βοήθεια τους σε όλη την διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων και την αμέριστη συνεργασία τους.

Ευχαριστώ επίσης θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τις χρήσιμες συμβουλές τους και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στοιχεία βιολογίας και καλλιέργειας του λαυρακιού	5
Βασική βιολογία πέψης	8
Ο ρόλος της βακτηριακής μικροχλωρίδας στην πέψη και την απορρόφηση θρεπτικών	11
Γιατί μας ενδιαφέρουν βακτήρια που παράγουν γλυκοσιδάσες.....	12
Κατηγορίες γλυκοσιδασών.....	13
Υποστρώματα υδατανθράκων.....	18
Σκοπός της μελέτης.....	21

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά και μέσα καλλιέργειας βακτηριών.....	22
Προσδιορισμός της δραστηριότητας γλυκοσιδασών με την χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων.....	23
Προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου.....	25

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....

	27
--	----

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....

	30
--	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....

	33
--	----

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΛΑΥΡΑΚΙΟΥ

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά από οικονομικής και εμπορικής αξίας είδη ψαριών (Εικ. 1.1). Βρίσκεται σε όλο το μήκος των ακτών της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας αλλά και στα δυτικά παράλια της σαχάριας Αφρικής ενώ πυκνοί πληθυσμοί του παρατηρούνται στους ρηχούς πυθμένες της βορειοδυτικής Ευρώπης (Βαλτική και Βόρεια Θάλασσα) καθώς εκεί επικρατούν οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάπτυξη του, που προϋποθέτουν σχετικά χαμηλή θερμοκρασία για ωοτοκία (13-15 °C).

Τόσο το βάρος του όσο και το μήκος του ποικίλουν, με ανώτερες τιμές τα 12kg και 103cm αντίστοιχα ενώ η μέγιστη ηλικία που έχει καταγραφεί είναι τα 12 χρόνια.

Αποτελεί είδος με οξεία όραση και αντοχή στην αλατότητα, ενώ οι θερμοκρασίες στις οποίες επιβιώνει παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση από 2°C μέχρι πάνω και από 30 °C εφόσον υπάρχει καλή ανανέωση νερού.

Η βέλτιστη θερμοκρασία ωστόσο για την ομαλή ανάπτυξη του είναι μεταξύ 22 και 24 °C.

Συστηματική κατάταξη:

Βασίλειο: Ζώα (Animalia)

Φύλο: Χορδωτά (Chordata)

Κλάση: Ακτινοπερύγιοι (Actinopterygii)

Τάξη: Περκόμορφα (Perciformes)

Οικογένεια: Μορονίδες (Moronidae)

Γένος: *Dicentrarchus*

Είδος: *Dicentrarchus labrax*

Dicentrarchus labrax



Probability of occurrence

0.80 - 1.00

0.60 - 0.79

0.40 - 0.59

0.20 - 0.39

0.01 - 0.19

Εικόνα 1.1: Κατανομή πληθυσμών *Dicentrarchus labrax* στις ακτές της Ευρώπης.

Το χρώμα του είναι ασημί πλευρικά που τείνει να γκριζαίνει προς τη ράχη του, και να ασπρίζει προς την κοιλιά του (φαινόμενο της αντισκίασης) .

Όταν είναι ακόμα μικρής ηλικίας, μέχρι και ενάμισι χρόνο, έχει κάποια σκούρα σημάδια, ή κηλίδες στη μεριά της ράχης, οι οποίες θα φεύγουν όσο θα μεγαλώνει και ωριμάζει (www.fishbase.org).

Το σώμα του είναι κυκλικό και επιμηκυσμένο και διαθέτει πλατύ στόμα με μικρά μυτερά δόντια ,το οποία χρησιμοποιεί για να πιάσει την λεία του .

Επιβιώνει τόσο σε αλμυρά όσο και σε υφάλμυρα και γλυκά νερά αλλά κατά το πρώτο στάδιο της ανάπτυξης του χρειάζεται 20% - 30% αλατότητα, ενώ στη συνέχεια επιλέγει βιότοπους όπου η αλατότητα είναι σχετικά σταθερή για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Όσον αφορά το είδος του βιοτόπου προτιμά ακτογραμμές με αμμοφυκιάδες ή βότσαλα για πιο εύκολη προστασία και εύρεση τροφής κοντά στις οποίες υπάρχουν εκβολές ποταμών ή χειμάρρων .

Συναντάται επίσης σε λιμνοθάλασσες και διβάρια.

Τα μικρής ηλικίας άτομα σχηματίζουν κοπάδια για να κυνηγήσουν, να τραφούν και να μετακινηθούν. Όσο μεγαλώνουν τείνουν να γίνονται πιο μοναχικά μέχρις ότου να φτάσουν στο επίπεδο να κυνηγούν ατομικά (*Jennings & Pawson 1992; Picket & Pawson 1994*). Η τροφή τους ποικίλει εξαιρετικά, μιας και το λαβράκι είναι σαρκοφάγος θηρευτής.

Τα νεαρά άτομα τρέφονται σε ένα μεγάλο ποσοστό με αμφίποδα και μικρά καρκινοειδή, ενώ όσο μεγαλώνουν, αρχίζουν να τρέφονται με ψάρια μέχρι και λίγο μικρότερα από το μέγεθός τους, όπως αθερίνες, κεφαλόπουλα και σαφρίδια, καθώς και με μαλάκια (www.fishbase.org).

Στοιχείο της διαίτας τους αποτελούν και τροφές φυτικής προέλευσης πλούσιες σε υδατανθρακικό περιεχόμενο οι οποίες καταναλώνονται κυρίως όταν οι περιβαλλοντολογικές συνθήκες και οι εξωγενείς παράγοντες καθιστούν δύσκολη την εύρεση τροφής πλούσιας σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Επίσης, τα ψάρια αυτά παρουσιάζουν κανιβαλιστικές τάσεις και δεν είναι λίγες οι φορές που θα επιτεθούν σε ψάρι του ίδιου είδους.

Το λαβράκι είναι σχεδόν όλο το χρόνο στις ελληνικές ακτές, κυρίως στην ρηχή ζώνη βάθους μέχρι δέκα μέτρα αλλά μεγάλα άτομα του είδους αλιεύονται σε βάθος μέχρι και ενενήντα μέτρα. Αν και το καλοκαίρι θα έπρεπε να κάνει πολύ πιο έντονη την παρουσία του, λόγω της αλιευτικής πίεσης που υφίσταται, καθώς και με το θόρυβο των σκαφών, των πλοίων και των λουόμενων, το ψάρι τελικά απομακρύνεται στα πιο βαθιά και ασφαλή νερά. Από το Φθινόπωρο και μετά που οι ακτές ησυχάζουν σημαντικά, το ψάρι προσεγγίζει τον αιγιαλό κυρίως για να τραφεί (www.fishbase.org).



ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Ιχθυοκαλλιέργεια ονομάζεται η εκτροφή ή καλλιέργεια χρήσιμων για τον άνθρωπο θαλάσσιων οργανισμών κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες παραγωγής σε κλειστά γλυκά υφάλμυρα ή θαλάσσια ύδατα. Σκοπός της δραστηριότητας αυτής είναι η παραγωγή τροφίμων υψηλής θρεπτικής αξίας με χρήση ζωικών ή φυτικών ζωοτροφών χαμηλής βιολογικής αξίας και χαμηλού κόστους.

Αν και μακραίωνη (οι πρώτες προσπάθειες για εκτροφή ψαριών αναφέρονται στην Κίνα το 2500 πχ) η εξέλιξη των ιχθυοκαλλιεργειών επιταχύνθηκε ιδιαίτερα κατά την σύγχρονη εποχή όπου η αλματώδης αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού και οι αυξανόμενες απαιτήσεις του για την κατανάλωση ψαριών, η ανάπτυξη της αλιευτικής τεχνολογίας και η μείωση του πληθυσμού των ελεύθερων ψαριών λόγω υπεραλίευσης, οδήγησαν σήμερα στην παραγωγή του 25% της παγκόσμιας ποσότητας ψαριών από μονάδες ιχθυοκαλλιεργειών (Εικ. 1.2).

Η βιομηχανία της ιχθυοκαλλιέργειας αποτελεί σήμερα έναν από τους πιο αναπτυσσόμενους κλάδους με ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης της παραγωγής 10% (FAO, 2004) την στιγμή που κλάδοι όπως οι αλιεία και η αγροτική παραγωγή αναπτύσσονται με πολύ βραδύτερους ρυθμούς (1,4% και 2,8% αντίστοιχα).



Source: Fishstat 2003.

Εικόνα 1.2: Παγκόσμια παραγωγή ψαριών 1950-2000. Πηγή: FAO, 2004.

Όσον αφορά την καλλιέργεια του λαυρακιού οι πρώτες προσπάθειες για την μαζική παραγωγή του έγιναν στα τέλη της δεκαετίας του 1960 από την Ιταλία και την Γαλλία ενώ στις επόμενες δεκαετίες που ακολούθησαν και άλλες μεσογειακές χώρες προώθησαν την καλλιέργεια του. Ενώ το 1985 η παραγωγή των μεσογειακών καλλιεργειών λαβρακιού και τσιπούρας ήταν μόλις 347 τόνοι, το 1990 η παραγωγή καλλιεργούμενων ψαριών έφτασε στους 3.876 τόνους όπου η Ιταλία η Ελλάδα και η Ισπανία παρήγαγαν το 80% της όλης παραγωγής (Εικ. 1.3). Το 2000 η συνδυασμένη μεσογειακή παραγωγή ξεπέρασε τους 130.000 τόνους με το μεγαλύτερο μερίδιο της παραγωγής να ανήκει στην Ελλάδα (50%) και να ακολουθούν η Τουρκία (20%) η Ιταλία (12%) και η Ισπανία (10%) (Πανταρίδης, 2005).



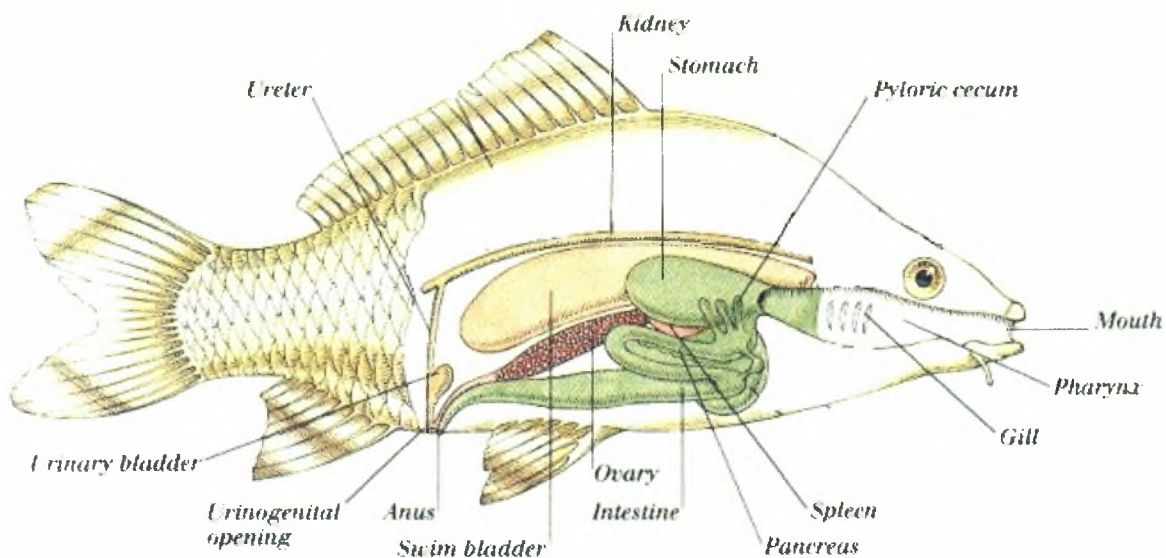
Εικόνα 1.3: Οι μεγαλύτερες χώρες παραγωγί του *Dicentrarchus labrax*. Πηγή: FAO Fishery Statistics 2004)

ΒΑΣΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΠΕΨΗΣ

Το λαβράκι όπως και τα περισσότερα ψάρια είναι παμφάγο, τρέφεται με μια πληθώρα τροφών στην οποία περιλαμβάνονται τόσο φυτικοί οργανισμοί όσο και άλλα είδη μικρότερων ψαριών. Η διαδικασία της πέψης αποτελεί ένα συντονισμένο συνδυασμό φυσικών, χημικών και ενζυμικών δραστηριοτήτων (Εικ. 1.4).

Αρχίζει από το **στόμα** όπου η τροφή διασπάται μηχανικά χωρίς την παρουσία πεπτικών ενζύμων, ενώ στη συνέχεια η τροφή κατευθύνεται στον **φάρυγγα** και τον **οισοφάγο** όπου κατά την διόδο της, επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν βλέννα η οποία χρησιμοποιείται ως λιπαντικό για διευκόλυνση της κατάποσης της τροφής, αλλά και για προστασία του επιθηλίου του οισοφάγου από τραυματισμό. Τα κύτταρα του οισοφάγου δεν εκκρίνουν πεπτικά ένζυμα (Jobling et al., 1995) όμως συμμετέχουν στην ωσμωρύθμιση.

Στην συνέχεια η τεμαχισμένη τροφή προωθείται στο **στομάχι**, στο οποίο πραγματοποιείται η προσωρινή αποθήκευση και η πρωτογενής πέψη, με την δράση του ενζύμου πεψίνη σε όξινο περιβάλλον (Hernandez et al, 1995).



Εικόνα 1.4: Ανατομία του πεπτικού σωλήνα των ψαριών

Το στομάχι από μορφολογικής άποψης χωρίζεται στην **καρδιακή μοίρα** με λεπτά και ελαστικά επιθηλιακά τοιχώματα και την **πυλωρική μοίρα** με παχιά και μυώδη τοιχώματα η οποία καταλήγει στον **πυλωρικό σφιγκτήρα** που αποτελεί την είσοδο στο ανώτερο τμήμα του εντέρου και ρυθμίζει τον ρυθμό της γαστρικής εκκένωσης. Το στομάχι αποτελεί σημαντικό σταθμό της πεπτικής διαδικασίας τόσο με την έκκριση ενζύμων (πεψίνες) που θα διασπάσουν την τροφή, όσο και με την βοήθεια περισταλτικών κινήσεων που αναδεύουν το περιεχόμενο του στομάχου και επιταχύνουν την πέψη του.

Οι πεψίνες, που θα πραγματοποιήσουν την πρωτογενή πέψη, είναι ενδοπεπτιδάσες που εκκρίνονται ως ανενεργά ζυμογόνα και ενεργοποιούνται σε pH χαμηλότερο του 6. Ωστόσο οι πεψίνες έχουν περιορισμένη δράση αφού υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς μόνο μεταξύ αρωματικών και δικαρβοξυλικών αμινοξέων.

Στο **έντερο** πραγματοποιείται το μεγαλύτερο μέρος της πέψης. Είναι ένα πολυσύνθετο όργανο το οποίο ποικίλει στο μήκος μεταξύ των ψαριών (κοντό στο λαβράκι), και πέραν της πέψης συμβάλει στην ισορροπία νερού, και ηλεκτρολυτών, την ενδοκρινή ρύθμιση της πέψης και του μεταβολισμού και την ανοσία.

Αποτελείται από βλεννογόνα και κυλινδρικά μονόστιβα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία έχουν στην επιφάνεια τους μικρολάχνες, αυξάνοντας έτσι την επιφάνεια απορρόφησης.

Χωρίζεται σε **πρόσθιο τμήμα**, που θεωρείται η κύρια θέση απορρόφησης μακρομορίων στο λαβράκι αλλά και τα περισσότερα είδη ψαριών και σε **οπίσθιο τμήμα**, που παρουσιάζει μειωμένη απορρόφηση θρεπτικών και πέψη, ενώ η έκκριση βλέννας είναι αυξημένη επειδή σε αυτό αυξάνεται ο αριθμός των βλενογόνων κυττάρων πλούσιων σε κενοτόπια με ηωσινόφιλο περιεχόμενο, τα οποία έχουν την ικανότητα απορρόφησης και πέψης πρωτεϊνών με πινοκυττάρωση (TanTue, 1980).

Στο ανώτερο τμήμα του εντέρου βρίσκονται μικρά **πυλωρικά τυφλά** (Εικ. 1.5) ενώ στις βάσεις του απελευθερώνονται οι εκκρίσεις του ηπατικού και παγκρεατικού αγωγού (Tanaka, 1971).



Εικόνα 1.5: Πυλωρικά τυφλά και στομάχι ιχθύος.

Τα πυλωρικά τυφλά χρησιμεύουν στη προσωρινή αποθήκευση της τροφής, στη συμπληρωματική πέψη των θρεπτικών συστατικών, στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, στη συμμετοχή στην διαδικασία της οσμωρύθμισης, στην αύξηση επιφάνειας του έντερου και στην αύξηση λειτουργίας του πεπτικού σωλήνα (Μούτου, 2000) .

Η εντερική πέψη πραγματοποιείται από ένζυμα που προέρχονται από

- I) τα παγκρεατικά κύτταρα,*
- II) τα κύτταρα εντερικού επιθηλίου,*
- III) την εντερική μικροχλωρίδα.*

Το πάγκρεας - που παρέχει και την μεγαλύτερη ποσότητα πεπτικών ενζύμων - δεν αποτελεί ένα συμπαγές όργανο αλλά αποτελείται παγκρεατικές νησίδες διάχυτες κατά μήκος του φλεβικού συστήματος από το συκώτι στο στομάχι, το σπλήνα , τα πυλωρικά τυφλά και το έντερο. Από το πάγκρεας παράγονται σημαντικά ένζυμα που δρουν στο επίπεδο του εντέρου και διασπούν πληθώρα βιομορίων όπως αλκαλικές πρωτεάσες , γλυκοσιδάσες , λιπάσες κ.α (Μούτου 2000).

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 και οδηγούν σε αύξηση του pH (Μούτου 2000).

Όταν ολοκληρώνεται η διάσπαση της τροφής με την δράση των πεπτικών ενζύμων προκύπτουν τα τελικά προϊόντα της πέψης (δισακχαρίτες, δι- και τρι- πεπτίδια, μονοσακχαρίτες αμινοξέα, λιπαρά οξέα), που απορροφούνται από τα επιθηλιακά κύτταρα των τοιχωμάτων του εντέρου και μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος για να κατανεμηθούν στους υπόλοιπους ιστούς του σώματος (Μούτου 2000).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ ΣΤΗΝ ΠΕΨΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΠΕΠΤΙΚΩΝ

Τα βακτήρια αποτελούν το πιο πολυπληθές και εξαπλωμένο βασιλείο οργανισμών στην βιόσφαιρα. Με κατά προσέγγιση 5×10^{30} βακτηριακά κύτταρα στη Γη είναι σχεδόν αυτονόητο ότι κανένας άλλος οργανισμός δεν μπορεί να ζει ανεπηρέαστος από την παρουσία τους.

Στους ανώτερους ζωικούς οργανισμούς πολυάριθμοι αριθμοί βακτηρίων ζουν συμβιωτικά στον πεπτικό σωλήνα σχηματίζοντας μια ολοκληρωμένη οικολογική μονάδα με τον οργανισμό ξενιστή. Αν και η ύπαρξη μόνιμης ενδογενούς χλωρίδας στον πεπτικό σωλήνα των ψαριών δεν ήταν αποδεκτή μέχρι τα τέλη του 1970 η ανάπτυξη σύγχρονων τεχνικών όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία απέδειξε ότι σημαντικοί πληθυσμοί κυρίως αερόβιων και δυνητικά αερόβιων βακτηρίων κατοικούν εντός του πεπτικού σωλήνα.

Η μικροχλωρίδα του πεπτικού σωλήνα χωρίζεται σε *αυτόχθονη*, η οποία είναι παρούσα σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του ψαριού, και *αλλόχθονη*, η οποία εγκαθίσταται παροδικά από το εξωγενές περιβάλλον στον πεπτικό σωλήνα (Ringo et al. 2003).

Το προστατευμένο από εξωγενείς κινδύνους περιβάλλον του πεπτικού σωλήνα δημιουργεί άριστες συνθήκες επιβίωσης από πολλά είδη βακτηρίων τα οποία εκμεταλλεύονται την αυξημένη παρουσία θρεπτικών ουσιών που έχουν καταναλωθεί από τον ξενιστή. Η συμβιωτική αυτή διαμονή των βακτηρίων έχει ποικίλα οφέλη στον οργανισμό ξενιστή. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια προστατεύουν τον οργανισμό από την εισβολή και εγκατάσταση παθογόνων μικροοργανισμών και παράγουν πολύτιμες βιταμίνες, που ο ξενιστής αδυνατεί να παράγει (Shisova et al., 1979), προσφέρουν πολύτιμα συστατικά που δεν απαιτούν περαιτέρω υδρόλυση, όπως αμινοξέα, γλυκόζη, και λιπαρά οξέα (Ugolev, 1985).

Επιπλέον συνεισφέρουν στην πέψη των τροφών αφού εκκρίνουν ένζυμα όπως πρωτεάσες, λιπάσες, κυτταρινάσες (παράγονται αποκλειστικά από βακτήρια και όχι από κύτταρα του οργανισμού) και γλυκοσιδάσες που ενισχύουν την δράση των ενζύμων του ξενιστή (Saha & Ray, 1998). Αν και αρχικά πιστευόταν ότι υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια δεν συμβάλουν στην έκκριση πεπτικών ενζύμων, πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι πληθυσμοί αναερόβιων βακτηρίων εκκρίνουν εστεράσες, λιπάσες, όξινη και αλκαλική φωσφατάση, ακόμα και θρυψίνη (Tengjaroenkul et al., 2000). Μολονότι τα παραπάνω ένζυμα υπάρχουν και στους ιστούς ψαριών, τα βακτηριακής προέλευσης ισόένζυμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πέψη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η βακτηριακή αλκαλική φωσφατάση που σχετίζεται με την απορρόφηση λιπιδίων, γλυκόζης και ασβεστίου και ανόργανων φωσφορικών επιτρέποντας στα θρεπτικά συστατικά να διαπερνούν ευκολότερα την πλασματική μεμβράνη (Moss, 1992; Eguchi, 1995; Villanueva et al., 1997). Ακόμη επισημάνθηκε (Matusiewicz & Dabroski 1998) ότι η εντερική αλκαλική φωσφατάση συμμετείχε στην υδρόλυση ασκορβικών φωσφοεστέρων ένα σημαντικό βήμα στην αξιοποίηση της βιταμίνης C. Μια σημαντική ανακάλυψη αποτέλεσε η διαπίστωση ότι τα αναερόβια βακτήρια συμβάλουν και στην πέψη του αμύλου. Μελέτη των Sugita et al. (1982), απέδειξε ότι το 56% των βακτηρίων που μελετήθηκαν

παράγουν αμυλάσες, ενώ μόνο το 20% των αερόβιων βακτηρίων είχαν αμυλολυτική ικανότητα.

Εκτός από την άμεση παραγωγή ενζύμων και θρεπτικών συστατικών διαπιστώθηκε ότι στελέχη βακτηρίων γαλακτικού οξέως μπορούν να επηρεάσουν θετικά την ενδογενή σύνθεση ενζύμων όπως η αλκαλική φωσφατάση, αμινοπεπτιδάσες, λακτάση και σακχαράση. Οι παρατηρήσεις αυτές έγιναν αρχικά σε προνύμφες του ευρωπαϊκού λαυρακιού (Tovar – Ramirez et al. 2004), ενώ παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και κατά την μελέτη ενήλικων ατόμων του ίδιου είδους, στα οποία παρατηρήθηκε βελτίωση της ικανότητας της πέψης, με την αύξηση σύνθεσης θρυψίνης και όξινης φωσφατάσης όταν χορηγήθηκαν σε αυτά παρασκευάσματα βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Frouel et al.2008).

ΓΙΑΤΙ ΜΑΣ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΕΣ



Η αλματώδης ανάπτυξη των ιχθυοκαλλιεργειών αποσκοπεί στο να παρέχει όσο το δυνατόν μεγαλύτερο όγκο και ποικιλία ψαριών στο αγοραστικό κοινό. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επικερδή και παραγωγική πορεία της καλλιέργειας ψαριών είναι να βρεθεί τρόπος ταχύτερης αύξησης των ψαριών και αποτελεσματικότερης εκτροφής αυτών, με τις λιγότερες οικονομικές δαπάνες. Επομένως η χρήση στις ιχθυοτροφές, βακτηρίων που έχουν την δυνατότητα να δράσουν ως προβιοτικά οδηγώντας στην αποτελεσματικότερη πέψη των τροφών αποτελεί μια άκρως ενδιαφέρουσα προοπτική . Ειδικότερα βακτήρια που εκκρίνουν γλυκοσιδάσες θα μπορούσαν να φανούν ιδιαίτερα χρήσιμα, καθώς ένα μέρος της δίαιτας των ψαριών αποτελείται από φυτικής προέλευσης τροφές, οι οποίες περιέχουν σε μεγάλο ποσοστό υδατάνθρακες και πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο .

Σύμφωνα με αποτελέσματα παλαιών αλλά και πρόσφατων ερευνών (Ringo et al. 1995) έχει διαπιστωθεί ότι η ενδογενής μικροχλωρίδα όχι μόνο των ψαριών αλλά και των υπόλοιπων ανώτερων οργανισμών συμβάλει σε πολύ μεγάλο βαθμό στην πέψη των τροφών μέσω των ενζύμων που αυτά εκκρίνουν στο εντερικό αυλό. Βακτήρια που έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν ένζυμα όπως γλυκοσιδάσες θα μπορούσαν να απομονωθούν από πεπτικούς σωλήνες ψαριών όχι αποκλειστικά του είδους *Dicentrarchus labrax* και να ενσωματωθούν σε τεχνητές ιχθυοτροφές, οι οποίες θα χορηγηθούν σε καλλιεργούμενα ψάρια, ιδιαίτερα σε ψάρια που διανύουν τα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους.

Η εξωγενής μικροχλωρίδα θα βοηθήσει στην πέψη τροφών πλούσιων σε υδατανθρακικό περιεχόμενο που μέχρι πρότινος ελάχιστα αξιοποιούνταν από τις ενδογενείς γλυκοσιδάσες του παγκρέατος του ζώου.

Έτσι με την χρήση πολύ φτηνών υποστρωμάτων φυτικής προέλευσης ο ιχθυοκαλλιεργητής μπορεί να πετύχει σε σύντομο χρονικό διάστημα μια ικανοποιητική αύξηση των καλλιεργούμενων ειδών ψαριών και να προσκομίσει κέρδος εκμεταλλεόμενος και τη μείωση των εξόδων από την αγορά ακριβών πρωτεϊνικών ιχθυοτροφών αλλά και από την αύξηση του ρυθμού αύξησης των ψαριών.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΩΝ

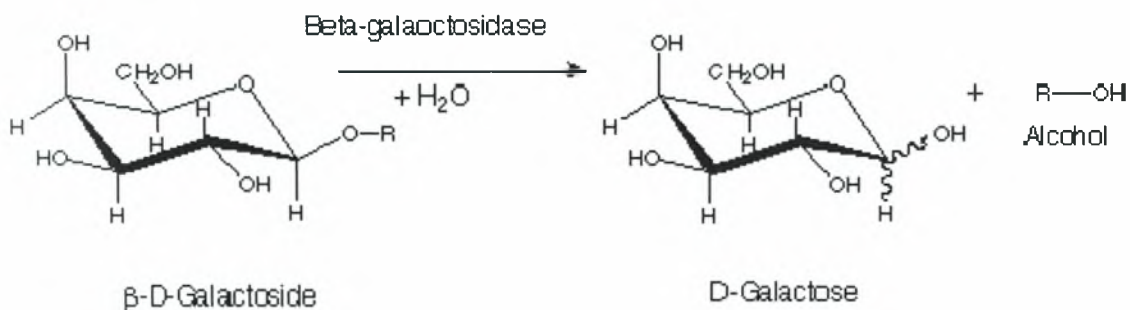
Οι γλυκοσιδάσες (ή γλυκοσιδικές υδρολάσες) είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση γλυκοσιδικών δεσμών για την παραγωγή δυο μορίων μικρότερων σακχάρων. Είναι πολύ συνηθισμένα ένζυμα και συμβάλουν σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών όπως στη αποικοδόμηση βιομάζας κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, σε αντιβακτηριδιακές στρατηγικές άμυνας, σε παθογενετικούς μηχανισμούς και σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες (*Bairoch, 1999*).

Μαζί με τις γλυκοσυλτρανφεράσες, οι γλυκοσιδάσες αποτελούν την κύρια καταλυτική στρατηγική για την σύνθεση και την αποδόμηση των γλυκοσιδικών δεσμών.

Οι γλυκοσιδάσες χωρίζονται ανάλογα με το υπόστρωμα το οποίο καταλύουν έτσι χαρακτηριστικά είδη γλυκοσιδασών είναι τα εξής:

α & β ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΕΣ

Αποτελούν σημαντικά βακτηριακά ένζυμα που υδρολύουν γαλακτοσίδια (μόρια γαλακτόζης ενωμένα με μη-υδατανθρακικό μόριο, όπου αναλόγως με την στερεοχημεία του γλυκοσιδικού δεσμού χωρίζονται σε α & β γαλακτοσίδια δίνοντας έτσι το αντίστοιχο όνομα στα ένζυμα που τα διασπούν) (*Marisa, 1996*). Η β-γαλακτοσιδάση (Εικ. 1.6) χρησιμοποιεί υποστρώματα όπως λακτόζη, γλυκοπρωτεΐνες, γαλιόσιδια (γλυκοσφιγκολιπίδια ενωμένα με ένα μόριο σαλικυλικού οξέως), χρειάζεται ιόντα Mg^{2+} & K^+ για να δράσει και αποτελείται από δυο υπομονάδες (lacZA και lacZΩ).

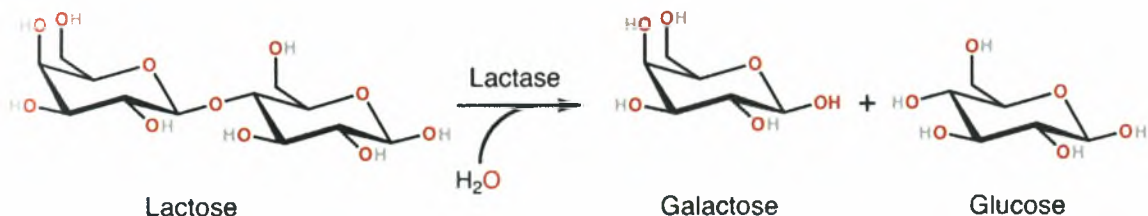


Εικόνα 1.6: χημική αντίδραση που καταλύεται από τη β-γαλακτοσιδάση.

ΛΑΚΤΑΣΕΣ

Οι λακτάσες ανήκουν στην οικογένεια των β-γαλακτοσιδασών. Υδρολύουν τον δισακχαρίτη λακτόζη σε γαλακτόζη και μονομερή γλυκόζη. Στους ανώτερους οργανισμούς οι λακτάσες εντοπίζονται στον εντερικό αυλό στην περιοχή των μικρολάχνων του εντέρου. Οι λακτάσες (Εικ. 1.7) είναι ιδανικές για την υδρόλυση της λακτόζης στο γάλα και έλλειψη ή δυσλειτουργία του ενζύμου προκαλεί δυσανεξία στη λακτόζη (*Tada & Shusaku 2006*).

Η βέλτιστη θερμοκρασία για την δράση του ενζύμου είναι 48 °C (118.4 °F) και το pH στο οποίο δρα πρέπει να προσεγγίζει την τιμή 6,5.



Εικόνα 1.7: χημική αντίδραση που καταλύεται από λακτάση.

Χρήσεις της λακτάσης στην βιομηχανία περιλαμβάνουν τη διάσπαση λακτόζης του γάλακτος σε γαλακτοβιομηχανίες αλλά και σε βιομηχανίες παρασκευής παγωτού καθώς η γλυκόζη και η γαλακτόζη προσδίδουν πιο γλυκιά γεύση από ότι η λακτόζη.

ΑΜΥΛΑΣΕΣ

Η αμυλάση είναι το ένζυμο που αποδομεί το άμυλο σε σάκχαρα. Γνωστή παλαιότερα και ως διαστάση, υπήρξε το πρώτο ένζυμο που ανακαλύφθηκε και απομονώθηκε το 1833 από τους *Anselme Payen* και *Jean-Francois Persoz*.

Αν και ο αριθμός και η ποικιλία των αμυλασών στους ζωικούς ιστούς είναι μεγάλη, (ιδιαίτερα στη σιέλο και το πάγκρεας), στα βακτήρια οι αμυλάσες περιορίζονται στις εξής κατηγορίες:

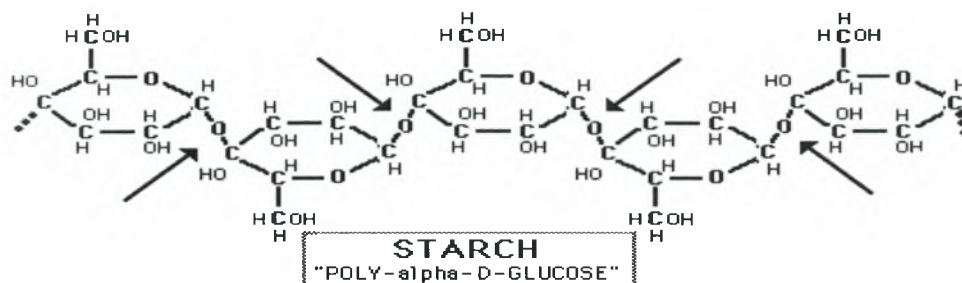
- *α-αμυλάση*

Η α-αμυλάση (1,4-α-D-glucan glucanohydrolase) είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη ασβεστίου, η οποία χάνει πλήρως την λειτουργικότητα της απουσία ασβεστίου. Δρώντας σε τυχαίες θέσεις στην αλυσίδα του αμύλου, (κυρίως στο μόριο της αμυλόζης) διασπά α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς παράγοντας μαλτοτριόζη και μαλτόζη από αμυλόζη ή μαλτόζη, γλυκόζη και δεξτρίνη από αμυλοπηκτίνη (Εικ. 1.8). Επειδή δρα οπουδήποτε στο υπόστρωμα η α-αμυλάση δρα γρηγορότερα από την β αμυλάση.

Στα ψάρια όπως και στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς είναι ένα από κυριότερα πεπτικά ένζυμα, παράγεται από το πάγκρεας και το βέλτιστο pH στο οποίο δρα, κυμαίνεται μεταξύ 6,7-7,0 . Ωστόσο η βακτηριακή α-αμυλάση δρα αποτελεσματικότερα σε όξινες συνθήκες (*Munilla & Saborido, 1996*).

Από συμβιωτικά βακτήρια του πεπτικού σωλήνα παρατηρείται αυξημένη παράγωγή α-αμυλασών, κυρίως από βακτήρια της οικογένειας *Bacillus*. Η ικανότητα τους να διασπούν μακρομόρια υδατανθρακών έχει αρχίσει να βρίσκει εφαρμογές και στον κλάδο της βιοτεχνολογίας . Παραδείγματος χάριν ,

μία α-αμυλάση η "Termamyl", προερχόμενη από τον *Bacillus licheniformis*, χρησιμοποιείται σε απορρυπαντικά για να μετατρέψει τις μεγάλες πολυσακχαρικές αλυσίδες σε ολιγοσακχαρίτες (Paolucci-Jeanjean, 2000).



Εικόνα 1.8: Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις στο μόριο του αμύλου που υδρολύονται από α-αμυλάση.

- β-αμυλάση

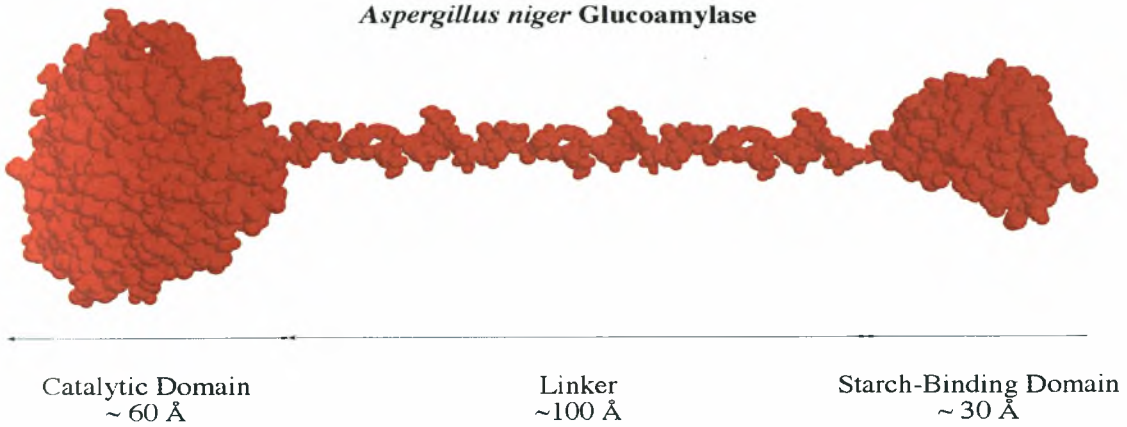
Η β-αμυλάση, (1,4-α-D-glucan maltohydrolase) συντίθεται από βακτήρια, μύκητες και φυτά. Καταλύει την υδρόλυση του α-1,4 γλυκοζιτικού δεσμού μόνο στα άκρα της πολυσακχαρικής αλυσίδας παράγοντας μόρια μαλτόζης.

Οι ζωικοί οργανισμοί δεν παράγουν β-αμυλάση, έτσι τα μόρια αυτής που εντοπίζονται στον πεπτικό σωλήνα των ψαριών προέρχονται αποκλειστικά από συμβιωτικά βακτήρια (Munilla & Saborido, 1996).

- γ-αμυλάση

Η γ-αμυλάση ονομαζόμενη αλλιώς και exo-1,4-α-d-glucosidase ή γλυκοαμυλάση, δρα διασπώντας το άκρο του πολυσακχαρίτη παράγοντας μόρια μαλτόζης και γλυκόζης. Εκτός από τη διάσπαση των τελευταίων α-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών στα άκρα της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης, η γ-αμυλάση διασπά και τους α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς παράγοντας γλυκόζη. Αντίθετα από τις άλλες μορφές αμυλάσης, η γ-αμυλάση είναι αποδοτικότερη στα όξινα περιβάλλοντα και έχει ένα βέλτιστο pH ίσο με 3. Το μόριο της γ-αμυλάσης αποτελείται από την *περιοχή δέσμευσης στο άμυλο* (starch binding domain), την *καταλυτική περιοχή* που απελευθερώνει μόρια γλυκόζης από το υπόστρωμα, και τη *περιοχή συνδέτη* που διατηρεί τις δυο επικράτειες ενωμένες (Εικ. 1.9).

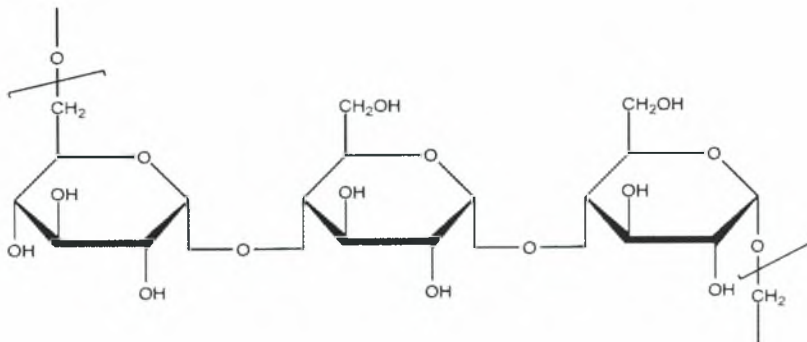
Aspergillus niger Glucoamylase



Εικόνα 1.9: μόριο γ αμυλάσης του *Aspergillus niger*.

- Pullulanase (pullulan-6-glucohydrolase)

Αποτελεί ένα ιδιαίτερο είδος αμυλολυτικής γλυκανάσης που διασπά πολυσακχαρίτες αποτελούμενους από μόρια μαλτοτριόζης συνδεδεμένα με α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Εικ. 1.10).



Εικόνα 1.10: το μόριο της μαλτοτριόζης αποτελείται από τρία μόρια γλυκόζης.

Παράγεται ως εξωκυτταρική λιποπρωτεΐνη από gram αρνητικά βακτήρια του γένους *Klebsiella* αλλά και άλλα είδη βακτηρίων και αρχαίων (*Hope & Dean, 1975*). Οι τύπου I Pullulanases, διασπούν τους α-1,6 δεσμούς ενώ οι τύπου II είναι ικανές να διασπάσουν και α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Χρησιμοποιείται σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές ως απορρυπαντικό.

ΣΑΚΧΑΡΑΣΕΣ

Ενζυμα προκαρυωτικών και ευκαρυώτων που καταλύουν την υδρόλυση της σακχαρόζης σε φρουκτόζη και γλυκόζη. Σε ζωικούς οργανισμούς εκκρίνονται από τις μικρολάχνες του επιθήλιου του εντερικού σωλήνα.

ΙΜΒΕΡΤΑΣΕΣ (β-φρουκτοφουρανοσιδάσες)

Ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση της σακχαρόζης, έχουν παρόμοια δομή και λειτουργία με τις σακχαράσες αφού και οι δυο υδρολύουν σακχαρόζη σε φρουκτόζη και γλυκόζη, με την διαφορά ότι οι σακχαράσες διασπούν O-C γλυκοσιδικούς δεσμούς φρουκτόζης, ενώ οι ιμβερτάσες υδρολύουν O-C

γλυκοσιδικούς δεσμούς γλυκόζης (*Sturm, 1999*). Αποτελούν ένα βασικό ένζυμο των μελισσών οι οποίες το χρησιμοποιούν για την παραγωγή μελιού από το νέκταρ. Οι βέλτιστες συνθήκες για δράση του ενζύμου απαιτούν θερμοκρασία 60°C και pH ίσο με 4,5.

ΜΑΛΤΑΣΕΣ

Ένζυμα που ανήκουν στην υπεροικογένεια των α-γλυκοσιδασών, υδρολύουν τον δισακχαρίτη μαλτόζη. Ουσιαστικά πρόκειται για α-γλυκοσιδάσες, ωστόσο ο όρος μαλτάση δίνει έμφαση στην φύση του υποστρώματος που χρησιμοποιεί το ένζυμο για να παράγει τα μόρια γλυκόζης.

ΧΙΤΙΝΑΣΕΣ

Πεπτικά ένζυμα που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς στην χιτίνη (*Seidl-Seiboth 2008*). Επειδή η χιτίνη είναι δομικό συστατικό του τοιχώματος των μυκήτων αλλά και εξωσκελετικό στοιχείο ορισμένων αρθρόποδων και σκώληκων, οι χιτινάσες παράγονται είτε από αυτούς τους οργανισμούς, είτε από βακτήρια όπως *Bacillus*, *Aeromonas* και *Vibrio* που εκκρίνουν χιτινάσες για να τραφούν από υπολείμματα των προαναφερθέντων οργανισμών. Αν και μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι η χιτίνη δεν χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας από τους οργανισμούς λόγω δυσκολίας πέψης, μελέτες απέδειξαν ότι σε ορισμένα ψάρια τα συμβιωτικά βακτήρια του πεπτικού σωλήνα εκκρίνουν χιτινάσες παρέχοντας στον ξενιστή μόρια γλυκόζης.

ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΕΣ

Αποτελούν την κατηγορία γλυκοσιδασών που αποδομούν το υαλουρονικό οξύ, βρίσκονται στο ακρόσωμα του σπέρματος στα περισσότερα θηλαστικά και βοηθούν την σύζευξη του σπερματοζωαρίου με το ωοκύτταρο. Βακτήρια όπως ο *Staphylococcus aureus* & *Streptococcus pyogenes* παράγουν υαλουρονιδάση για ευκολότερη μετακίνηση εντός των ιστών (*Csoka, 1997*), καθώς οι υαλουρονιδάσες υδρολύουν το υαλουρονικό που βρίσκεται άφθονο στον εξωκυτταρικό χώρο αυξάνοντας έτσι την διαπερατότητα του ιστού.

ΛΥΣΟΖΥΜΗ (N-ακετυλομουραμιδάση)

Υδρολύει τους 1,4-β γλυκοσιδικούς δεσμούς μεταξύ του N-ακετυλομουραμικού οξέως και του τέταρτου άνθρακα της N-ακετυλογλυκοζαμίνης στα μόρια πεπτιδογλυκανών τοιχωμάτων gram⁺ βακτηρίων.

ΞΥΛΑΝΑΣΕΣ

Υδρολύουν το πολυσακχαρίτη β-1,4 ξυλάνιο σε ξυλόζη, ενώ διασπούν τη ημικυτταρίνη των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων αποτελώντας σημαντικά ένζυμα μικροοργανισμών που τρέφονται από φυτικά υποστρώματα. Χρησιμοποιούνται στην χαρτοβιομηχανία για την λεύκανση του πολτού και την αποφυγή πολυχλωριωμένων λευκαντικών ουσιών (*Srinivasan, 1997*).

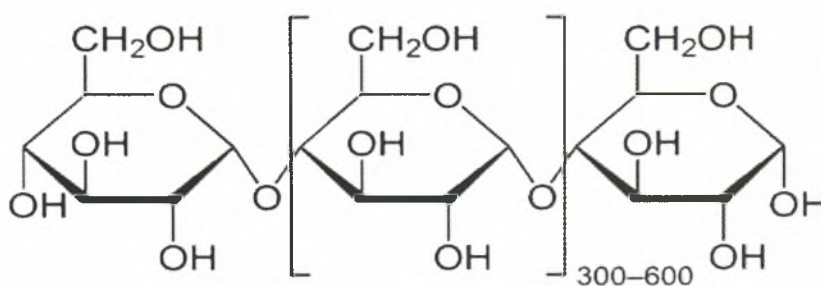
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

Οι προαναφερθέντες κατηγορίες γλυκοσιδασών δρουν σε ένα ευρύ φάσμα υδατανθρακικών υποστρωμάτων, μερικά από τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως από τους οργανισμούς για πρόσληψη ενέργειας. Τα πιο συνηθισμένα υδατάνθρακικά μόρια που καταναλώνουν οι οργανισμοί είναι:

- **ΑΜΥΛΟ**

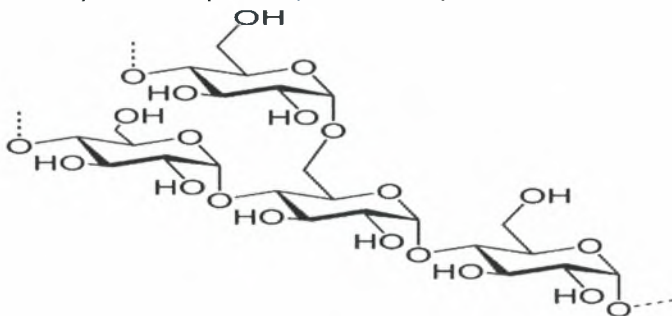
Το άμυλο αποτελεί την θρεπτική δεξαμενή των φυτών, αποτελείται από δεκάδες χιλιάδες μόρια γλυκόζης που διασπώμενα από αμυλάσες παρέχουν ενέργεια στον οργανισμό. Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης που υπάρχει σε δυο μορφές:

I) την **αμυλόζη** (Εικ. 1.11), μια ευθεία αλυσίδα μορίων γλυκόζης, συνδεδεμένων με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς.



Εικόνα 1. 11: μόριο αμυλόζης.

II) την **αμυλοπηκτίνη** (Εικ. 1.12), ένα τύπο αμύλου με διακλαδώσεις, που διαθέτει έναν γλυκοζιτικό δεσμό α -1,6 ανά 30 γλυκοζιτικούς δεσμούς α -1,4 .

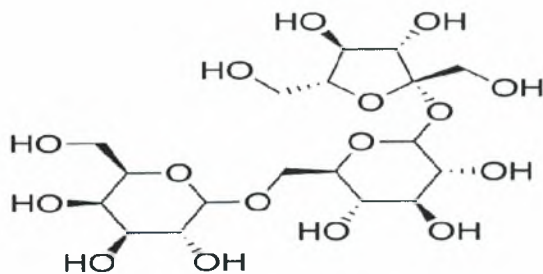


Εικόνα 1.12: μόριο αμυλοπηκτίνης.

Επειδή τα πεπτικά ένζυμα δυσκολεύονται στο να διασπούν κρυσταλλικές δομές, το άμυλο (όπως και οι υπόλοιποι υδατάνθρακες), αποδομείται ανεπαρκώς στον εντερικό σωλήνα, επομένως η προσθήκη βακτηρίων που παράγουν ένζυμα ικανά να παρέχουν μεγαλύτερα ποσά γλυκόζης στο ψάρι θα οδηγούσαν σε γρηγορότερη αύξηση των ψαριών, σε οικονομικότερη καλλιέργεια τους, περιορίζοντας την ποσότητα των ιχθυοτροφών, και σε εντατικοποίηση της ιχθυοκαλλιέργειας.

- ΡΑΦΙΝΟΖΗ

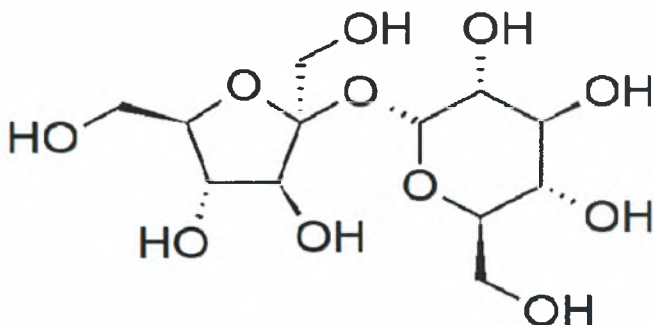
Τρισακχαρίτης αποτελούμενος από μόρια γαλακτόζης, φρουκτόζης και γλυκόζης (Εικ. 1.13), άφθονος σχεδόν σε όλους τους καρπούς φυτών αλλά κυρίως περιέχεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε λαχανικά όπως φασόλια, μπρόκολα, σπαράγγια. Υδρολύεται από την γλυκοσιδάση α-γαλακτοσιδάση (αGAL) ένα ένζυμο που δεν παράγεται από ανώτερους οργανισμούς και η ύπαρξη του στον πεπτικό σωλήνα οφείλεται αποκλειστικά στην μικροβιακή μικροχλωρίδα.



Εικόνα 1.13: μόριο ραφινόζης.

- ΣΑΚΧΑΡΟΖΗ

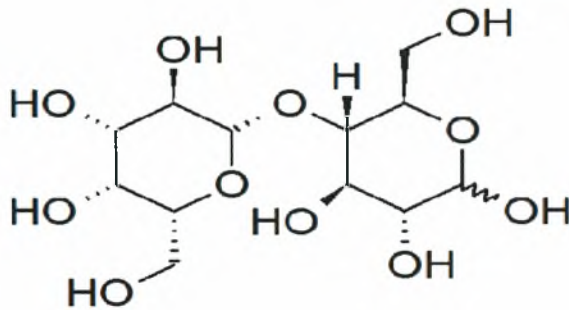
Η κοινή ζάχαρη, είναι δισακχαρίτης αποτελούμενος από μόρια γλυκόζης και φρουκτόζης (Εικ. 1.14). Συντίθεται αποκλειστικά από φυτικούς οργανισμούς και αποτελεί την κύρια μορφή υδατάνθρακα σε πλήθος καρπών φυτών. Γλυκοσιδάσες όπως η σακχαράση, η ιμβερτάση, και η ισομαλτάση υδρόλυουν τον δισακχαρίτη στα σάκχαρα του.



Εικόνα 1.14: μόριο σακχαρόζης.

- ΛΑΚΤΟΖΗ

Δισακχαρίτης αποτελούμενος από γαλακτόζη και γλυκόζη συνδεδεμένων με β-1,4 γλυκοσιδικό δεσμό (Εικ. 1.15). Βρίσκεται άφθονος στο γάλα των θηλαστικών με διακινούμενες τιμές ανά είδος. Το ένζυμο λακτάση που ανιχνεύεται στο εντερικό επιθήλιο των νεογνών θηλαστικών διασπά το δισακχαρίτη απελευθερώνοντας μονοσακχαρίτες γλυκόζης κα γαλακτόζης .



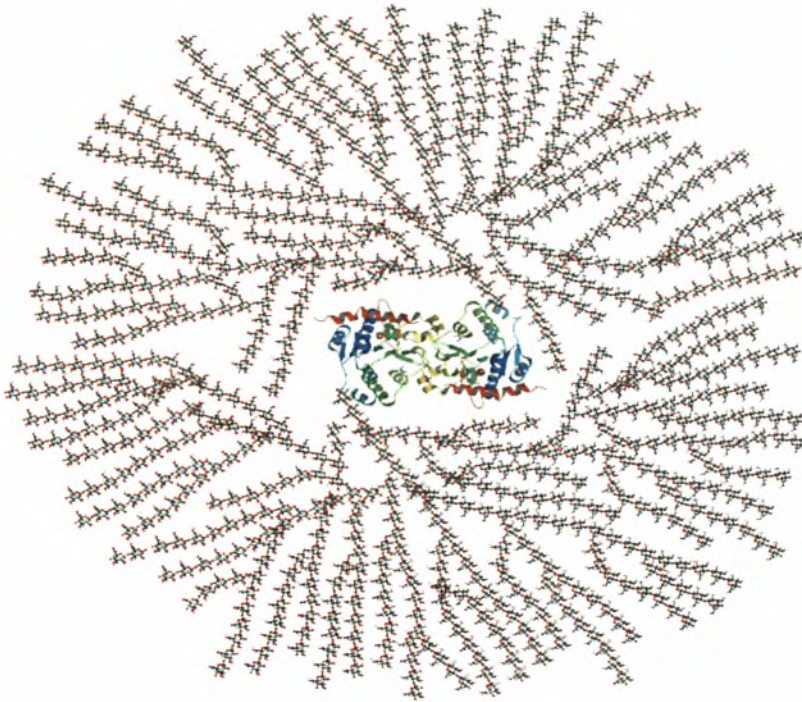
Εικόνα 1.15: μόριο λακτόζης.

- ΜΑΛΤΟΖΗ

Δισακχαρίτης που σχηματίζεται από δυο μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα με α-1,4 γλυκοσιδικό δεσμό, η πρόσθεση ενός τρίτου μορίου γλυκόζης στην μαλτόζη δημιουργεί την μαλτότριόζη ενώ περαιτέρω προσθήκες γλυκόζης οδηγούν στην δημιουργία δεξτρινών και τελικά αμύλου. Η μαλτόζη παράγεται όταν το άμυλο διασπάται από αμυλάσες , ενώ το ένζυμο μαλτάση που παράγεται τόσο από προκαρύωτες όσο και από ευκαρύωτες υδρολύει τον δισακχαρίτη σε μόρια γλυκόζης.

- ΓΛΥΚΟΓΟΝΟ

Πολυσακχαρίτης ανάλογης δομής με το άμυλο (αποκαλείται και ζωικό άμυλο) και ιδιαίτερα με την αμυλοπικτίνη. Αποτελείται από μόρια γλυκόζης ενωμένων με α-1,4 γλυκοσιδικό δεσμό (Εικ. 1.16). Βρίσκεται σε μορφή κόκκων στο κυτοσόλιο σε πολλά είδη κυττάρων αλλά ιδιαίτερα σε ηπατοκύτταρα (8%κ.β.) και σε μυϊκά κύτταρα (1%κ.β) ενώ αποθηκεύεται για να χρησιμοποιηθεί σε καταστάσεις που επιβάλουν άμεση παραγωγή ενέργειας. Το γλυκογόνο αποδομείται από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η οποία δρα στα άκρα της αλυσίδας του πολυμερούς παράγοντας μόρια γλυκόζης.



Εικόνα 1.16: Η κεντρική πρωτεΐνη της γλυκογενίνης περιστοιχίζεται από πολυμερή γλυκόζης. Κάθε δομή γλυκογόνου μπορεί να περιέχει μέχρι και 30.000 κλάδους πολυμερών γλυκόζης.

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η απομόνωση βακτηριακών στελεχών που παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα γλυκοσιδασών από την εντερική μικροχλωρίδα του *Dicentrarchus labrax*, και η μελέτη της δραστηριότητας των εκκρινόμενων γλυκοσιδασών πάνω σε συγκεκριμένα υποστρώματα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα υπό μελέτη στελέχη βακτηρίων απομονώθηκαν από την στιβάδα του βλεννογόνου του πρόσθιου τμήματος του εντερικού αυλού ενήλικων λαυρακιών. Ύστερα από την απομόνωση τους από προηγούμενη πειραματική εργασία προέκυψαν επτά διαφορετικά βακτηριακά στελέχη: F₃, F₅, B₄, B₅, C₄, C₅ και C₆.

Αρχικά τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες που περιείχαν θρεπτικό διάλυμα *Tryptone SoyBroth (TSB)*. Το TSB (Πίνακας 2.1) αποτελεί ένα πλούσιο θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη αερόβιων ή δυνητικά αναερόβιων μικροοργανισμών. Περιέχει πεπτόνες οι οποίες αποτελούν μικρά πεπτίδια που προέρχονται από την υδρόλυση πρωτεϊνών (συνήθως γάλακτος) από πεπτικά ένζυμα. Εκτός από ολιγοπεπτίδια, το προκύπτον διάλυμα των πεπτόνων περιέχει λίπη, βιταμίνες, άλατα και ιχνοστοιχεία που προσφέρουν στα βακτήρια άριστες συνθήκες ανάπτυξης. Η γλυκόζη που υπάρχει σε αυτό αποτελεί μια πρόσθετη πηγή ενέργειας για τα βακτήρια ενώ το NaCl εξασφαλίζει την οσμωτική ισορροπία και το K₂HPO₄ αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα.

Πίνακας 2.1: Σύσταση του *Tryptone SoyBroth (TSB)*

Ingredients	Casein peptone	Soy peptone	glucose	Sodium chloride	Dipotassium hydrogen phosphate
g/litre	17	3	2,5	5	2,5

Για την παρασκευή 100 ml *Tryptone soy broth* προσθέσαμε 3 g θρεπτικού μέσου σε 100 ml απιονισμένου νερού και αφού αναδεύσαμε καλά αποστειρώσαμε στους 120°C για 25 λεπτά. Μετά από την επιτυχημένη ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών σε πλούσιο θρεπτικό υλικό TSB, ακολούθησε ενοφθαλμισμός με την βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου αποικιών σε υγρές καλλιέργειες *minimal medium* θρεπτικού υλικού. Το *minimal medium* θρεπτικό υλικό, είναι φτωχό σε θρεπτικά συστατικά, η χαμηλή περιεκτικότητά του σε πεπτίδια και μας εξασφαλίζει ότι οι μόνες πρωτεΐνες που θα υπάρχουν στο εναιώρημα της υγρής καλλιέργειας θα προέρχονται από τα καλλιεργούμενα βακτήρια. Όπως φαίνεται και στον παρακάτω Πίνακα 2.2, περιέχει πληθώρα αλάτων που παρέχουν στα βακτήρια πολύτιμα στοιχεία όπως μαγνήσιο, φωσφόρο, άζωτο, θείο για να συνθέσουν τα πεπτίδια τους και τα νουκλεϊκά οξέα τους, ενώ η γλυκερίνη αποτελεί την πηγή άνθρακα. Το αποβουτυρωμένο γάλα που προστίθεται είναι μια επιπλέον βοήθεια στην ανάπτυξη των βακτηρίων και αποτελεί πηγή πρωτεϊνών. Για την παρασκευή 100 ml *minimal medium* προστέθηκαν σε 100 ml νερού οι αντίστοιχες ποσότητες των επιμέρους συστατικών ενώ για καλύτερη διαλυτοποίηση προσθέσαμε πρώτα τα άλατα και στο τέλος την γλυκερίνη. Ακολούθησε αποστείρωση του θρεπτικού υλικού για αυστηρώς 20 min καθώς επιπλέον έκθεση του θρεπτικού υλικού σε υψηλή θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα την κροκίδωση των πρωτεϊνών του γάλακτος.

Πίνακας 2.2: Σύσταση του minimal medium

Ingredients	K ₂ HPO ₄)	(NaH ₂ PO ₄)	(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	(NH ₄) ₂ SO ₄	NaCl	glycerol	Skim milk
g/litre	2,28	1,38	0,02	0,5	5	10	1

Μετά από την τέταρτη μέρα η θωλερότητα του θρεπτικού υλικού υποδεικνυε την επαρκή ανάπτυξη των βακτηρίων. Ακολούθησε φυγοκέντριση των επτά υγρών καλλιιεργειών για να καθιζάνουν τα βακτηριακά κύτταρα και να απομονωθεί το υπερκείμενο το οποίο θα περιέχει ένζυμα που έχουν εκκριθεί από τα βακτήρια όπως γλυκοσιδάσες.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας των γλυκοσιδασών του υπερκειμένου που συλλέχθηκε από τις φυγοκεντριμένες καλλιέργειες έγινε χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων υδατανθράκων.

Τα ειδικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Άμυλο
- Γλυκογόνο
- Ραφινόζη
- Σακχαρόζη
- Λακτόζη
- μαλτόζη

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα και πρώτες ύλες ιχθυοτροφών με υψηλό υδατανθρακικό περιεχόμενο:

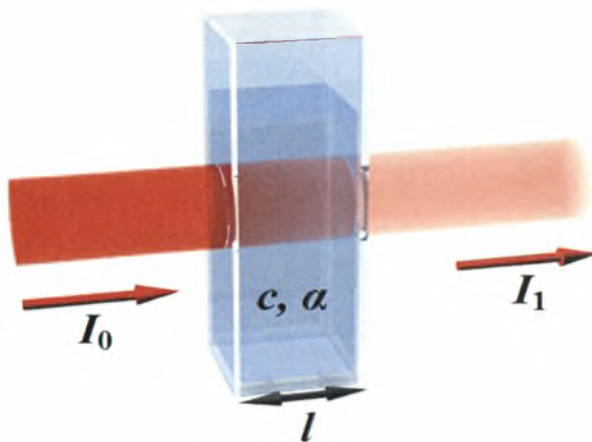
- Χαρούπι
- Αλεύρι σίτου εξωθημένο
- Σογιάλευρο
- Ιχθυάλευρο

Καθώς και δύο σιτηρέσια με διαφορετική σύσταση (E, C).

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στην μέθοδο προσδιορισμού συγκέντρωσης σακχαριτών *Somogyi-Nelson* (1952) και είναι η εξής: Για κάθε στέλεχος βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν εις τριπλούν erpendorf για την πειραματική διαδικασία και ένα τυφλό στο οποίο το πρωτεϊνικό περιεχόμενο ήταν εξ αρχής μετουσιωμένο (με NaOH). Στα erpendorf των 1,5 ml προσθέσαμε 30 μl buffer, 50μl υποστρώματος και κατόπιν προστέθηκαν 50 μl υπερκειμένου. Τα ένζυμα που περιέχονταν στο υπερκείμενο αφέθηκαν να δράσουν στο υδατανθρακικό υπόστρωμα για διάστημα 15 min και ακολούθησε προσθήκη 20μl NaOH (1N) για την μετουσίωση των γλυκοσιδικών ενζύμων και τη διακοπή της διάσπασης του υποστρώματος. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε κάθε σωληνάριο 200 μl του αντιδραστηρίου *χαλκού Somogyi-Nelson* (Αντιδραστήριο Α).

Το αντιδραστήριο Α περιέχει ιόντα χαλκού Cu^{+2} που οξειδώνουν την κυκλική μορφή της γλυκόζης (γλυκοπυρανόζη) και βαθμιαία μετατρέπονται στην μορφή Cu^{+} . Ακολουθεί βρασμός του περιεχομένου των erpendorf για 10 min για πλήρη μετουσίωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου. Αφού τα δείγματα επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου προστίθενται 200ml *αντιδραστηρίου αρσενομολυβδικού Somogyi Nelson (Αντιδραστήριο Β)*. Το Αντιδραστήριο Β οδηγεί σε οξείδωση των Cu^{+} ξανά σε Cu^{+2} χρησιμοποιώντας ένα σύμπλοκο αρσενικού-μολύβδου το οποίο αναγόμενο δίνει χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Αναδεύοντας στο vortex αραιώσαμε 400ml του περιεχομένου σε erpendorf των 2 ml που περιείχαν 1260 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε δεύτερη ανάδευση για καλύτερη ομογενοποίηση και φυγοκέντρωση στις 8000 στροφές ανά λεπτό για χρονικό διάστημα 5 min. Τέλος το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης τοποθετήθηκε σε κυψελίδες και φωτομετρήθηκε στα 650 nm.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων λήφθηκαν με φασματοφωτομετρική μέθοδο μέτρησης βασισμένη στον νόμο Lambert-Beer. Ο νόμος Lambert Beer στηρίζεται στο γεγονός, ότι το μήκος κύματος της εξέρχουσας από την μετρώμενη ουσία ακτίνας, είναι διαφορετικό από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας μονοχρωματικής ακτινοβολίας (Εικ. 2.1).



Εικόνα 2.1: δέσμη μονοχρωματικής ακτινοβολίας διαπερνά κυψελίδα και μεταβάλλει το μήκος κύματος της.

Συσχετίζει την απορρόφηση του φωτός (A) με την συγκέντρωση της ουσίας την οποία διαπερνά (C) σύμφωνα με την εξίσωση:

$$A = \epsilon b c$$

όπου ϵ η γραμμομοριακή απορροφητικότητα της ουσίας X στο δεδομένο μήκος κύματος της ακτινοβολίας και b η οπτική διαδρομή εντός της κυψελίδας. Επομένως αν γνωρίζουμε την απορρόφηση μιας ουσίας μπορούμε να βρούμε και την συγκέντρωσή της.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

• Ρυθμιστικό διάλυμα

Για την παρασκευή 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν 117,64 g κιτρικού νατρίου ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) σε 500ml απιονισμένου νερού καθώς και προσθήκη μικρής ποσότητας HCl για ρύθμιση του pH 7. Η τιμή pH ίση με 7 είναι απαραίτητη για την πειραματική διαδικασία, καθώς μόνο σε ουδέτερο pH η πλειονότητα των μορίων της γλυκόζης κυκλοποιούνται (γλυκοκυρανόζη) και είναι ικανά να αλληλεπιδρούν με τα ιόντα χαλκού του αντιδραστηρίου Α.

• Αντιδραστήριο Α

Για την παρασκευή 1L αντιδραστηρίου χαλκού:

- Διαλύουμε 28g Na_2HPO_4 (Sigma S-0876) και 40 g αλάτων Rochelle (K-Na tartate, Sigma P-2347) σε 700 ml απιονισμένου νερού.
- Θερμαίνουμε αναδεύοντας ταυτόχρονα το μίγμα σε μαγνητικό αναδευτήρα έως ότου να διαλυτοποιηθούν τα άλατα και στην συνέχεια το επαναφέρουμε σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε 100ml 1N NaOH.
- Προσθέτονται 80ml 10% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ με συνεχή ανάδευση.
- Προσθέτονται 180g Na_2SO_4 (Sigma S-9627).
- Όταν διαλυθούν τα συστατικά προσθέτουμε απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1 L.
- Το αντιδραστήριο πρέπει να έχει μπλε χρώμα, αποθηκεύεται σε σκούρο δοχείο και αφήνεται σε ηρεμία για χρονικό διάστημα 2 ημερών.

• Αντιδραστήριο Β

Για την παρασκευή 1L αντιδραστηρίου Β :

- Διαλύονται 50 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (Sigma A-7302) σε 900 ml απιονισμένου νερού.
- Ακολουθώς αναμιγνύονται σε 42 ml θειϊκού οξέος (12M).
- Διαλύουμε 6g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma S-9663,) σε 25 ml απιονισμένου νερού και προσθέτουμε όλη την ποσότητα στο προηγούμενο διάλυμα .
- Επωάζουμε στους 37 °C για τουλάχιστον δυο μέρες και αποθηκεύουμε σε σκουρόχρωμο δοχείο.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ

Ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου κάθε δείγματος έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Lowry (1951).

Η μέθοδος Lowry είναι μια βιοχημική τεχνική προσδιορισμού του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου ενός δείγματος. Η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης καθορίζεται με μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, ανάλογης του ποσοστού της περιεχόμενης πρωτεΐνης και μετρείται με φασματοφωτομέτρηση. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση των ιόντων Cu^{2+} του αλκαλικού διαλύματος χαλκού με τους πεπτιδικούς δεσμούς των αμινοξέων των πρωτεϊνών οδηγώντας σε αναγωγή του Cu^{2+} σε Cu^+ . Τα μονοσθενή ιόντα χαλκού και τα αμινοξέα μεθειονίνης, τυροσίνης και κυστεΐνης αντιδρούν με το φαινολικό αντιδραστήριο και παράγουν ένα ασταθές προϊόν που ανάγεται και δίνει την χαρακτηριστική μπλε χρώση.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ LOWRY

- *ΑΛΚΑΛΙΚΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ ΧΑΛΚΟΥ*

A) Σε ογκομετρικό γυάλινο σωλήνα προσθέτουμε 70 ml νερού και 2 g NaOH 10 g, Na₂CO₃ και 0,1 g potassium Sodium Tartate, το τελικό διάλυμα πρέπει να είναι διαυγές.

B) σε 10ml απιονισμένου νερού διαλύουμε 0,05 g θειϊκού χαλκού.

Αναμιγνύουμε τα A & B συμπληρώνοντας με αποσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100ml.

- *ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ*

Αναμιγνύουμε ένα μέρος Αντιδραστηρίου *Folin & Ciocalteu's* με 18 μέρη απιονισμένου νερού.

- *BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA)*

Το σκεύασμα του εμπορίου βρίσκεται σε πυκνότητα 10 g/dl. Για τη μέθοδο χρειάζεται συγκέντρωση 1μg/ml .

Άρα για την Παρασκευή 1 ml πρότυπου διαλύματος αραιώνουμε με 990 μl NaCl 0,85% β.κ.ο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ LOWRY

Αρχικά προετοιμάζουμε σωλήνες εις διπλούν με διαδοχικές αραιώσεις του BSA πρότυπου διαλύματος με αποσταγμένο νερό.

Σωλήνας	BSA (μl)	Νερό (μl)
S ₁	0	1000
S ₂	50	950
S ₃	100	900
S ₄	150	850
S ₅	200	800
S ₆	250	750

Παράλληλα ετοιμάζουμε εις διπλούν το δείγμα προς ανάλυση: σε 800 μl νερού προσθέτουμε 200 μl υπερκειμένου για κάθε στέλεχος βακτηρίων.

Προσθέτουμε 1 ml αντιδραστηρίου χαλκού σε όλους τους σωλήνες και αναδεύουμε εντόνως για 3 sec, τα αφήνουμε να ηρεμήσουν για 10 min.

Προσθέτουμε 4ml φαινολικού αντιδραστηρίου με πίεση μέσα στο σωλήνα και αναδεύουμε έντονα.

Μεταφέρουμε στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 56 °C για 5 min.

Όταν τα δείγματα επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου φωτομετρώνται στα 740 nm.

Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με το μέσο όρο της απορρόφησης στον άξονα των τεταγμένων (Y) και τη συγκέντρωση της BSA στην τετμημένη (X). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης των άγνωστων δειγμάτων γίνεται βάσει της πρότυπης καμπύλης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΩΝ

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1 από τα απομονωμένα είδη βακτηρίων και τη δράση των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών τους πάνω σε πλήθος υδατανθρακικών υποστρωμάτων πρόκευσε ότι στα περισσότερα είδη συναντώνται τύποι γλυκοσιδασών, με διαφορετικές ωστόσο δραστηκότητες πάνω σε κάθε υπόστρωμα.

Πίνακας 3.1: Ειδική δραστηκότητα των βακτηριακών στελεχών σε διαφορετικά σακχαριτικά υποστρώματα ($\mu\text{g glucose} / \text{mg protein} \cdot \text{min}$)

	starch	rafinnose	lactose	maltose	sucrose	glycogen
F3	0,344	0,615	1,674	0	0,488	0,336
F5	0,478	0,058	3,529	2,932	0,639	1,155
B4	0,845	0,264	1,583	1,450	0,010	0
B5	0,622	0	1,724	2,229	0,080	1,290
C4	0,640	0	0,767	0	0,846	3,330
C5	1,237	0,377	6,192	2,004	0,571	2,500
C6	1,881	1,203	5,651	0	0,336	3,758

Στη πλειονότητα των βακτηριακών στελεχών παρατηρείται παρόμοια διάσπαση γλυκογόνου και αμύλου, καθώς και τα δυο δομούνται από μονομερή γλυκόζης (Εικ. 3.1). Στα βακτήρια B₄, C₄ παρατηρούνται οι μεγαλύτερες διαφορές των δυο υποστρωμάτων.

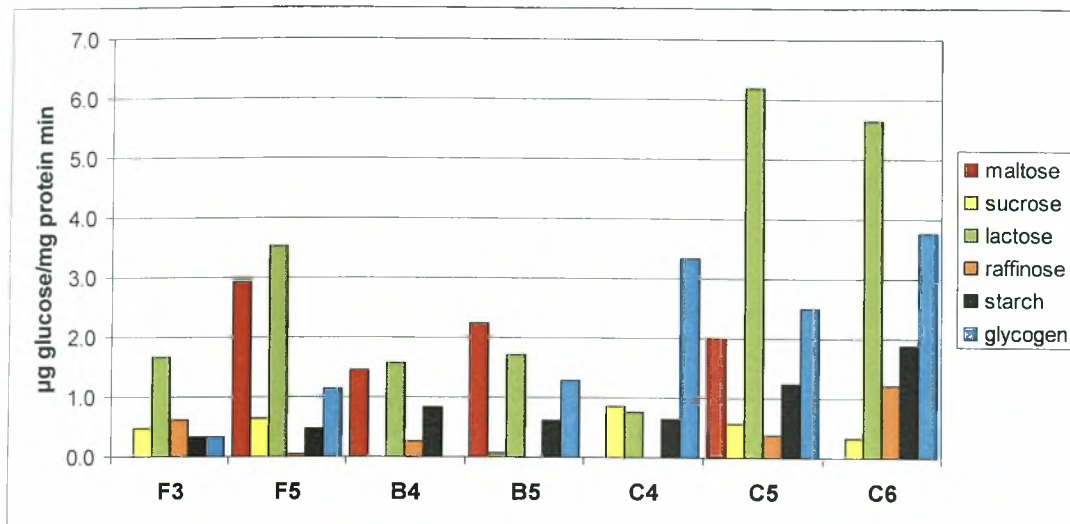
Επιπλέον ένα κοινό γνώρισμα σε όλων των τύπων τα βακτήρια που παρατηρήθηκε και σε παρόμοια μελέτη των *Amoozegar και Malekzadeh (2002)*, ήταν η πολύ χαμηλή δράση γλυκοσιδασών στον δισακχαριτη σακχαρόζη που υποδηλώνει την μειωμένη παραγωγή του ενζύμου σακχαράσης από τα στελέχη των βακτηρίων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι ο δισακχαριτης της λακτόζης διασπάται σε πολύ μεγάλο ποσοστό από τις γλυκοσιδάσες όλων των βακτηριακών στελεχών αλλά και ο δισακχαριτης μαλτόζη που παρουσιάζει αυξημένη διάσπαση σε μόρια γλυκόζης από βακτηριακές μαλτάσες στα πιο πολλά στελέχη με εξαίρεση τα F₃, C₄ και C₆.

Έτσι από τα διαφορετικά στελέχη μπορούμε να διακρίνουμε δυο ομάδες.

Την ομάδα που περιλαμβάνει στελέχη με αυξημένη παραγωγή γλυκοσιδασών και δράση αυτών σχεδόν σε όλα τα υποστρώματα και αφορά τα βακτήρια F₅,

C₅ και C₆ και αυτή που περιλαμβάνει τα στελέχη F₃, B₄, B₅ και C₄ τα οποία σε γενικές γραμμές έχουν μειωμένη έκκριση γλυκοσιδασών.



Εικόνα 3.1: Συγκριτική παρουσίαση της δραστηριότητας όλων των βακτηριακών στελεχών απέναντι σε διαφορετικά υποστρώματα.

Όσον αφορά την μελέτη της δράσης των βακτηριακών γλυκοσιδασών σε υποστρώματα τροφών που δεν βρίσκονται σε καθαρή μορφή και καταναλώνονται στο φυσικό περιβάλλον των ψαριών (Πίνακας 3.2), σε αυτήν την περίπτωση η ομάδα των βακτηρίων B₄ C₅ C₆ παράγει γλυκοσιδάσες που δρουν σχεδόν σε όλα τα υποστρώματα με αυτές των βακτηριακών στελεχών C₅ και C₆ να δίνουν και αυξημένες ποσότητες παραγόμενης γλυκόζης.

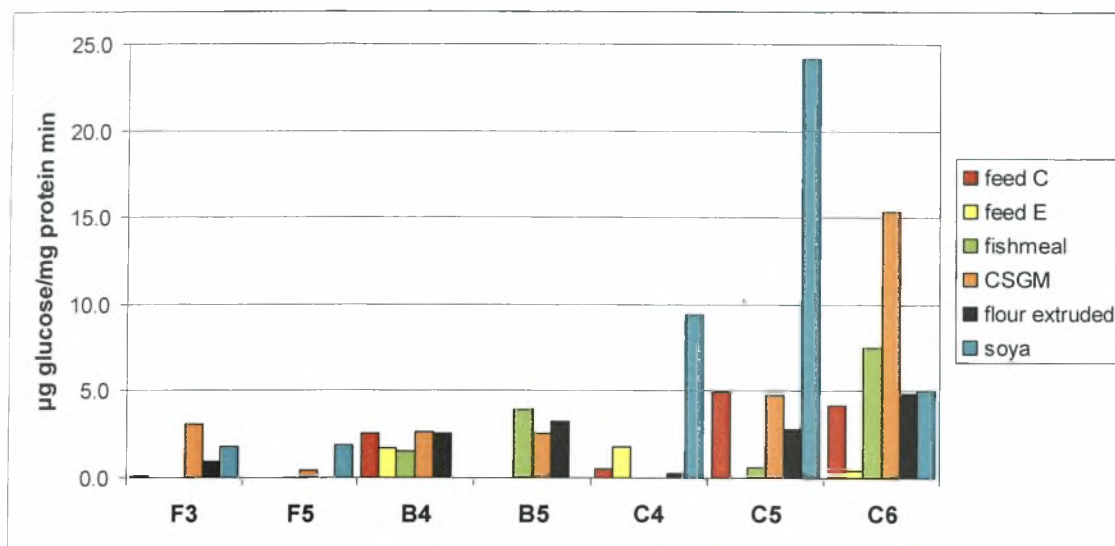
Γενικότερα σε αυτού του είδους μη καθαρών υδατανθρακικών υποστρωμάτων παρατηρήθηκε ότι όσο πιο ακάθαρμο και αναμιγμένο με άλλα είδη βιομοριών (πρωτεΐνες, λιπίδια) είναι το υπόστρωμα, όπως στις περιπτώσεις των feed C, feed E και ιχθυάλευρων, οι γλυκοσιδάσες δυσκολεύονται να διασπάσουν το υδατανθρακικό περιεχόμενο στο ποσοστό που αυτό υπάρχει αφού το υπόστρωμα δυσκολεύεται να προσεγγίσει το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικ. 3.2).

Πίνακας 3.2: Ειδική δραστηριότητα των βακτηριακών στελεχών σε διαφορετικά σακχαριτικά υποστρώματα (μg glucose / mg protein*min)

	CSGM	flour extruded	soya	fishmeal	feed E	feed C
F3	3,056	0,962	1,772	-	-	0,099
F5	0,388	-	1,893	-	-	-
B4	2,642	2,576	-	1,555	0,001691	2,599
B5	2,573	3,280	-	3,967	-	-
C4	-	0,238	9,374	-	0,001776	0,476
C5	4,771	2,824	24,162	0,617	-	4,967
C6	15,371	4,843	5,064	7,503	0,000416	4,154

Ένας ακόμα λόγος που οι τροφές feed E και feed C δεν έδωσαν αυξημένη παραγωγή γλυκόζης είναι ότι οι κλασικές ιχθυοτροφές του εμπορίου περιέχουν κυρίως πρωτεϊνικό περιεχόμενο και λίγους υδατάνθρακες, αφού τα περισσότερα είδη καλλιεργούμενων ψαριών δεν βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στους υδατάνθρακες ως ενεργειακή πηγή.

Φυτικής προέλευσης υποστρώματα όπως το χαρούπι, το αλεύρι και η σόγια έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα σε όλους τους τύπους βακτηρίων γεγονός που οφείλεται στη μεγάλη περιεκτικότητα πολυσακχαρίτων σε αυτά.



Εικόνα 3.2: Συγκριτική παρουσίαση της δραστηριότητας όλων των βακτηριακών στελεχών απέναντι σε διαφορετικές πρώτες ύλες και ιχθυοτροφές.

Από την μελέτη τόσο των καθαρών υδατανθρακικών υποστρωμάτων όσο και από τα σύνθετα υποστρώματα των ιχθυοτροφών προέκυψε ότι το βακτηριακό στέλεχος C₅, έχει την καλύτερη απόδοση από όλα τα μελετημένα στελέχη βακτηρίων καθώς φαίνεται ότι παράγει σημαντικό αριθμό διαφορετικών τύπων γλυκοσιδασών, οι οποίες δρουν σε ευρύ φάσμα σακχαρικών υποστρωμάτων. Παρουσιάζει αυξημένη έκκριση β-γαλακτοσιδάσης που διασπά λακτόζη και υψηλά επίπεδα έκφρασης αμυλασών και μαλτάσης.

Η μειωμένη ωστόσο διάσπαση του τρισακχαρίτη ραφινόζης και του δισακχαρίτη της σακχαρόζης υποδηλώνει χαμηλά επίπεδα έκφρασης α-γαλακτοσιδάσης και σακχαράσης αντίστοιχα.

Αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα δίνει και το στέλεχος C₆ με ανάλογα ποσά β-γαλακτοσιδάσης, αμυλασών, σακχαράσης και α-γαλακτοσιδάσης με το C₅ με την διαφορά ότι το C₆ παρουσιάζει μηδαμινή έκκριση μαλτάσης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια για την απομόνωση βακτηριακών στελεχών που παράγουν γλυκοσιδάσες από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ατόμων ευρωπαϊκού λαυρακιού.

Ακολούθως καθορίστηκε το μέγεθος της δραστηριότητας των ενζύμων αυτών καθώς και η ικανότητα τους να διασπούν υποστρώματα υδατανθράκων καθαρής μορφής ή αναμιγμένων με άλλα είδη βιομορίων *in vitro*, τα οποία περιέχονται ή μπορούν εν δυνάμει να χρησιμοποιηθούν σε ιχθυοτροφές ιχθυοκαλλιεργειών.

Η μελέτη των ενδογενούς προέλευσης πεπτικών ενζύμων στα ψάρια, έχει μελετηθεί σε πληθώρα εργασιών (Dhage, 1968; Kawai & Ikeda, 1972; Das & Tripathi, 1991). Ωστόσο οι πληροφορίες για την δράση των ενζύμων που προέρχονται από την μικροχλωρίδα του πεπτικού σωλήνα ήταν ελάχιστες .

Αν και αρχικά η παραγωγή βακτηριακών ενζύμων στον πεπτικό σωλήνα είχε υποτιμηθεί, πρόσφατα πειραματικές μελέτες (Bairagi et al., 2002) απέδειξαν ότι τα βακτήρια του πεπτικού σωλήνα διαφόρων τύπων ψαριών, έχουν την δυνατότητα να παράγουν σημαντικές ποσότητες ενζύμων, ιδιαίτερα πρωτεασών αλλά και γλυκοσιδασών, ενώ επιβεβαιώθηκε η εικασία ότι τα βακτήρια φυτοφάγων ψαριών έκκριναν σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό γλυκοσιδάσες σε σχέση με βακτήρια πεπτικού σωλήνα σαρκοφάγων ψαριών.

Σε ορισμένα είδη ψαριών το μέγεθος του αποικισμού αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών βακτηρίων στον πεπτικό σωλήνα ήταν τόσο μεγάλο που υποδείκνυε ότι ο εφοδιασμός του οργανισμού με βακτηριακές αμυλάσες και πρωτεάσες αποτελεί την βάση για την ανοχή του ξενιστή στην παρουσία των βακτηριακών πληθυσμών (Grisez, 1997).

Τα προαναφερθέντα δεδομένα ήρθαν να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, στην οποία ένα σημαντικό ποσοστό βακτηριακών στελεχών έδωσε θετικό αποτέλεσμα στην παραγωγή γλυκοσιδασών σε διαφορετικές ωστόσο ποσότητες σε κάθε είδος βακτηρίου.

Αν και το πάγκρεας των ψαριών εκκρίνει ενζυμα που σχετίζονται με την πέψη όπως αμυλάσες και πρωτεάσες (Μούτου, 2000) δεν θα ήταν υπερβολή να δηλώσουμε ότι τα εκκρινόμενα ένζυμα των βακτηρίων του εντερικού αυλού όχι μόνο δρουν συνεργικά με τα ενδογενής προέλευσης ενζυμα αλλά συνεισφέρουν σε πολύ μεγάλο ποσοστό στην πέψη των τροφών και στην περαιτέρω ανάπτυξη του οργανισμού ξενιστή.

Η ποικιλία των βακτηριακών στελεχών (τα περισσότερα ανήκουν στην οικογένεια των βάκιλων) προσφέρει ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνικών ενζύμων . Στην περίπτωση των μελετώμενων γλυκοσιδασών παρατηρήθηκε ότι κάθε στέλεχος είχε την ικανότητα να παράγει ξεχωριστά ποσά και είδη γλυκοσιδικών ενζύμων (μαλτάσες , α και β γαλακτοσιδάσες, σακχαράσες, και αμυλάσες) παρέχοντας έτσι στον ξενιστή την δυνατότητα επιβίωσης και θρέψης με διαφορετικά είδη υδατανθράκων.

Ωστόσο παρά τις προσπάθειες για να ανιχνευτεί η δραστηριότητα των γλυκοσιδασών στα βακτηριακά στελέχη της μικροχλωρίδας του λαυρακιού πρέπει να τονιστεί ότι οι τιμές από τις *in vitro* τεχνικές που ακολουθηθήκαν

δεν μπορούν να προσεγγίσουν πλήρως τα ποσά της δραστηριότητας των ενζύμων που δρουν *in vivo*.

Το λαβράκι ζει σε ένα περιβάλλον με έντονη διακύμανση εξωγενών παραγόντων όπως η αλατότητα, το βάθος, ενώ και η ευρεία ποικιλία τροφών που καταναλώνει, αλλά και οι συνθήκες που επικρατούν στον εντερικό αυλό επηρεάζουν σε μεγάλο ποσοστό την ικανότητα των ενζύμων να δράσουν στο υπόστρωμα.

Η μεγάλη διακύμανση των τιμών των δραστηριοτήτων των γλυκοσιδασών στην *in vitro* μελέτη, ιδιαίτερα στην περίπτωση των μη καθαρών μορφών ιχθυοτροφών, υπέδειξε πως οι εργαστηριακές διαδικασίες δύσκολα μπορούν να προσεγγίσουν τον φυσικό χώρο των διεργασιών.

Για αυτόν τον λόγο κατά την δράση των γλυκοσιδασών πάνω σε ιχθυοτροφές και άλευρα έγινε η χρήση αναδευτήρα ώστε να προσομοιωθούν οι συνθήκες με τις περισταλτικές κινήσεις του πρόσθιου εντέρου και να βοηθηθεί η προσέγγιση του ενεργού κέντρου του ενζύμου με τον υδατάνθρακα.

Όσον αφορά την διαφορετική δραστηριότητα αμυλασών βακτηριακών στελεχών πάνω σε πολυμερή γλυκόζης όπως αμύλου και γλυκογόνου, αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι το άμυλο υπάρχει σε δυο δομές η μια εκ των οποίων (αμυλόζη) διαφέρει αρκετά στερεοχημικά από την άλλη (αμυλοπικτίνη) που προσεγγίζει την δομή του γλυκογόνου και επομένως αυτό να αποτελεί ένα εμπόδιο για την δράση του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

Ένας άλλος λόγος της απόκλισης του παραγόμενου ποσοστού γλυκόζης από το ίδιο βακτήριο στα δυο υποστρώματα οφείλεται στο ότι η δράση ιδιαίτερα της α-αμυλάσης σε τόσο μεγάλα πολυμερή, δεν παράγει πάντα συγκεκριμένα υποστρώματα όπως γίνεται στην περίπτωση ενός δισακχαρίτη αλλά αναλόγως από την θέση που θα δράσει το ένζυμο μπορεί να παραχθεί ένα πλήθος σακχάρων διαφορετικών από γλυκόζη που δεν θα μπορέσει να μετρηθεί κατά την μέθοδο προσδιορισμού γλυκόζης Somogyi-Nelson, παραδείγματος χάριν ανάλογα με την δράση της αμυλάσης μπορεί να παραχθεί μαλτοτριόζη και μαλτόζη από αμυλόζη ή μαλτόζη, γλυκόζη και δεξτρίνη από αμυλοπικτίνη.

Στην περίπτωση αδιάλυτων μορφών υποστρωμάτων όπως στις feed C και feed E, η δράση των ενζύμων είναι μόνο τοπική στην επιφάνεια της συμπλοκοποιημένης τροφής και αυτός είναι ίσως ένας λόγος για τα χαμηλά ποσοστά ενζυμικής δραστηριότητας που έδωσαν οι δυο ιχθυοτροφές.

Επιπλέον για να μπορέσει να υπάρξει σύγκριση μεταξύ των τιμών σε κάθε στέλεχος βακτηρίων ακολουθήθηκε ένα αυστηρώς σταθερό χρονικό διάστημα υδρόλυσης των υποστρωμάτων, δεκαπέντε λεπτών ώστε να μην δοθεί περαιτέρω δράση σε ορισμένα ενζυμα δίνοντας αυξημένες τιμές υδρολυτικής δραστηριότητας. Παράγοντες όπως σταθερή θερμοκρασία δωματίου 25 °C με την βοήθεια επωαστήρα και υδατόλουτρου λήφθησαν υπόψη ώστε να υπάρχουν οι βέλτιστες συνθήκες για την δράση των γλυκοσιδασών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να εφαρμοστούν κυρίως στο πεδίο της εντατικής ιχθυοκαλλιέργειας.

Συγκεκριμένα τα είδη βακτηρίων που έδωσαν τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα θα μπορούσαν να προστεθούν ως προβιοτικά σε ιχθυοτροφές και μετά από την εγκατάσταση τους στον πεπτικό σωλήνα ιχθυδίων προνυμφικών σταδίων να βοηθήσουν στην πέψη τροφών φυτικής προέλευσης.

Η χρήση βακτηριακών στελεχών θα μπορούσε να βρει εφαρμογή σε πλήθος καλλιεργούμενων ψαριών εκτός του λαυρακιού λαμβάνοντας ωστόσο υπ όψιν την φυσιολογία του είδους, αλλά και το είδος των ενδογενών πληθυσμών βακτηρίων που ήδη ζουν στο πεπτικό σωλήνα .

Η εγκατάσταση ενός νέου πληθυσμού βακτηριακών κυττάρων θα πρέπει να γίνει με ιδιαίτερη προσοχή να μην διαταραχτεί η μικροβιακή μικροχλωρίδα του πεπτικού σωλήνα, οι μικροοργανισμοί που θα χρησιμοποιηθούν δεν θα πρέπει να λειτουργήσουν ως δυνητικά παθογόνοι, διαταράσσοντας την ισορροπία του εντερικού αυλού.

Για αυτό τον λόγο τα στελέχη των βακτηρίων που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να είναι συγγενικά είδη της υφιστάμενης μικροχλωρίδας και να μην οδηγήσουν ανοσολογική απόκριση από τον οργανισμό ξενιστή.

Η χρήση της βιοτεχνολογίας θα μπορούσε να δώσει μια περεταίρω ώθηση στην ανάπτυξη των προβιοτικών.

Πιο συγκεκριμένα η δημιουργία διαγονιδιακών βακτηριακών στελεχών που θα έχουν ενσωματωμένα στο γενετικό υλικό τους γονίδια που θα εκφράζουν πληθώρα ενζύμων γλυκοσιδασών θα μπορούσε να οδηγήσει στην δημιουργία προβιοτικών με αυξημένη παραγωγή ένζυμων υδρόλυσης υδατανθράκων.

Απαιτείται ωστόσο πιο εντατική έρευνα για την πλήρη κατανόηση των μεταβολικών μονοπατιών που ακολουθούνται από τους μικροοργανισμούς αυτούς για να διαπιστωθεί η ακριβής συμβολή τους στην διαδικασία της πέψης.

Αν και η φυτικής προέλευσης ιχθυοτροφές δεν χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς μέχρι πρόσφατα η ύπαρξη σημαντικού αριθμού γλυκοσιδασών στον εντερικό αυλό των ψαριών αμφισβητούνταν, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης αλλά και άλλων παραπλήσιων εργασιών δείχνουν ότι η χρήση υδατανθράκων ως ιχθυοτροφή θα μπορούσε να αποτελεί μια οικονομική και επικερδή λύση σε ψάρια που χρησιμοποιούν ως προβιοτικά συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη αυξημένης έκκρισης γλυκοσιδασών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Nielsen T., Appel K.F., Gram L. (2000). The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 182, 1-15.

L. Grisez, J. Reyniers, L. Verdonck, J. Swings and F. Ollevier (1997) .*Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development.* *Aquaculture* 155-399.

Hongyue Dang, Hu Zhu, Jing Wang and Tiegang Li (2009). Extracellular hydrolytic enzyme screening of culturable heterotrophic bacteria from deep-sea sediments of the Southern Okinawa Trough. World J Microbiol Biotechnol 25:71-79.

Munilla-Moran R Saborido-Rey F (1996). Digestive Enzymes in Marine Species. II. Amylase Activities in Gut from Seabream (Sparus aurata), Turbot (Scophthalmus maximus) and Redfish (Sebastes mentella). Comp. Biochem. Physiol. Vol 113B, No4 , pp827-834.

Tinh NT, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P (2008) .A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. Pubmed.gov.

FAO FISHERY STATISTICS ,2004.

Marisa S. Garro, Graciela F. de Valdez, Guillermo Oliver and Graciela S. de Giori (2008). Influence of Carbohydrates on the α -Galactosidase Activity of Lactobacillus fermentum .Current Microbiology.

G. C. Hope and A. C. R. Dean (1975). Pullulanase synthesis in Klebsiella (Aerobacter) aerogenes strains growing in continuous culture. Biochem J. 146(3): 513.b1

Arnd Sturm (1999). Invertases, primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning. Plant Physiol. 121: 1-8

Delphine Paolucci-Jeanjean, Marie-Pierre Belleville, Nadine Zakhia, Gilbert M. Rios (2000).Kinetics of cassava starch hydrolysis with Termamyl® enzyme. Biotechnology and Bioengineering ,volume 68 Issue 1, Pages 71 – 77.

TADA SHUSAKU(Daiwakasei) (2006). *Application of Bacterial Lactase on Processing of Milk Product. Bio Ind,*

Seidl V (2008). *Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. Fungal Biol Rev 22: 36-42.*

Csóka TB, Frost GI, Stern R. *Hyaluronidases in tissue invasion. Pubmed.gov*

M. C. Srinivasan and Meenakshi V. Rele. *Microbial xylanases for paper industry.*

Dabrowski, K. and Glogowski, J. (1977). *Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. Hydrobiologia, 54: 129-134.*

Nibedita Kar, Koushik Ghosh. *Enzyme Producing Bacteria in the Gastrointestinal Tracts of Labeo rohita (Hamilton) and Channa punctatus (Bloch).*

Bairagi, A., Ghosh, K., Sen, S.K. and Ray, A.K. (2002). *Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquaculture International, 10: 109-121.*

Blanch, A.R., Alsina, M., Simon, M. and Jofre, J (1997). *The alimentary canal and digestion. In Academic Press, New York: 109-161.*

Cahill, M.M. (1990). *Bacterial flora of fishes: a review. Microbial Ecology, 19: 21-41.*

Okeyo, D.O. (1989).Herbivory in freshwater fishes: review. Israeli J. of Aquaculture 41: 77-97.

Britannica Online Encyclopedia.

Wikipedia, the free encyclopedia.

Νέα Δομή Εγκυκλοπαίδεια .

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, ΤΟΜΟΣ Ι: BERG M.J., TYMOCZKO L.J., STRYER L.:

Χημεία τροφίμων H-D Belitz, W Grosch, P. Schieberle 3^η έκδοση εκδόσεις τζιόλα.

Βιολογία των μικροοργανισμών ΤΟΜΟΣ Ι , Michael T. Madigan, John M Martinko ,Jack Parker.

