



**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας**

**Επίδραση του pH στην παραγωγή πεπτικών πρωτεασών και
γλυκοσιδασών από την εντερική μικροχλωρίδα του
λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*)**

Διπλωματική εργασία: Λαμπαδάρης Κωνσταντίνος

Λάρισα, 2011

Το εργαστηριακό-πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής εργασίας είναι η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Μούτου Αικατερίνη.

Τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής είναι:

Μούτου Αικατερίνη: Αναπληρώτρια 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.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την καθηγήτριά μου, κ. Μούτου Κατερίνα για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και για την πολύτιμη βοήθεια της κατά τη διεξαγωγή και συγγραφή αυτής της εργασίας.

Επίσης θερμές ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα Γεωργίου Στέλλα για την πολύτιμη βοήθεια της σε όλη την πορεία των πειραμάτων και για την αμέριστη συνεργασία της.

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

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	5
Στοιχεία βιολογίας και καλλιέργειας του λαβρακιού (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	5
Βασική φυσιολογία πέψης.....	8
Ο ρόλος της βακτηριακής μικροχλωρίδας στην πέψη και την απορρόφηση θρεπτικών.....	12
Κατηγορίες βακτηριακών ενζύμων.....	14
Σκοπός της μελέτης.....	25
Υλικά και μέθοδοι	26
Υλικά και μέσα καλλιέργειας βακτηρίων.....	26
Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας.....	28
Προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου.....	31
Αποτελέσματα	34
Διαφοροποίηση των βακτηριακών στελεχών σύμφωνα με το ενζυμικό τους προφίλ και την απόκρισή τους στις αλλαγές του pH.....	34
Συζήτηση	41
Βιβλιογραφία	45

Εισαγωγή

✚ Στοιχεία βιολογίας και καλλιέργειας του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*)



Εικόνα 1: Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)

Συστηματική κατάταξη:

Βασίλειο: Ζώα (*Animalia*)
 Φύλο: Χορδωτά (*Chordata*)
 Κλάση: Ακτινοπτερύγιοι (*Actinopterygii*)
 Υποκλάση: Τελεόστεοι (*Teleostei*)
 Τάξη: Περκόμορφα (*Perciformes*)
 Οικογένεια: Μορονίδες (*Moronidae*)
 Γένος: *Dicentrarchus*
 Είδος: *Dicentrarchus labrax*

Ο τελεόστεος *Dicentrarchus labrax*, με την κοινή ονομασία λαβράκι (εικ.1), είναι ένα ψάρι με μεγάλη διατροφική και οικονομική αξία. Το μήκος του μπορεί να φτάσει τα 100-105 εκατοστά και το βάρος του τα 12 κιλά. Το σώμα του είναι στρογγυλό και επιμηκισμένο και διαθέτει πλατύ στόμα με μικρά μυτερά δόντια, το οποίο χρησιμοποιεί για να πιάσει τη λεία του. Το χρώμα του σώματος του είναι γκρι κατά μήκος της πλάτης, ασήμι στα πλευρά και άσπρο στην περιοχή της κοιλιάς. Τα νεαρά ψάρια έχουν σκούρες κηλίδες στην πλάτη τους, οι οποίες όμως εξαφανίζονται σταδιακά καθώς τα ψάρια μεγαλώνουν και ωριμάζουν. Η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής που έχει παρατηρηθεί είναι τα 15 χρόνια (www.fishbase.org, Encyclopedia of aquaculture).

Είναι ένα ευρύαλο είδος, βρίσκεται δηλαδή σε αλμυρά, υφάλμυρα ακόμη και σε γλυκά νερά. Κατά το πρώτο στάδιο της ανάπτυξης του χρειάζεται 20-30% αλμυρότητα, ενώ στη συνέχεια δεν πρέπει να υπάρχουν απότομες και μεγάλες μεταβολές αυτής. Αρχίζει να τρώει όταν η θερμοκρασία του ύδατος φτάνει τους 7-8 βαθμούς και αντέχει σε θερμοκρασία 30 βαθμών και πάνω, εφόσον υπάρχει καλή ανανέωση του ύδατος. Τα κατώτερα όρια αντοχής του είναι 2-3 βαθμοί. Πάντως η ιδανικότερη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του κυμαίνεται μεταξύ 22-24 βαθμών.

Όσον αφορά στο είδος του βιότοπου, προτιμά ακτογραμμές με αμμοφυκιάδες ή και βότσαλα, κοντά στις οποίες υπάρχουν εκβολές ποταμών ή χειμάρρων. Συχνά εισχωρεί και μέσα στα ποτάμια, καθώς επίσης συναντάται σε λιμνοθάλασσες και βιβάρια. Κινείται συνήθως στη ρηχή ζώνη βάθους μέχρι 10 μέτρων και πολύ κοντά στη ακτογραμμή, αν και πολλές φορές συναντάται και πολύ βαθύτερα. Μεγάλα άτομα του είδους αλιεύονται και σε βάθη μέχρι 90 μέτρων (www.fishbase.org). Είναι εξαπλωμένο σε όλες τις ανατολικές ακτές του Ατλαντικού ωκεανού, από τη Νορβηγία μέχρι το

Μαρόκο, τις Καννάρειες νήσους και τη Σενεγάλη, σε όλη τη Μεσόγειο και τη Μαύρη θάλασσα. (Χώτος Γ. & Ρογδάκης Ι., 1992).



Εικόνα 2: Περιοχές εξάπλωσης λαβρακιού.

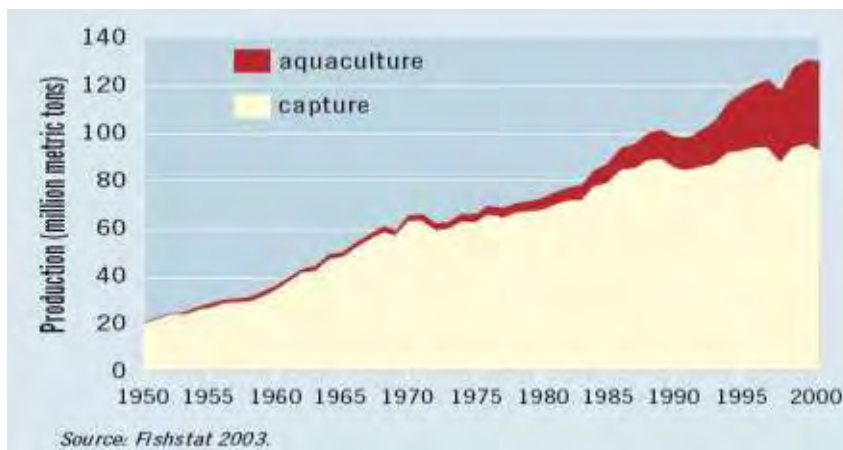
Το λαβράκι ανήκει στην κατηγορία των σαρκοφάγων και αρπακτικών ψαριών. Η δομή του πεπτικού σωλήνα, τα είδη των ενζύμων που εκκρίνονται και ο τύπος των δοντιών ερμηνεύουν απόλυτα αυτό το χαρακτηρισμό (Gliffard-Mena et al., 2006; Eshel et al., 1993). Στα νεαρά στάδια της ηλικίας του τρέφεται κυρίως με γαρίδες και μαλάκια ενώ μεγαλώνοντας καταναλώνει σταδιακά περισσότερα ψάρια, κυρίως αφρόψαρα όπως αθερίνες, σαρδέλες και μικρά κεφαλόπουλα. Σε νεαρή ηλικία, τα λαβράκια σχηματίζουν κοπάδια προκειμένου να κυνηγήσουν, να τραφούν και να μετακινηθούν. Καθώς όμως μεγαλώνουν τείνουν να γίνονται πιο μοναχικά μέχρις ότου να φτάσουν στο επίπεδο να κυνηγούν ατομικά, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι σταματούν να σχηματίζουν κοπάδια. Στο τέλος της νεαρής ηλικίας τα λαβράκια περιστασιακά μεταναστεύουν σε μικρές αποστάσεις, προτού απομακρυνθούν από την ακτή και μεταναστεύσουν σε μεγάλες αποστάσεις (Jennings & Pawson 1992; Picket & Pawson 1994; Hampel et al., 2005).

Στοιχείο της δίαιτας τους αποτελούν και τροφές φυτικής προέλευσης πλούσιες σε υδατανθρακικό περιεχόμενο οι οποίες καταναλώνονται κυρίως όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι εξωγενείς παράγοντες καθιστούν δύσκολη την εύρεση τροφής πλούσιας σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο (www.fishbase.org).

Στοιχεία ιχθυοκαλλιέργειας

Η ιχθυοτροφία ή ιχθυοκαλλιέργεια είναι ο κλάδος ο οποίος ασχολείται αποκλειστικά με την εκτροφή ή καλλιέργεια χρήσιμων για τον άνθρωπο ψαριών, κάτω

από ελεγχόμενες συνθήκες αναπαραγωγής και διαβίωσης, μέσα σε κλειστά γλυκά, υφάλμυρα ή θαλάσσια ύδατα. Σκοπός της δραστηριότητας αυτής είναι η παραγωγή τροφίμων υψηλής θρεπτικής αξίας για τον άνθρωπο, με ζωικές ή φυτικές ιχθυοτροφές χαμηλής βιολογικής αξίας. Η ιχθυοτροφία, αν και αρχαία, απέκτησε μεγάλη σημασία κατά τη 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 ιχθυοκαλλιέργειών (Εικ. 3). Η βιομηχανία της ιχθυοκαλλιέργειας αποτελεί μια από τις πλέον αναπτυσσόμενες βιομηχανίες στον κόσμο με ετήσιο ρυθμό αύξησης της παραγωγής 10%, σε σύγκριση με 1,4% για την αλιεία και 2,8% για προϊόντα αγροτικής προέλευσης (FAO, 2004; Francis et al., 2003).



Εικόνα 3: Παγκόσμια παραγωγή ψαριών 1950-2000. Πηγή: FAO, 2004

Η καλλιέργεια του λαβρακιού γινόταν αρχικά σε παράκτιες λιμνοθάλασσες και σε παλιρροιακές δεξαμενές προτού να ξεκινήσει ο αγώνας για την ανάπτυξη της μαζικής παραγωγής αυτού στο τέλος του 1960. Η ιχθυοκαλλιέργεια αρχικά είχε συσχετιστεί με την παραγωγή αλατιού. Η προμήθεια για αυτές τις καλλιέργειες προερχόταν από την παγίδευση κοπαδιών ψαριών, τα οποία ζούσαν σε περιοχές κοντά σε εκβολές ποταμών. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 η Ιταλία και η Γαλλία συναγωνίζονταν προκειμένου να αναπτύξουν αξιόπιστες τεχνικές για την μαζική παραγωγή λαβρακιού, ενώ στα τέλη της δεκαετίας του 1970 αυτές οι τεχνικές ήταν αρκετά καλά αναπτυγμένες στις περισσότερες χώρες της Μεσογείου και παράγονταν εκατοντάδες χιλιάδες ιχθύδια. Ενώ το 1985 η παραγωγή της μεσογειακής καλλιέργειας ψαριών ήταν μόλις 374 τόνοι τσιπούρας και λαβρακιού, ως το 1990 η παραγωγή είχε αυξηθεί στις 3.876 τόνους, όπου η Ελλάδα, η Ισπανία και η Ιταλία κυριαρχούσαν με σχεδόν 80% όλης της παραγωγής. Το 2000 η συνδυασμένη μεσογειακή παραγωγή ξεπέρασε τις 130.000 τόνους. Και αυτή την περίοδο αρχίζει η κυριαρχία της Ελλάδας με σχεδόν το 50% (70.000 τόνοι) όλης της

παραγωγής, ενώ οι άλλες σημαντικές χώρες παραγωγού είναι η Τουρκία (20%, 28.500 τόνοι), η Ιταλία (12%, 17.000 τόνοι) και η Ισπανία (10%, 14.140 τόνοι). Η κοσμογονία για τον κλάδο έρχεται αργότερα, και σήμερα λειτουργούν περίπου 250 μονάδες, των οποίων η παραγωγή είναι 85.000-100.000 τόνοι (Παναταρίδης, 2005). Ελλάδα, Τουρκία, Ιταλία, Ισπανία, Κροατία και Αίγυπτος αποτελούν ορισμένες από τις μεγαλύτερες χώρες-παραγωγούς του λαβρακιού.



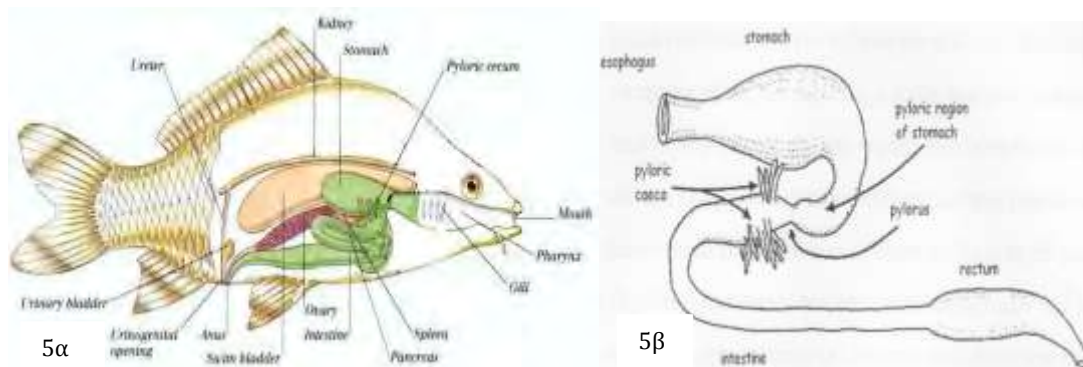
Εικόνα 4: Οι μεγαλύτερες χώρες-παραγωγού του λαβρακιού. Πηγή: FAO Fishery Statistics 2004)

Οι τεχνικές της ιχθυοκαλλιέργειας διακρίνονται γενικά σε 3 κατηγορίες. Καθοριστικός παράγοντας για την διάκριση αποτελεί η διατροφή. Εκτατική χαρακτηρίζεται η ιχθυοκαλλιέργεια όταν η εκτροφή του ιχθυοπληθυσμού γίνεται αποκλειστικά από το περιβάλλον. Ημι-εντατική όταν η εκτροφή γίνεται από το περιβάλλον αλλά ταυτόχρονα παρέχεται και συμπλήρωμα διατροφής σε όλη τη διάρκεια του παραγωγικού κύκλου. Εντατική χαρακτηρίζεται η ιχθυοκαλλιέργεια όταν ο πληθυσμός τρέφεται αποκλειστικά με τροφές που τους παρέχονται από εξωτερικές πηγές, εκτός του περιβάλλοντος τους. Σήμερα, με την επιτυχή έκβαση σε ότι αφορά τη διατροφή του με συμπυκνωμένες ιχθυοτροφές, είναι δυνατή η εντατική κυρίως εκτροφή του μέσα σε τεχνητά υδροστάσια.

Βασική φυσιολογία πέψης

Έρευνες στη μορφολογία και την οντογένεση του πεπτικού σωλήνα του λαβρακιού έδειξαν ότι η ανάπτυξη του ξεκινά ως ένας συνεχής αδιαφοροποίητος αγωγός και καταλήγει σε μία πολύπλοκη δομή (εικ.5α,5β) αποτελούμενη από το στόμα και τη στοματική κοιλότητα, συνεχίζει στο φάρυγγα, τον οισοφάγο και το στομάχι, ακολουθούν τα πυλωρικά τυφλά, το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο και καταλήγει στην έδρα (Elbal et al., 2004; Garcia Hernandez et al., 2001). Χαρακτηριστικό του ψαριού

αυτού, όπως και όλων των σαρκοφάγων ψαριών, είναι το κοντό έντερο (αποτελεί περίπου το 20% του μήκους του σώματος) με τη μορφή ενός ευθύ σωλήνα, που συνδέει το στομάχι με την έδρα. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό είναι το καλά διαμορφωμένο σε σχήμα Y στομάχι. Το επιθήλιο του πεπτικού σωλήνα αντιπροσωπεύει μια σημαντική επιφάνεια επαφής ανάμεσα στο εξωτερικό και το εσωτερικό περιβάλλον και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ποικίλες λειτουργίες, στις οποίες περιλαμβάνονται η πέψη και η απορρόφηση θρεπτικών, η οσμωρύθμιση, η έκκριση ορμονών, η ανοσολογική απόκριση καθώς και η μεταφορά νερού και αλάτων για την διατήρηση της ομοιόστασης νερού και ανόργανων συστατικών (Πανεπιστημιακές παραδόσεις 2000).



Εικόνα 5α,5β: Ανατομία του πεπτικού σωλήνα

Η διαδικασία της πέψης αποτελεί ένα συντονισμένο συνδυασμό φυσικών, χημικών και ενζυμικών δραστηριοτήτων. Ξεκινάει από το στόμα και το φάρυγγα, όπου πραγματοποιείται μηχανική διάσπαση των τροφών. Στα τμήματα αυτά δεν έχει διαπιστωθεί μέχρι σήμερα καμία έκκριση πεπτικών ενζύμων. Η πέψη συνεχίζεται στον οισοφάγο, όπου κατά τη δίοδο της τροφής τα επιθηλιακά του κύτταρα εκκρίνουν βλέννα. Αυτή είναι απαραίτητη, καθώς παίζει το ρόλο λιπαντικού για τη διευκόλυνση της κατάποσης, ενώ παράλληλα αποφεύγεται η καταστροφή των τοιχωμάτων του. Τα κύτταρα του οισοφάγου δεν εκκρίνουν πεπτικά ένζυμα, (Jobling et al, 1995), πρόσφατα όμως έχει διαπιστωθεί ο ρόλος τους στην οσμωρύθμιση. Στη συνέχεια η τροφή εισέρχεται στο στομάχι, όπου συνεχίζεται η πέψη με τη βοήθεια των περισταλτικών κινήσεων των τοιχωμάτων του καθώς και των στομαχικών εκκρίσεων.

Οι λειτουργίες του στομάχου είναι γενικά η προσωρινή αποθήκευση, ανάμειξη και πρωτογενής πέψη της τροφής (Cataldi et al, 1987). Από μορφολογικής και λειτουργικής άποψης, το στομάχι διαχωρίζεται στην καρδιακή μοίρα, με λεπτά ελαστικά τοιχώματα και στην πυλωρική μοίρα με παχιά μυώδη τοιχώματα. Η πυλωρική μοίρα τελειώνει με τον πυλωρικό σφιγκτήρα που είναι η είσοδος στο άνω τμήμα του εντέρου. Στο στομάχι ξεκινάει η ενζυμική πέψη με τη δράση της πεψίνης σε όξινο περιβάλλον. Σύμφωνα με την έρευνα των Nikolopoulou et al. (2010) το pH στο στομάχι 2 ώρες μετά το τάισμα των ψαριών κυμαίνονταν μεταξύ του 4.7 και 5.7 ενώ 12 ώρες

μετά του γεύματος η μέση τιμή του ήταν 3.5. Στους γαστρικούς αδένες των ψαριών έχει βρεθεί ένας μόνο κυτταρικός τύπος που παράγει υδροχλωρικό οξύ και πεψίνες, ενώ συναντώνται και βλεννογόνα κύτταρα. Οι πεψίνες είναι ενδοπεπτιδάσες, οι οποίες εκκρίνονται ως ανενεργά ζυμογόνα και ενεργοποιούνται σε όξινες συνθήκες σε pH χαμηλότερο του 6. Υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ αρωματικών και δικαρβοξυλικών αμινοξέων, με αποτέλεσμα να διασπών πολύ λίγους από τους δεσμούς μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας καταλήγοντας σε μικρότερα πολυπεπίδια, που χρήζουν συμμετοχής άλλων πρωτεασών (Jobling et al, 1995).

Το όξινο περιεχόμενο περνάει στον πυλωρό δια μέσου του πυλωρικού σφιγκτήρα, ρόλος του οποίου είναι να ρυθμίζει το ρυθμό της γαστρικής εκκένωσης, και ακολούθως αφήνει το στομάχι από τον πυλωρό και εισέρχεται στο έντερο. Στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου (η περιοχή μεταξύ του πυλωρικού σφιγκτήρα και του πρώτου εντερικού βρόγχου) το pH αυξάνει σημαντικά σε τιμές μεταξύ του 6 και 8 (Nikolopoulou et al., 2010). Αυτό αποδίδεται στην ύπαρξη των μικρών πυλωρικών τυφλών (4 ή 5 στο λαβράκι) στην αρχή του πρόσθιου τμήματος του εντέρου, στη βάση των οποίων απελευθερώνονται οι εκκρίσεις του ηπατικού και παγκρεατικού αγωγού (Cataldi et al., 1987). Στους κυριότερους ρόλους των πυλωρικών τυφλών περιλαμβάνονται οι εξής : i) η αποθήκευση της τροφής, μέχρι την εξουδετέρωση μέσω των παγκρεατικών εκκρίσεων του προερχόμενου από τη στομαχική πέψη όξινου pH, ii) η πέψη θρεπτικών συστατικών, λειτουργώντας συμπληρωματικά με αυτή του στομάχου, iii) η απορρόφηση των θρεπτικών, iv) συμμετοχή στη διαδικασία της οσμωρύθμισης, v) αύξηση ή συμπλήρωση της λειτουργίας του πεπτικού σωλήνα καθώς και vi) αύξηση της επιφάνειας του εντέρου (Karoor et al, 1975; Alarcon et al, 1998). Έπειτα το περιεχόμενο περνά στο ενδιάμεσο τμήμα του εντέρου (η περιοχή από το τέλος του πρόσθιου εντέρου μέχρι τη βαλβίδα που διαχωρίζει το έντερο από το ορθό έντερο) και τέλος στο ακραίο τμήμα του εντέρου (η περιοχή από το τέλος του ενδιάμεσου τμήματος μέχρι την έδρα) όπου αυξάνεται περαιτέρω το pH σε τιμές 6.5-8.5 και 7.5-8.5 αντίστοιχα για κάθε τμήμα (Nikolopoulou et al. 2010).

Η βρώση της τροφής συνδέεται αναπόφευκτα με την κατάποση νερού η οποία καταλήγει σε αλλαγές της ιοντικής ισορροπίας του εντέρου μέσω της λήψης αλατιού από την τροφή και από το νερό. Σε καλλιεργούμενα είδη, όπως είναι και το λαβράκι, οι ξηρές τροφές που τους χορηγούνται δημιουργούν ένα μεγάλο οσμωτικό στρες στο έντερο, προκαλώντας την κατάποση του νερού μετά το γεύμα και την πολτοποίησή τους έτσι ώστε να φτάσει η υγρασία τους σε ένα ικανοποιητικό επίπεδο για την πέψη τους (Windell et al., 1969; Ruohonen et al., 1997; Kristiansen & Rankin, 2001). Το περιεχόμενο ενυδατώνεται αρχικά στο στομάχι και περαιτέρω περνώντας από το

στομάχι στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου του λαβρακιού (Nikolopoulou et al., 2010) καθώς εκκρίνονται χολικά και παγκρεατικά ένζυμα (Grosell et al., 2000; Rust, 2002; Bucking & Wood, 2006b). Ταυτόχρονα υδρολύονται και απορροφώνται θρεπτικά συστατικά αφήνοντας έτσι ένα λιγότερο στέρεο περιεχόμενο (Buddington & Diamond, 1987). Τα επίπεδα υγρασίας του περιεχομένου μειώνονται καθώς αυτό συνεχίζει στο ενδιάμεσο και ακραίο τμήμα του εντέρου (Nikolopoulou et al., 2010).

Το μεγαλύτερο μέρος της ενζυμικής πέψης πραγματοποιείται καθώς η τροφή διέρχεται μέσω των πυλωρικών τυφλών και του εντέρου. Το έντερο είναι ένα σύνθετο πολυλειτουργικό όργανο το οποίο, πέρα από τις λειτουργίες της πέψης και της απορρόφησης θρεπτικών συστατικών, είναι σημαντικό για την ισορροπία νερού και ηλεκτρολυτών, την ενδοκρινή ρύθμιση της πέψης και του μεταβολισμού καθώς και την ανοσία. Παρουσιάζει σημαντική διακύμανση τόσο στο μήκος και την οργάνωση (Fange & Groove, 1979; Stevens, 1988), όσο και στη δομική ποικιλομορφία στα ψάρια (Suyehiro, 1942). Το πρόσθιο τμήμα του εντέρου θεωρείται η κύρια θέση απορρόφησης μακρομορίων στα περισσότερα είδη ψαριών και στο λαβράκι (Dalmo et al, 1997). Το οπίσθιο έντερο παρουσιάζει σταδιακά ελαττούμενες λειτουργίες πέψης και απορρόφησης και αυξημένα επίπεδα παραγωγής βλενωδών εκκρίσεων, καθώς σε αυτό αυξάνεται ο αριθμός των βλεννογόνων κυττάρων πλουσίων σε κενοτόπια με ηωσινόφιλο περιεχόμενο, τα οποία έχουν την ικανότητα απορρόφησης και πέψης πρωτεϊνών με πινοκυττάρωση (Cataldi et al., 1987). Το επιθήλιο του εντέρου καλύπτεται γενικά από δύο τύπους κυττάρων, τα βλεννογόνα και τα κυλινδρικά μονόστιβα επιθηλιακά, τα οποία έχουν στην επιφάνεια τους μικρολάχνες που αυξάνουν σημαντικά την επιφάνεια απορρόφησης (Cataldi et al., 1987).

Η εντερική πέψη πραγματοποιείται από ένζυμα, που προέρχονται κατά κύριο λόγο από το πάγκρεας και τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου αλλά και από την εντερική χλωρίδα (Karoor et al., 1975). Το πάγκρεας, που παρέχει τη μεγαλύτερη ποικιλία και ποσότητα πεπτικών ενζύμων, δεν αποτελεί ένα συμπαγές όργανο αλλά παγκρεατικές νησίδες είναι διάχυτες κατά μήκος του φλεβικού συστήματος· από το συκώτι στο στομάχι, το σπλήνα, τα πυλωρικά τυφλά και το έντερο. Από το πάγκρεας παράγονται αλκαλικές πρωτεάσες, οι οποίες ανήκουν σε δύο μεγάλες οικογένειες, τις καρβοξυπεπτιδάσες και τις πρωτεάσες της σερίνης. Οι καρβοξυπεπτιδάσες ανήκουν στην οικογένεια των M14A των μεταλλοπρωτεασών και διακρίνονται στην καρβοξυπεπτιδάση Α και καρβοξυπεπτιδάση Β. Συμμετέχουν στο μηχανισμό της πέψης διασπώντας περαιτέρω πεπτίδια που προκύπτουν από τη δράση της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης, που είναι πρωτεάσες σερίνης. Για την καταλυτική τους δράση απαιτούν ένα ιόν ψευδαργύρου. Πιο συγκεκριμένα, η καρβοξυπεπτιδάση Α είναι μια

εξωπεπτιδάση που αποσπά αμινοξέα από το καρβοξυτελικό άκρο πεπτιδικών αλυσίδων που έχουν αρωματικές ή ογκώδεις αλειφατικές, μη πολικές πλευρικές αλυσίδες ενώ η καρβοξυπεπτιδάση Β είναι εξειδικευμένη να αποσπά τα πολικά καρβοξυτελικά αμινοξέα λυσίνης και αργινίνης. Από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου παράγονται δι- και τριπεπτιδάσες καθώς και μια αμινοπεπτιδάση. Τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν μέγιστη δραστηριότητα σε ελαφρά αλκαλικές συνθήκες (pH 7-9) (Πανεπιστημιακές παραδόσεις, 2000). Οι παγκρεατικές εκκρίσεις περιέχουν επίσης δικαρβονικά ιόντα, τα οποία δρουν σε συνεργασία με τα χολικά υγρά, με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των οξέων που προέρχονται από το στομάχι και την αύξηση του pH (Karoor et al., 1975; Kurakawa & Suzuki, 1995). Έτσι εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες που επιτρέπουν την αποτελεσματική δράση των παραπάνω ενζύμων. Ακόμη η εξουδετέρωση του pH προστατεύει τις λάχνες των επιθηλιακών κυττάρων από το υδροχλωρικό οξύ (Rust, 2002). Όταν ολοκληρώνεται η διάσπαση της τροφής με τη δράση και των πεπτικών ενζύμων, που εκκρίνονται από το εντερικό επιθήλιο και συγκεντρώνονται κυρίως στην περιοχή των λαχνών, προκύπτουν τα τελικά προϊόντα της πέψης (δισακχαρίτες, δι- και τρι-πεπτίδια, μονοσακχαρίτες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα). Αυτά απορροφούνται και μεταφέρονται, μέσω των εντεροκυττάρων, στην κυκλοφορία του αίματος για να κατανεμηθούν στη συνέχεια στους υπολοίπους ιστούς του σώματος. (Karoor et al, 1975; Moyle & Cech, 1982; Halver, 1989).

Ο ρόλος της βακτηριακής μικροχλωρίδας στην πέψη και την απορρόφηση θρεπτικών

Τα βακτήρια αποτελούν το πιο πολυπληθές και εξαπλωμένο βασίλειο 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. Οι σχέσεις μεταξύ ζώων και μικροοργανισμών είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και μπορεί να ποικίλουν από ανταγωνιστικές έως και συνεργιστικές (Roderick et al, 1985). Στους ανώτερους ζωικούς οργανισμούς πολυάριθμοι αριθμοί βακτηρίων ζουν συμβιωτικά στον πεπτικό σωλήνα σχηματίζοντας μια ολοκληρωμένη οικολογική μονάδα με τον οργανισμό ξενιστή. Αυτή η σύνθετη οντότητα, αποτελούμενη από βακτήρια και άλλα είδη μικροοργανισμών, μπορεί να θεωρηθεί ως το καλύτερα μεταβολικά προσαρμοσμένο και γρήγορα ανανεώσιμο όργανο του σώματος, ένα όργανο που έχει ζωτικό ρόλο στις διατροφικές, φυσιολογικές, ανοσολογικές και προστατευτικές λειτουργίες του ξενιστή (Roderick et al., 2005). 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). Η δημιουργία και καθιέρωση της μικροχλωρίδας του εντέρου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την μικροχλωρίδα του νερού καθώς και της τροφής που προσλαμβάνεται από τα ψάρια, καθώς ο πεπτικός σωλήνας των ψαριών είναι ένα ανοιχτό σύστημα που βρίσκεται σε συνεχή επικοινωνία με το υδάτινο περιβάλλον. Το εσωτερικό του πεπτικού σωλήνα των ψαριών προσφέρει ένα περιβάλλον ιδανικότερο για τη μικροβιακή ανάπτυξη σε σχέση με το υδάτινο οικοσύστημα στο οποίο ζουν, καθώς είναι πολύ πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά (Strom & Olafsen, 1990; Hansen, Strom & Olafsen, 1992). Για το λόγο αυτό πολλά είδη βακτηρίων που βρίσκονται σε μικρούς αριθμούς στο υδάτινο περιβάλλον δημιουργούν πολυάριθμους πληθυσμούς στο περιβάλλον του εντέρου. 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 και γλυκοσιδάσες που ενισχύουν την δράση των ενζύμων του ξενιστή (Saha & Ray, 1998). Επίσης παρατηρήθηκε ότι εκκρίνουν και κυτταρινάσες οι οποίες παράγονται αποκλειστικά από μικροβιακούς πληθυσμούς που φιλοξενούνται στο εσωτερικό φυτοφάγων κυρίως ψαριών καθώς έχει παρατηρηθεί ότι είναι αδύνατη η ενδογενής παραγωγή τους (Trust & Sparrow, 1974; Lindsay & Harris, 1980; Lesel, Fromageot & Lesel, 1986; Saha & Ray, 1998; Bairagi et al., 2002). Μέλη του γένους *Trichoderma* και *Aspergillus* θεωρούνται οι καλύτεροι παραγωγοί κυτταρινασών (Esterbauer, Steiner, Labudova, Herman & Hayn, 1991; Gomes, Steines & Esterbauer, 1992; Kim, Kang & Lee, 1997; Kang, Park, Lee, Hong & Kim, 2004).

Αν και η ύπαρξη των υποχρεωτικά αναερόβιων βακτηρίων στον εποικισμό του πεπτικού σωλήνα δεν ήταν εξακριβωμένη, πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι πληθυσμοί αναερόβιων βακτηρίων υπάρχουν και εκκρίνουν εστεράσες, λιπάσες, όξινη και αλκαλική φωσφατάση, ακόμα και θρυψίνη (Tengjaroenkul et al., 2000). Μολονότι τα παραπάνω ένζυμα υπάρχουν και στους ιστούς των ψαριών, τα βακτηριακής

προέλευσης ισοένζυμα 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 οξέος μπορούν να επηρεάσουν θετικά την ενδογενή σύνθεση ενζύμων όπως η αλκαλική φωσφατάση, αμινοπεπτιδάσες, λακτάση και σακχαράση. Οι παρατηρήσεις αυτές έγιναν αρχικά σε ιχθύδια 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).

Κατηγορίες βακτηριακών ενζύμων

○ Πρωτεάσες

Οι πρωτεάσες αποτελούν μια τάξη ενζύμων που κατέχει ζωτικής σημασίας θέση χάρη στις εφαρμογές τους τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε εμπορικά επίπεδα. Βρίσκονται σε αφθονία σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και είναι απαραίτητα για την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (Gupta et al. 2002). Είναι αποικοδομητικά ένζυμα, που καταλύουν την διάσπαση πεπτιδικών δεσμών και είναι υπεύθυνα για την ολική υδρόλυση πρωτεϊνών (Rao et al. 1998). Οι βακτηριακές πρωτεάσες βρίσκονται ανάμεσα στα πιο σημαντικά υδρολυτικά ένζυμα και έχουν μελετηθεί εκτενώς από την εκκίνηση της επιστήμης της ενζυμολογίας. Τα βακτήρια παράγουν και επεξεργάζονται μια σειρά πρωτεασών, που είναι ενδοκυτταρικές ή εξωκυτταρικές. Οι ενδοκυτταρικές πρωτεάσες είναι σημαντικές για ποικίλες κυτταρικές ή μεταβολικές διαδικασίες, όπως η δημιουργία σπορίων και η διαφοροποίηση, η μετατροπή πρωτεϊνών, ωρίμανση των ενζύμων και ορμονών και διατήρηση των

διαθέσιμων πρωτεϊνών. Οι εξωκυτταρικές πρωτεάσες συμμετέχουν στην υδρόλυση πρωτεϊνών σε περιβάλλοντα εκτός κυττάρων, επιτρέποντας στη συνέχεια σε αυτά να απορροφήσουν και να αξιοποιήσουν τα προϊόντα υδρόλυσης (Kalisz 1988). Παράλληλα αυτά τα εξωκυτταρικά ένζυμα αξιοποιούνται σε εμπορικό επίπεδο προκειμένου να ενισχυθεί η αποικοδόμηση πρωτεϊνών σε διάφορες βιομηχανικές διαδικασίες (Kumar and Takagi, 1999; Outtrup and Boyce, 1990).

Επί του παρόντος, οι βακτηριακές πρωτεάσες, όμοια με τις πρωτεάσες των υπόλοιπων ζωντανών οργανισμών, ταξινομούνται βάσει 3 βασικών κριτηρίων: 1) τον τύπο της αντίδρασης που καταλύουν 2) την χημική φύση της καταλυτικής θέσης και 3) την εξελικτική σχέση ως προς τη δομή (Barrett, 1994). Μια αρχική διάκριση των πρωτεασών γίνεται σε εξωπεπτιδάσες και ενδοπεπτιδάσες, ανάλογα με τη θέση δράσης τους. Βάσει της λειτουργικής ομάδας που βρίσκεται στο καταλυτικό κέντρο, ταξινομούνται περαιτέρω σε 4 ομάδες: i) πρωτεάσες σερίνης ii) πρωτεάσες ασπαρτικού iii) πρωτεάσες κυστεΐνης και iv) μεταλλοπρωτεάσες (Hartley, 1960). Τέλος, ανάλογα με την αμινοξική τους αλληλουχία, χωρίζονται σε διαφορετικές οικογένειες και ακολούθως σε «φυλές», προκειμένου να δημιουργηθούν ομάδες πεπτιδασών που έχουν προέλθει από κοινό πρόγονο (Rawlings & Barrett, 1993). Κάθε οικογένεια πεπτιδασών χαρακτηρίζεται από ένα κωδικό γράμμα, υποδηλώνοντας τον τύπο της κατάλυσης π.χ S, C, A, M για τους τύπους σερίνης, κυστεΐνης, ασπαρτικού και μεταλλοπρωτεασών αντίστοιχα.

1) Εξωπεπτιδάσες

Τα ένζυμα αυτά δρουν μόνο κοντά στα άκρα πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Ανάλογα με την δράση τους στο αμινο- ή καρβοξυ- τελικό άκρο, διακρίνονται σε αμινο- και καρβοξυπεπτιδάσες αντίστοιχα. Οι αμινοπεπτιδάσες δρουν σε ένα ελεύθερο N-τελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και ελευθερώνουν ένα μεμονωμένο αμινοξύ, ένα διπεπτίδιο ή τριπεπτίδιο. Υπάρχουν σε μεγάλη ποικιλία βακτηρίων καθώς επίσης και άλλων μικροβιακών ειδών συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων (Watson, 1976). Γενικά, είναι ενδοκυτταρικά ένζυμα αλλά υπάρχει μια μεμονωμένη αναφορά για μια εξωκυτταρική αμινοπεπτιδάση παραγόμενη από το είδος *A. oryzae* (Labbe et al, 1974). Παραδείγματα τέτοιων βακτηριακών ενζύμων αποτελούν i) η αμινοπεπτιδάση I από την *Escherichia coli*, μια μεγάλη πρωτεάση με μοριακό βάρος 400,000 Da και ευρύ βέλτιστο pH 7,5 -10,5, η οποία απαιτεί ιόντα Mg^{2+} και Mn^{2+} για καλύτερη δραστηριότητα (De Marco and Dick, 1978) και ii) η αμινοπεπτιδάση του *Bacillus licheniformis* με μοριακό βάρος 34,000 που περιέχει ένα g ατόμου Zn/mol και η δραστηριότητα της ενισχύεται από ιόντα Ca^{2+} . Οι καρβοξυπεπτιδάσες δρουν στο C-τελικό άκρο

πολυπεπτιδικών αλυσίδων και ελευθερώνουν μεμονωμένα αμινοξέα ή διπεπτίδια. Χωρίζονται σε 3 ομάδες :i) καρβοξυπεπτιδάσες σερίνης ii) μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάσες και iii) καρβοξυπεπτιδάσες κυστεΐνης , ανάλογα με την φύση των αμινοξικών καταλοίπων στην καταλυτική θέση του ενζύμου. Παράδειγμα αποτελούν οι μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάσες από είδη *Pseudomonas* που απαιτούν Zn^{2+} ή Co^{2+} για την δραστηριότητα τους (Lu et al., 1969).

2) Ενδοπεπτιδάσες

Οι ενδοπεπτιδάσες χαρακτηρίζονται από την δράση τους σε πεπτιδικούς δεσμούς που βρίσκονται σε εσωτερικές περιοχές των πολυπεπτιδικών αλυσίδων μακριά από το αμινο- και καρβοξυ- τελικό άκρο. Διακρίνονται σε: i) πρωτεάσες σερίνης ii) πρωτεάσες ασπαρτικού iii) πρωτεάσες κυστεΐνης και iv) μεταλλοπρωτεάσες , βάσει της φύσης των αμινοξικών καταλοίπων στην καταλυτική τους θέση (Rawlings & Barrett, 1993).

Πρωτεάσες σερίνης

Οι πρωτεάσες σερίνης παρουσιάζουν αξιοσημείωτο ενδιαφέρον, χάρη στη δραστικότητα και σταθερότητα τους σε αλκαλικό pH, γεγονός που προσφέρει την δυνατότητα αξιοποίησης τους σε πολλές εφαρμογές. Έχουν ένα νουκλεόφιλο κατάλοιπο σερίνης στην δραστική τους θέση. Εκτός αυτού, οι πρωτεάσες αυτές ξεχωρίζουν καθώς διαθέτουν απαραίτητα κατάλοιπα ασπαρτικού και ιστιδίνης, τα οποία μαζί με την σερίνη σχηματίζουν την καταλυτική τριάδα. Είναι γενικά δραστικές σε ουδέτερες και αλκαλικές συνθήκες, με βέλτιστο pH 7-11, αν και έχει επίσης αναφερθεί βέλτιστο pH 10-12,5 για πρωτεάσες του είδους *Bacillus* (Shimogaki et al., 1991). Εμφανίζουν ευρεία ειδικότητα ως προς το υπόστρωμα, και με λίγες εξαιρέσεις (όπως πρωτεάσες σερίνης μεγάλου μοριακού βάρους από τον *B.subtilis*) έχουν γενικά μικρό μοριακό βάρος 18-35Kd (Kato et al., 1992; Yamagata et al., 1995). Οι πρωτεάσες σερίνης που είναι δραστικές σε υψηλό αλκαλικό pH αντιπροσωπεύουν την μεγαλύτερη υποομάδα των ενζύμων αυτών.

Αλκαλικές πρωτεάσες σερίνης

Παράγονται από πολυάριθμα βακτήρια και άλλους μικροβιακούς οργανισμούς. Υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς που έχουν τυροσίνη, φαινυλαλανίνη ή λευκίνη στην πλευρά του καρβοξυλικού οξέος του πεπτιδικού δεσμού. Το βέλτιστο pH για την δράση τους είναι κοντά στο 10 και το ισοηλεκτρικό τους σημείο κοντά στο 9. Τα μοριακά βάρη τους κυμαίνονται μεταξύ 15-30 kDa. Αν και οι αλκαλικές πρωτεάσες σερίνης παράγονται από πολλά βακτήρια όπως τα *Arthrobacter*, *Streptomyces* και

Flavobacterium, (Boguslawski et al., 1983) οι σαμπτυλισίνες που παράγονται από διάφορα είδη *Bacillus* είναι οι πιο γνωστές. Η διαμόρφωση της καταλυτικής τους θέσης είναι παρόμοια με αυτή της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης παρά τις συνολικές διαφορές σε όλο το μόριο (Phadarate et al., 1997).

Πρωτεάσες ασπαρτικού

Οι πρωτεάσες ασπαρτικού, γνωστές κοινώς ως όξινες πρωτεάσες, είναι οι ενδοπεπτιδάσες που εξαρτώνται από κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος για την καταλυτική τους δράση. Οι περισσότερες πρωτεάσες ασπαρτικού επιδεικνύουν μέγιστη δραστηριότητα σε χαμηλό pH 3-4 και έχουν ισοηλεκτρικά σημεία 3-4,5. Τα μοριακά τους βάρη κυμαίνονται μεταξύ 30-45 kDa. Το κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος του καταλυτικού κέντρου βρίσκεται εσωτερικά του μοτίβου Asp-Xaa-Gly, στο οποίο το Xaa μπορεί να είναι Ser ή Thr. Οι πρωτεάσες αυτές αναστέλλονται από πεπστατίνη (Fitzgerald et al., 1990). Είναι επίσης ευαίσθητες σε συστατικά διαζοκετονών, όπως ο μεθυλεστέρας της διαζοακετυλ-DL-νορλευκίνης (DAN) και 1,2 εποξυ-3-π-νιτροφαινοξυπροπάνιο (EPNP) παρουσία ιόντων Cu. Οι μικροβιακές όξινες πρωτεάσες εκδηλώνουν ειδικότητα έναντι αρωματικών ή μεγάλων αμινοξικών καταλοίπων και στις 2 πλευρές ενός πεπτιδικού δεσμού, που είναι παρόμοια με την ειδικότητα της πεψίνης, η δράση τους όμως είναι λιγότερο αυστηρή σε σχέση με αυτήν. Οι μικροβιακές πρωτεάσες ασπαρτικού μπορούν να διαχωριστούν σε 2 ομάδες :i) πρωτεάσες όμοιες με την πεψίνη και ii) πρωτεάσες όμοιες με την ρενίνη (Rao et al., 1998).

Πρωτεάσες κυστεΐνης

Η δραστηριότητα των πρωτεασών αυτών βασίζεται σε μια καταλυτική δυάδα που αποτελείται από κυστεΐνη και ιστιδίνη. Γενικά οι πρωτεάσες κυστεΐνης είναι δραστικές μόνο παρουσία αναγωγικών μέσων όπως το HCN ή κυστεΐνη. Βάσει της ειδικότητας θέσης αλυσίδας, χωρίζονται σε 4 ομάδες: i) πρωτεάσες όμοιες με την παπαΐνη ii) πρωτεάσες όμοιες με την θρυψίνη με προτίμηση για διάσπαση σε κατάλοιπα αργινίνης iii) πρωτεάσες με ειδικότητα στο γλουταμικό οξύ iv) άλλες. Έχουν ουδέτερο βέλτιστο pH αν και ορισμένες από αυτές εκδηλώνουν μέγιστη δραστηριότητα σε όξινο pH. Είναι ευαίσθητες σε σουλφυδρυλικά συστατικά όπως το PCMB αλλά δεν επηρεάζονται από το DFP και από χηλικούς παράγοντες μετάλλων.

Μεταλλοπρωτεάσες

Αποτελούν την ομάδα πρωτεασών με την μεγαλύτερη ποικιλία (Barrett, 1995). Χαρακτηρίζονται από την απαίτηση τους για ένα δισθενές μεταλλικό ιόν για την δράση τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταλλοπρωτεάσης παραγόμενης από βακτήρια είναι η θερμολυσίνη. Βάσει της ειδικότητας της δράσης τους, χωρίζονται σε 4 ομάδες: i) ουδέτερες ii) αλκαλικές iii) πρωτεάσες *Mycobacter* I iv) πρωτεάσες *Mycobacter* II. Οι ουδέτερες πρωτεάσες δείχνουν ειδικότητα για υδροφοβα αμινοξέα, ενώ οι αλκαλικές έχουν ευρεία ειδικότητα. Η πρωτεάση *Mycobacter* I είναι ειδική για μικρά αμινοξικά κατάλοιπα σε οποιαδήποτε πλευρά του πεπτιδικού δεσμού, ενώ η πρωτεάση *Mycobacter* II είναι ειδική για κατάλοιπα λυσίνης στην αμινοξική πλευρά του πεπτιδικού δεσμού. Όλα τα παραπάνω ένζυμα αναστέλλονται από χηλικούς παράγοντες όπως το EDTA αλλά όχι από σουλφυδρυλικά συστατικά όπως το GFP. Η θερμολυσίνη, μια ουδέτερη πρωτεάση, είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη πρωτεάση της οικογένειας MA (οικογένεια που έχει την αλληλουχία HEXXXH). Άλλες σημαντικές μεταλλοπρωτεάσες παραγόμενες από βακτήρια είναι η κολλαγενάση, που παράγεται από το αερόβιο βακτήριο *Achromobacter iophagus*, καθώς και η ελαστάση που παράγεται από το *Pseudomonas aeruginosa*.

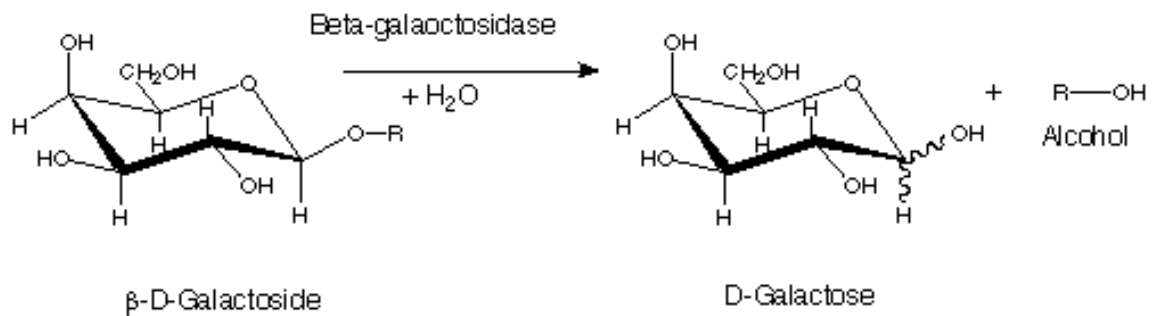
ο Γλυκοσιδάσες

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 συμβάλλουν σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών όπως στην αποικοδόμηση βιομάζας κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, σε αντιβακτηριδιακές στρατηγικές άμυνας, σε παθογενετικούς μηχανισμούς και σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες (Bairoch, 1999). Μαζί με τις γλυκοσυλτρανσφεράσες, 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 γλυκοσιδάσων είναι τα εξής:

α & β γαλακτοσιδάσες

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. 6) χρησιμοποιεί υποστρώματα όπως λακτόζη, γλυκοπρωτεΐνες, γαγλιοσίδια

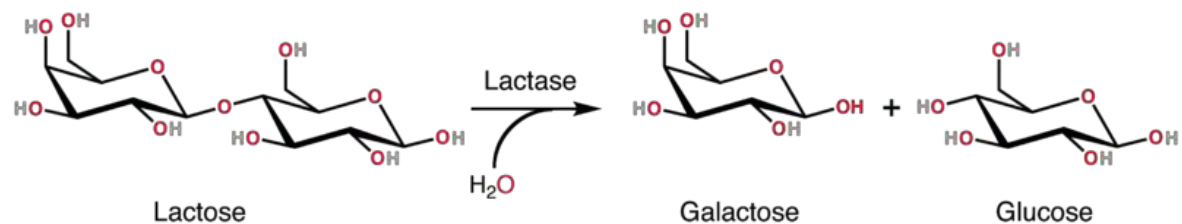
(γλυκοσφιγκολιπίδια ενωμένα με ένα μόριο σαλικυλικού οξέος), χρειάζεται ιόντα Mg^{2+} & K^+ για να δράσει και αποτελείται από δυο υπομονάδες (lacZA και lacZΩ).



Εικόνα 6: Χημική αντίδραση που καταλύεται από τη β-γαλακτοσιδάση.

Λακτάσες

Οι λακτάσες είναι μία υπο-κλάση 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. 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. 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 απ' ότι η λακτόζη.



Εικόνα 7: Χημική αντίδραση που καταλύεται από λακτάση.

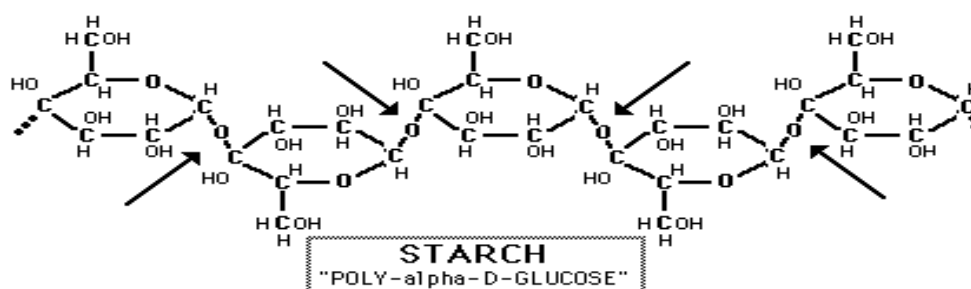
Αμυλάσες

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 σίελο 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 τη λειτουργικότητά 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. 8). Επειδή δρα οπουδήποτε στο υπόστρωμα η α-αμυλάση δρα γρηγορότερα από τη 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, μια 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 8: Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις στο μόριο του αμύλου που υδρολύονται από α-αμυλάση.

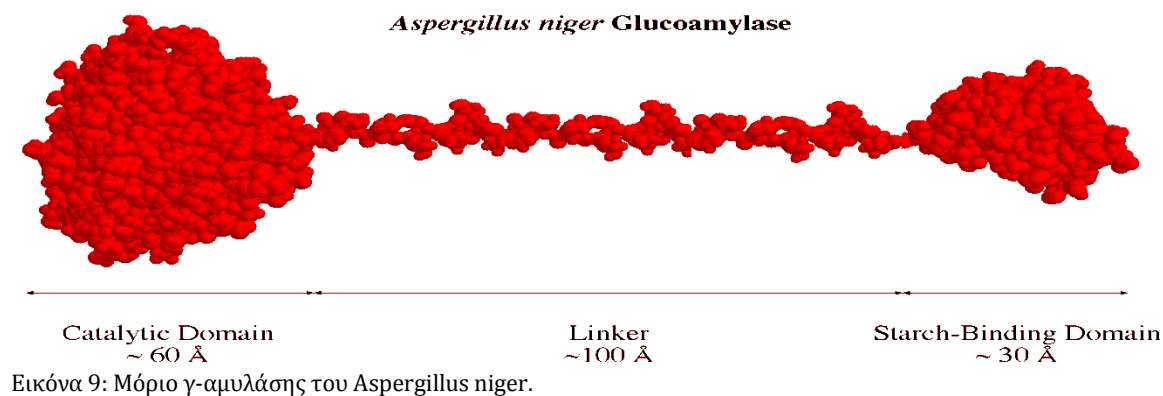
β-αμυλάση

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

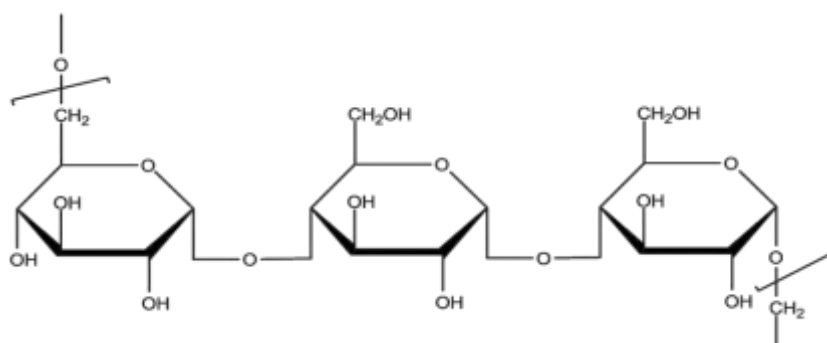
Η γ-αμυλάση ονομαζόμενη αλλιώς και exo-1,4-α-d-glucosidase ή γλυκοαμυλάση, δρα διασπώντας το άκρο του πολυσακχαρίτη παράγοντας μόρια μαλτόζης και γλυκόζης. Εκτός από τη διάσπαση των τελευταίων α-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών στα άκρα της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης, η γ-αμυλάση διασπά και τους α-1,6 γλυκοζιτικούς

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. 9).



Pullulanase (pullulan-6-glucanohydrolase)

Αποτελεί ένα ιδιαίτερο είδος αμυλολυτικής γλυκανάσης που διασπά πολυσακχαρίτες αποτελούμενους από μόρια μαλτοτριόζης συνδεδεμένα με α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Εικ. 10). 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.



Εικόνα 10: Το μόριο της μαλτοτριόζης αποτελείται από τρία μόρια γλυκόζης.

Σακχαράσες

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

Ιμβερτάσες (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 τη δράση του ενζύμου απαιτούν θερμοκρασία 60°C και pH ίσο με 4,5.

Μαλτάσες

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.

Χιτινάσες

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 τα υπολείμματα των προαναφερθέντων οργανισμών. Αν και μέχρι πρόσφατα θεωρούσαν ότι η χιτίνη δεν χρησιμοποιούταν ως πηγή ενέργειας από τους οργανισμούς λόγω της δυσκολίας της πέψης της, μελέτες αποδεικνύουν ότι σε ορισμένα ψάρια τα συμβιωτικά βακτήρια του πεπτικού σωλήνα εκκρίνουν χιτινάσες παρέχοντας στον ξενιστή μόρια γλυκόζης.

Ξυλανάσες

Υδρολύουν τον πολυσακχαρίτη β-1,4 ξυλάνιο σε ξυλόζη, ενώ διασπούν την 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 πολυχλωριομένων λευκαντικών ουσιών (Srinivasan,1997).

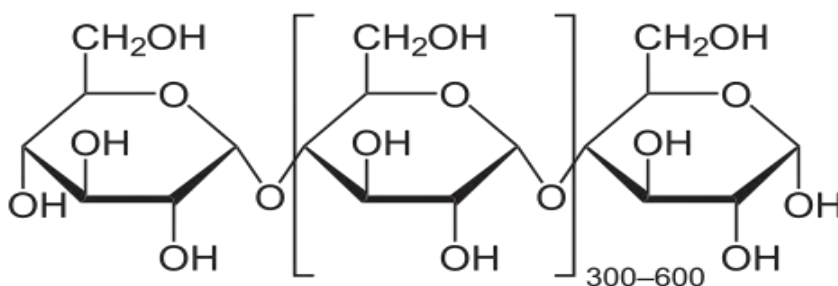
➤ Υποστρώματα υδατανθράκων

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:

Άμυλο

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. 11), μια ευθεία αλυσίδα μορίων γλυκόζης, συνδεδεμένων με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς.



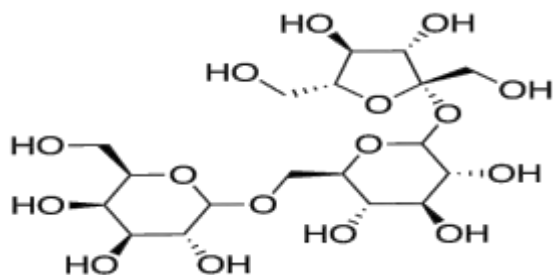
Εικόνα 11: Μόριο αμυλόζης.

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

Επειδή τα πεπτικά ένζυμα δυσκολεύονται στο να διασπών 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 ιχθυοτρόφων, και σε εντατικοποίηση της ιχθυοκαλλιέργειας.

Ραφινόζη

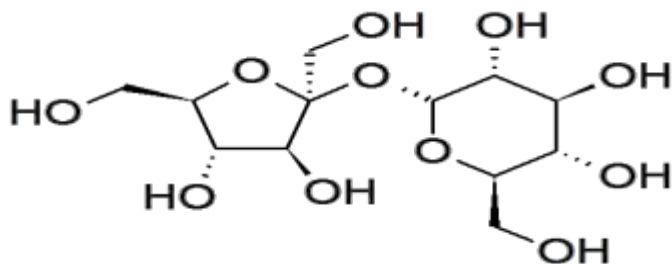
Τρισακχαρίτης αποτελούμενος από μόρια γαλακτόζης, φρουκτόζης και γλυκόζης (Εικ. 12), άφθονος σχεδόν σε όλους τους καρπούς φυτών αλλά κυρίως περιέχεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε λαχανικά όπως φασόλια, μπρόκολα, σπαράγγια. Υδρολύεται από την γλυκοσιδάση α -γαλακτοσιδάση (α GAL) ένα ένζυμο που δεν παράγεται από ανώτερους οργανισμούς και η ύπαρξη του στον πεπτικό σωλήνα οφείλεται αποκλειστικά στην μικροβιακή μικροχλωρίδα.



Εικόνα 12: Μόριο ραφινόζης.

Σακχαρόζη

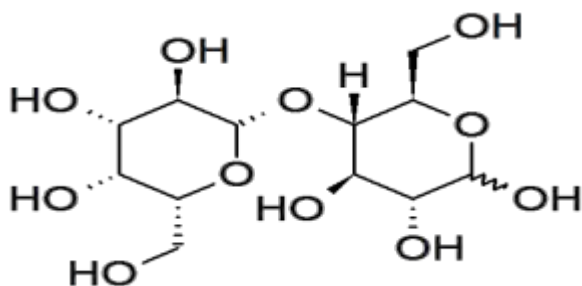
Η κοινή ζάχαρη, είναι δισακχαρίτης αποτελούμενος από μόρια γλυκόζης και φρουκτόζης (Εικ. 13). Συντίθεται αποκλειστικά από φυτικούς οργανισμούς και αποτελεί την κύρια μορφή υδατάνθρακα σε πλήθος καρπών φυτών. Γλυκοσιδάσες όπως η σακχαράση, η ιμπερτάση, και η ισομαλτάση υδρόλυουν τον δισάκχαριτη στα σάκχαρα του.



Εικόνα 13: Μόριο σακχαρόζης.

Λακτόζη

Δισακχατίτης αποτελούμενος από γαλακτόζη και γλυκόζη συνδεόμενων με β-1,4 γλυκοσιδικό δεσμό (Εικ. 14). Βρίσκεται άφθονος στο γάλα των θηλαστικών και τα επίπεδά του διαφέρουν από είδος σε είδος. Το ένζυμο λακτάση που ανιχνεύεται στο εντερικό επιθήλιο των νεογνών θηλαστικών διασπά το δισακχαρίτη απελευθερώνοντας μονοσακχαρίτες γλυκόζης κα γαλακτόζης .



Εικόνα 14: μόριο λακτόζης.

Μαλτόζη

Δισακχαρίτης που σχηματίζεται από δύο μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα με α-1,4 γλυκοσιδικό δεσμό, η πρόσθεση ενός τρίτου μορίου γλυκόζης στη μαλτόζη δημιουργεί την μαλτότριόζη ενώ περεταίρω 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.

Γλυκογόνο

Πολυσακχαρίτης ανάλογης δομής με το άμυλο (αποκαλείται και ζωικό άμυλο) και ιδιαίτερα με την αμυλοπηκτίνη. Αποτελείται από μόρια γλυκόζης ενωμένων με α-1,4 γλυκοσιδικό δεσμό. 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 επιβάλλουν άμεση παραγωγή ενέργειας. Το γλυκογόνο αποδομείται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η οποία δρα στα άκρα της αλυσίδας του πολυμερούς παράγοντας μόρια γλυκόζης.

Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του pH στην παραγωγή πεπτικών πρωτεασών και γλυκοσιδασών από την εντερική μικροχλωρίδα του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*).

Υλικά και μέθοδοι

Υλικά και μέσα καλλιέργειας βακτηρίων

Τα στελέχη των βακτηρίων που μελετώνται στην εργασία απομονώθηκαν από τη στιβάδα του βλεννογόνου του πρόσθιου τμήματος του πεπτικού σωλήνα ενήλικων λαυρακιών. Ύστερα από την απομόνωση τους κατά τη διάρκεια προηγούμενης πειραματικής εργασίας προέκυψαν επτά διαφορετικά βακτηριακά στελέχη: B₄, B₅, C₄, C₅, C₆, F₃ και F₅. Αρχικά τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες που περιείχαν θρεπτικό διάλυμα Tryptone Soy Broth (TSB). Το TSB (Πίνακας 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. Κάθε βακτηριακό στέλεχος καλλιεργήθηκε σε pH 6, 7 και 8 ενώ η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 20 °C.

Πίνακας 1: Σύσταση του Tryptone Soy Broth (TSB)

Συστατικά	g/litre
Casein peptone	17
Soy peptone	3
Glucose (Dextrose)	2,5
Sodium Chloride (NaCl)	5
Dipotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	2,5

Για την παρασκευή 100 ml Tryptone Soy Broth προστέθηκαν 3g θρεπτικού μέσου σε 100 ml απιονισμένο νερό και μετά από ανάδευση αποστειρώθηκαν 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 και η χαμηλή περιεκτικότητα του σε πεπτίδια εξασφαλίζει ότι οι μόνες πρωτεΐνες που θα υπάρχουν στο εναιώρημα της υγρής καλλιέργειας θα προέρχονται από τα καλλιεργούμενα βακτήρια. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2, περιέχει πληθώρα αλάτων που παρέχουν στα βακτήρια πολύτιμα στοιχεία όπως μαγνήσιο, φωσφόρο, άζωτο και θείο για την σύνθεση πεπτιδίων και νουκλεϊκών οξέων, 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 την καλύτερη διαλυτοποίησή τους προστέθηκαν πρώτα τα άλατα και στο τέλος η γλυκερίνη. Ακολούθησε αποστείρωση του θρεπτικού υλικού για αυστηρώς 20 λεπτά καθώς επιπλέον έκθεση του θρεπτικού υλικού σε υψηλή θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα την κροκίδωση των πρωτεϊνών του γάλακτος.

Πίνακας 2: Σύσταση του minimal medium

Συστατικά	g/litre
Dipotassium Hydrogen Phosphate (K_2HPO_4)	2,28
Sodium Phosphate Monobasic Anhydrous (NaH_2PO_4)	1,38
Magnesium Sulphate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,02
Ammonium Sulphate ($(NH_4)_2SO_4$)	0,5
Sodium Chloride (NaCl)	5
Glycerol	10
skim milk	1

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

Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας

○ Θρυψίνη

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της θρυψίνης έγινε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 5mM benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilide (BAPNA, Sigma B3279) σε DMSO, σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCL pH=8.2, 10mM CaCl₂ (Alarcon et al., 1998). Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 100μl ενζυμικού εκχυλίσματος σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 1mM στην κυψελίδα και συνολικό όγκο αντίδρασης 1ml. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 405nm σε χρονικό διάστημα 2min και σε θερμοκρασία 20 °C. Βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηριότητα της θρυψίνης εκφράζεται σε μmol p-nitroaniline που παρήχθηκε ανά mg protein⁻¹ min⁻¹ (ειδικός συντελεστής απορρόφησης $e=8800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

○ Χυμοθρυψίνη

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της χυμοθρυψίνης έγινε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE, Sigma B1625), σε ρυθμιστικό διάλυμα 44.4mM Tris-HCL pH=7.8, 55.5mM CaCl₂ (Alarcon et al., 1998). Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 50μl ενζυμικού εκχυλίσματος σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 1mM στην κυψελίδα και συνολικό όγκο αντίδρασης 1ml. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 256nm σε χρονικό διάστημα 2min και σε θερμοκρασία 20 °C. Βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηριότητα της χυμοθρυψίνης εκφράζεται σε μmol τυροσίνης που παρήχθηκε ανά mg protein⁻¹ min⁻¹ (ειδικός συντελεστής απορρόφησης $e=964\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

○ Καρβοξυπεπτιδάση A

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της καρβοξυπεπτιδάσης A έγινε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα Hippuryl-L-Phe, σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.025M Tris-HCL pH=7.5, 0.5M NaCl (Folk & Schirmer, 1963). Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 100μl ενζυμικού εκχυλίσματος σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 0.5mM στην κυψελίδα και συνολικό όγκο αντίδρασης 1ml. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 254nm σε χρονικό διάστημα 2min και σε θερμοκρασία 20 °C. Βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A εκφράζεται σε units Hippuryl-L-Phe που παρήχθηκε ανά mg protein⁻¹min⁻¹ (ειδικός συντελεστής απορρόφησης $e=0.36\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

ο Καρβοξυπεπτιδάση Β

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της καρβοξυπεπτιδάσης Β έγινε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα Hippuryl-L-Arg, σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.025M Tris-HCl pH=7.65, 0.1M NaCl (Folk et al., 1960). Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 100μl ενζυμικού εκχυλίσματος σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 0.5mM στην κυψελίδα και συνολικό όγκο αντίδρασης 1ml. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 254nm σε χρονικό διάστημα 2min και σε θερμοκρασία 20 °C. Βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β εκφράζεται σε units Hippuryl-L-Arg που παρήχθηκε ανά mg protein⁻¹ min⁻¹ (ειδικός συντελεστής απορρόφησης $\epsilon=0.349\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

ο Γλυκοσιδάσες

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των γλυκοσιδάσων έγινε χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων υδατανθράκων. Τα ειδικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα άμυλο, γλυκογόνο, σακχαρόζη, ραφινόζη, λακτόζη και μαλτόζη. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στην μέθοδο προσδιορισμού συγκέντρωσης σακχαριτών Somogyi-Nelson (1952).

Για κάθε στέλεχος βακτηρίων και διαφορετικό pH χρησιμοποιήθηκαν εις διπλούν erpendorf για την πειραματική διαδικασία και ένα τυφλό στο οποίο το πρωτεϊνικό περιεχόμενο ήταν εξ' αρχής μετουσιωμένο (με NaOH). Σε κάθε σωληνάκι αντίδρασης προστέθηκαν 30μl buffer, 50μl υποστρώματος (2%) και έπειτα προστέθηκαν 20μl υπερκείμενου. Τα ένζυμα που περιέχονταν στο υπερκείμενο αφέθηκαν να δράσουν στο υδατανθρακικό υπόστρωμα για διάστημα 30 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 200μl του αντιδραστήριου 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^{+} .

Ακολούθησε βρασμός για 10 min για πλήρη μετουσίωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου. Όταν τα δείγματα επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκε 200μl αντιδραστήριου 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 αραιώνονται 400μl του περιεχομένου σε erpendorf των 2 μl που περιείχαν 1280μl απιονισμένου νερού. Ακολούθησε δεύτερη ανάδευση για καλύτερη ομογενοποίηση και φυγοκέντριση στις 8000 στροφές ανά λεπτό για χρονικό

διάστημα 5 min. Τέλος το υπερκείμενο της φυγοκέντρισης τοποθετήθηκε σε κυψελίδες και φωτομετρήθηκε στα 650 nm. Ο ειδικός συντελεστής απορρόφησης της γλυκόζης είναι $\epsilon=0.3789\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Όλες οι αντιδράσεις επαναλήφθηκαν εις τριπλούν και οι φωτομετρήσεις έγιναν σε φασματοφωτόμετρο CARY 50Bio.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων:

Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)

Για την παρασκευή 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν 117,64g 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 (γλυκοπυρανόζη) και είναι ικανά να αλληλεπιδρούν με τα ιόντα χαλκού του αντιδραστηρίου A.

Αντιδραστήριο A (αντιδραστήριο χαλκού)

Για την παρασκευή 1L αντιδραστηρίου χαλκού, διαλύονται 28g Na_2HPO_4 (Sigma S-0876) και 40g άλατα Rochelle (K-Na tartate, Sigma P-2347) σε 700 ml απιονισμένου νερού.

Θερμαίνεται και αναδεύεται ταυτόχρονα το μίγμα σε μαγνητικό αναδευτήρα έως ότου να διαλυτοποιηθούν τα άλατα και στη συνέχεια επαναφέρεται το μίγμα σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσθέτονται 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 προσθέστε 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 σε θερμοκρασία δωματίου.

Αντιδραστήριο B (αντιδραστηρίου αρσενομολυβδικού)

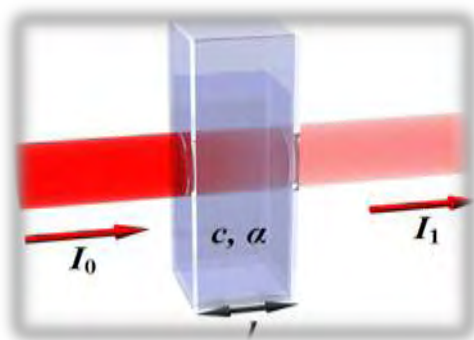
Για την παρασκευή 1L αντιδραστηρίου B, διαλύονται 50g μολυβδενικού αμμωνίου (Sigma A-7302) σε 900ml απιονισμένου νερού.

Ακολούθως αναμιγνύονται σε 42ml θειϊκού οξέος (12M).

Έπειτα διαλύονται 6g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma S-9663) σε 25 ml απιονισμένου νερού και προσθέστε όλη την ποσότητα στο προηγούμενο διάλυμα.

Επώαζεται στους 37 °C για τουλάχιστον δυο μέρες και αποθηκεύεται σε σκουρόχρωμο δοχείο.

❖ 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.15).



Εικόνα 15: δέση 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:

$$A = e b c$$

όπου e ο ειδικός συντελεστής απορρόφησης 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.

Προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου

Ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου κάθε δείγματος έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Lowry (1951). Η μέθοδος αυτή είναι μια βιοχημική τεχνική προσδιορισμού του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου ενός δείγματος. Η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης καθορίζεται με τη μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, ανάλογης του ποσοστού της περιεχόμενης πρωτεΐνης και μετριέται 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.

Παρασκευή αντιδραστηρίων Lowry

Αλκαλικό αντιδραστήριο χαλκού

Σε ογκομετρικό γυάλινο σωλήνα προσθέστε 70ml απεσταγμένο νερό και 2g NaOH, 10g Na₂CO₃ και 0,1 g Potassium Sodium Tartate, αναδεύστε χωρίς θέρμανση μέχρι το τελικό διάλυμα να είναι διαυγές.

Σε 10ml απιονισμένο νερό διαλύστε 0,05g θειϊκού χαλκού.

Έπειτα αναμίξτε τα παραπάνω διαλύματα συμπληρώνοντας με αποσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100ml.

Φαινολικό αντιδραστήριο

Αναμίξτε 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. 10μl BSA εμπορίου.

Πορεία τεχνικής 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 700μl απιονισμένου νερού προσθέτουμε 300μl 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 για 3 sec.

Μεταφέρουμε τους σωλήνες στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55 °C για 5 min. Όταν τα δείγματα επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου φωτομετρώνται στα 740 nm.

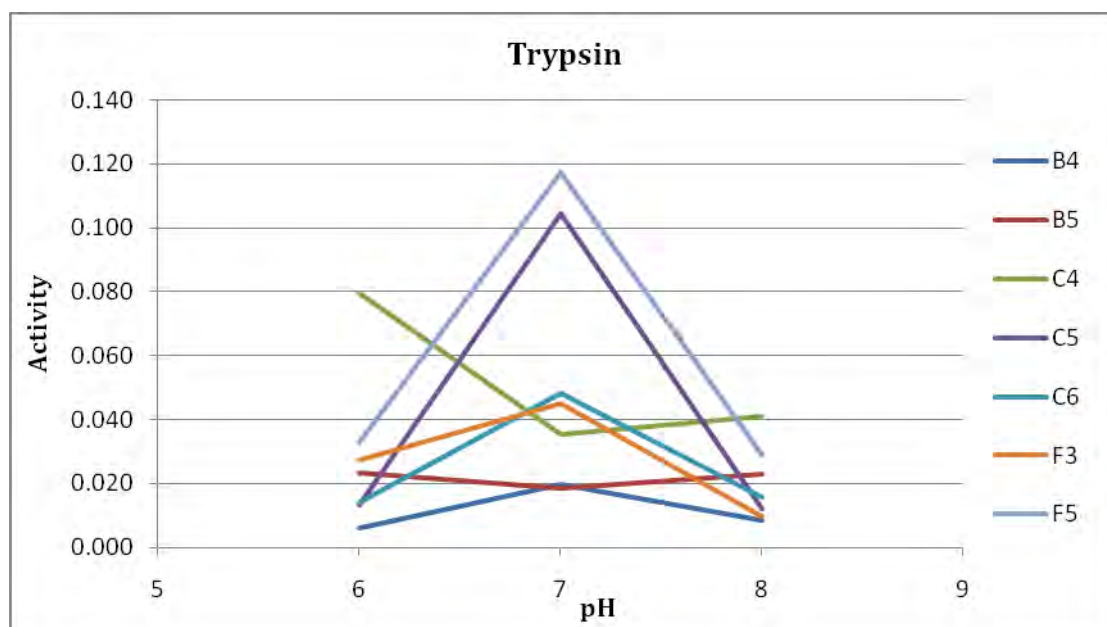
Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με το μέσο όρο της απορρόφησης στον άξονα των τεταγμένων (Y) και τη συγκέντρωση της BSA στην τετμημένη (X). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης των άγνωστων δειγμάτων γίνεται βάσει της πρότυπης καμπύλης.

Αποτελέσματα

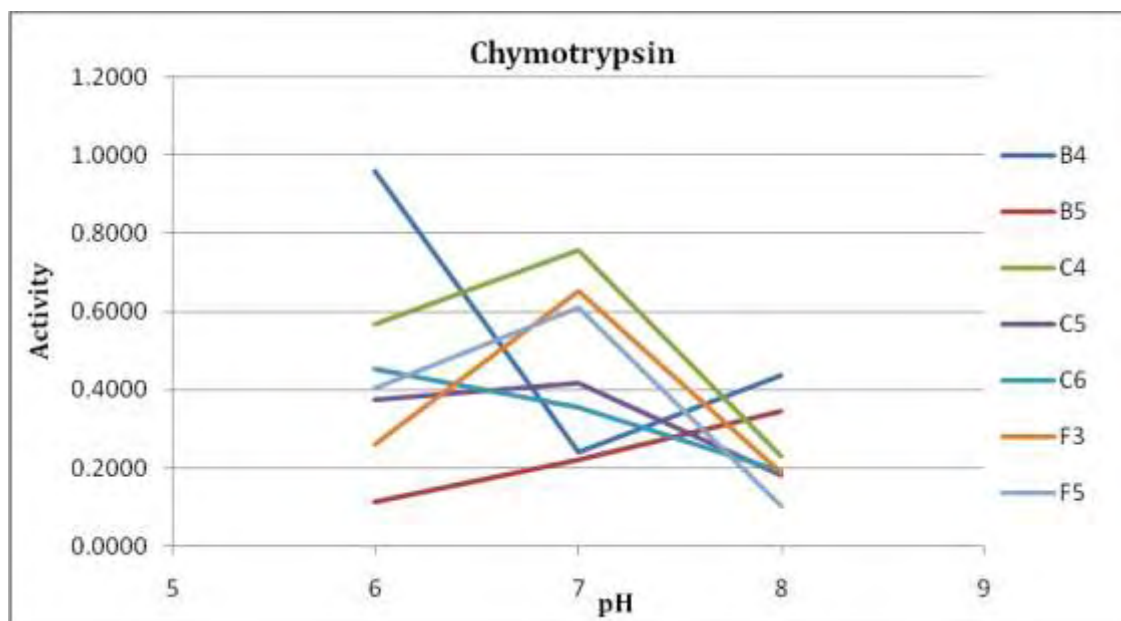
✚ Διαφοροποίηση των βακτηριακών στελεχών σύμφωνα με το ενζυμικό τους προφίλ και την απόκρισή τους στις αλλαγές του pH

○ Πρωτεάσες σερίνης

Αρχικά αυτό που παρατηρείται από τα διαγράμματα 1 και 2 είναι πως οι τιμές της ειδικής δραστηριότητας της θρυψίνης είναι χαμηλότερες από εκείνες της χυμοθρυψίνης. Αυτό σημαίνει πως τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη παράγουν είτε πιο δραστικά είτε περισσότερα ένζυμα χυμοθρυψίνης στις συγκεκριμένες τιμές του pH που αναπτύχθηκαν. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το ενζυμικό προφίλ των περισσότερων βακτηριακών στελεχών επιδεικνύει μεγαλύτερη δραστηριότητα σε pH=7 και μικρότερη σε pH=6 ή 8 με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα στελέχη F₅, C₅, C₆ και F₃ στη θρυψίνη και τα C₄, F₃ και F₅ στη χυμοθρυψίνη. Επιπρόσθετα το στέλεχος C₄ επιδεικνύει υψηλές τιμές και στο pH=6 και ειδικότερα στη θρυψίνη έχει διπλάσια τιμή από τα pH=7 και 8. Τέλος τα στελέχη B₄ και B₅ παρουσιάζουν χαμηλές τιμές δραστηριότητας σε όλες τις τιμές του pH στη θρυψίνη ενώ στη χυμοθρυψίνη το B₅ συνεχίζει να έχει χαμηλές τιμές με μια μικρή αύξηση στο pH=8 και το B₄ παρουσιάζει μεγάλη δραστηριότητα στο pH=6.



Διάγραμμα 1: Συγκριτικό διάγραμμα pH και ειδικής δραστηριότητας θρυψίνης στα επτά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ατόμων λαβρακιού. Η ειδική δραστηριότητα θρυψίνης εκφράζεται σε $\mu\text{mol p-nitroaniline που παρήχθηκε ανά mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$.



Διάγραμμα 2: Συγκριτικό διάγραμμα pH και ειδικής δραστηριότητας χυμοθρυψίνης στα επτά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ατόμων λαβρακιού. Η ειδική δραστηριότητα χυμοθρυψίνης εκφράζεται σε μολ τυροσίνης που παρήχθη ανά mg protein⁻¹ min⁻¹.

ο Καρβοξυπεπτιδάσες

Η ειδική δραστηριότητα των καρβοξυπεπτιδασών Α και Β στις τιμές pH=6, 7 και 8 σε όλα τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη είναι είτε μη ανιχνεύσιμη είτε ελάχιστη. Στην καρβοξυπεπτιδάση Β παρατηρείται μια μικρή τάση μεγαλύτερης ενζυμικής δραστηριότητας σε pH=7 στα βακτηριακά στελέχη C₄, F₃ και F₅.

Πίνακας 3: Συγκριτικός πίνακας pH και ειδικής δραστηριότητας **καρβοξυπεπτιδάσης Α** στα επτά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ατόμων λαβρακιού. Η ειδική δραστηριότητα καρβοξυπεπτιδάσης Α εκφράζεται σε units Hippuryl-L-Phe που παρήχθη ανά mg protein⁻¹min⁻¹.

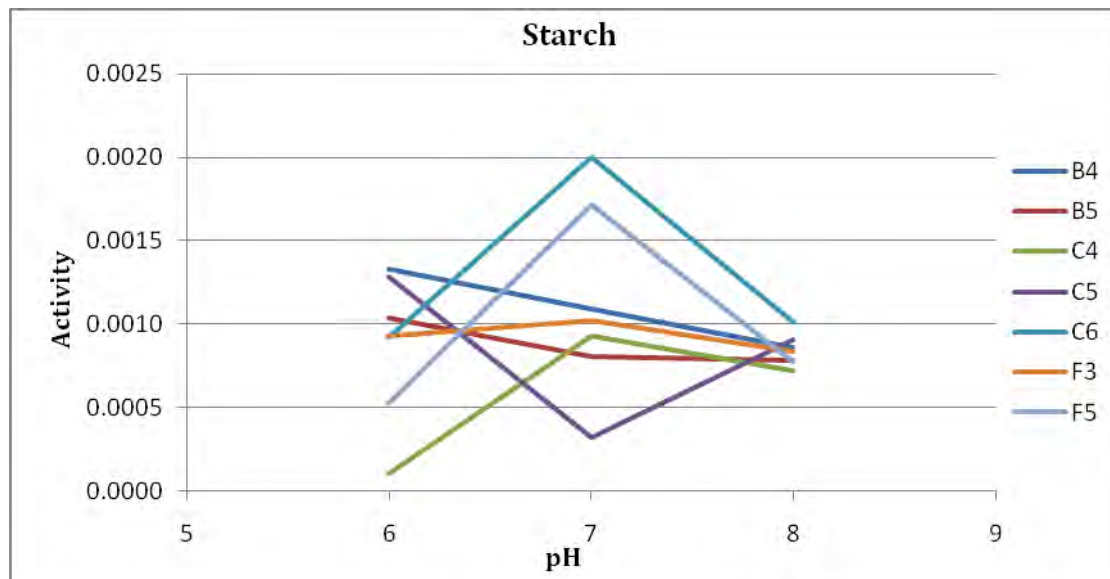
Βακτηριακό στέλεχος:	B ₄	B ₅	C ₄	C ₅	C ₆	F ₃	F ₅
pH=6	0	0	0	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
pH=7	0,0001	0	0,0001	0	0,0001	0	0,0001
pH=8	0,0001	0,0001	0,0001	0	0	0,0001	0

Πίνακας 4: Συγκριτικός πίνακας pH και ειδικής δραστηριότητας **καρβοξυπεπτιδάσης Β** στα επτά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ατόμων λαβρακιού. Η ειδική δραστηριότητα καρβοξυπεπτιδάσης Β εκφράζεται σε units Hippuryl-L-Arg που παρήχθηκε ανά mg protein⁻¹min⁻¹.

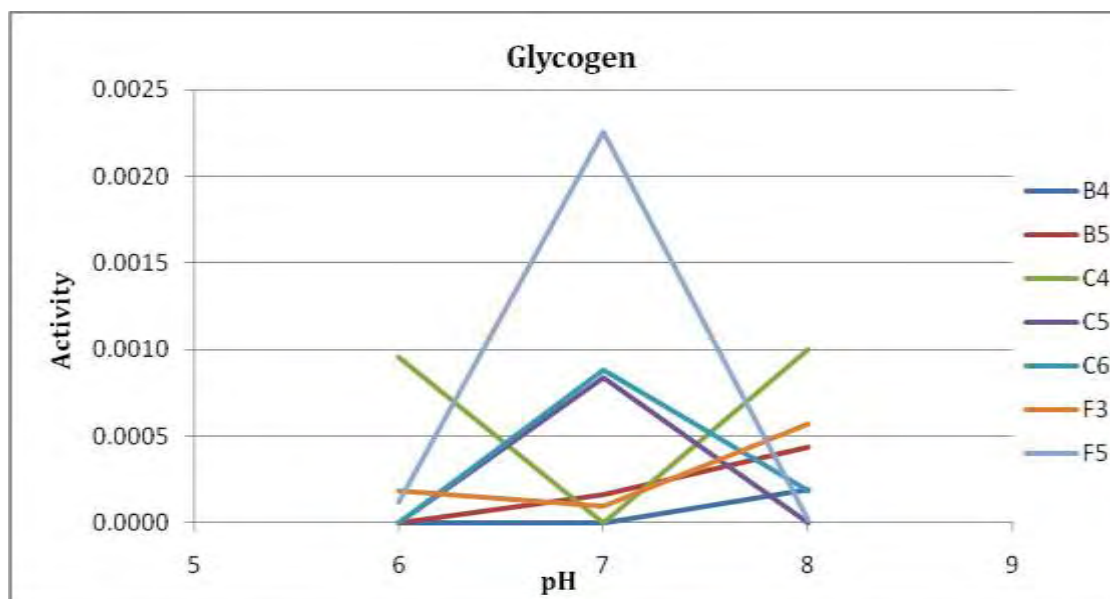
Βακτηριακό στέλεχος:	B ₄	B ₅	C ₄	C ₅	C ₆	F ₃	F ₅
pH=6	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0
pH=7	0,0001	0,0001	0,0002	0	0,0001	0,0002	0,0002
pH=8	0	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

ο Γλυκοσιδάσες

Στα διαγράμματα 3 και 4 παρουσιάζεται η ενζυμική δραστηριότητα των γλυκοσιδάσων που αποικοδομούν τους πολυσακχαρίτες άμυλο και γλυκογόνο και γενικά παρατηρείται πως στο άμυλο οι τιμές είναι ελαφρώς πιο υψηλές από εκείνες στο γλυκογόνο, άρα η δραστηριότητα της αμυλάσης είναι μεγαλύτερη από εκείνη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (κύρια ένζυμα που αποικοδομούν τα συγκεκριμένα υποστρώματα). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως και εδώ το ενζυμικό προφίλ των βακτηριακών στελεχών που υπερισχύει παρουσιάζει υψηλότερες τιμές ενζυμικής δραστηριότητας για pH=7 και χαμηλότερες στα pH=6 και 8 με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα C₆ και F₅ στο άμυλο και τα F₅,C₆ και C₅ στο γλυκογόνο. Επίσης παρατηρήται ότι τα B₄ και B₅ έχουν χαμηλές τιμές σε όλα τα pH στο γλυκογόνο με μια μικρή αύξηση του B₅ στο pH=8 και όλα τα βακτηριακά στελέχη παρουσιάζουν χαμηλές τιμές στο pH=6 με μια εξαίρεση του C₄. Επιπρόσθετα στο διάγραμμα του αμύλου παρατηρούνται σχεδόν οι ίδιες τιμές για όλα τα βακτηριακά στελέχη στο pH=8 ενώ η δραστηριότητα της αμυλάσης των F₃,B₄ και B₅ φαίνεται να μην επηρεάζεται πολύ από τις αλλαγές του pH.



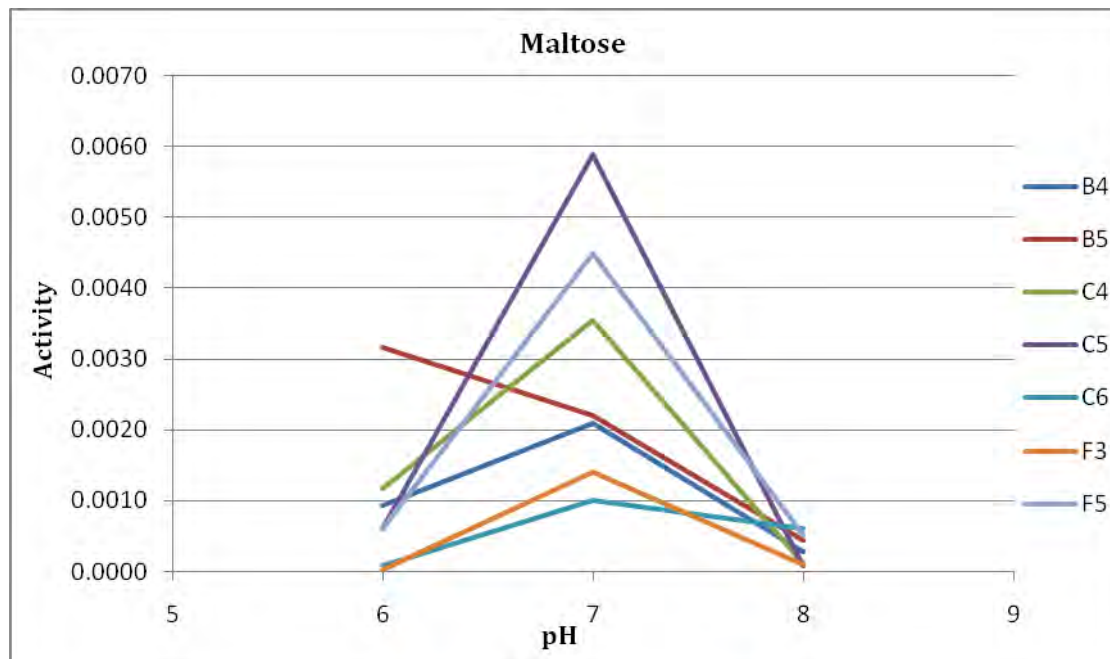
Διάγραμμα 3: Συγκριτικό διάγραμμα pH και δραστηριότητας γλυκοσιδασών που δρουν στο άμυλο στα επτά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ατόμων λαβρακιού. Η δραστηριότητα εκφράζεται σε units γλυκόζης που παρήχθηκε ανά mg protein⁻¹ min⁻¹.



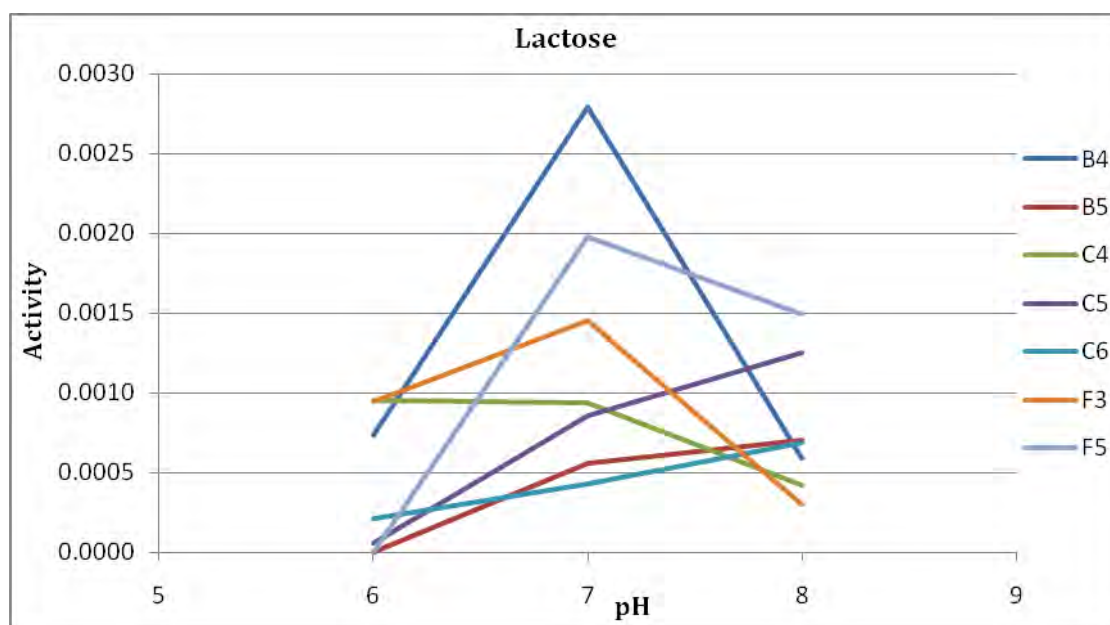
Διάγραμμα 4: Συγκριτικό διάγραμμα pH και δραστηριότητας γλυκοσιδασών που δρουν στο γλυκογόνο στα επτά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ατόμων λαβρακιού. Η δραστηριότητα εκφράζεται σε units γλυκόζης που παρήχθηκε ανά mg protein⁻¹ min⁻¹.

Στα διαγράμματα 5 και 6 φαίνεται καθαρά πως το ενζυμικό προφίλ της πλειοψηφίας των γλυκοσιδασών (μαλτάση και λακτάση) που αποικοδομούν τους δισακχαρίτες μαλτόζη και λακτόζη παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές δραστηριότητας σε pH=7 από ότι σε pH=6 και 8 με παραδείγματα όλα τα βακτηριακά στελέχη, εκτός του B5

που παρουσιάζει μεγαλύτερη τιμή σε pH=6, στη μαλτόζη και τα B₄,F₅ και F₃ στη λακτόζη. Επιπλέον σχετικά υψηλές τιμές δραστηριότητας εμφανίζουν τα στελέχη και σε pH=8 στη λακτόζη με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα F₅ και C₅ ενώ αντίθετα στη μαλτόζη οι δραστηριότητες σε pH=8 είναι πολύ χαμηλές σε όλα τα στελέχη.



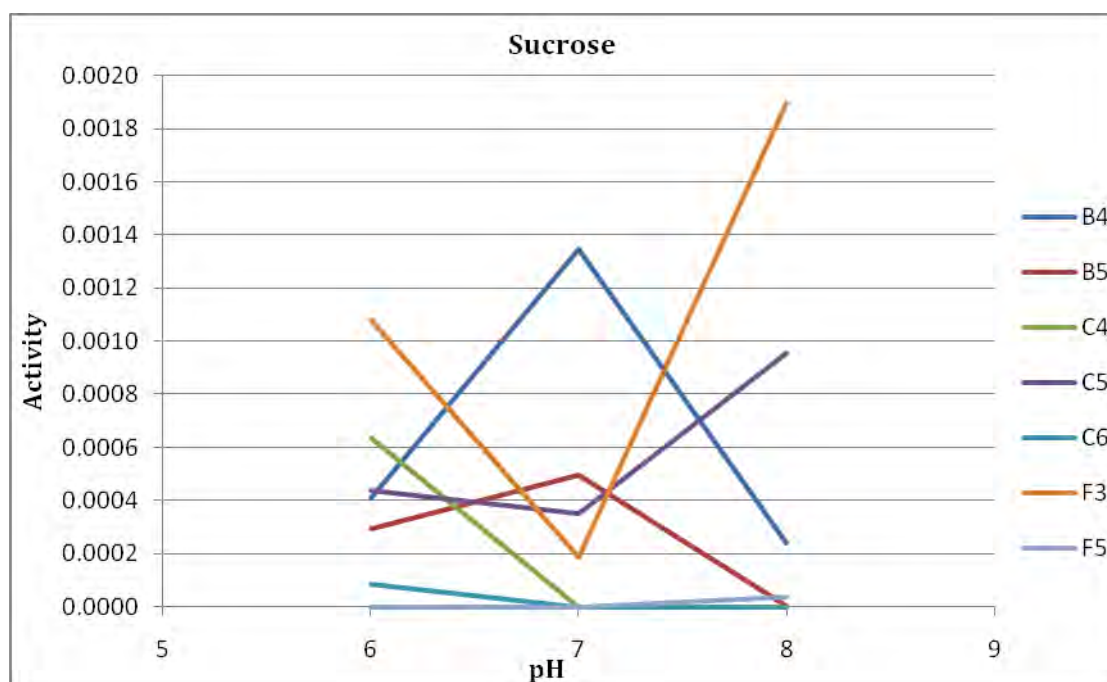
Διάγραμμα 5: Συγκριτικό διάγραμμα pH και δραστηριότητας μαλτάσης στα επτά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ατόμων λαβρακιού. Η δραστηριότητα εκφράζεται σε units γλυκόζης που παρήχθηκε ανά mg protein⁻¹ min⁻¹.



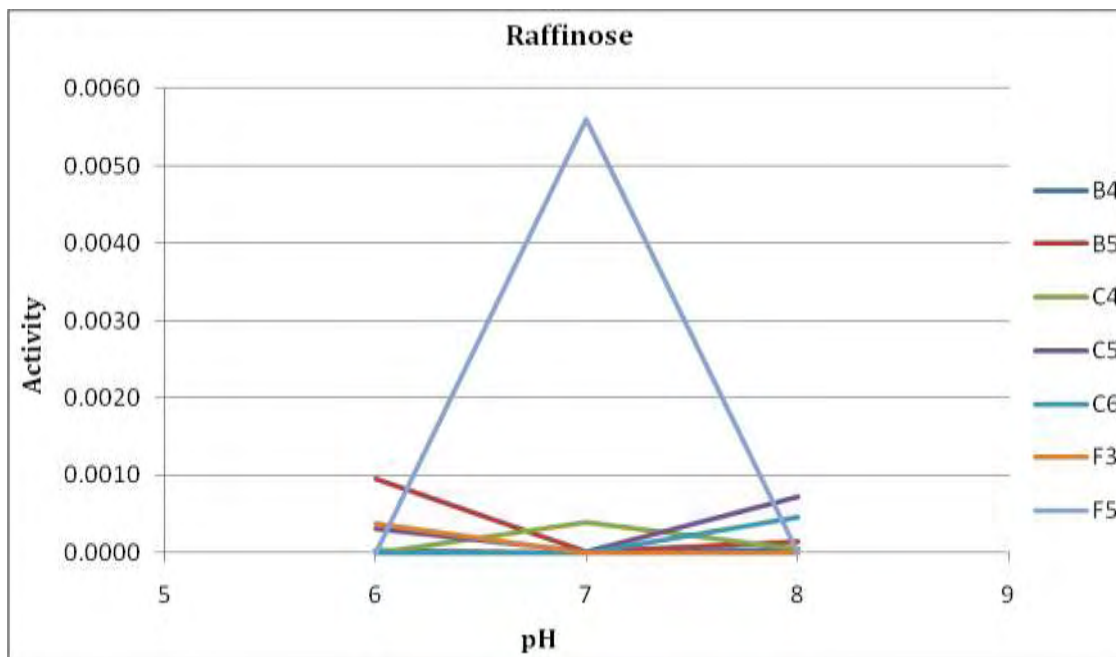
Διάγραμμα 6: Συγκριτικό διάγραμμα pH και δραστηριότητας λακτάσης στα επτά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ατόμων λαβρακιού. Η δραστηριότητα εκφράζεται σε units γλυκόζης που παρήχθηκε ανά mg protein⁻¹ min⁻¹.

Στα διαγράμματα 7 και 8 παρατηρείται η ενζυμική δραστηριότητα σε δύο συγγενικά υποστρώματα καθώς η ραφινόζη είναι ένας τρισακχαρίτης που αποτελείται από γαλακτόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη ενώ η σακχαρόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από φρουκτόζη και γλυκόζη. Στο σύνολό τους οι τιμές των ενζυμικών δραστηριοτήτων είναι σχετικά χαμηλές σε σχέση με εκείνες των παραπάνω υδατανθρακικών υποστρωμάτων και ιδιαίτερα αυτό φαίνεται στη ραφινόζη. Αυτό δείχνει ότι η δραστηριότητα της α -γαλακτοσιδάσης που διασπά τη γαλακτόζη από τον τρισακχαρίτη είναι χαμηλή. Ένα κοινό γνώρισμα σε όλων των τύπων τα βακτήρια που παρατηρήθηκε και σε μελέτη των Amoozegar & Malekzadeh (2002), ήταν η πολύ χαμηλή δράση στη σακχαρόζη που υποδηλώνει τη μειωμένη παραγωγή του ενζύμου σακχαράσης από τα στελέχη των βακτηρίων.

Επιπλέον παρουσιάζεται μια μικρή τάση των ενζυμικών δραστηριοτήτων στη ραφινόζη να αυξάνονται περισσότερο στα pH=6 ή 8. Εξάριση αποτελεί το στέλεχος F₅ που παρουσιάζει πολύ υψηλή τιμή σε pH=7 σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα. Επίσης πιο αυξημένη είναι η δραστηριότητα της σακχαράσης του στελέχους F₃ σε pH=8 και του στελέχους B₄ σε pH=7.



Διάγραμμα 7: Συγκριτικό διάγραμμα pH και δραστηριότητας σακχαράσης στα επτά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ατόμων λαβρακιού. Η δραστηριότητα εκφράζεται σε units γλυκόζης που παρήχθη ανά mg protein⁻¹ min⁻¹.



Διάγραμμα 8: Συγκριτικό διάγραμμα pH και δραστηριότητας γλυκοσιδάσων που δρουν στη ραφινόζη στα επτά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ατόμων λαβρακιού. Η δραστηριότητα εκφράζεται σε units γλυκόζης που παρήχθηκε ανά $\text{mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Τελικά αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι από όλα τα διαγράμματα που αφορούν τις πρωτεάσες σερίνης και τις γλυκοσιδάσες, το βακτηριακό στέλεχος F₅ παρουσιάζει σταθερά από τις πιο υψηλές ενζυμικές δραστηριότητες σε pH=7 με εξαίρεση μόνο στη σακχαρόζη. Αντίθετα, το βακτηριακό στέλεχος B₅ παρουσιάζει συνήθως από τις χαμηλότερες ενζυμικές δραστηριότητες στις περισσότερες τιμές του pH. Τέλος παρουσιάζεται μια μεγαλύτερη δραστηριότητα των μαλτασών σε σχέση με τις υπόλοιπες γλυκοσιδάσες.

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του pH στη δραστηριότητα των πεπτικών πρωτεασών και γλυκοσιδασών που παράχθηκαν από επτά βακτηριακά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου του λαβρακιού. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της δραστηριότητας των ενζύμων αυτών περιέχονται ή μπορούν να περιέχονται σε ιχθυοτροφές ιχθυοκαλλιιεργειών.

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 τη δράση των ενζύμων που προέρχονται από την μικροχλωρίδα του πεπτικού σωλήνα του λαβρακιού είναι ελάχιστες, ενώ δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για την επίδραση του pH στην παραγωγή και δραστηριότητα πρωτεασών και γλυκοσιδασών από την εντερική μικροχλωρίδα.

Αν και αρχικά η παραγωγή βακτηριακών ενζύμων στον πεπτικό σωλήνα είχε υποτιμηθεί, πρόσφατα πειραματικές μελέτες (Baigagi et al., 2002) απέδειξαν ότι τα βακτήρια του πεπτικού σωλήνα διαφόρων τύπων ψαριών, έχουν τη 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).

Προς το παρόν δεν έχει διεξαχθεί εκτεταμένη έρευνα στο ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), και τα μέχρι τώρα δεδομένα για το συγκεκριμένο είδος περιορίζονται κυρίως στα είδη των βακτηρίων που αποικίζουν τον πεπτικό τους σωλήνα (Κυρκούδης & συνεργάτες, 2000; Grisez et al., 1997; Frouel et al., 2008) και την σχετική αφθονία αυτών, χωρίς να γίνεται αναφορά στην ποικιλία των ενζύμων που παράγουν, την επίδραση που έχει το pH στη δραστηριότητα τους και τον τρόπο με τον οποίο ενδεχομένως να συμβάλλουν στην διαδικασία της πέψης και απορρόφησης.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμβαδίζουν με τα προαναφερθέντα δεδομένα, στα οποία ένα σημαντικό ποσοστό βακτηριακών στελεχών έδωσε θετικό αποτέλεσμα στην παραγωγή πρωτεασών και γλυκοσιδασών με διαφορετικές ωστόσο δραστηριότητες για κάθε ένζυμο σε κάθε στέλεχος βακτηρίου και για διαφορετικό pH.

Αν και το πάγκρεας των ψαριών εκκρίνει ένζυμα που σχετίζονται με την πέψη όπως αμυλάσες και πρωτεάσες (Μούτου,2000) δε θα ήταν υπερβολή να δηλώσουμε ότι τα εκκρινόμενα ένζυμα των βακτηρίων του εντερικού αυλού όχι μόνο δρουν συνεργικά με τα ενδογενής προέλευσης ένζυμα αλλά συνεισφέρουν σε πολύ μεγάλο ποσοστό στην πέψη των τροφών και στην περαιτέρω ανάπτυξη του οργανισμού ξενιστή. Το ενζυμικό προφίλ για την πλειοψηφία των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών παρουσιάζει αυξημένες τιμές της δραστηριότητας σε $pH=7$, όχι όμως και μηδαμινές τιμές για τα $pH=6$ και 8 που μελετήθηκαν. Παράλληλα υπήρξαν και κάποια στελέχη που παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα ενζύμων στα $pH=6$ ή 8 . Αυτό μας δείχνει ότι υπάρχει ένα εύρος τιμών που μπορεί να κυμανθεί το pH και ταυτόχρονα τα ένζυμα που παράγονται από τη μικροχλωρίδα του πρόσθιου εντέρου του λαβρακιού να έχουν ακόμα δραστηριότητα βοηθώντας έτσι στην πέψη των τροφών και στην περαιτέρω ανάπτυξη του ψαριού.

Η επιλογή των συγκεκριμένων τιμών του pH για την παρούσα μελέτη στηρίχτηκε στην έρευνα των Νικολοπούλου et al. (2010), όπου καταδείχθηκε ότι στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου του λαβρακιού (η περιοχή μεταξύ του πυλωρικού σφιγκτήρα και του πρώτου εντερικού βρόγχου) το pH κυμαίνεται σε τιμές μεταξύ του 6 και 8 την ώρα που διέρχεται ο πολτός της τροφής.

Στην παρούσα μελέτη υπάρχει ποικιλία βακτηριακών στελεχών που παράγουν ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνικών ενζύμων από πρωτεάσες, μαλτάσες, α και β γαλακτοσιδάσες, σακχαράσες και αμυλάσες παρέχοντας έτσι στον ξενιστή την δυνατότητα επιβίωσης και θρέψης με διαφορετικά είδη τροφών. Κάθε βακτηριακό στέλεχος όμως μπορεί να παράγει διαφορετικές ισομορφές του κάθε ενζύμου. Οι ισομορφές αυτές μπορούν να έχουν μικρές διαφορές στη δομή τους επηρεάζοντας μερικές φορές και το ενεργό κέντρο του ενζύμου άρα και τη δραστηριότητά του στα διάφορα υποστρώματα. Γι' αυτό το λόγο παρατηρήθηκαν διαφορετικά ενζυμικά προφίλ κατά τις αλλαγές του pH στα βακτηριακά στελέχη αλλά και παρόμοια, πολλές φορές, υποδεικνύοντας ότι η δομή των ισοενζύμων επηρεάστηκε με τον ίδιο τρόπο από την αλλαγή του pH ή απλά ήταν η ίδια ισομορφή. Κάποιες φορές τα ένζυμα επηρεάστηκαν σε μεγάλο βαθμό από την αλλαγή του pH και κάποιες φορές λίγο. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες πάνω στην αλλαγή της δομής των ενζύμων λόγω αλλαγών του pH , όχι όμως πάνω σε συγκεκριμένα ένζυμα που να έχουν απομονωθεί από την μικροχλωρίδα του λαβρακιού (Dixon M., Brennan R. and Matthews B., 1991, Mavridis et al., 1974, Valden and Tulinsky, 1973).

Το γεγονός ότι τα ένζυμα των βακτηριακών στελεχών έδειξαν χαμηλή δραστηριότητα καρβοξυπεπτιδασών μπορεί να οφείλεται στο ότι οι συγκεκριμένες τιμές του pH να μην ήταν ιδανικές για τα συγκεκριμένα ένζυμα. Έχει αναφερθεί (Wolff et al.,

1962) ότι το ιδανικό pH για την δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης B που έχει απομονωθεί από το πάγκρεας βοδιού είναι 9. Παράλληλα υπάρχει πιθανότητα τα βακτηριακά στελέχη να μην έκκριναν καρβοξυπεπτιδάσες σε ικανοποιητικό βαθμό.

Επιπρόσθετα, η μικρή απόκλιση που παρατηρήθηκε στο παραγόμενο ποσοστό γλυκόζης από το ίδιο βακτήριο στα συγγενικά υποστρώματα αμύλου και γλυκογόνου ίσως να 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 μπορέσουν να μετρηθούν με τη 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.

Πρέπει να επισημανθεί ότι η δραστικότητα των υπό μελέτη ενζύμων *in vitro* δε μπορεί να προσεγγίζει πλήρως τα ποσά της δραστικότητας 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 κάθε υπόστρωμα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζουν αξιοσημείωτο ενδιαφέρον, ιδιαίτερα για το πεδίο της εντατικής ιχθυοκαλλιέργειας. Τα βακτηριακά στελέχη-παραγωγοί πρωτεασών και γλυκοσιδασών μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους διατροφολόγους ψαριών ως προβιοτικά για την παρασκευή οικονομικά αποδοτικών ιχθυοτροφών, ιδιαίτερα για τα λαρβικά στάδια κατά τα οποία το πεπτικό σύστημα δεν είναι επαρκώς ανεπτυγμένο (Mondal et al., 2008). Με την προσθήκη των στελεχών αυτών, όπως το στέλεχος F₅ που δείχνει μεγάλη δραστικότητα πρωτεασών αλλά και γλυκοσιδασών σε κατάλληλο pH, στις εμπορικές ιχθυοτροφές θα είναι δυνατή η πιο αποτελεσματική αξιοποίηση της παρεχόμενης τροφής από τα ψάρια, επομένως και η καλύτερη και ταχύτερη ανάπτυξη τους.

Η χρήση των συγκεκριμένων βακτηριακών στελεχών θα μπορούσε να βρει εφαρμογή και σε πλήθος καλλιεργούμενων ψαριών εκτός του λαβρακιού λαμβάνοντας ωστόσο υπόψη τη 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 για να μη διαταραχθεί η μικροβιακή μικροχλωρίδα του πεπτικού σωλήνα, οι μικροοργανισμοί που θα χρησιμοποιηθούν δε 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 έτσι ώστε να μην οδηγήσουν στην ανοσολογική απόκριση από τον οργανισμό ξενιστή. Επιπρόσθετα θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και το pH που θα επικρατεί στον πεπτικό σωλήνα του ψαριού, για τη σωστή επιλογή των βακτηριακών στελεχών που θα χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικά.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι και η χρήση υδατανθράκων ως ιχθυοτροφή θα μπορούσε να αποτελεί μια οικονομική λύση σε ψάρια που χρησιμοποιούν ως προβιοτικά συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη αυξημένης έκκρισης γλυκοσιδασών. Απαιτείται ωστόσο πιο εντατική έρευνα για να κατανοηθούν πλήρως τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούνται από τους μικροοργανισμούς αυτούς και να επιβεβαιωθεί η ουσιαστική συμβολή τους στην διαδικασία της πέψης.

Βιβλιογραφία

- Alarcon F.J., Diaz M., Moyano F. J. Abellan E. (1998) characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish physiology and Biochemistry* 19, 257-267
- Bairagi A., Sarkar Ghosh K., Sen S.K. and Ray A.K. (2002). Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International* 10,109-121.
- Barrett A.J., (1995). Proteolytic enzymes aspartic and metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248:183
- Barrett A.J., (1994) proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 224:1-15
- Barnabe G., Balineau-Coatanea F., and Rene F.,(1976) Chronologie de la morphogenese chez le group ou bar *Dicentrarchus labrax*(L.)(Pisces, Serranidae) obtenu par reproduction artificielle. *Aquaculture* 8, 351-363.
- Bucking, C.,Wood, C.M., 2006b. Gastrointestinal processing of Na⁺, Cl⁻, and K⁺ during digestion: implications for homeostatic balance in freshwater rainbow trout. *Am. J. . Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R1764–1772.
- Buddington R.K., Kuz'mina V. (2000) Digestive system. In the laboratory fish (ed G.K.Ostrande). Academic Press, New York, pp. 379-384.
- Buddington, R.K., Diamond, J.M., 1987. Pyloric ceca of fish: a “new” absorptive organ. *Am. J. Physiol.* 252, G65–G72.
- Cataldi E., Cataudella S., Monaco G., Ross A., Tanciomi L. (1987) A study of the histology and morphology of the digestive tract of the sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of Fish Biology* 30,135-145
- De Marko A.C. and Dick A.J.(1978) Aminopeptidase I activities in several microorganisms. *Can J. Biochem.* 56:66-71
- Dimes L.E. and Haard N.F. (1994) Estimation of protein digestibility-I.Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*) *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 349-362.
- Diniz F.M. and Martin A.M. (1996) 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 and Technology* 31, 419-426.

- Melinda M. Dixon, Richard G. Brennan and Brian W. Matthews. Structure of γ -chymotrypsin in the range pH 2.0 to pH 10.5 suggests that γ -chymotrypsin is a covalent acyl-enzyme adduct at low pH. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1991, Vol. 13, April.
- Elbal, M.T., García Hernández, M.P., Lozano, M.T., Agulleiro, B., 2004. Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture* 234, 215–238.
- Eshel, A., Lindner, P., Smirnoff, P., Newton, S., Harpaz, S., 1993. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the European sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. *Comp. Biochem. Physiol. A* 106, 627–634.
- Eguchi M., (1995) Alkaline phosphatase isoenzymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B-151-162.
- FAO FISHERY STATISTICS, 2004.
- Folk, J. E. & Schirmer, E. W. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3884-3894
- Folk, J. E., Piez, K. A., Carroll, W. R. & Gladner, J. A. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2272-2277
- Fitzgerald P.M.D., Mckeever B.M., Van Middlesworth J.F., Springer J.P., Heimbach J.C., Chih-Tai Leu, Herber W.K., Dixon R.A.F. and Darke P.L (1990) Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type I protease and acetyl-pepstatin at 2.0 Å resolution. *J.Biol. Chem.*265:14209-14219.
- Frouel S., Le Bihan E., Serpentine A., Lebel J.M, Koueta N., Nicolas J.L. (2008). Preliminary study of the effects of commercial Lactobacilli preparations on digestive metabolism of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Mol. Microbial Biotechnol* 2008; 14:100-106.
- Garcia Hernandez, M.P., Lozano, M.T., Elbano, M.T., Agulleivo, B., 2001. Development of the digestive tract of sea bass. Light and electron microscopic studies. *Anat. Embryol.* 204, 39–57.
- Ghosh K., Sen S.K. and Ray A.K. (2002) Characterization of Bacilli isolated from the gut of rohu, *Labeo rohita* fingerlings and its significance in digestion. *Journal of Applied Aquaculture International* 10,109-121.
- Gildberg A., Mikkelsen H., Sandaker and Ringo E. (1997) Probiotic effect on lactic acid in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 352:279-285.
- Giffard-Mena, I., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Castille, R., 2006. Digestive tract ontogeny of *Dicentrarchus labrax*: Implication in osmoregulation. *Dev. Growth Differ.* 48, 139–151.

- Grisez L., Reyniers J., Verdonck L., Swings J., Omevier F. (1997) Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture* 155, 387-399.
- Grosell, M., O'Donnell, M.J., Wood, C.M., 2000. Hepatic versus gallbladder bile composition: in vivo transport physiology of the gallbladder in rainbow trout. *Am. J. Physiol.* 278, R1674–R1684.
- Gupta R., Gupta K., Saxena RK., Khan S (1999) Bleach-stable , alkaline protease from *Bacillus* species. *Biotechnol. Lett* 21:135-138.
- Hansen G.H., Strom E. and Olafson J.A. (1992) Effect of different holding regimes on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. *Applied and Environmental Microbiology* 58:461-470.
- Hampel, H., Cattrijsee, A., Elliott, M., 2005. Feeding habits of young predatory fish in marsh creeks situated along the salinity gradient of the Schelde estuary, Belgium and The Netherlands. *Helgol. Mar. Res.* 59, 151–162.
- Hartley B.S. (1960) Proteolytic enzymes. *Annu. Rev.Biochem.* 29:54-72.
- 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
- Jennings S. and Pawson M.G. (1992) The origin and recruitment of bass, *Dicentrarchus labrax* larvae to nursery areas. *J. Mar. Biol. ASSOC. UK.* 72,199-212.
- Jobling M. (1995) *Environmental Biology of fishes*, 175-178.
- Kalisz H.M. (1998) Microbial proteinases. *Adv Biochem Eng. Biotechnol* 36:1-65
- Kar N., Ghosh K. (2008) Enzyme producing bacteria in the gastrointestinal tracts of *Labeo rohita*(Hamilton) and *Channa punctatus* (Bloch). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic sciences* 8:115-120.
- Kato T., Yamagata Y., Arai T., Icishima E. (1992) Purification of a new extracellular 90-kDa serine proteinase with isolectric point of 39 from *Bacillus subtilis* and elucidation of its distinct mode of action. *Biosc. Biotech. Biochem* 56:1166-1168.
- Kumar C.G., Takagi H. (1999) Microbial alkaline proteases from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* 17:561-594.
- Kristiansen, H.R., Rankin, J.C., 2001. Discrimination between endogenous and exogenous water sources in juvenile rainbow trout fed extruded dry feed. *Aquat. Liv. Resour.* 14, 359–366.
- Κυρκούδης Ι., Αγγελίδης Π., Ηλιάδης Ν., Φώτης Γ. Διερεύνηση της μικροβιακής χλωρίδας σε τσιπούρες και λαβράκια ηλικίας έως 90 ημερών.

- Labbe J.P., Rebegrotte P. and Turpine M. (1974) Demonstrating extracellular leucine aminopeptidase(E.C 3.4.1.1) of *Aspergillus oryzae*(IP 410): leucine aminopeptidase 2 fraction. C.R. Acad. Sci. (Paris) 278D:2699
- Lesel R., Fromageot C. and Lesel M. (1986) Cellulose digestibility in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* and in goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture* 54:11-17
- Lindsay G.J.H. and Harris J.E. (1980) Carboxymethylcellulose activity in the digestive tracts of fish. *Journal of fish Biology* 16:219-233.
- Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr, and Rose J. Randall. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *J. Biol. Chem.* 1951, 193: 265-275.
- Lu A.Y.H., Junk K.W. and M.J.Coon (1969) Resolution of the cytochrome P-450 containing W-Hydroxylation system of liver microsomes into three components. *J. Biol. Chem* 244:3714-3721
- Mackie R.I. and Cann I.K.O. (2005) A review of gastrointestinal microbiology with special emphasis on molecular microbial ecology approaches. *Applications of Gene-based Technologies for Improving Animal Production and Health in Developing Countries*, 175-198.
- Mananos E.L., Zanuy and Carillo M. (1997) Photoperiodic manipulations of the reproductive system of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on Gonadal development and plasma 17 β -estradiol and vitellogenin levels. *Fish Physiol. Biochem.* 16:211-222
- Matusiewicz M., Dabrowski K. (1995) Characterization of ascorbylester hydrolysis in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110, 739-745.
- Mavridis A., Tulinsky A. and Liebmann M. N. *Biochemistry* 1974, 13, 3661
- Mazzon L., Pisedda A., Simonato M, Martinez -Sanudo L, Squartini A., Girolami V. (2008) Presence of symbiotic bacteria in flies of the subfamily Tephritinae and their phylogenetic relationships rproposal of *Candidatus Stammurula tephritidis* . *International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology*, 58:1 277-1287.
- Mondal S., Roy T., Sen S.K. (2008) Distribution of enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish. *Acta Ichthyol. Piscat.* 38(1):1-8.
- Moss D,W. (1992) Perspective in alkaline phosphatase research. *Clin.Chem.* 38, 2486-24-92.
- Munilla-Moran & 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.
- Μούτου Κ. (2000) Φυσιολογία θρέψης ιχθύων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις
 - D. Nikolopoulou, K.A. Moutou, E. Fountoulaki, B. Venou, S. Adamidou and M.N. Alexis (2010). Patterns of gastric evacuation, digesta characteristics and pH changes along the gastrointestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Volume 158, Issue 4, April 2011, Pages 406-414.
 - Nogi Y., Masui N. and Chiaki Kato (1998) *Photobacterium Profundum* species nov, a new moderately barophilic bacterial species isolated from a deep-sea sediment. *Extremophiles* 2:1-17.
 - Outtrup H., Boyce COL (1990) Microbial proteinases and biotechnology. In: Fogarty CT, Kelly K. (eds). *Microbial enzymes and biotechnology*. Elsevier London, pp 227-254
 - Opuszynski K., Shireman J.V. (1995) Digestive mechanisms in herbivorous fish culture and use for Weed Management. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 21-31
 - 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.
 - Picket G.D. and Pawson M.G. (1994) Sea bass: biology, exploitation and conservation. In *Fish and Fisheries Series*, Vol. 12 (ed T.J. Pitcher). Chapman and Hall, London, pp. 1-235
 - Phadarate S., Rao M. and Desphande V. (1997) A serine alkaline protease from the fungus *Conidiobolus coronatus* with a distinctly different structure than the serine protease subtilisin Carlsberg. *Arch. Microb.* 166:414-417.
 - Πανταρίδης Κ., Κλαουδάτος Σπ., Παναγιωτάκη Π., Νεοφύτου Χ. Αύξηση αντιστάθμισης στην εκτροφή τσιπούρας. 8^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας και Αλιείας .
 - Ringo E., Strom E. and Tabachek J.A. (1995) Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture research* 26:773-789.
 - Ringo E., Olsen R.F., Mayhew M.T., Myklebust R. (2003) Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture* 227, 395-415.
 - Rawlings N.D. and Barrett A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290:205-218.

- Ruohonen, K., Grove, D.J., McIlroy, J.T., 1997. The amount of food ingested in a single meal by rainbow trout offered chopped herring, dry and wet diets. *J. Fish Biol.* 51, 93–105.
- Rust, M.B., 2002. Nutritional Physiology, In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, 3rd ed. Academic Press, New York, NY, pp. 368–452.
- Saha A.K. and Ray A.K. (1998) Cellulase activity in rohu fingerlings. *Aquaculture International* 6, 281-291.
- Seidl V (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev* 22: 36-42.
- Shishova-Kasatochkina O.A. and Leutskaya Z.K. (1979) Biochemical aspects of Helminth-Host interactions
- Smith T.B., Wahl D.H., Mackie R.I. (1996) Volatile fatty acids and anaerobic fermentation piscivorous and omnivorous freshwater fish. *J. Fish Biol.* 48, 829-841.
- Somogyi, M. (1952). *J. Biol. Chem.*, 200, 245.
- Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Nielsen T., Appel K.F., Grom L. (1999) The microflora of rainbow trout intestine :a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 182,1-15.
- Spilker T., Coenye T., Vandamme P., Lipuma J.J (2004) PCR-based Assay for differentiation of *Pseudomonas Aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2074-2079.
- M. C. Srinivasan and Meenakshi V. Rele. Microbial xylanases for paper industry.
- Stavrik and Kornegay, (1995) Microbial probiotics for pigs and poultry. *Biotechnology in Animal feeds and Animal feeding*. Weinheim, New York, pp 205-231.
- Strom E. and Olafsen J.A.(1990) The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pan rearing. In: *Microbiology in Poikilotherms*, pp 181-185.
- Sugita H., Enomoto A., Deguchi Y. (1982) Intestinal microflora in the fry of *Tilapia mossambica*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. fish.* 48,875.
- Tada & Shusaku (Daiwakasei) (2006). Application of Bacterial Lactase on Processing of Milk Product. *Bio Ind.*
- Tengjaroenkul B., Smith B., Ceccedi T., Smith S. (2000) Distribution of intestinal enzyme activities along the tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 182, 317-327.

- Tovar -Ramirez D. , Zambonino-Infante J.L., Cahu C, Gatesoupe F.J., Vazquez-Juarez R. (2004) Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture* 234:415-427.
- Trust T.J. and Sparrow R.A.H. (1974) The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. *Canadian Journal of Microbiology* 20,1219-1228.
- Ugolev A.M. (1985) Evolution of digestion and principles of the evolution of functions. Leningrad:Nauka.
- Vandlen R. L. and Tulinsky, A. *Biochemistry* 1973, 12, 4193
- Villanueva J., Vanacore R., Goicoechea O., Amthauer R. (1997) Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*: regional distribution and membrane association. *J. Exp. Zool.* 279, 347-355.
- Watson R.R.(1976) Substrate specificities of aminopeptidases : a specific method for microbial differentiation. *Methods Microbiol.* 9:1-14.
- Weaver L.H., Kester W.R. and Mathews B.W. (1997) A crystallographic study of the complex of phosphoramidate with thermolysin. A model for the presumed catalytic transition state and for the binding of structures. *J. Mol. Biol.* 114:119-132.
- Windell, J.T., Norris, D.O., Kitchell, J.F., Norris, J.S., 1969. Digestive response of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to pellet diets. *J. Fisher. Res. Board Can.* 26, 1801–1812.
- Yamagata Y., Isshiki K., Ichishima E.(1995) Subtilisin Sendai from *Alkalophilus Bacillus* species: molecular and enzymatic properties of the enzyme and molecular cloning and characterization of the gene *aprS*. *Enzyme Shimogaki. Microb. Technol.* 17:653-663.
- www.fishbase.org
- Encyclopedia of aquaculture