



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Απομόνωση και ποσοτικοποίηση των ελεύθερων αμινοξέων στην  
πέστροφα *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792)



ΠΑΛΟΥΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΛΑΡΙΣΑ 2011

## Απομόνωση και ποσοτικοποίηση των ελεύθερων αμινοξέων στην πέστροφα *Oncorhynchus mykiss*

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, του Τμήματος  
Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος στο Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας.

### Υπεύθυνος Καθηγητής:

Μούτου Αικατερίνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Εξαδάκτυλος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Αποστολίδης Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής της Γεωπονικής σχολής του τμήματος Ζωικής παραγωγής, του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

### **Ευχαριστίες:**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την ομαλή και επιτυχή διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές κύριο Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, και κύρια Μούτου Κατερίνα, υπό την επίβλεψη των οποίων πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, όπως επίσης και τον κύριο Αποστολίδη Απόστολο, για όλη τη βοήθεια, την επιστημονική καθοδήγηση και την ηθική υποστήριξη που μου προσέφεραν. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Μαρτσικάλη Πέτρο, υποψήφιο διδάκτορα του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος για τη σημαντική συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων και για την υποστήριξή του. Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω όλους τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς, για την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1. ABSTRACT	5
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
2.1 Ιριδίζουσα Πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	6
2.2 Η καλλιέργεια της ιριδίζουσας πέστροφας και η οικονομική της σημασία	7
2.3 Αμινοξέα	8
2.3.1 Μικρά, ουδέτερα αμινοξέα: Γλυκίνη και Αλανίνη	9
2.3.2 Αμινοξέα με μεγάλες αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες: Βαλίνη, Λευκίνη και Ισολευκίνη	10
2.3.3 Αρωματικά αμινοξέα: Τρυπτοφάνη, Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη	10
2.3.4 Αμινοξέα με αλειφατικές υδροξυλικές ομάδες: Σερίνη και Θρεονίνη	10
2.3.5 Αμινοξέα με σουλφυδρικές ομάδες: Κυστεΐνη και Μεθειονίνη	10
2.3.6 Προλίνη	11
2.3.7 Αμινοξέα με όξινες πλευρικές αλυσίδες: Ασπαραγινικό και Γλουταμινικό οξύ	11
2.3.8 Αμίδια: Ασπαραγίνη και Γλουταμίνη	11
2.3.9 Αμινοξέα με βασικές πλευρικές αλυσίδες: Ιστιδίνη, Λυσίνη και Αργινίνη	11
2.4 Ρόλος αμινοξέων	11
2.4.1 Αλανίνη	15
2.4.2 Αργινίνη και Ορνιθίνη	15
2.4.3 Ασπαραγίνη και Ασπαρτικό οξύ	17
2.4.4 Γλουταμίνη και Γλουταμινικό οξύ	18
2.4.5 Γλυκίνη και Θρεονίνη	18
2.4.6 Ιστιδίνη	19
2.4.7 Ισολευκίνη και Λευκίνη	19
2.4.8 Λυσίνη	19
2.4.9 Φαινυλαλανίνη και Τυροσίνη	20
2.4.10 Τρυπτοφάνη	20
2.5 Μέθοδος HPLC	21
2.5.1 Ιστορική αναδρομή της μεθόδου HPLC	21
2.5.2 Αρχή της τεχνικής HPLC	21
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
3.1. Δειγματοληψία	23
3.2 Προετοιμασία	24
3.3 Αντιδραστήρια	25
3.4 Προετοιμασία κινητών φάσεων	25
3.5 Προετοιμασία OPA-thiol	26

3.6	Πρότυπα διαλύματα αμινοξέων	26
3.7	Εργαστηριακός εξοπλισμός	26
3.8	Ιχνηθέτηση	27
3.9	Μέθοδος	28
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37

## 1.Περίληψη

Τα φιλέτα ιχθύων παρουσιάζουν έντονο ενδιαφέρον για τον καταναλωτή. Κύρια συνιστώσα της οσμής και της γεύσης τους αποτελούν τα ελεύθερα αμινοξέα καθορίζοντας την ποιότητά τους. Η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται από φυσιολογικούς, περιβαλλοντικούς και διατροφικούς παράγοντες. Ο διαχωρισμός και η ποσοτική ανάλυση δεκαπέντε ελεύθερων αμινοξέων (ASP, GLU, ASN, HIS, GLN, GLY, ARG, THR, ALA, TYR, PHE, ILE, LEU, ORN, LYS) πραγματοποιήθηκε με την τεχνική OPA-RP-HPLC σε ενενήντα φιλέτα ιριδιζουσας πέστροφας, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792), προερχόμενα από έξι διαφορετικά ρέοντα συστήματα εντατικής εκτροφής αντιπροσωπευτικά της ελληνικής επικράτειας. Οι συγκεντρώσεις των περισσότερων ελεύθερων αμινοξέων εμφάνισαν σημαντικά διάφορα προφίλ (ANOVA,  $p < 0,05$ ) με εξαίρεση τη GLN, τη THR και την ALA οι οποίες εμπλέκονται στη σύνθεση του RNA και DNA, στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και στη γλυκονεογένεση και μεταφορά αζώτου, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα σε κάθε περίπτωση εμφάνισαν επαναληψιμότητα. Επιπρόσθετα, οι πληθυσμοί Νάουσας, Σερρών και Πλαστήρα ομαδοποιήθηκαν ως προς το προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων και διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τους υπόλοιπους Έδεσσας, Ιωαννίνων και Καλαμάτας (Διαχωριστική Ανάλυση). Το σύνολο των ελεύθερων αμινοξέων σε ένα πρωτόλειο στάδιο φαίνεται να απεικονίζει ένα διακριτό γεωγραφικό πρότυπο των εκτροφών της βορειοδυτικής και νότιας Ελλάδας, ένδειξη που διερευνάται και με τη χρήση μοριακών δεικτών (SNP's).

## 1.Abstract

Fish fillets are products of great interest for the consumer. Main contributors of their flavor and taste are the free amino acids determining significantly their quality. Free amino acid concentration depends on physiological, environmental and nutritional factors. The separation and quantitative analysis of fifteen free amino acids (ASP, GLU, ASN, HIS, GLN, GLY, ARG, THR, ALA, TYR, PHE, ILE, LEU, ORN, LYS) was conducted using the OPA-RP-HPLC technique in ninety rainbow trout fillets, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792). The fillets were derived from six different rivers throughout Greece, where intensive aquaculture conditions are practiced. Most of the free amino acid concentrations presented significantly different profiles (ANOVA,  $p < 0.05$ ), apart from GLN, THR and ALA, which participate in the RNA and DNA synthesis, brain development and glyconeogenesis and nitrogen transfer, respectively. Nevertheless, results illustrated remarkable reproducibility. Moreover, populations derived from Naoussa, Serres and Plastira were grouped as far as their free amino acid profiles differing significantly with populations derived from Edessa, Ioannina and Kalamata (Discriminant Analysis). Consequently, fish fillets' free amino acid profiles seem to be a decisive factor on differentiating inland aquaculture practices in northwestern and southern Hellas, a fact which is surveyed by novel molecular markers (SNP's).

## **2. Εισαγωγή**

### **2.1 Ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss***

Η ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792) ανήκει στην οικογένεια Salmonidae, η οποία περιλαμβάνει και άλλα είδη ιχθύων όπως το σολομό του Ατλαντικού (*Salmon salar*), καθώς και άλλα είδη πέστροφας, όπως η *Salvenillus*. Η ιριδίζουσα πέστροφα αποτελεί εδώ και δεκαετίες είδος κατεξοχήν εντατικά εκτρεφόμενο σε παγκόσμια κλίμακα χάρη κυρίως των υφισταμένων δυνατοτήτων ευχερούς διαχείρισης, της μεγάλης προσαρμογής της στην τεχνητή διατροφή, των ταχύτατων αναπτυξιακών ρυθμών που εμφανίζει και της ελκυστικότητας της ως τελικού προϊόντος που έχει αναμφισβήτητα σε σχέση με το σύγχρονο καταναλωτή. Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η ποιότητα του νερού είναι σημαντικοί για τη σωστή ανάπτυξη της ιριδίζουσας πέστροφας. Σε σύγκριση με τα λοιπά είδη εμφανίζει τις μεγαλύτερες, αλλά και αυστηρότερες απαιτήσεις αναφορικά με την ποσότητα και κυρίως με την ποιότητα του παρεχόμενου νερού εκτροφής. Το κατάλληλο εύρος θερμοκρασιών στο οποίο ευδοκimei είναι 14-15° C σε συνδυασμό με την υψηλή περιεκτικότητα του νερού σε οξυγόνο (Leitritz & Lewis 1980). Φυσικοχημικές παράμετροι νερού όπως η θερμοκρασία, το pH, η περιεκτικότητα σε οξυγόνο, αμμωνία, νιτρικά, νιτρώδη και διοξείδιο του άνθρακα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην καλή αποδοτική πορεία μιας εντατικής εκτροφής, όσο και στη βιωσιμότητα της μονάδας. Ο χρόνος εκτροφής της πέστροφας μέχρι το εμπορεύσιμο μέγεθος παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις, από 10-20 μήνες, με το μεγαλύτερο ποσοστό των μονάδων (>40%) να χρειάζεται 10,5-12 μήνες εκτροφής, ιδιαίτερα θετικό αν συγκριθεί με το χρόνο άλλων ευρωπαϊκών χωρών που συνήθως ξεπερνά τους 16 μήνες. Η εκτροφή της πέστροφας από πλευράς διατροφής, στηρίζεται στη χορήγηση αποκλειστικά και μόνο τεχνητής τροφής, ενώ μια σύγχρονη καλλιέργεια πέστροφας με επιχειρηματικό χαρακτήρα και διάσταση, χαρακτηρίζεται καταρχήν από την αυτάρκεια γόνου, την ύπαρξη κατάλληλης υποδομής για κάθε φάση εκτροφής, καθώς και την επιτακτική λήψη μέτρων αναφορικά με τη συμμόρφωσή της σε συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς όρους λειτουργίας (Σαββίδης 2002).

## 2.2 Η καλλιέργεια της ιριδιζουσας πέστροφας και η οικονομική της σημασία στην Ευρώπη και στην Ελλάδα.

Η Ισπανία, η Δανία, η Γερμανία, η Γαλλία και η Ιταλία αποτελούν τις χώρες της Ευρώπης με την υψηλότερη παραγωγή της εκτρεφόμενης ιριδιζουσας πέστροφας. Έχει καταγραφεί αύξηση της ζήτησης για μεγαλύτερου μεγέθους πέστροφες, οι οποίες ενδείκνυνται για την παραγωγή φιλέτων που παρουσιάζουν έντονο οικονομικό ενδιαφέρον. Από το 1995 η εκτροφή της ιριδιζουσας πέστροφας στις ευρωπαϊκές χώρες έχει αρχίσει να εμφανίζει αυξητικές μεταβολές χάριν στην προσιτή τιμή της και στην επαρκή ποσότητα της που είναι διαθέσιμη στον καταναλωτή. Ειδικότερα, στην ευρωπαϊκή αγορά η τιμή λιανικής πώλησης του φιλέτου πέστροφας ήταν 6,50 Ευρώ (FAO, 2010). Στην Ελλάδα, η εκτροφή της πέστροφας αποτελεί το 81% της συνολικής παραγωγής εκτρεφόμενων ιχθύων γλυκού νερού και ανέρχεται στους 2588 τόνους ετησίως, αξίας 10 εκατομμυρίων Ευρώ (FEAP Production Report 2010). Οι ιδιαίτερες κλιματολογικές συνθήκες, η γεωμορφολογία, η ποικιλία των "πηγών υδροδότησης" ρεόντων συστημάτων (ποτάμια, λίμνες, θάλασσα κ.λπ.), η οικονομική ενίσχυση από διάφορους φορείς και η γρήγορη και επιτυχημένη σε πολλές περιπτώσεις εισαγωγή τεχνολογίας και τεχνογνωσίας, συνέβαλαν στην ανάπτυξη των ελληνικών υδατοκαλλιεργειών. Χρονολογικά, η Ελλάδα έκανε τα πρώτα βήματα στην παραγωγή ιριδιζουσας πέστροφας με την ίδρυση του πρώτου Κρατικού Ιχθυογεννητικού Σταθμού στις πηγές του ποταμού Λούρου (30 χλμ νότια της πόλης των Ιωαννίνων). Σήμερα στην Ελλάδα λειτουργούν περίπου 100 μονάδες εκτροφής πέστροφας διαφορετικής δυναμικότητας και με ιδιαίτερη ανισομέρεια ως προς τη γεωγραφική τους κατανομή. Οι περισσότερες από τις μονάδες βρίσκονται εγκατεστημένες στην περιοχή της Ηπείρου εκμεταλλεζόμενες κυρίως τα νερά ποταμών όπως ο Λούρος και ο Αώος. Συγκεκριμένα, στην Ήπειρο λειτουργούν 57 μονάδες εντατικής εκτροφής πέστροφας, δηλαδή το 53% των μονάδων που λειτουργούν στην Ελλάδα και παράγουν περισσότερο από το 80% της συνολικής παραγωγής της χώρας, τάση που εντάθηκε περαιτέρω το έτος 1998 και κατά πιθανότητα και το 1999. Στη Μακεδονία εντοπίζονται μονάδες στους νομούς Σερρών, Δράμας, Πέλλας, Καβάλας, Καστοριάς και Ημαθίας. Οι υπόλοιπες μονάδες είναι διασκορπισμένες στο σύνολο της λοιπής επικράτειας κυρίως στη Στερεά Ελλάδα και την Πελοπόννησο (Σαββίδης 2002).



Εικόνα 1: Ευρωπαϊκή παραγωγή ιχθυοκαλλιέργειας (FEAP 2008)

### 2.3 Αμινοξέα

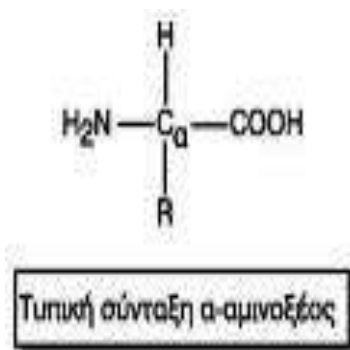
Κύρια συνιστώσα της οσμής και της γεύσης των φιλέτων των ιχθύων αποτελούν τα ελεύθερα αμινοξέα καθορίζοντας σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα και την αποδοχή τους ως τελικού προϊόντος από τον καταναλωτή. Οι πρωτεΐνες αποτελούν απαραίτητο συστατικό της διατροφής των ιχθύων, και παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, στην αναπαραγωγή και στην επιβίωση τους (Van de Poll *et al.*, 2005). Στο σώμα των ιχθύων οι πρωτεΐνες αποτελούν το δομικό συστατικό των ιστών και κατέχουν σημαντικό λειτουργικό ρόλο ως ένζυμα και μεταφορείς. Ανεπαρκή ποσότητα πρωτεϊνών στη διατροφή έχει ως αποτέλεσμα μείωση ή και παύση στο ρυθμό αύξησης καθώς και ανικανότητα των λιγότερο ζωτικών ιστών να διατηρήσουν τη λειτουργία σημαντικά ζωτικών ιστών (Furst & Young 2000). Τα αμινοξέα αποτελούν το δομικό λίθο των πρωτεϊνών και καθορίζουν τις ιδιότητές τους. Ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, στα απαραίτητα και στα μη απαραίτητα αμινοξέα (Bender 1985). Τα 10 απαραίτητα αμινοξέα αποτελούν η αργινίνη, η ιστιδίνη, η ισολευκίνη, η λευκίνη, η λυσίνη, η μεθειονίνη, η φαινυλαλανίνη, η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη και η βαλίνη (Barrows and Hardy 2001). Τα αμινοξέα αυτά δεν μπορούν να συντεθούν από τον ίδιο τον οργανισμό, επομένως πρέπει να προσλαμβάνονται από την τροφή. Τα αμινοξέα κυστεΐνη, προλίνη, ορνιθίνη, αλανίνη, τυροσίνη, θρεονίνη, γλυκίνη, σερίνη, γλουταμίνη, το γλουταμινικό οξύ, το ασπαρτικό οξύ και η ασπαραγίνη ονομάζονται μη απαραίτητα καθώς μπορούν να συντεθούν από τον ίδιο τον οργανισμό. Ο μεταβολισμός και η απαίτηση σε απαραίτητα αμινοξέα μπορεί να ποικίλει ανάμεσα στα ζώα, συμπεριλαμβανομένου και των ιχθύων (D'Mello, 2003). Επομένως η απαίτηση σε πρωτεΐνες έχει δύο συνιστώσες: (i) οι ιχθύες χρειάζονται τα απαραίτητα αμινοξέα καθώς δεν μπορούν να συντεθούν από τον οργανισμό, ή επειδή η σύνθεσή τους είναι μια αργή διαδικασία, (ii) και οι πρωτεΐνες χρειάζονται για να



προμηθεύουν τον οργανισμό με αμινοξέα που ονομάζονται μη απαραίτητα ή να παρέχουν αζωτούχες αμίνες για τη σύνθεση των μη απαραίτητων αμινοξέων.

### Δομή και ταξινόμηση των αμινοξέων

Τα αμινοξέα είναι μικρά οργανικά μόρια, των οποίων η σημαντικότητα οφείλεται στο γεγονός ότι αποτελούν τα μονομερή εκ των οποίων συντίθενται οι πρωτεΐνες. Η δομή και η λειτουργία των πρωτεϊνών εξαρτώνται από την αλληλουχία, στην οποία τα αμινοξέα συμμετέχουν, καθώς το κάθε αμινοξύ έχει συγκεκριμένες φυσικές και χημικές ιδιότητες ( Emery 2005). Ο γενικός τύπος των αμινοξέων απεικονίζεται στην **Εικόνα 2**. Το κεντρικό άτομο άνθρακα σε αυτή τη δομή ονομάζεται α-άνθρακα, οι αμινοομάδες και οι καρβοξυλομάδες που ενώνονται με αυτό το άτομο άνθρακα ονομάζονται α- αμινοομάδες και α- καρβοξυλοομάδες. Η R ομάδα των 20 αμινοξέων τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν στις πρωτεΐνες, απεικονίζεται στον **Πίνακα 1**. Αυτές οι R ομάδες είναι εκείνες που προσδίδουν στο κάθε αμινοξύ τις ξεχωριστές χημικές και φυσικές ιδιότητες. (Stryer 1995). Τα αμινοξέα με βάση τις χημικές τους ιδιότητες ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες.



**Εικόνα 1:** Γενικός τύπος α αμινοξέος.

#### 2.3.1 Μικρά, ουδέτερα αμινοξέα :Γλυκίνη και Αλανίνη:

Μια μικρή πλευρική αλυσίδα, ένα άτομο υδρογόνου και μια μεθυλική ομάδα, έχουν μικρή επίδραση στο σχηματισμό της πεπτιδικής αλυσίδας. Τα αμινοξέα αυτά, δρουν σαν ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού. Η γλυκίνη αποτελεί πρόδρομο μόριο των πουρινών και των πυριμιδινών και επιπρόσθετα, έχει ρόλο νευροδιαβιβαστή και συζευκτικής ουσίας, η οποία βοηθά στην απέκκριση των ξενοβιοτικών ουσιών, με το να είναι περισσότερο διαλυτές στο νερό. Η αλανίνη

αποτελεί προϊόν τρανσαμίνωσης του πυροσταφυλικού οξέος, συμμετέχει στο μεταβολισμό των υδρογονανθράκων, και επίσης σημαντική είναι η δράση του και ως κύριο πρόδρομο μόριο στη γλυκονογένεση (Damodaran 1996).

### 2.3.2 Αμινοξέα με μεγάλες αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες υδατανθράκων: Βαλίνη, Λευκίνη και Ισολευκίνη

Αυτά τα αμινοξέα έχουν μεγάλες, μη πολικές πλευρικές αλυσίδες και για αυτό κυρίως βρίσκονται μέσα στον υδρόφοβο πυρήνα των πρωτεϊνών. Τα αμινοξέα αυτής της κατηγορίας μεταβολίζονται αρχικά στον μυϊκό και λιπώδη ιστό και όχι τόσο στο ήπαρ όπου μεταβολίζονται τα υπόλοιπα αμινοξέα (Stryer 1995).

### 2.3.3 Αρωματικά αμινοξέα: Τρυπτοφάνη, Τυροσίνη και Φαινυλαλανίνη

Τα αμινοξέα αυτής της κατηγορίας έχουν επίσης μεγάλες μη πολικές αλυσίδες και αλληλεπιδρούν με άλλα υδρόφοβα μόρια. Η φαινυλαλανίνη περιέχει ένα φαινολικό δακτύλιο συνδεδεμένο στη θέση ενός από τα υδρογόνα της αλανίνης. Ο αρωματικός δακτύλιος της τυροσίνης περιέχει υδροξύλιο. Η τρυπτοφάνη έχει έναν ινδολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μια μεθυλική ομάδα.

### 2.3.4 Αμινοξέα με αλειφατικές υδροξυλικές ομάδες: Σερίνη και Θρεονίνη

Τα αμινοξέα αυτά είναι πολικά, ασθενή οξέα και αφόρτιστα σε ουδέτερο pH. Μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου και έτσι είναι αρκετά διαλυτά. Μόνο ο η L- θρεονίνη απαντάται στις πρωτεΐνες. Η σερίνη βρίσκεται στο ενεργό κέντρο των ενζύμων και αποτελεί τη θέση δέσμευσης των υδρογονανθράκων στις γλυκοπρωτεΐνες, και για στις φωσφορικές ομάδες για τις φωσφοπρωτεΐνες. Η θρεονίνη, όπως και η ισολευκίνη, περιέχει συμπληρωματικά ασύμμετρα κέντρα και οι υδροξυλικές τους ομάδες έχουν ως αποτέλεσμα να είναι πολύ πιο υδρόφιλα εύκολα στο να αντιδρούν σε σύγκριση με άλλα αμινοξέα.

### 2.3.5 Αμινοξέα με σουλφυδρυλικές ομάδες: Κυστεΐνη και Μεθειονίνη.

Η κυστεΐνη είναι δομικός όμοια με τη σερίνη αλλά περιέχει μια σουλφυδρυλική ή θειολική ομάδα στη θέση της υδροξυλομάδας. Η υδροξυλική ομάδα είναι πιο δραστική. Τα ζεύγη των σουλφυδρυλικών ομάδων μπορούν να ενωθούν για να δώσουν δισουλφιδικούς δεσμούς, που είναι ιδιαίτερα σημαντικοί στη σταθεροποίηση μερικών πρωτεϊνών. Η μεθειονίνη έχει μια πλευρική αλυσίδα και περιλαμβάνει ένα θειοαιθέρα.

### 2.3.6: Προλίνη

Η προλίνη διαφέρει από τα υπόλοιπα αμινοξέα καθώς η πλευρική της αλυσίδα συνδέεται και με το άτομο αζώτου και με το άτομο του α-άνθρακα. Η προλίνη μπορεί να επηρεάσει ιδιαίτερα την πρωτεϊνική αρχιτεκτονική διότι ο δακτύλιος της δομής της την κάνει πιο άκαμπτη από ότι τα άλλα αμινοξέα.

### 2.3.7 Αμινοξέα με όξινες πλευρικές αλυσίδες: Ασπαραγινικό και Γλουταμινικό οξύ.

Οι αλυσίδες αυτών των αμινοξέων είναι τις πιο πολλές φορές αρνητικά φορτισμένες σε φυσιολογικό pH. Σε μερικές πρωτεΐνες, αυτές οι πλευρικές αλυσίδες δέχονται πρωτόνια, και αυτή η ικανότητά τους είναι ιδιαίτερα σημαντική από λειτουργική άποψη.

### 2.3.8 Αμίδια: Ασπαραγίνη και Γλουταμίνη

Είναι ισχυρά πολικά μόρια τα οποία εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια των πρωτεϊνών, όπου μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με το νερό ή με άλλα πολικά μόρια. Η μετατροπή του γλουταμινικού οξέος σε γλουταμίνη είναι ιδιαίτερα σημαντική στη διαθεσιμότητα της αμμωνίας και στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ οξέων και βάσεων.

### 2.3.9 Βασικές πλευρικές αλυσίδες: Ιστιδίνη, Λυσίνη και Αργινίνη

Η λυσίνη και η αργινίνη έχουν μακριές πλευρικές αλυσίδες που τελειώνουν με ομάδες θετικά φορτισμένες σε ουδέτερο pH. Η λυσίνη τελειώνει σε αμινική ομάδα και η αργινίνη σε ομάδα γουανιδίνης. Η ιστοδίνη περιέχει μια ομάδα ιμιδαζολίου, έναν αρωματικό δακτύλιο που μπορεί να φορτιστεί.

## 2.4 Ρόλος των αμινοξέων

Τα αμινοξέα εκτός από τον πολύ σημαντικό τους ρόλο ως δομικά συστατικά των πρωτεϊνών, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες ζωτικές λειτουργίες των οργανισμών. Μπορούν να λειτουργήσουν ως νευροδιαβιβαστές, ως πρόδρομα μόρια νευροδιαβιβαστών και άλλων σημαντικών μεταβολιτών συμπεριλαμβανομένων ολιγοπεπτιδίων και πολυπεπτιδίων, σαν διεγέρτες για την απελευθέρωση των ορμονών καθώς και στη μεταφορά και απέκκριση του αζώτου στο εσωτερικό των οργάνων ( van de Poll 2005). Ακόμη έχει προταθεί σε

προηγούμενες μελέτες ότι η συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων στους ιστούς των ζώων μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για τον υπολογισμό της απαίτησης σε αμινοξέα σε πολλούς οργανισμούς( Pion 1976). Επίσης, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα ελεύθερα αμινοξέα στην αλλοίωση των ψαριών, καθώς οι καταστροφικές αλλαγές στους ιχθύες ενδείκνυται από την παραγωγή βιογενών αμινών (Jay 1992, Beljaars and others 1998).

Η διαθεσιμότητα των αμινοξέων καθορίζεται από το ρυθμό με τον οποίο απελευθερώνονται στο πλάσμα ή σε άλλα μέρη του οργανισμού όπου λαμβάνουν χώρα συγκεκριμένες αντιδράσεις, καθώς και από την απουσία τους από τον οργανισμό, είτε λόγω της απέκκριση τους, είτε λόγω της συμμετοχής τους στη σύνθεση των πρωτεϊνών, ή στην μετατροπή τους σε άλλα αμινοξέα. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι υπάρχει αλληλεξάρτηση ανάμεσα στην ανάγκη για ορισμένα αμινοξέα και στη σύνθεση των αμινοξέων στους ιχθύες ((Mambrini & Kaushik, 1995; Wilson & Poe, 1985; Tacon & Cowey, 1985; Ngamsnae et al., 1999). Το προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων καθορίζεται από το προφίλ των πρωτεϊνών σε όλο τον οργανισμό και αλλαγές στη συγκέντρωση στο προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων έχει αμελητέα επίδραση (Mente 2003). Παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά τη συγκέντρωση των αμινοξέων είναι η επαγωγή των ενζύμων και η διέγερση ή ο φραγμός μερικών μεταφορέων αμινοξέων που επηρεάζουν την ανταλλαγή και τη κατανομή αμινοξέων ανάμεσα σε διαφορετικά διαμερίσματα του οργανισμού. Η ρύθμιση της συγκέντρωσης συγκεκριμένων αμινοξέων στο πλάσμα και στους ιστούς, μπορεί να αποδίδεται στο γεγονός ότι η απελευθέρωση των αμινοξέων από ένα όργανο, για παράδειγμα από τον μυ και η επαναπρόσληψη του ίδιου αμινοξέος από ένα άλλο όργανο, για παράδειγμα από το ήπαρ, υπόκεινται στη ρύθμιση πολλαπλών ορμονικών. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά τα ενδιάμεσα προϊόντα κάθε αμινοξέος και ο ρόλος τους.

**Πίνακας 1:** Απεικόνιση των αμινοξέων, των προϊόντων τους και ο ρόλος τους

ΑΜΙΝΟΞΕΑ	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
1) Αλανίνη	Πυροσταφυλικό οξύ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Γλυκονεογένεση</li> <li>• Μεταφορά αζώτου</li> </ul>
2) Αργινίνη	Νιτρικό οξύ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αγγειοδιαστολή</li> <li>• Ρύθμιση ανοσοποιητικού</li> <li>• Νευροδιαβίβαση</li> </ul>
	Ουρία	<ul style="list-style-type: none"> <li>• αμμωνία αποτοξίνωση</li> </ul>
	Κρεατίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• συστατικό των μυών</li> </ul>

	Αγματίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• κυτταρικό σήμα</li> <li>• πρόδρομο μόριο ορνιθίνης</li> </ul>
3) Κιτροουλίνη	Παραγωγή αργινίνης	
4) Ορνιθίνη	πολυαμίνες	<ul style="list-style-type: none"> <li>• διαφοροποίηση κυττάρου</li> <li>• πρόδρομο μόριο προλίνης</li> </ul>
5) Προλίνη	υδροξυπρολίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA ηπατοκυττάρων</li> <li>• πρωτεϊνοσύνθεση</li> <li>• σύνθεση κολλαγόνου</li> </ul>
6) Ασπαραγίνη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• πρόδρομο μόριο ασπαρατικού οξέος</li> </ul>
7) Ασπαρατικό οξύ	οξαλοξικό, φουμαρικό	<ul style="list-style-type: none"> <li>• γλυκονεογένεση</li> </ul>
8) Μεθειονίνη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• πρόδρομο μόριο κυστεΐνης</li> </ul>
9) Κυστεΐνη	γλουταθειόνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• αντιοξειδωτικό</li> </ul>
	Ταυρίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• σύζευξη χολικού οξέος</li> <li>• ανάπτυξη νευρικών κυττάρων</li> <li>• ρύθμιση του δυναμικού της μεμβράνης</li> <li>• μεταφορά ασβεστίου</li> <li>• αντιοξειδωτικό</li> </ul>
10) Γλουταμινικό οξύ	γλουταμίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• αποβολή αμμωνίας</li> </ul>
	α- κετογλουταρικό	<ul style="list-style-type: none"> <li>• γλυκονεογένεση</li> </ul>
	γλουταθειόνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• αντιοξειδωτικό</li> </ul>
	γ- αμινοβουτυρικό οξύ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• αναστολέας CNS</li> <li>• διεγέρτης CNS (NMDA υποδοχέα)</li> </ul>
11) Γλουταμίνη	Αμμωνία	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ενδομεταφορά νιτρικών</li> <li>• παραγωγή HCO<sub>3</sub> στα νεφρά</li> </ul>
	Πουρίνες, πυριμιδίνες	<ul style="list-style-type: none"> <li>• σύνθεση RNA και DNA</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• πρόδρομο μόριο γλουταμινικού οξέος</li> </ul>
12) Γλυκίνη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• αναστολέας CNS (υποδοχέας γλυκίνης)</li> <li>• διέγερση CNS(NMDA υποδοχέας)</li> </ul>
	γλουταθειόνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• αντιοξειδωτικό</li> </ul>
	Κρεατινίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• συστατικό των μυών</li> </ul>
13) Σερίνη	D-σερίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• διέγερση CNS(NMDA υποδοχέας)</li> <li>• πρόδρομο μόριο γλυκίνης</li> <li>• πρόδρομο μόριο κυστεΐνης</li> </ul>
14) Θρεονίνη	Γλυκίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ανάπτυξη του εγκεφάλου</li> </ul>
	Σερίνη	
15) Ιστιδίνη	Ισταμίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ρύθμιση ανοσοποιητικού</li> <li>• απέκκριση γαστρικού οξέος</li> </ul>
16) Λυσίνη	Καρνιτίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• αποικοδόμηση των μακρών αλυσίδων των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια</li> </ul>
	Γλουταμινικό οξύ	
17) Ισολευκίνη	Κετο-μεθυλοβουλενικό οξύ	
18) Λευκίνη	_ -ketoisocaproic acid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ρύθμιση ενέργειας και μεταβολισμού των πρωτεϊνών</li> <li>• υπόστρωμα για τη σύνθεση της γλουταμίνης</li> </ul>
19) Βαλίνη	_ -ketoisovaleric acid	
20) Φαινυλαλανίνη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• πρόδρομο μόριο τυροσίνης</li> </ul>
21) Τυροσίνη	L-Dopa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• σύνθεση ντοπαμίνης</li> </ul>
	Ντοπαμίνη	

	Νοραδρεναλίνη, αδρεναλίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος</li> </ul>
	Θυροξίνη, τριοδοθυρονίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ρύθμιση του μεταβολισμού</li> </ul>
<b>22) Τρυπτοφάνη</b>	Kynureninic acid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• αναστολέας CNS</li> </ul>
	Quinolinic acid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ενεργοποίηση CNS</li> </ul>
	σεροτονίνη	
	μελατονίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ρύθμιση κιρκάδιου ρυθμού</li> </ul>

#### 2.4.1 Αλανίνη

Η αλανίνη και η γλουταμίνη είναι τα κύρια αμινοξέα με δράση υποστρώματος για τη διαδικασία της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ και το σχηματισμό ουρίας. Η αλανίνη παράγεται στους περιφερικούς ιστούς με αντιδράσεις τρανσαμίνωσης με γλουταμινικό οξύ και με άλλα αμινοξέα. Με την απελευθέρωσή της στο κυκλοφορικό σύστημα, η αλανίνη προσλαμβάνεται κυρίως από το ήπαρ και λιγότερο από τα νεφρά. Στο ήπαρ η αλανίνη μπορεί να απαμινωθεί σε πυροσταφυλικό οξύ και σε μια αμινοομάδα, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις τρανσαμίνωσης, στην παραγωγή της ουρίας, ή μπορεί να απεκκριθεί στα ούρα. Έτσι η αλανίνη η οποία απελευθερώνεται από τους περιφερικούς ιστούς μπορεί να μετατραπεί σε γλυκόζη στο ήπαρ ή στα νεφρά και τελικά λειτουργεί ως υπόστρωμα για την περιφερική (κυρίως στους μύες) γλυκόλυση. Αυτό ονομάζεται κύκλος αλανίνης- γλυκόζης που συμβαίνει κατά τη διάρκεια του stress λόγω μεταβολισμού ( Stryer 1995). Ένας ακόμη σημαντικός ρόλος της αλανίνης είναι η συμμετοχή της ως δεύτερο αμινοξύ σε διπεπτίδια γλουταμίνης τα οποία είναι υπεύθυνα για την αύξηση της διαλυτότητας και της σταθερότητας της γλουταμίνης σε θρεπτικά διαλύματα. Λειτουργεί ακόμη και ως μεταφορέας αζώτου Van de Poll *et al.*, 2005).

#### 2.4.2 Αργινίνη και ορνιθίνη

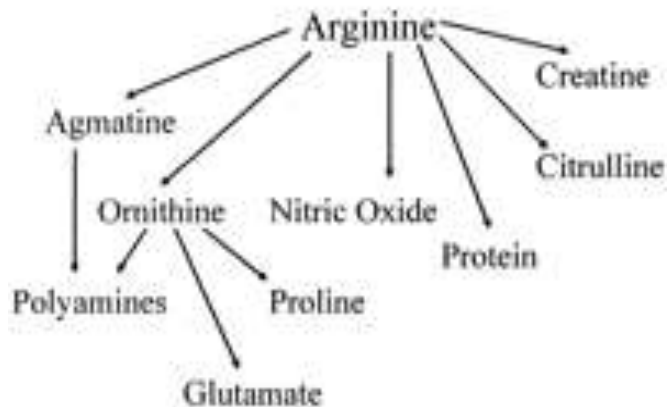
Η αργινίνη είναι ένα αμινοξύ πλούσιο σε άζωτο καθώς εμπεριέχει τρία άτομα αζώτου και αποτελεί πρόδρομο μόριο του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Η μετατροπή σε μονοξείδιο του αζώτου καταλύεται από το ένζυμο συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου και καταλήγει στην παραγωγή του τελικού προϊόντος, του αμινοξέος κιτρουλλίνη. Το NO ως προϊόν της αργινίνης είναι ιδιαίτερα

σημαντικό καθώς συμβάλλει σε σημαντικές λειτουργίες όπως η διέγερση του θυρεοειδή αδένος, η αγγειοδιαστολή, η νευροδιαβίβαση και η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η **αργινίνη** είναι επίσης πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση της ουρίας στον κύκλο της ουρίας, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση του οργανισμού από την αμμωνία και απέκκριση της περίσσειας του αζώτου. Ένας πλήρης κύκλος της ουρίας συμβαίνει μόνο στο ήπαρ, αλλά το ένζυμο αργινάση το οποίο καταλύει τη μετατροπή της αργινίνης σε ουρία και ορνιθίνη, εντοπίζεται σε περιορισμένο βαθμό και σε άλλους ιστούς και κύτταρα όπως στον εγκέφαλο, στα νεφρά, στο έντερο και στα ερυθροκύτταρα (Wu & Morris 1998). Η **αργινίνη** διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του κολλαγόνου και στην επιδιόρθωση των ιστών. Η διαθεσιμότητα σε **αργινίνη** ρυθμίζεται από την ισορροπία ανάμεσα στο NOS και στη δραστηριότητα του ενζύμου αργινάση, η οποία ακολούθως καθορίζει τη διαθεσιμότητα υποστρωμάτων για την παραγωγή του NO και για την παραγωγή της ορνιθίνης. Εκτός από τη σύνθεση του NO, της ουρίας και της ορνιθίνης, η **αργινίνη** συμμετέχει στη σύνθεση της κρεατίνης, που αποτελεί σημαντικό συστατικό των σκελετικών μυών και των νευρώνων και δρα σαν πηγή ενέργειας για αυτούς τους ιστούς (Εικόνα 3). Επιπρόσθετα, η αργινίνη μπορεί και καταλύεται σε αγματίνη, η οποία δρα σαν μόριο σηματοδότησης των κυττάρων. Η αργινίνη όχι μόνο δρα σαν ενδιάμεσο για την παραγωγή λειτουργικών προϊόντων, αλλά αποτελεί έναν ισχυρό διεγέρτη για την απελευθέρωση ορμονών, όπως η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη, η σωματοστατίνη καθώς και οι αυξητικές ορμόνες. Η αργινίνη μπορεί να σχηματιστεί στον οργανισμό από **κιτρουλίνη**. Καθώς όλα τα προϊόντα της αργινίνης παράγονται στο ήπαρ και παγιδεύονται μέσω του κύκλου της ουρίας, οι νεφροί αποτελούν το μόνο όργανο που γίνεται σύνθεση της αργινίνης και συνεισφέρει σημαντικά στα ποσοστά ελεύθερης αργινίνης στον οργανισμό. Έρευνες, εκτιμούν ότι η απαίτηση σε αργινίνη διαφέρει σημαντικά στην ιριδίζουσα πέστροφα (Klein & Halver 1980). Σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκαν αλλαγές στην απαίτηση σε αργινίνη, οι οποίες οφείλονται σε παράγοντες όπως το επίπεδο διατροφής και στην ισορροπία ηλεκτρολυτών (Chiu 1984). Βρέθηκε ακόμη ότι οι πέστροφες που εκτρέφονταν σε αλμυρά νερά, να έχουν χαμηλότερη απαίτηση σε αργινίνη συγκριτικά με αυτές που βρίσκονται σε γλυκά νερά. Παρόλα αυτά κανένας από τους παράγοντες δεν φαίνεται να είναι σημαντικός για τη μεγάλη ποικιλία που υπάρχει στην απαίτηση για αργινίνη (Kaushik 1978).

Η **ορνιθίνη**, χρησιμοποιείται για το σχηματισμό της προλίνης, πολυαμινών (πουτρεσκίνη, σπερμίνη και σπερμιδίνη), του γλουταμινικού οξέος και της γλουταμίνης. Η ορνιθίνη, μαζί με τα αμινοξέα ιστιδίνη και λυσίνη αποτελούν άμεσα πρόδρομα μόρια των βιογενών αμινών, οι οποίες αποτελούν δείκτες ένδειξης της ποιότητας των ιχθύων και της αποσύνθεσής τους (Antoine 2001).



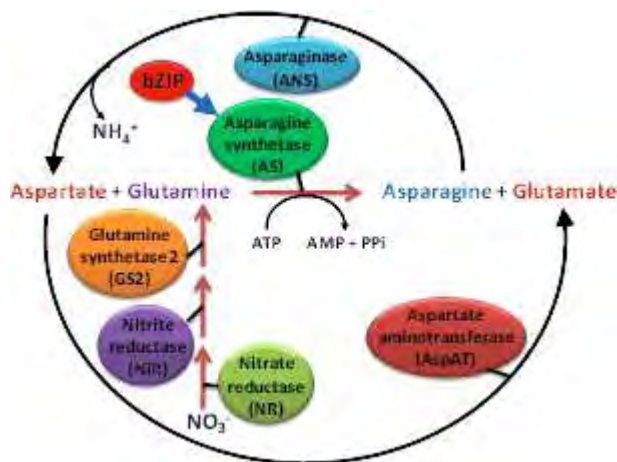
## Arginine Metabolism



Εικόνα 3: Προϊόντα του μεταβολισμού της αργινίνης.

### 2.4.3 Ασπαραγίνη και ασπαρτικό οξύ

Η **ασπαραγίνη** μπορεί να μετατραπεί από το ένζυμο ασπαραγινάση σε αμμωνία και ασπαρτικό οξύ, το οποίο αποτελεί πρόδρομο μόριο των ενδιάμεσων προϊόντων του κύκλου του κιτρικού, όπως είναι το οξαλοξικό οξύ και το φουμαρικό οξύ (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Μεταβολισμός της ασπαραγίνης

#### **2.4.4 Γλουταμίνη και γλουταμινικό οξύ**

Η γλουταμίνη αποτελεί το πιο άφθονο αμινοξύ στο πλάσμα και στους ιστούς. Στα κύτταρα που καταναλώνουν γλουταμίνη με τη βοήθεια του ενζύμου γλουταμινάση, η γλουταμίνη μετατρέπεται άμεσα σε αμμωνία και σε γλουταμινικό οξύ, το οποίο αποτελεί το πρωταρχικής σημασίας ενδιάμεσο προϊόν σε όλους τους κύκλους αποικοδόμησης της γλουταμίνης. Παρουσία αμμωνίας η αντίδραση αυτή μπορεί να αντιστραφεί με το ένζυμο συνθάση της γλουταμίνης (Newsholme et al 2003) . Σε αντίθεση με το γλουταμινικό οξύ, η γλουταμίνη μπορεί να διαπεράσει εύκολα την κυτταρική μεμβράνη και έτσι αποβάλλεται η περίσσεια αζώτου έξω από τα κύτταρα και λειτουργεί σαν φορέας αζώτου διαμέσου των εσωτερικών οργάνων. Η γλουταμίνη στους νεφρούς προσφέρει  $\text{NH}_3$  , που αποτελεί τον δέκτη πρωτονίων που απελευθερώνονται από το ανθρακικό οξύ, για να σχηματίσει  $\text{NH}_4^+$  και έτσι διευκολύνει το σχηματισμό  $\text{HCO}_3^-$ , που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH στο πλάσμα. Με τη μετατροπή της σε γλουταμινικό οξύ και ακολούθως σε ακετογλουταρικό οξύ, η γλουταμίνη συμπληρώνει τα ενδιάμεσα προϊόντα στον κύκλο του κιτρικού. Έτσι η γλουταμίνη χρησιμεύει ως το προτιμώμενο <καύσιμο> για τη γρήγορη διαίρεση των κυττάρων, όπως των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και του εντερικού βλεννογόνου (Zubay 1993). Στον εγκέφαλο το γλουταμινικό οξύ είναι ο πιο άφθονος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής και το πρόδρομο μόριο του  $\gamma$ -αμινοβουτυρικού οξέος, το οποίο είναι ένα σημαντικός ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής. Η γλουταμίνη αποτελεί ακόμη άμεσο πρόδρομο μόριο πουρινών και πυριμιδινών με αποτέλεσμα να συμμετέχει στη σύνθεση του RNA και DNA.Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπρόσθετα, είναι συστατικό του τριπεπτιδίου γλουταθειόνης, που είναι το κύριο ενδοκυττάριο αντιοξειδωτικό στους ευκαρυώτες.

#### **2.4.5 Γλυκίνη και θρεονίνη**

Η θρεονίνη είναι ένα απαραίτητο αμινοξύ, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε γλυκίνη στο ήπαρ και ακολούθως σε σερίνη. Η γλυκίνη αποτελεί συστατικό της γλουταθειόνης και αποτελεί σημαντικό νευροδιαβιβαστή του κεντρικού νευρικού συστήματος (Young et al. 2003). Μέσω του υποδοχέα της η γλυκίνη έχει ανασταλτική λειτουργία ως νευροδιαβιβαστής, αν και υπάρχει και μία θέση πρόσδεσης για τη γλυκίνη στον υποδοχέα του γλουταμικού οξέος NMDA. Ενεργοποίηση της συγκεκριμένης περιοχής της γλυκίνης, έχει ως αποτέλεσμα ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDA, που καθιστά τη γλυκίνη ως μεσάζοντα στα διεγερτικά αποτελέσματα νευροδιαβίβασης του γλουταμικού οξέος. Εκτός από το σημαντικό της ρόλο στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η γλυκίνη έχει αποδειχθεί

ότι έχει και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Η γλυκίνη μπορεί να αντιδράσει με αργινίνη και μεθειονίνη και να σχηματίσει κρεατίνη. Όπως και η ταυρίνη, η γλυκίνη, αποτελεί μόριο σύζευξης για τα χολικά οξέα.

#### **2.4.6 Ιστιδίνη**

Η ιστοδίνη, αποτελεί πρόδρομο μόριο της ισταμίνης, η οποία είναι σημαντική για το ανοσοποιητικό σύστημα με το να μεσολαβεί στην ανάπτυξη και στη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ισταμίνη δρα σαν νευροδιαβιβαστής και μεσολαβεί στην παραγωγή γαστρικών οξέων. Αυτό συμβαίνει μέσω του  $H^+$  υποδοχέα που βρίσκεται στον γαστρικό βλεννογόνο (Fange & Grove 1979).

#### **2.4.7 Ισολευκίνη, λευκίνη**

Τα αμινοξέα αυτής της κατηγορίας ( αμινοξέα με μεγάλες αλυσίδες υδατανθράκων BCAAs), είναι απαραίτητα αμινοξέα και τα δύο μαζί απαρτίζουν το ένα τρίτο των συνολικών αμινοξέων που απαιτεί ένας οργανισμός καθημερινά. Τα αμινοξέα αυτά και συγκεκριμένα η λευκίνη, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενέργειας και του μεταβολισμού των πρωτεϊνών. Τα αμινοξέα αυτής της κατηγορίας υφίστανται οξείδωση πρώτα στους σκελετικούς μύες και όχι στο ήπαρ. Τα BCAAs δίνουν την αμινοομάδα τους για να σχηματιστεί γλουταμινικό οξύ στους μύες με αντιδράσεις τρανσαμίνωσης, αποδίδοντας  $\alpha$ -κετοξέα,  $\alpha$ -ketoisocaproic acid,  $\alpha$ -κετο  $\beta$ -μεθυλοβουλενικό οξύ, και  $\alpha$ -ketoisovaleric acid ( Singh & Shaner 1995). Αυτά τα προϊόντα τρανσαμίνωσης των BCAAs μπορούν να εισέλθουν στο κύκλο του κιτρικού και να συνεισφέρουν στην παραγωγή ATP. Μετά την κατανάλωση τροφών, οι οποίες είναι άφθονες σε πρωτεΐνες, ένα μεγάλο μέρος των BCAAs διαπερνά μέσω του ήπατος και προσλαμβάνεται από τους μύες, όπου πρωταρχικά συνεισφέρει στην πρωτεϊνοσύνθεση και στη σύνθεση της γλουταμίνης, που αποτελεί το 70% των αμινοξέων που απελευθερώνεται από τους μύες (Damodaran 1996) . Η λευκίνη είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της επαναπρόσληψης των πρωτεϊνών στα μυικά κύτταρα, παρεμποδίζοντας την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και βελτιώνοντας τη σύνθεσή τους.

#### **2.4.8 Λυσίνη**

Η λυσίνη είναι ένα απαραίτητο αμινοξύ το οποίο παρέχεται μέσω της τροφής. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην πρωτεϊνοσύνθεση. Καταβολίζεται σε γλουταμινικό και σε ακέτυλο-CoA και αποτελεί πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση της καρνιτίνης, η οποία είναι απαραίτητη για την αποικοδόμηση των μακρών αλυσίδων των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια (Morrey et al. 1996).

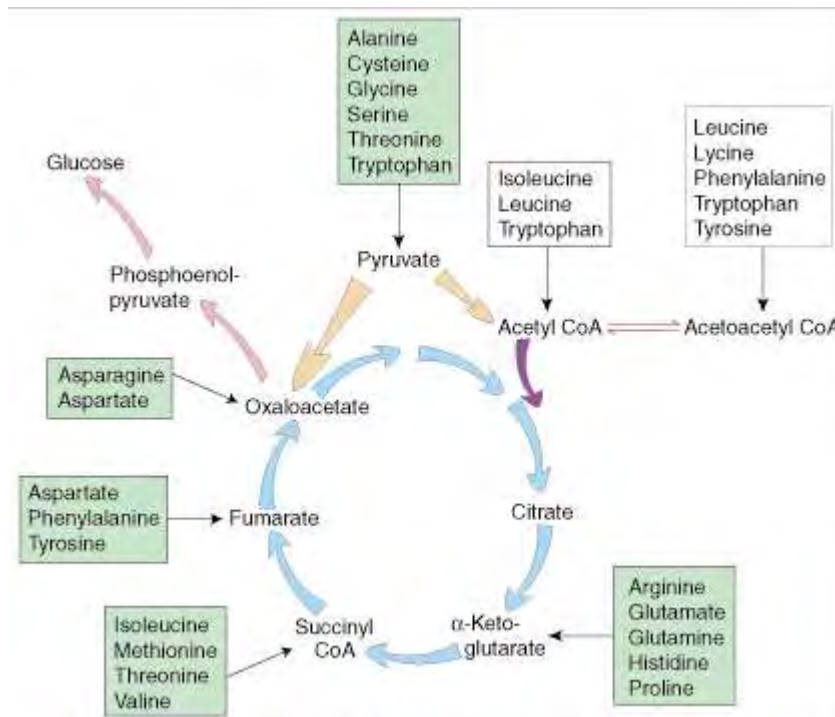
#### **2.4.9 Φαινυλαλανίνη και τυροσίνη**

Η φαινυλαλανίνη υδροξυλιώνεται σε τυροσίνη μέσω του ενζύμου υδροξυλάση της φαινυλαλανίνης. Η τυροσίνη αποτελεί το πρόδρομο μόριο για την διυδροξυφαινυλαλανίνη (ντόπα) το οποίο διαδοχικά μπορεί να μετατραπεί στις κατεχολαμίνες ντοπαμίνη, νοραδρεναλίνη (νορεπινεφρίνη) και αδρεναλίνη (επινεφρίνη). Αν και μόνο ένα μικρό ποσοστό της τυροσίνης χρησιμοποιείται σε αυτό το μονοπάτι, αυτή η μεταβολική πορεία είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η ντοπαμίνη είναι ένας σημαντικός νευροδιαβιβαστής ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κίνηση (Snyder 2000). Η νοραδρεναλίνη και η αδρεναλίνη αποτελούν τους σημαντικότερους νευροδιαβιβαστές του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Η τυροσίνη εκτός από πρόδρομο μόριο των κατεχολαμινών, λειτουργεί και ως πρόδρομο μόριο των ορμονών του θυρεοειδούς αδένα, οι οποίες αποτελούν ρυθμιστές της μεταβολικής δραστηριότητας ολόκληρου του οργανισμού.

#### **2.4.10 Τρυπτοφάνη**

Η τρυπτοφάνη αποτελεί ένα αμινοξύ, τα παράγωγα του οποίου παράγονται μέσω δύο βασικών μονοπατιών. Το πρώτο κύριο μονοπάτι είναι η αποικοδόμηση της μέσω οξείδωσης και η χρησιμοποίησή της στο μονοπάτι της κυνουρενίνης. Το δεύτερο σημαντικό μονοπάτι στο οποίο λαμβάνει χώρα η τρυπτοφάνη είναι στο μονοπάτι κατά το οποίο συμβαίνει καρβοξυλίωση και ακολούθως αποκαρβοξυλίωσης της για το σχηματισμό της 5-υδροξυτριπταμίνης (σεροτονίνη), και ακολούθως σε μελατονίνη. Τα προϊόντα του μονοπατιού της κυνουρενίνης, τα οποία ονομάζονται κυνουρενίνες, αποτελούν το κινολογικό οξύ και το κυνουρενικό οξύ. Το κινολογικό οξύ αποτελεί ανταγωνιστή του υποδοχέα NMDA, ενώ το κυνουρενικό οξύ αποτελεί ένα μη συναγωνιστικό αναστολέα του υποδοχέα NMDA και επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς ρυθμίζει τη διέγερση του κεντρικού νευρικού συστήματος (Laidlaw & Kopple 1987). Η τρυπτοφάνη συναγωνίζεται με τα αμινοξέα ισολευκίνη, βαλίνη και λευκίνη για τη μεταφορά διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Έτσι η αναλογία ανάμεσα στην τρυπτοφάνη και στα προηγούμενα αμινοξέα που αναφέρθηκαν, καθορίζει την επαναπρόσληψη των παραπάνω αμινοξέων από τον εγκέφαλο. Η μελατονίνη η οποία παράγεται στο μονοπάτι όπου συμβαίνει αποδιάταξη της σεροτονίνης στο σκοτάδι, αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του κερκάδιου ρυθμού (Bender 1985). Στην Εικόνα 5 απεικονίζεται πως ορισμένα από τα προϊόντα των αμινοξέων που αναφέρθηκαν παραπάνω συμμετέχουν στην παραγωγή της ενέργειας, στην

παραγωγή της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων, διεργασίες οι οποίες είναι απαραίτητες για τη λειτουργία του οργανισμού.



**Εικόνα 5:** Απεικόνιση της μετατροπής των αμινοξέων σε ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού και παραγωγή ενέργειας, γλυκόζης και λιπαρών οξέων.

## 2.5 Μέθοδος HPLC

### 2.5.1 Αρχή τεχνικής HPLC

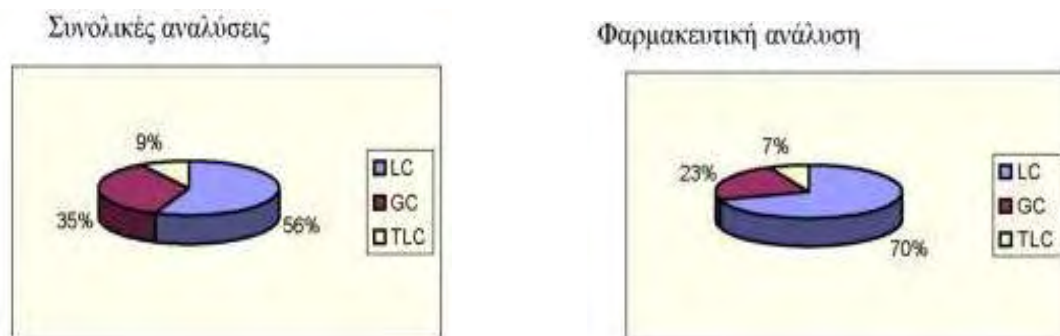
Η χρωματογραφία αποτελεί σημαντική τεχνική ενόργανης ανάλυσης, η οποία καθιστά δυνατό το διαχωρισμό συστατικών παρόμοιας χημικής δομής σε ένα μίγμα. Ο διαχωρισμός αυτός επιτυγχάνεται με μια σειρά διαδοχικών ισορροπιών μερισμού των συστατικών του δείγματος. Οι ισορροπίες αυτές βασίζονται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης τους με τις δύο φάσεις του

χρωματογραφικού συστήματος. Η κινητή φάση (φέρουσα) διέρχεται μέσω της στατικής φάσης προκαλώντας διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μίγματος, τα οποία με αυτό τον τρόπο διαχωρίζονται και εκλύονται σε διαφορετικούς χρόνους ( Lough & Wainer 1996).

Ως υγρή χρωματογραφία, χαρακτηρίζεται η χρωματογραφία, κατά την οποία η κινητή φάση είναι υγρό και η στατική φάση στερεό πορώδες υλικό ή υγρό, το οποίο συγκρατείται μηχανικά επί στερεού υποστρώματος. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC) αποτελεί εξέλιξη της κλασικής υγρής χρωματογραφίας, κατά την οποία η διαβίβαση της κινητής φάσης γίνεται με τη χρήση αντλίας υψηλής πίεσης, καθώς η στατική φάση αποτελείται από σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντίστασης στη ροή της κινητής φάσης. Τόσο η βαρυτική, όσο και η μηχανική (μέσω αντλίας) προώθηση της κινητής φάσης δημιουργούν νηματική ροή, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών στην υγρή χρωματογραφία.

Το προς ανάλυση μίγμα εισάγεται στη κινητή φάση, η οποία προωθείται με τη βοήθεια της υψηλής πίεσεως και υφίσταται μια σειρά διαδοχικών αλληλεπιδράσεων στη διαχωριστική επιφάνεια των δύο φάσεων. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται χάρη των διαφορών στις φυσικές και τις χημικές ιδιότητες των επιμέρους συστατικών, διαφοροποιώντας κατά συνέπεια τη σχετική συγγένεια τους ως προς τη στατική και τη κινητή φάση( L.R Snyder 1997).

Η τεχνική HPLC έχει ποικίλες εφαρμογές. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την ποιοτική και ποσοστική ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων και ουσιών ποικίλης προελεύσεως, αποτελεί την τεχνική επιλογής σε πολλά ζητήματα φαρμακευτικής αναλύσεως. Ακόμη, η ισχύς της τεχνικής αξιοποιείται στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων τα οποία περιέχουν τα φυσιολογικά συστατικά, τα χορηγούμενα φάρμακα και τους μεταβολίτες τους σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Lewis & Bartle 2002). Στις παρακάτω Εικόνες 6 και 7 απεικονίζονται τα ποσοστά εφαρμογών των τριών βασικών χρωματογραφικών τεχνικών, συμπεριλαμβανομένου της HPLC.



**Εικόνα 6, 7:** Ποσοστά εφαρμογών των τριών βασικών χρωματογραφικών τεχνικών (υγρή χρωματογραφία- LC, αέρια χρωματογραφία- GC και χρωματογραφία λεπτής στιβάδας- TLC), όπως αυτές παρουσιάζονται στα Analytical Abstracts των δημοσιευμένων ερευνητικών άρθρων την περίοδο 1980-1992.

### Σκοπός εργασίας:

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η απομόνωση, η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση του προφίλ ελεύθερων αμινοξέων σε πληθυσμούς πέστροφας του είδους *Oncorhynchus mykiss*, με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Αντίστροφης Φάσης (RP-HPLC). Με την παρούσα εργασία θα προσδιοριστεί η χημική σύσταση και θρεπτική αξία με στόχο τη σύγκριση πληθυσμών διαφορετικής προέλευσης του αναφερόμενου είδους από εκτρεφόμενους πληθυσμούς διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών της Ελληνικής επικράτειας.

## 3. Υλικά και Μέθοδοι

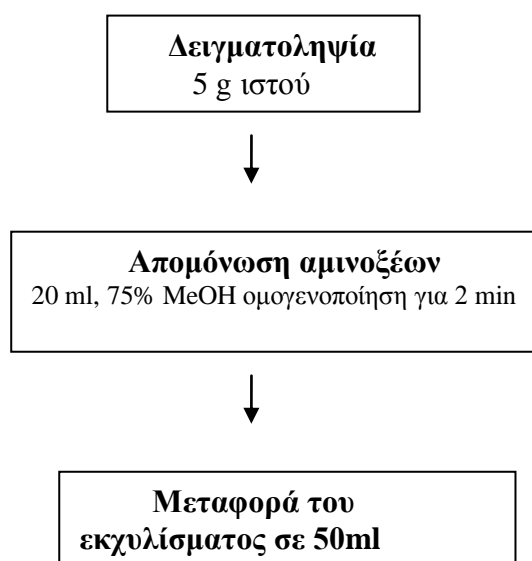
### 3.1 Δειγματοληψία

Ενεήντα συνολικά δείγματα πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* συλλέχθηκαν από 6 διαφορετικά ρέοντα συστήματα αντιπροσωπευτικά της ελληνικής επικράτειας. Στα συστήματα που συλλέχθηκαν τα δείγματα συγκαταλέγονται το ρέμα του Αγίου Ιωάννη Σερρών (ανατολική βόρεια Ελλάδα), ο ποταμός Εδεσσαίος στην Έδεσσα και ο ποταμός Αραπίτσα στη Νάουσα (κεντρική βόρεια Ελλάδα), ο ποταμός Λούρος στα Ιωάννινα (δυτική Ελλάδα), ο ποταμός Ταυρωπός στη λίμνη Πλαστήρα (κεντρική Ελλάδα) και η πηγή Μπουρνιά στην Καλαμάτα (νότια Ελλάδα). Για την προετοιμασία των δειγμάτων, την παρασκευή της ορθοφθαλδεΐδης (OPA) και την ιχνηθέτηση των αμινοξέων εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο των Antoine *et al.*, 2001. Οι ιχθύες αμέσως μετά

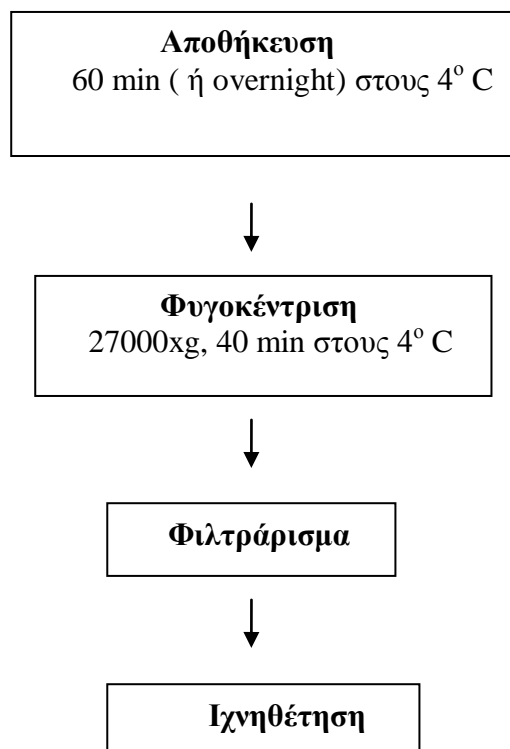
την εξαλίευσή τους τοποθετήθηκαν σε πάγο και μεταφέρθηκαν οδικώς αυθημερόν στις εγκαταστάσεις του πανεπιστημίου Θεσσαλίας όπου και πραγματοποιήθηκε κατά σειρά η ζύγιση, η μέτρηση του μήκους και η φωτογράφησή τους. Έπειτα κόπηκαν φιλέτα μυϊκού ιστού από την ίδια κάθε φορά πλευρά του ψαριού και αφαιρέθηκαν τα οστά.

### **3.2 Προετοιμασία**

Η προετοιμασία των δειγμάτων άρχισε με ζύγιση 5 g μυϊκού ιστού από κάθε φιλέτο πέστροφας και την τοποθέτηση αυτών σε πλαστικούς σωλήνες τύπου falcon των 50 ml προσθέτοντας 20 ml διαλύματος εξαγωγής (75% μεθανόλη σε υπερκάθαρο νερό). Με τη βοήθεια κατάλληλου ομογενοποιητή πραγματοποιήθηκε λειοτρίβιση του κάθε δείγματος για 5 min. Με το πέρας της παραπάνω διαδικασίας σε κάθε falcon προστέθηκε διάλυμα εξαγωγής μέχρι τελικό όγκο 50 ml και τοποθετήθηκαν στους +4 °C για 12 h. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση των δειγμάτων για 20 min στα 5000 x g και αφού λάβαμε το υπερκείμενο το τοποθετήσαμε σε πλαστικούς σωλήνες 1.5ml τύπου erpendorf, επαναλαμβάνοντας τη φυγοκέντριση στις 14000 rpm για 30 min. Ακολούθως λήφθηκε το υπερκείμενο και τελικά τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε erpendorf . Έπειτα κάθε δείγμα φιλτραρίστηκε ξεχωριστά χρησιμοποιώντας φίλτρο Puradisc 0,2 μm . Παρακάτω απεικονίζεται διαγραμματικά η προετοιμασία των δειγμάτων.







### **3.3 Αντιδραστήρια**

Για την πραγματοποίηση της HPLC χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια: Μεθανόλη ( για ανάλυση HPLC) της εταιρίας Applichen, ορθοφθαλδεύδη (OPA) από την εταιρία Fluka, καθώς και απόλυτη αιθανόλη και τετραϋδροφουράνη από την εταιρία Applichen. Τα standard αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν, το οξικό νάτριο και η μερκαπτοαιθανόλη, ήταν επίσης της εταιρίας Applichen. Το υπερκάθαρο νερό που χρησιμοποιήθηκε καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας ήταν της εταιρίας MilliQ.

### **3.4 Προετοιμασία κινητών φάσεων**

Η κινητή φάση A παρασκευάστηκε από μεθανόλη και η κινητή φάση B περιείχε 1,5% τετραϋδροφουράνη σε 50mM οξικό νάτριο (pH 5,9). Για την προετοιμασία των κινητών φάσεων χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα Puradisc 0,2 μm με σκοπό την προστασία της στήλης από φραγμό από οποιοδήποτε σωματίδιο εμπεριέχεται στις κινητές φάσεις.

### **3.5 Προετοιμασία αντιδραστηρίου OPA- thiol.**

Το αντιδραστήριο OPA παρασκευάζεται τουλάχιστον 24 ώρες πριν τη χρήση. Αρχικά διαλύονται 27 mg ορθοφθαλδεΐδης σε 500  $\mu\text{L}$  απόλυτη αιθυλική αλκοόλη. Στη συνέχεια προστίθενται 5 mL από 0,1 M τετραυδροφουράνη (pH 9,5) και ακολούθως 50  $\mu\text{L}$  μερκαπτοαιθανόλη. Το μίγμα στη συνέχεια αναμιγνύεται καλά και αποθηκεύεται στο σκοτάδι όπου μπορεί να διατηρηθεί για μερικές μέρες με τη περιοδική προσθήκη 20  $\mu\text{L}$  μερκαπτοαιθανόλης (Joseph & Marsden 1986; Miles & Leong 1992).

### **3.6 Πρότυπα διαλύματα αμινοξέων**

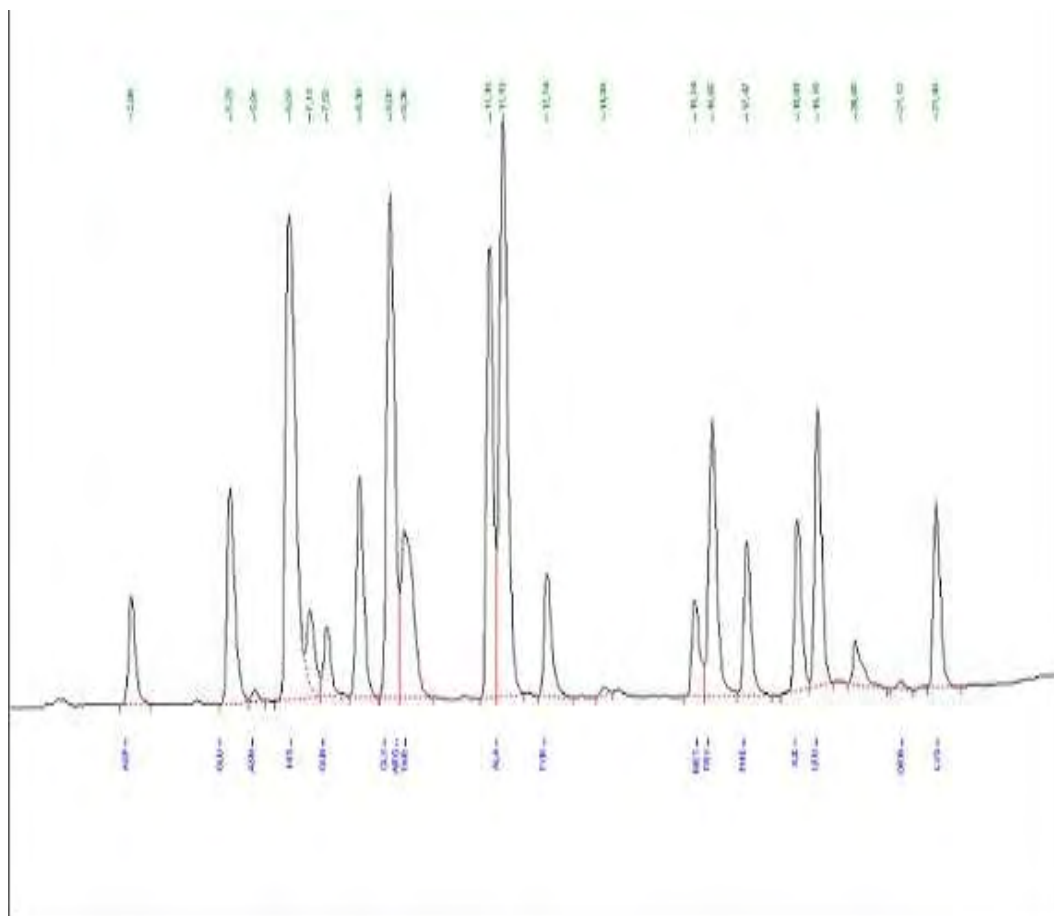
Για την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων. Για την ποσοτικοποίηση των ελεύθερων αμινοξέων κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς για κάθε ένα αμινοξύ ξεχωριστά, το εύρος των οποίων κυμαίνονταν μεταξύ των αναμενόμενων τιμών συγκεντρώσεων των δειγμάτων. Κάθε πρότυπη καμπύλη αναφοράς αποτελούνταν από 5 σημεία. Το  $R^2$  της καμπύλης αναφοράς πλησίαζε το 0,99 σε όλες τις περιπτώσεις.

### **3.7 Εργαστηριακός εξοπλισμός**

Η διεξαγωγή των αναλύσεων πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή HPLC (Perkin Elmer 200 Series) και η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Brownlee Pecosphere 3 $\mu\text{m}$  C18 (84x4,6 mm). Για τον έλεγχο της βαθμιαίας μεταβολής της αναλογίας των κινητών φάσεων και τη ρύθμιση της ροής (1,5ml/min) έγινε χρήση του λογισμικού TotalChrom Navigator Version 6.3. Η αντλία που χρησιμοποιήθηκε ήταν Perkin Elmer 200 Series. Ο ανιχνευτής φθορισμού και τα μήκη διέγερσης και εκπομπής του μονοχρωμάτορα ρυθμίστηκαν στα 340 και 430nm. Η συσκευή διέθετε αυτόματο δειγματολήπτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανίχνευση τους έχει ως προαπαιτούμενο την ανάμειξη των δειγμάτων με φθορίζουσα ουσία-ιχνητέτη (OPA) το οποίο δίνει δυνατότητα στον ανιχνευτή να τα ανιχνεύσει. Προσθέτουμε επίσης μερκαπτοαιθανόλη η οποία προσδίδει σταθερότητα στην ανίχνευση των αμινοξέων, και για αυτό το 70 % των εργασιών χρησιμοποιείται μερκαπτοαιθανόλη.

### 3.8 Ιχνηθέτηση

Σε 100μl από το πρότυπο διάλυμα αμινοξέων προστέθηκαν 400μl ορθοφθαλδεΐδης (OPA) και στη συνέχεια ακολούθησε ανακίνηση σε vortex. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου συγκέντρωσης 0.05 M και pH 5.5 χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό κάθε φορά ώστε να εξασφαλίσουμε τις καθαρότητα της στήλης και για την αξιοποίηση των αποτελεσμάτων του ανιχνευτή. Πριν την εισαγωγή του δείγματος ακολούθησε ανακίνηση για 2 min, η τήρηση της οποίας είναι σημαντική για τη σωστή ανάδευση της ορθοφθαλδεΐδης (OPA) και του δείγματος. Η αναλογία των κινητών φάσεων δεν ήταν ισοκρατική, αλλά άλλαζαν βαθμιαία κατά τη διάρκεια της έκλουσης. Οι συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν βάσει εξωτερικής πρότυπης καμπύλης.





Εικόνα 8 : συσκευή HPLC (Perkin Elmer 200 Series)

### **3.9 Μέθοδος**

Η ανάλυση των αμινοξέων αποτελεί από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αναλυτικές διαδικασίες. Χρησιμοποιείται στη διασαφήνιση της δομής των πρωτεϊνών, στη διάγνωση ασθενειών, ακόμη και στον καθορισμό της θρεπτικής αξίας των τροφών (Lunte 2005). Τα αμινοξέα δεν διαθέτουν κάποιο ιχνηθέτη που να διακρίνεται εύκολα, και για αυτό η ανίχνευσή τους βασίζεται πάντα στην αντίδραση της αμίνης με ένα παράγωγο αντιδραστήριου. Είναι απαραίτητο να επιλεγεί ένα αντιδραστήριο, που αντιδρά γρήγορα, ώστε να δώσει ένα προϊόν το οποίο διαθέτει διαφορετικές ιδιότητες από το αντιδραστήριο από το οποίο προήλθε. Αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιούνται είναι η νινυδρίνη, 1-fluoro-2,4 dinitrobenzene, fluorescamine, και η ορθοφθαλδεΐδη (OPA). Το αποτέλεσμα της απορρόφησης ή του φθορισμού παρέχει την ένδειξη της συνολικής ποσότητας του αμινοξέος που εμπεριέχεται στο δείγμα (Blau & Halket JM 1993).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των αμινοξέων είναι η αντίστροφη φάσεως υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας (reversed phase high performance liquid chromatography). Αυτός ο τύπος υγρής χρωματογραφίας, αποτελεί μία χρωματογραφία διαχωρισμού όπου η σταθερή φάση είναι υδρόφοβη ή μη-πολική, και η φάση που διαπερνά τη στήλη ( που μπορεί να είναι νερό) θα πρέπει να είναι περισσότερη πολική από τη σταθερή φάση (Bertholf et al. 2007). Η HPLC είναι από τα πιο σύγχρονα εργαλεία είδη χρωματογραφίας που υπάρχουν. Η έκλουση γίνεται είτε ισοκρατικά όπου η σύσταση της κινητής φάσης δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, είτε βαθμιδωτά όπου η ισχύς τη κινητής φάσης μεταβάλλεται επιτυχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό. Με την ισοκρατική έκλουση, όταν το δείγμα περιέχει σχετικά μεγάλο αριθμό συστατικών είναι δύσκολο να διαχωριστεί ενώ παράλληλα τα συστατικά του δείγματος που συγκρατούνται ισχυρά από τη στήλη, εκλούνται πολύ αργά με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών τους. Με τη βαθμωτή έκλουση γίνεται ανάμιξη ενός ασθενούς με έναν ισχυρό διαλύτη σε ποσοστά που μπορεί να μεταβάλλονται με το χρόνο, με τη περιεκτικότητα του ισχυρού διαλύτη διαρκώς αυξανόμενη. Έτσι διαχωρίζονται στην αρχή οι ουσίες που έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης στη στήλη και με την αύξηση της ισχύος εκλούνται καλύτερα και όσες συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο (Gehrke et al. 2001).

Τα κύρια στοιχεία ενός συστήματος HPLC είναι τα ακόλουθα:

- το σύστημα έκλουσης
- το σύστημα παροχής του διαλύτη
- σημείο εισαγωγής του δείγματος
- η αναλυτική στήλη
- ο ανιχνευτής
- το λογισμικό

Το σύστημα έκλουσης αποτελούν οι φιάλες οι οποίες διαθέτουν το διαλύτη (κινητή φάση). Ο διαλύτης διοχετεύεται με πίεση διαμέσου των σωληναρίων, που φέρουν φίλτρα στα άκρα τους, στο υπόλοιπο σύστημα. Ο κάθε διαλύτης ή το σύστημα των διαλυτών πριν από τη χρήση του επεξεργάζεται για να εκδιωχθεί ο όποιος αέρας υπάρχει μέσα του προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα που μπορούν να καταστρέψουν τη στήλη (Jandera & Chuacck 1986). Η επιλογή της κινητής φάσης γίνεται έτσι ώστε να διαφέρει η πολικότητα της από αυτή της στατικής φάσης με αποτέλεσμα να υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός στα συστατικά του δείγματος που αναλύονται.

Το σύστημα παροχής έκλουσης, διοχετεύει το διαλύτη με σταθερή πίεση, η οποία έχει προκαθοριστεί και ελέγχεται αυτομάτως συνέχεια. Η σταθερότητα της πίεσης είναι πολύ σημαντική στην υγρή χρωματογραφία.

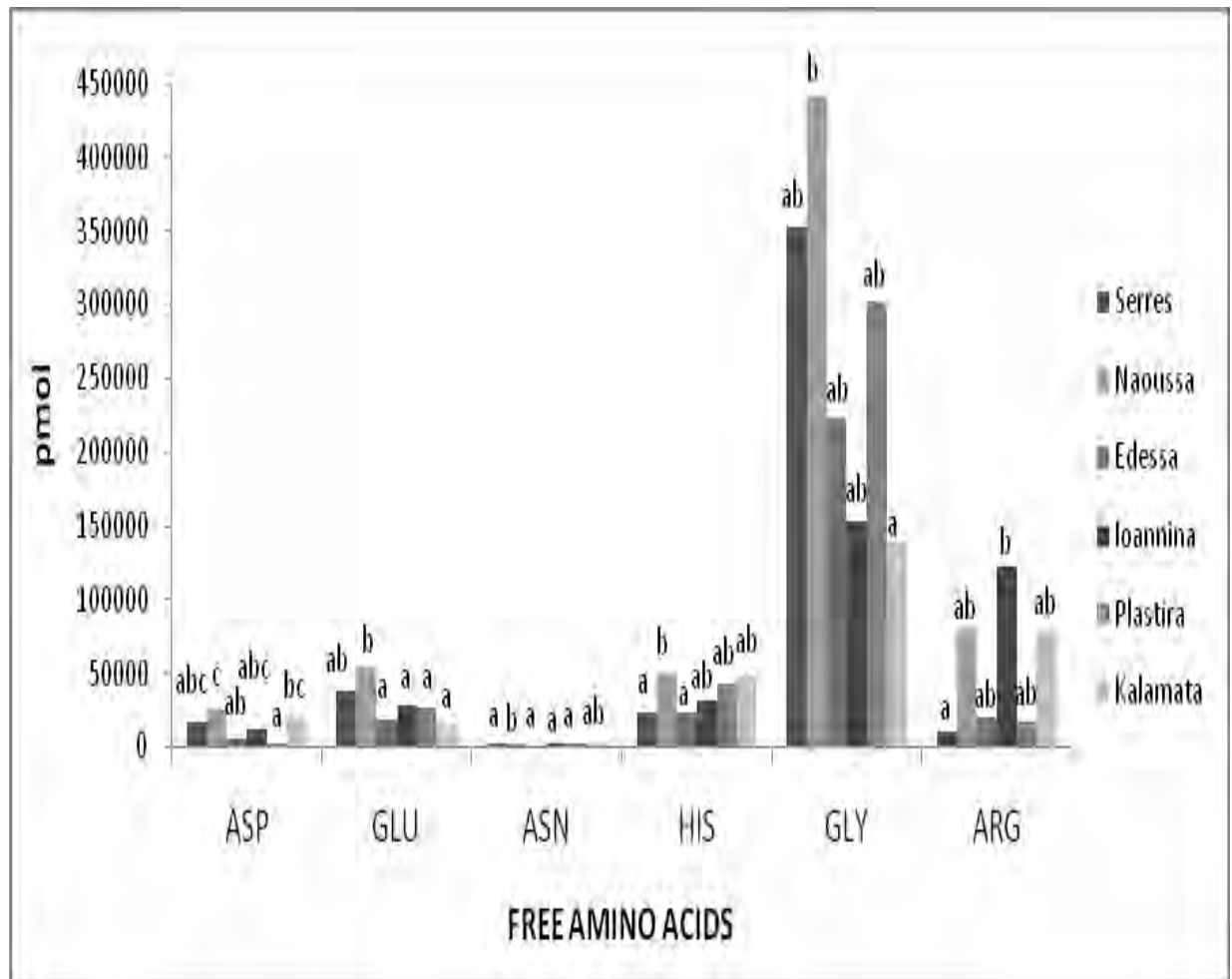
Η αναλυτική στήλη αποτελεί το πιο σημαντικό στοιχείο της συσκευής της υγρής χρωματογραφίας. Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσεως το υλικό πληρώσεως αυτών των στηλών είναι υλικό με μικρή πολικότητα (Blau & Halket 1993).

Ο ανιχνευτής που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το είδος της ουσίας που αναλύεται κάθε φορά. Ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το φωτόμετρο υπεριώδους φωτός, ο ανιχνευτής φθορισμού, ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές, οι ανιχνευτές αγωγιμότητας και το φωτόμετρο υπέρυθρου φωτός. Χαρακτηριστικά όπως, η υψηλή ακρίβεια, η σταθερότητα, η υψηλή αξιοπιστία σε αλλαγές θερμοκρασίας και πίεσης και η εύκολη χρήση του, καθιστούν έναν ανιχνευτή σημαντικό για ακριβή αποτελέσματα στην HPLC (Skea 1989). Στην παρούσα εργασία για την ανίχνευση των αμινοξέων χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής φθορισμού, καθώς τα αμινοξέα εκπέμπουν σημαντικό ποσοστό της ακτινοβολίας που έχουν απορροφήσει.

Το καταγραφικό απεικονίζει τις μεταβολές του σήματος που ανιχνεύει ο ανιχνευτής. Το χρωματογράφημα και οι άξονές του παριστάνουν την ανταπόκριση του ανιχνευτή ( $\psi$  άξονας) και το χρόνο κατακράτησης της ουσίας ( $\chi$  άξονας). Οι διάφορες ουσίες ταυτοποιούνται με βάση διάφορα πρότυπα. Ποσοτικά από το εμβαδό ή το ύψος της κορυφής και ποιοτικά από το χρόνο κατακράτησης (Yang 1983)

#### **4.Αποτελέσματα**

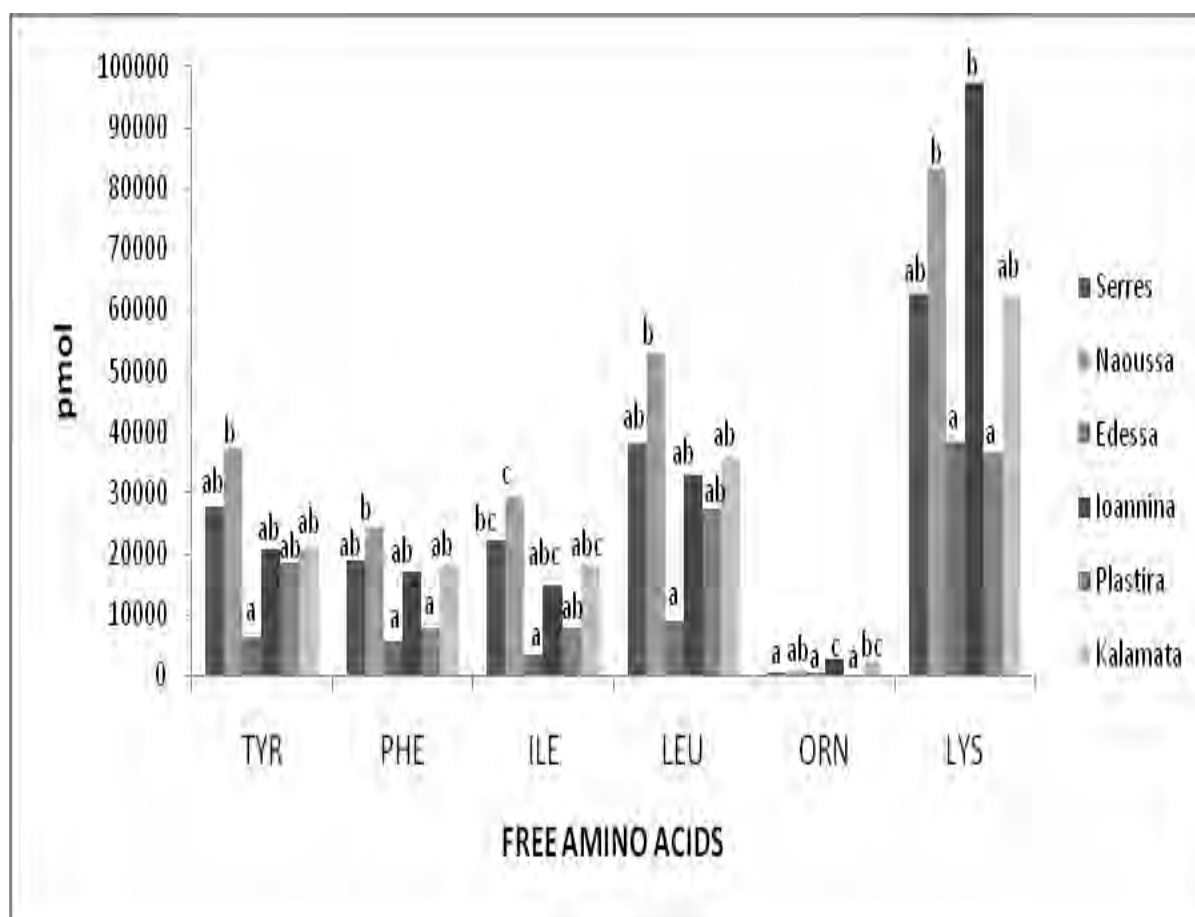
Οι συγκεντρώσεις των περισσότερων ελεύθερων αμινοξέων απεικονίζονται στα παρακάτω σχήματα και δείχνουν ότι εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικά διάφορα προφίλ (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Σχ. 1 και Σχ.2) με εξαίρεση τη GLN, τη THR και την ALA. Τα αποτελέσματα σε κάθε περίπτωση εμφάνισαν επαναληψιμότητα.



**Σχήμα 1.** Συγκέντρωση ελεύθερων αμινοξέων ASP, GLU, ASN, HIS, GLY, ARG (pmol/g) ανά περιοχή

Στο **Σχήμα 1** παρατηρούμε τη συγκέντρωση των αμινοξέων ασπαρτικού οξέος (ASP), γλουταμινικού οξέος (GLU), ασπαραγίνης (ASP), ιστιδίνης (HIS), γλυκίνης (GLY) και αργινίνης (ARG) ανά περιοχή. Η συγκέντρωση του ασπαρτικού οξέος παρατηρείται να έχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των αναφερόμενων περιοχών. Η συγκέντρωση του συγκεκριμένου αμινοξέος σε ιχθύες που συλλέχθηκαν στην περιοχή της Νάουσας παρατηρείται ότι διαφέρει σημαντικά στατιστικά από ιχθύες στην περιοχή στη λίμνη Πλαστήρα και την περιοχή της Έδεσσας, ενώ στις περιοχές των Σερρών και Ιωαννίνων δεν παρατηρείται σημαντική στατιστική απόκλιση. Επιπρόσθετα, στη συγκέντρωση ασπαρτικού οξέος παρουσιάζονται χαμηλά ποσοστά στην περιοχή της Καλαμάτας συγκρινόμενη με τη συγκέντρωση που εμφάνισαν οι ιχθύες στη λίμνη Πλαστήρα. Στη συγκέντρωση του γλουταμινικού οξέος δεν παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις στη συγκέντρωση μεταξύ των περιοχών, με εξαίρεση μόνο την

περιοχή της Νάουσας να διαφέρει με τις περιοχές Έδεσσας, Ιωάννινα, Πλαστήρα και Καλαμάτα, έχοντας υψηλότερα ποσοστά συγκέντρωσης. Όσο αναφορά τη συγκέντρωση της ασπαραγίνης, η περιοχή της Νάουσας ανέδειξε σημαντικές διαφορές με τις περιοχές των Σερρών, Ιωαννίνων, Πλαστήρα και Έδεσσας, αλλά όχι με την Καλαμάτα. Τα υψηλότερα ποσοστά συγκέντρωσης ασπαραγίνης εμφανίζονται στους ιχθύες της περιοχής της Νάουσας, η οποία διαφέρει σημαντικά με τις συγκεντρώσεις των περιοχών Σερρών και Έδεσσας. Η γλυκίνη εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση συγκρινόμενη με τα άλλα αμινοξέα, με τη συγκέντρωση στην περιοχή της Νάουσας να διαφέρει σημαντικά με αυτή στην περιοχή της Καλαμάτας, αλλά όχι με τις υπόλοιπες περιοχές. Η αργινίνη, παρουσιάζει ομοιότητες στα ποσοστά συγκέντρωσης μεταξύ των περιοχών Νάουσας, Έδεσσας, Ιωαννίνων, Πλαστήρα και Καλαμάτας, αλλά παρατηρείται διαφορά μεταξύ των περιοχών Ιωαννίνων και Σερρών με τις Σέρρες να εμφανίζουν τη χαμηλότερη συγκέντρωση σε αργινίνη, σε σύγκριση με τα Ιωάννινα.



**Σχήμα 2.** Συγκέντρωση ελεύθερων αμινοξέων TYR, PHE, ILE, LEU, ORN, LYS (pmol/g) ανά περιοχή

Στο **Σχήμα 2**, απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των αμινοξέων τυροσίνη (TYR), φαινυλαλανίνη (PHE), ισολευκίνη (ILE), λευκίνη (LEU), ορνιθίνη (ORN) και λυσίνη (LYS), ανά περιοχή. Η συγκέντρωση του αμινοξέος τυροσίνη



παρατηρείται υψηλή στους ιχθύες από την περιοχή της Νάουσας και στις υπόλοιπες περιοχές και διαφέρει σημαντικά με τη συγκέντρωση που παρατηρείται στην Έδεσσα. Στο αμινοξύ φαινυλαλανίνη, όπως και στην ισολευκίνη, διαφορές παρατηρούνται στη συγκέντρωση στην περιοχή της Νάουσας, με τις περιοχές Έδεσσας και τη λίμνη Πλαστήρα. Η συγκέντρωση των ιχθύων σε ορνιθίνη παρουσίασε ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά, με σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ της περιοχής των Ιωαννίνων και τη λίμνη Πλαστήρα. Αντιθέτως το αμινοξύ λυσίνη βρέθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις, με διαφορές να εντοπίζονται μεταξύ των περιοχών των Ιωαννίνων με την Έδεσσα και την λίμνη Πλαστήρα.

**Πίνακας 2:** Απεικόνιση των τιμών του μέσου όρου, καθώς και των τιμών μέγιστου και ελάχιστου για τα αμινοξέα TYR, PHE, ILE, LEU, ORN, LYS, ASP, GLU, ASN, HIS, GLY, ARG.

		Mean (pmol)	Minimum (pmol)	Maximum (pmol)
	Νάουσα	2557,47	0	8389
	Σέρρες	1718,74	0	4574
<b>ASP</b>	Καρδίτσα	289,17	0	995
	Ιωάννινα	1240,22	564	2483
	Καλαμάτα	2038,57	458	6013
	Έδεσσα	559,30	190	1139
	Νάουσα	5490,26	0	13945
	Σέρρες	3757,65	0	7244
<b>GLU</b>	Καρδίτσα	2636,29	0	4740
	Ιωάννινα	2882,63	1557	4443
	Καλαμάτα	1518,11	0	4429
	Έδεσσα	1788,24	724	3266
	Νάουσα	150,09	0	685
	Σέρρες	34,28	0	206
<b>ASN</b>	Καρδίτσα	10,03	0	150
	Ιωάννινα	38,05	0	183
	Καλαμάτα	87,81	0	280
	Έδεσσα	,00	0	0
	Νάουσα	4988,65	603	9541

	Σέρρες	2302,73	0	5320
<b>HIS</b>	Καρδίτσα	4264,66	0	15140
	Ιωάννινα	3170,42	1258	11495
	Καλαμάτα	4790,01	2598	6702
	Έδεσσα	2306,10	991	5110
	Νάουσα	518,55	0	2110
	Σέρρες	854,68	0	2645
<b>GLN</b>	Καρδίτσα	1857,49	0	26281
	Ιωάννινα	773,16	0	1828
	Καλαμάτα	1125,50	0	2611
	Έδεσσα	154,32	0	1108
	Νάουσα	44163,82	0	79774
	Σέρρες	35312,59	15381	85367
<b>GLY</b>	Καρδίτσα	30203,57	0	62047
	Ιωάννινα	15330,44	0	209996
	Καλαμάτα	13897,80	0	39455
	Έδεσσα	22337,90	0	46832
		<b>Mean</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
	Νάουσα	8057,35	0	67739
	Σέρρες	1097,01	0	6486
<b>ARG</b>	Καρδίτσα	1688,56	0	22307
	Ιωάννινα	12167,59	0	27475
	Καλαμάτα	7811,88	0	28420
	Έδεσσα	1994,13	0	22088
	Νάουσα	2254,63	0	11996
	Σέρρες	2122,96	0	10131
<b>THR</b>	Καρδίτσα	459,87	0	2763
	Ιωάννινα	2864,43	0	5581
	Καλαμάτα	2123,71	0	11567
	Έδεσσα	373,68	0	2921
	Νάουσα	27041,28	10263	48615
	Σέρρες	27552,01	13187	65073
<b>ALA</b>	Καρδίτσα	21787,58	15206	30581
	Ιωάννινα	26717,26	15547	36980
	Καλαμάτα	31343,47	11739	46800
	Έδεσσα	23669,06	6238	44826
	Νάουσα	3747,34	272	12131

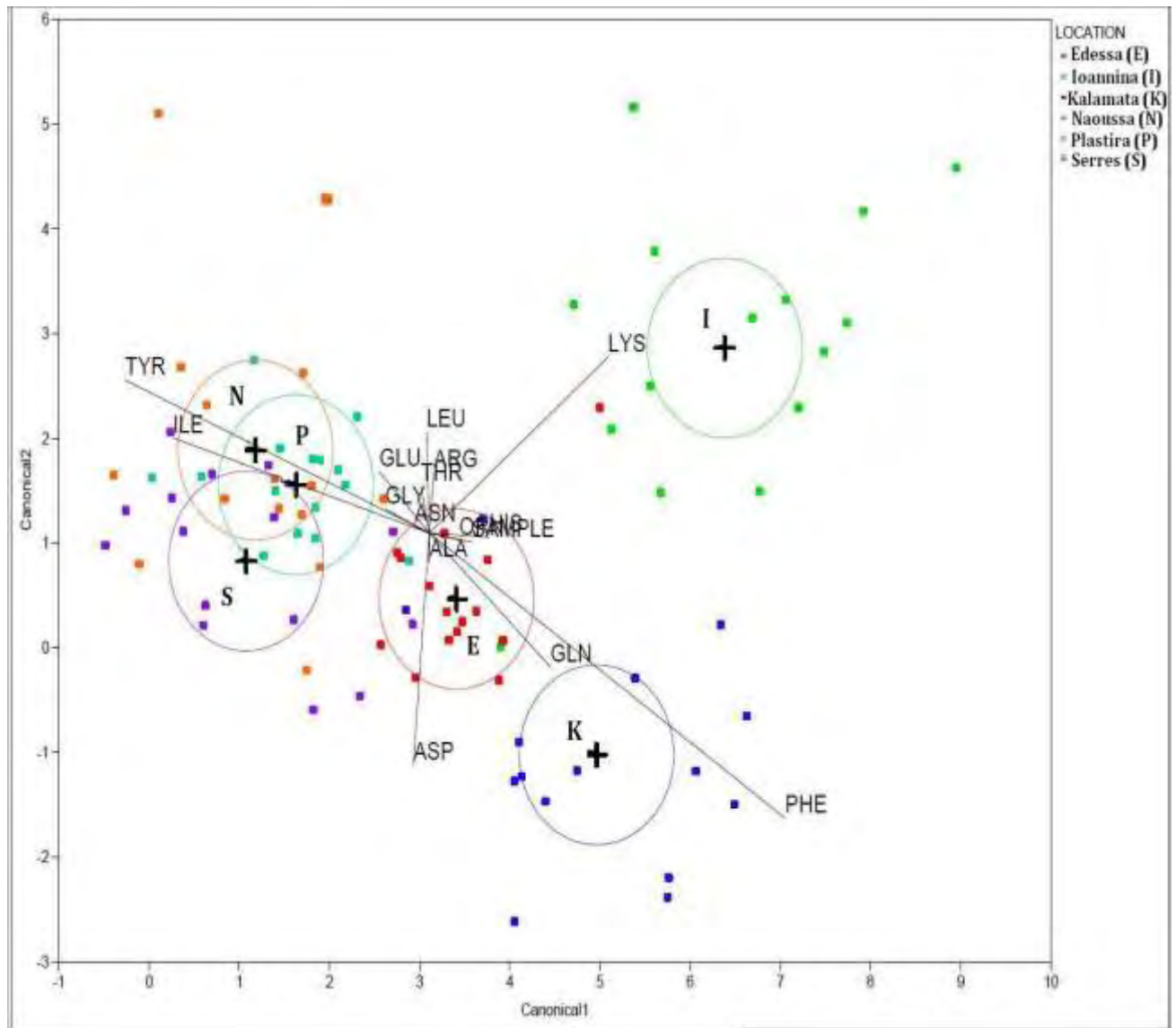
	Σέρρες	2769,23	154	6861
<b>TYR</b>	Καρδίτσα	1851,14	463	12915
	Ιωάννινα	2093,54	947	4155
	Καλαμάτα	2099,79	482	5413
	Έδεσσα	630,78	0	2277
	Νάουσα	2442,77	289	7875
	Σέρρες	1890,12	249	4578
<b>PHE</b>	Καρδίτσα	801,12	420	1545
	Ιωάννινα	1699,61	800	3246
	Καλαμάτα	1827,22	545	4981
	Έδεσσα	565,16	20	1564
	Νάουσα	2935,23	157	10060
	Σέρρες	2209,37	196	5741
<b>ILE</b>	Καρδίτσα	798,18	354	1612
	Ιωάννινα	1502,15	660	3397
	Καλαμάτα	1835,62	261	6576
	Έδεσσα	347,92	0	1310
		<b>Mean</b>	<b>Manimum</b>	<b>Maximum</b>
	Νάουσα	5268,77	465	18386
	Σέρρες	3799,42	499	10199
<b>LEU</b>	Καρδίτσα	2745,88	877	16747
	Ιωάννινα	3301,71	1702	6671
	Καλαμάτα	3599,98	776	11224
	Έδεσσα	890,80	296	2545
	Νάουσα	72,14	0	747
	Σέρρες	24,89	0	245
<b>ORN</b>	Καρδίτσα	,00	0	0
	Ιωάννινα	274,38	0	1388
	Καλαμάτα	242,36	0	598
	Έδεσσα	14,32	0	139
	Νάουσα	8357,34	1472	24506
	Σέρρες	6270,32	2421	11637
<b>LYS</b>	Καρδίτσα	3654,87	1910	5097
	Ιωάννινα	9755,62	3596	13775
	Καλαμάτα	6253,67	2388	15259
	Έδεσσα	3843,79	2485	7894

- Διαχωριστική ανάλυση και ανάλυση σε κύριες συνιστώσες

Η βασική ιδέα της διαχωριστικής ανάλυσης (discriminant analysis) είναι να κατατάξει παρατηρήσεις (συνήθως πολυδιάστατες) σε γνωστούς πληθυσμούς με γνωστές κατανομές για κάθε πληθυσμό. Αποτελεί μία μέθοδο με πλήθος εφαρμογών σε πολλές επιστήμες και έχει δύο στόχους. Τη διαχώριση ενός πληθυσμού σε ευδιάκριτα σύνολα και τη ταξινόμηση παρατηρήσεων στους προηγούμενους γνωστούς πληθυσμούς με γνωστές κατανομές για κάθε πληθυσμό, με τη βοήθεια ενός κανόνα.

Η μέθοδος των κυρίων συνιστωσών είναι μία τεχνική ανάλυσης δεδομένων με σκοπό τη δημιουργία καινούργιων μεταβλητών, οι οποίες είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών, έτσι ώστε να είναι ασυσχέτιστες μεταξύ τους και να περιέχουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών μεταβλητών. Οι νέες μεταβλητές που παράγονται ονομάζονται κύριες συνιστώσες. Αυτό που επιτυγχάνεται με τη μέθοδο αυτή, είναι ότι από ένα σύνολο συσχετισμένων μεταβολών καταλήγουμε σε ένα σύνολο ασυσχέτιστων μεταβλητών, το οποίο είναι χρήσιμο για αρκετές στατιστικές μεθόδους.

Οι πληθυσμοί Νάουσας, Σερρών και Πλαστήρα ομαδοποιήθηκαν ως προς το προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων και διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τους υπόλοιπους Έδεσσας, Ιωαννίνων και Καλαμάτας (Διαχωριστική Ανάλυση, Σχ. 3). Επίσης παρατίθενται οι συσχετίσεις μεταξύ των ελεύθερων αμινοξέων (Ανάλυση σε Κύριες Συνιστώσες, Σχ. 3).



Σχήμα 3. Διαχωριστική Ανάλυση και Ανάλυση σε Κύριες Συνιστώσες

## 5. Συζήτηση

Τα ελεύθερα αμινοξέα καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα και την αποδοχή του φιλέτου ως τελικού προϊόντος από τον καταναλωτή, επηρεάζοντας την οσμή και τη γεύση του (Haard 1992). Οι Belinsky et al. (1998) μελέτησαν διαφορετικά είδη πέστροφας στα οποία δεν παρατήρησαν σημαντικά στατιστικές διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών. Οι ίδιοι ερευνητές υποστήριξαν ότι ο τόπος αλιείας αποτελεί σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τη σύσταση των αλιευμάτων. Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί ότι το προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων στο γόνιο διαφορετικής προέλευσης αποτελεί καθοριστικό

παράγοντα για την εκκολαψιμότητά του (Ronnestad 1993). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι το σύνολο των ελεύθερων αμινοξέων στα φιλέτα της ιριδίζουσας πέστροφας, σε ένα πρωτόλειο στάδιο, φαίνεται να απεικονίζει ένα διακριτό γεωγραφικό πρότυπο των εκτροφών ανά περιοχή (βορειοδυτική και νότια Ελλάδα). Η ένδειξη αυτή διερευνάται σε συνδυασμό με τη χρήση μοριακών δεικτών (SNPs), αλλά και παραμέτρων, όπως τις μετρήσεις των ελεύθερων αμινοξέων στην τροφή των ιχθύων, τη σκληρότητα του νερού, την ιχθυοπυκνότητα, την ηλικία των ιχθύων και τον κύκλο σίτισης που ακολουθεί ο εκάστοτε εκτροφέας (Metusalach et al. 2000; Buentello Gatlin 2002). Η διατροφή αποτελεί σημαντικό παράγοντα και επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την σύσταση των αλιευμάτων. Οι Regost et al. (2001) μελέτησαν την επίδραση διαφορετικού διαιτολογίου σε διάρκεια τριών μηνών στην ιριδίζουσα πέστροφα και διαπίστωσαν σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Οι Jay και Kontou (1992) έδειξαν ότι τα ελεύθερα αμινοξέα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση των ιχθύων η οποία συμβαίνει κατά την ψύξη και συντήρησή τους. Σύμφωνα με τους Beljaars et al. (1998) οι αλλοιώσεις αυτές στους ιχθύες οφείλονται σε αλλαγές φυσικοχημικών παραμέτρων στις οποίες περιλαμβάνεται η παραγωγή βιογενών αμινών εξαιτίας της αποκαρβοξυλίωσης των ελεύθερων αμινοξέων των μικροβίων. Οι βιογενείς αμίνες σύμφωνα με τους Finne et al. (1998) αποτελούν δείκτες της αλλοίωσης των ιχθύων με επιπτώσεις στην οικονομία και στην υγεία του ανθρώπου. Η ιστιδίνη, η λυσίνη, η ορνιθίνη και η γλουταμίνη αποτελούν πρόδρομα μόρια για την παραγωγή των βιογενών αμινών όπως είναι η ισταμίνη, η πουτρεσκίνη και η καδαβερίνη (Sikorski et al 1990). Οι υψηλές συγκεντρώσεις της λυσίνης ήταν αναμενόμενες γιατί βρίσκεται σε επαρκείς ποσότητες στις πρωτεΐνες των αλιευμάτων (Iliadis 2004). Η μελέτες των El και Kanas (1996) σε μη επεξεργασμένα και σε επεξεργασμένα δείγματα (βραστά ή καπνιστά) δείγματα πέστροφας, έδειξαν ότι η περιεκτικότητα σε απαραίτητα αμινοξέα ήταν υψηλότερη στα μη επεξεργασμένα δείγματα σε σχέση με τα επεξεργασμένα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μέγιστη απώλεια λυσίνης και τρυπτοφάνης. Ορισμένα αμινοξέα όπως η γλουταμίνη, η θρεονίνη και η αλανίνη δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωσή τους, ενδεχομένως διότι επιτελούν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του RNA και DNA, στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και στη γλυκονεογένεση και μεταφορά αζώτου, αντίστοιχα (Van de Poll et al., 2005). Σε επόμενο στάδιο θα πραγματοποιηθεί προσπάθεια ανίχνευσης SNPs σε κύρια λειτουργικά γονίδια-στόχους τα οποία εμπλέκονται στο βιοχημικό μονοπάτι της γλυκονεογένεσης.

## Βιβλιογραφία

- A.J Martin, R.L Synge, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1358.
- Antoine F.R., Wei C.I., Littell R.C., Quinn B.P., Hogle A.D. and Marshall M.R. (2001) Free Amino Acids in Dark-and White-muscle Fish as Determined by O-phthaldialdehyde Precolumn Derivatization. *Journal of Food Science*, 66 (1): 72-77.
- A. Townshed, P.J Worsfold, S.J Haswell, R. Macrae, H.W Weerner, I.D Wilson, (ed.) *Encyclopedia of Analytical Science*, 1<sup>st</sup> ed., Academic Press Ltd., New York, (1995).
- Barrows FT, Hardy RW (2001) Nutrition and feeding. In: Wedemeyer G (ed) *Fish hatchery management*, 2nd edn. American Fisheries Society, Bethesda MD 20814-2199, USA
- Beljaars PR, Dijk RV, Jonker KM, Schout LJ.(1998).Liquid chromatographic determination of histamine in fish, sauerkraut, and wine: interlaboratory study. *J AOAC Int* 81 (5): 991-998
- Bender DA (1985) *Amino Acid Metabolism*, 2nd edn. Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- Berge, G.E., Sveier, H., Lied, E., 1998. Nutrition of Atlantic salmon (*Salmo salar*); the requirements and metabolic effect of lysine. *Comp. Biochem. Physiol.* 120A, 477– 485
- Blau,K and Halket, J.M *Handbook of Derivatives for Chromatography*, John Willey, Chinchester (1993) p. 355-358
- Damodaran S (1996) Amino acids, peptides and proteins. In: Fennema OR (ed.) *Food Chemistry*, 3rd edn. pp. 321–429. New York, NY: Marcel-Dekker.
- Framian BV (2009) Review of the EU aquaculture sector and results of costs and earnings survey. Reference No. FISH/2006/15 - Lot 6, 170p
- FAO (2010) *European Price Report*, Rome, 15p.
- Furst P and Young V (2000) Proteins, Peptides and Amino Acids in Enteral Nutrition. Nestle ' Nutrition Workshop Series Clinical & Performance Program, vol. 3. Vevey: Nestec Ltd and Basel: Kargern
- Fange, R., Grove, D., 1979. Digestion. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R.\_Eds., *Fish Physiology*, Vol. VIII. Academic Press, New York, pp. 162–260
- Gehrke CW, Wixom RL, and Bayer E (2001) *Chromatography a Century of Discovery 1900–2000, the Bridge to the Sciences/Technology*. Amsterdam: Elsevier.
- Haard N.F. (1992) Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*, 25: 289-307
- J. Kirkland *Anal. Chemistry*.,41 (1969) 219

- J.J Van Deemter, F.J Zuidrewg, A Klinkerbeg, Chem.Eng.Sci., 5 (1956) 271.
- Jay JM. 1992 . Modern food microbiology 4<sup>th</sup> Edition .New York: Chapman and Hall .p 221-233, 413-416
- J.C Giddings, Dynamics of Chromatography Principles and Theory, Dekker, New York, 1965
- Jandera, P.and Chuacck, J.(1986) Gradient Elution in Column Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam.
- Ketola, H. G. (1983) Requirement for dietary lysine and arginine by fry of rainbow trout. J. Anim. Sci. 56: 101-107.
- L.R Snyder , J.J Kirkland and J.L Glajch, Practical HPLC method development, 2<sup>nd</sup> ed.. John Wiley and Sons inc, New York , (1997)
- Laidlaw SA and Kopple JD (1987) Newer concepts of the indispensable amino acids. American Journal of Clinical Nutrition 46: 593–605
- Mambrini, M., Kaushik, S.J., 1995. Indispensible amino acid requirements of fish: correspondence between quantitative data and amino acid profiles of tissue proteins. J. Appl. Ichthyol. 11, 240–247
- Mente Eleni, Simeon Deguara, Maria Begona Santos, Dominic Houlihan. White muscle free amino acids concentration following feeding a maize gluten dietary protein in Atlantic Salmon (*Salmo Salar.L*). Aquaculture 225 (2003) 133–147.
- Metusalach, Brown J.A., Sharibi F. (2000) Variations in the contents of crude protein, total and free amino acids of Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) reared at different stocking densities. Journal of Aquatic Food Product Technology, 9 (3): 39-56.
- Morrey RK, Granner DK, Mayes PA and Rodwell VW (1996) Harper's Biochemistry, 24<sup>th</sup> edn. Stanford, CN: Appleton & Lange.
- M.S Tswett, Ber. Deutsch Boton Ges, 24 (1906) 384
- Miles CJ, Leong G. 1992. Glyphosate herbicide analysis by liquid chromatography with post-column reaction detection: column comparison and application notes. LC-GC 10(6):452-458.
- Newsholme P, Procopio J, LimaMMR, Pthion-Curi TC, and Curi R (2003) Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. Cell Biochemistry and Function 21: 1–9.
- P.W Emery M.C.G.,, Dejong C.H.C and Soeters P.B. (2005) Chemistry and Classification of Amino Acids. Elsevier Ltd. p 76-84.
- Pion (1976) Dietary effects and amino acids in tissues. In: Cole, D.J.A., Boorman, K.N., Buttery, P.J., Lewis, D., Eale, R.J.N., Swan, H.(Eds.),Protein Metabolism and Nutrition. Butterworth, London, pp. 259– 278
- Ronnestad I., Fyhn H.J. (1993) Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. Rev Fish Sci Japan 1: 239-259.
- Roger L. Bertholf, Ruth E Winecker( 2007) Chromatographic Methods in Clinical Chemistry and Toxicology, 2007 John Wiley & Sons, Ltd p.56-65
- S. Moore, W. Stein, J.Biol.Chem., 176 (1948) 367.



- S.M Lunte (2005) *Chromatographic Methods of Amino Acids*. Elsevier Ltd. p 61-69
- Skea, W.M. *Anal.(NY), High Performance Liquid Chromatography* (1989)p.98-100.
- Stryer, L. (1995). *Biochemistry*, 4th ed. Freeman, New York
- Singh BK and Shaner DL (1995) Biosynthesis of the branch chain amino acids: from test tube to the field. *Plant Cell* 7: 935–944
- Snyder, S. H. (2000). d-Amino acids as putative neurotransmitters: Focus on d-serine. *Neurochem. Res.* 25, 460–553
- Walton, M. J., Cowey, C. B. & Adron, J. W. (1984) The effect of dietary lysine levels on the growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 52: 115-122.
- Wu G and Morris SM (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal* 336: 1–17.
- W.Lough and I Wainer, *High Performance Liquid Chromatography*, Blackie Academic and professional (1996).
- Yang, F.G.J *High reversed phase Performance Liquid Chromatography Comm....*, 3 .(1983) p.348-350
- Young V, Bier DM, Cynober L, Hayashi Y, and Kadowaki M (eds.) (2003) *The third Workshop on the Assessment of adequate Intake of Dietary Amino Acids*. *J Nutr Supplement* 134: 1553S–1672S.
- Zubay, G. L. (1993). *Biochemistry*, 3rd ed. Brown, Dubuque, IA