

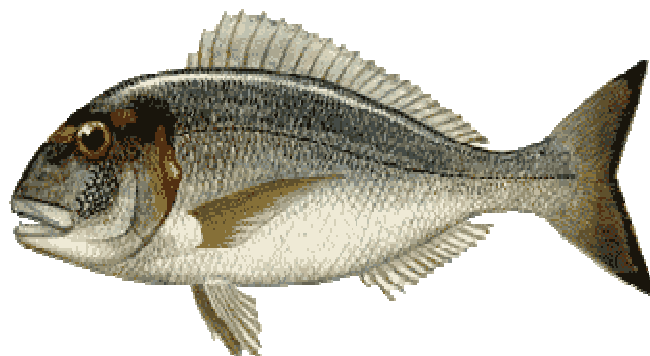


# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας **ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

***ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ. Γ. ΦΑΣΣΑΣ***




***Επίδραση της ποιότητας των διατροφικών  
πρωτεϊνών στο δείκτη αύξησης MLC2 στην  
τσιπούρα (*Sparus aurata*)***



**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2010  
ΛΑΡΙΣΑ**

***Επίδραση της ποιότητας των διατροφικών  
πρωτεϊνών στο δείκτη αύξησης MLC2 στην  
τσιπούρα (*Sparus aurata*)***

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

-  Μούτου Αικατερίνη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.
-  Μαμούρης Ζήσης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.
-  Σαραφίδου Θεολογία: Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην κα. Μούτου Αικατερίνη Επίκουρο καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του τμήματος, επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της τόσο στο πειραματικό στάδιο όσο και κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Θερμό ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω και στην υποψήφια διδάκτορα, κα. Γεωργίου Στέλλα για την πολύτιμη βοήθειά της και την άψογη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ τον κ. Ζήση Μαμούρη και τη κα. Θεολογία Σαραφίδου, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	6
1.1. Η τσιπούρα- γενικά χαρακτηριστικά και καλλιέργεια	6
1.2. Αρχές διατροφής και αύξησης	9
1.2.1. Οι υδατάνθρακες στη διατροφή των ψαριών	9
1.2.2. Κατηγοριοποίηση υδατανθράκων	10
1.3. Αντιθρεπτικοί παράγοντες	11
1.4. Τι είναι τα ιχθυάλευρα / ιχθυέλαια και από πού προέρχονται	12
1.5. Σύνθεση των τροφών	13
1.6. Χρησιμοποιούμενα συστατικά και περιορισμοί	14
1.7. Η ανάγκη να προσδιοριστούν νέα συστατικά των σιτηρεσίων	15
1.8. Δομή φιλέτου- λευκού μυ	17
1.9. Σπόροι οσπρίων	17
1.9.1. Τα μπιζέλια (κτηνοτροφικά) ως τροφή στην ιχθυοκαλλιέργεια	18
1.9.2. Τα ρεβύθια ως τροφή στην ιχθυοκαλλιέργεια	21
1.10. Δείκτες Αύξησης- η MLC2	22
1.11. Σκοπός της εργασίας	24
2. Υλικά και Μέθοδοι	25
2.1. Εκτροφή ψαριών	25
3. Αποτελέσματα	31
4. Συζήτηση	33
Βιβλιογραφία	37

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) - γενικά χαρακτηριστικά και καλλιέργεια

**Συστηματική κατάταξη:**

**Βασίλειο:** Ζώα (Animalia)

**Φύλο:** Χορδωτά (Chordata)

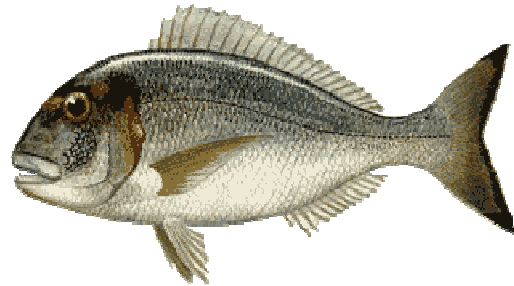
**Κλάση:** Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)

**Τάξη:** Περκόμορφα (Perciformes)

**Οικογένεια:** Σπαρίδες (Sparidae)

**Γένος:** *Sparus*

**Είδος:** *Sparus aurata*



**Μέγιστα μεγέθη:** Η τσιπούρα μπορεί να φτάσει σε μήκος τα 70 cm ενώ το μεγαλύτερο δημοσιευμένο βάρος για ψάρι του είδους είναι τα 17,2 kg. Το ψάρι έχει μέγιστη ηλικία τα 11 χρόνια σε συνθήκες κράτησης . <http://www.fishbase.org>.

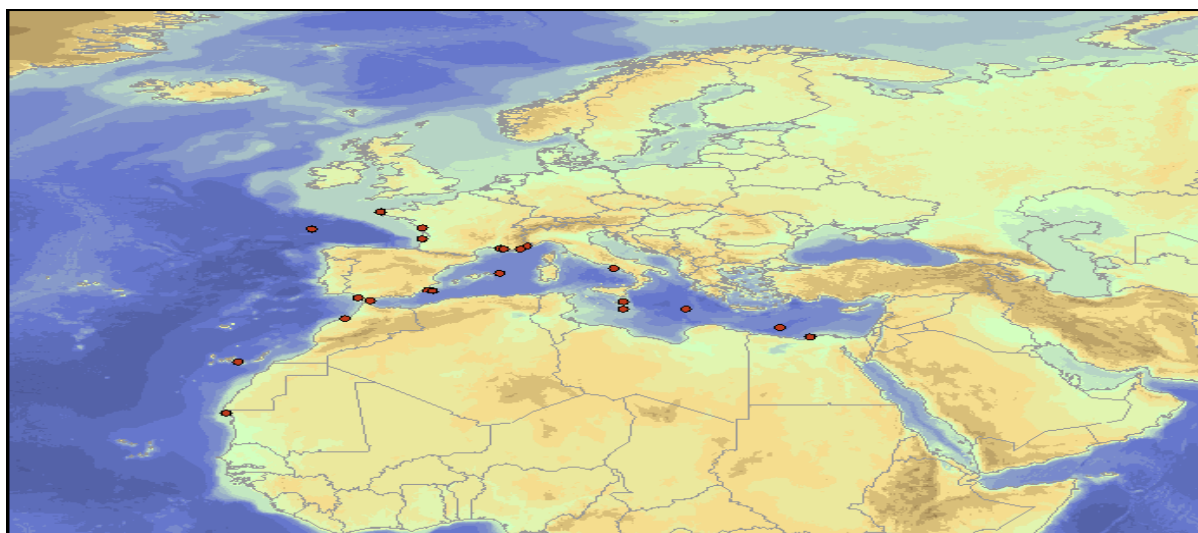
**Εξωτερικά χαρακτηριστικά:** Η εμφάνιση του ψαριού είναι λίγο πολύ γνωστή. Μια μεγάλη μαύρη κηλίδα στο τέλος του βραγχιακού επικαλύμματος σε ένα ασημένιο φόντο, είναι το σήμα κατατεθέν της τσιπούρας. Το έντονο κυρτό προφίλ, δίνει στο ψάρι μια όμορφη αγκριάδα και έναν αέρα κυριαρχίας. Οι κάθετοι ασημόγκριζοι χρωματισμοί που αποκτά το ψάρι όταν είναι λίγο νευρικό, όταν είναι σε περίοδο αναπαραγωγής ή όταν κυνηγά για να συλλάβει την τροφή του, ολοκληρώνει την εικόνα του ψαριού. <http://www.fishbase.org>

**Βιολογία/Αναπαραγωγή:** Η τσιπούρα είναι πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος, δηλαδή γεννιέται πρώτα ως αρσενικό και μετά το πέρας περίπου 3 χρόνων κάνει αναστροφή φύλου και γίνεται θηλυκό. Έτσι στα πρώτα δύο χρόνια της ζωής του ως αρσενικό, έχει 20-30 cm μήκος και ζυγίζει γύρω στα 350-400 g. Στον τρίτο χρόνο, που γίνεται θηλυκό, το μήκος της είναι συνήθως 33-40 cm και ζυγίζει από 600 g και πάνω. Η αναπαραγωγή της τσιπούρας λαμβάνει χώρα από τον Οκτώβριο μέχρι και το Δεκέμβριο στην ανοιχτή θάλασσα. Ένα θηλυκό, μπορεί να γεννάει 20.000-80.000 αυγά καθημερινά κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Ο γόνος που θα παραχθεί, θα κολυμπήσει στα ρηχά νερά, εκεί που μπορεί να βρει μεγαλύτερη ασφάλεια και αφθονία τροφής, όπου και θα μείνει μέχρι τον επόμενο Οκτώβρη. Μετά θα

ενσωματωθεί στο αρχικό κοπάδι, θα λαμβάνει μέρος στην αναπαραγωγή και θα το ακολουθεί στις μετακινήσεις του. Κάτι αξιοσημείωτο για την τσιπούρα είναι ότι ενώ μπορεί να είναι σε διαδικασία αλλαγής φύλου από αρσενικό σε θηλυκό, μπορεί να τη διακόψει, και να ξαναπαράξει σπέρμα για την ερχόμενη αναπαραγωγική περίοδο. <http://www.fishbase.org>

**Τόπος/τρόπος διαβίωσης:** Η τσιπούρα σχηματίζει κοπάδια πολυμελή ή ολιγομελή, ενώ κάποιες φορές, μεγάλα θηλυκά άτομα μπορεί να βρεθούν να κυνηγούν μόνα τους για μια περίοδο. Τα βάθη που κινούνται συνήθως είναι μέχρι τα 40 μέτρα, ενώ το μεγαλύτερο βάθος που έχει εντοπιστεί ψάρι είναι τα 150 μέτρα. Παρόλα αυτά ψάρια 5 - 6 κιλών, είναι πιθανόν να τα βρούμε σε αρκετά ρηχά νερά, λιγότερο από 10 μέτρα. Είναι ευρύαλο και ευρύθερμο είδος, γεγονός που καθορίζει σε πολύ μεγάλο βαθμό τον τρόπο ζωής του, καθώς και που το συναντάμε. Πιο συγκεκριμένα, την τσιπούρα μπορούμε να τη βρούμε όχι μόνο στη θάλασσα, αλλά και κοντά σε εκβολές ποταμών, μέσα σε λιμνοθάλασσες και μέσα σε ποτάμια σε κοντινή απόσταση από τη θάλασσα. Απαντάται συνήθως σε επίπεδους βυθούς με τραγάνα, λάσπη ή φύκια καθώς και σε λιβάδια ποσειδωνίας. Προτιμά αυτούς τους βιοτόπους, γιατί εκεί βρίσκει πιο εύκολα την τροφή της η οποία αποτελείται κυρίως από όστρακα, όπως μύδια, στρείδια και κυδώνια, και πιο σπάνια από θαλάσσια φυτά και φύκη. Θα τη βρούμε επίσης να κινείται και σε βυθούς, με πέτρες και πλάκες (όπου μπορεί και να βραχώσει), που συνορεύουν με τα προαναφερθέντα περιβάλλοντα. <http://www.fishbase.org>

**Εξάπλωση:** Στον Ατλαντικό εξαπλώνεται από τη Μεγάλη Βρετανία, στις ακτές της Πορτογαλίας, στα Στενά του Γιβραλτάρ ως το Πράσινο Ακρωτήριο και γύρω από τα Κανάρια νησιά έως τη Σενεγάλη, ενώ απαντάται στη Μεσόγειο και στη Μαύρη θάλασσα (Εικ. 1.1). Στην Ελλάδα συναντάται κυρίως στο Αιγαίο, από το Πόρτο Λάγος έως τα Δωδεκάνησα, καθώς και σε κόλπους όπως ο Θερμαϊκός, ο Σαρωνικός, ο Κορινθιακός, ο Πατραϊκός και τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου.



**Εικόνα 1.1.** Εξάπλωση του είδους *Sparus aurata*- ([www.fao.com](http://www.fao.com))

Κατά τον Barnabé (1990) και σύμφωνα με παρατηρήσεις κατά την εκτροφή, οι παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν την εξάπλωση του είδους είναι :

**Θερμοκρασία.** Η τσιπούρα εμφανίζει ταχύτερους ρυθμούς αύξησης σε θερμοκρασία 25 °C (Barnabé, 1990). Συναντιέται το χειμώνα σε θερμοκρασίες 5 °C – 6 °C και το καλοκαίρι σε θερμοκρασίες έως 25 °C – 27 °C. Μέγιστη θερμοκρασία επιβίωσης είναι 34 °C ενώ η ελάχιστη 5 °C.

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

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

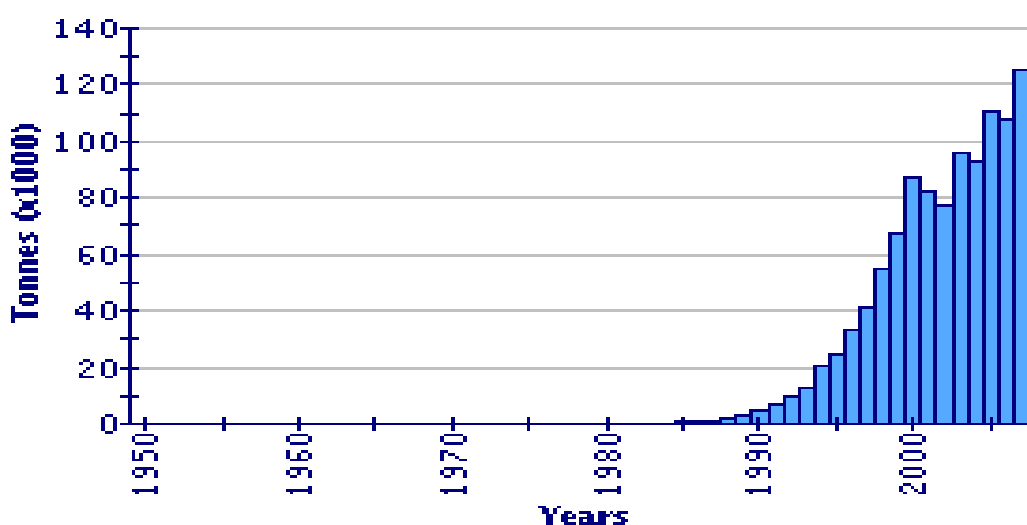
**Θολερότητα.** Η τσιπούρα δε φαίνεται να προτιμά τα θολά νερά των εκβολών των ποταμών ή των παράκτιων περιοχών κατά τις θαλασσοταραχές.

**Στατιστικά & οικονομικά μεγέθη** Είναι είδος ιδιαίτερης σημασίας για την αλιεία και τις ιχθυοκαλλιέργειες, καθώς και για την ερασιτεχνική αλιεία. Η ετήσια



παγκόσμια παραγωγή εκτρεφόμενης τσιπούρας σύμφωνα με στοιχεία του FAO (Εικ. 1.2) για το 2002 ανήλθε σε 80420 τόνους. Από αυτή την παραγωγή το 52,2% προέρχεται από την Ελλάδα. Η εντατική εκτροφή του είδους επιτυγχάνεται σήμερα σε όλα τα στάδιά της χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα. Σύμφωνα με την πρόσφατη έκθεση της Ομοσπονδίας Ευρωπαίων Υδατοκαλλιεργητών (Production and price reports of the member associations of the Federation of European Aquaculture Producers, 2001-2008):

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



**Εικόνα 1.2.** Παγκόσμια παραγωγή τσιπούρας σε ιχθυοκαλλιέργειες (FAO Fishery Statistic, [www.fao.com](http://www.fao.com))

## 1.2. Αρχές διατροφής και αύξησης

### 1.2.1. Οι υδατάνθρακες στην διατροφή των ψαριών

#### Γενικά

Ο ρόλος των υδατανθράκων στη διατροφή των εκτρεφόμενων ψαριών είναι αντικείμενο αρκετών μελετών (Wilson, 1994; Jauncey, 1998; Dabrowski & Guderley, 2002; Hemre et al., 2002; Krogh et al., 2005). Οι υδατάνθρακες είναι μη ουσιώδεις

στη διατροφή των ψαριών καθώς η ενέργεια που προμηθεύονται μπορεί να αντικατασταθεί από πρωτεΐνες ή λιπίδια και οι απαιτήσεις σε γλυκόζη μπορεί να επιτευχθούν από την γλυκονεογένεση (Hemre et al., 2002), ωστόσο οι υδατάνθρακες και ειδικά το άμυλο μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά (Wilson, 1994), για να ενισχύσουν την εξοικονόμηση πρωτεΐνης για ανάπτυξη και αύξηση (Jauncey, 1998). Οι υδατάνθρακες αποτελούν εγγενή- φυσικά συστατικά των σιτηρεσίων κυρίως αυτών που είναι φυτικής προέλευσης και σε αυτό το πλαίσιο κάποια διατροφική αναλογία είναι αναπόφευκτη. Εκτός από το χαμηλό κόστος τους ανά kJ και την αποτελεσματική επίδραση στις φυσικές ιδιότητες της διατροφής οι υδατάνθρακες αποτελούν σημαντικά συστατικά της διατροφής των ψαριών. (Jauncey, 1998; Krogdhal et al., 2005).

### **1.2.2. Κατηγοριοποίηση υδατανθράκων**

**Οι υδατάνθρακες** μπορούν να ταξινομηθούν σε μία σειρά από κατηγορίες σύμφωνα με την χημική τους δομή και τις ιδιότητές τους και αυτές ποικίλουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων τύπων υδατανθράκων (Knudsen, 1997). Η κύρια κατηγορία υδατανθράκων για τη διατροφή των ζώων είναι το άμυλο, οι διαιτητικές ίνες και η μικρού μοριακού βάρους ζάχαρη (LMW-sugars) ή ολιγοσακχαρίτες (Knudsen, 2001).

**Το άμυλο** αποτελείται από δύο κρυσταλλικά πολυμερή, την αμυλόζη και την αμυλοπεπτίνη, με την αμυλοπεπτίνη να είναι προσκολλημένη στην αμυλόζη (Gallant et al., 1992). Το άμυλο από την μεριά του κατηγοριοποιείται σύμφωνα με την πεπτική απόκριση σε ευκόλως πεπτώμενο άμυλο, αργά πεπτώμενο άμυλο και ανθεκτικό (Cairns et al., 1996). Η πεπτικότητα του αμύλου στα ψάρια ποικίλει και κυμαίνεται από 25-29% (Wilson, 1994; Shiau, 1997) και εξαρτάται από το είδος του ψαριού, την πολυπλοκότητα του αμύλου, το βαθμό συμμετοχής του στην διατροφή, τη στρατηγική διατροφής (Wilson, 1994).

**Οι ολιγοσακχαρίτες** ή α-γαλακτοσίδια συνθέτονται με ραφινάρισμα των βερμπασκόζη (verbascose) και σταχυόζη (stachyose) ως βασική μονάδα. Συχνά οι ολιγοσακχαρίτες είναι παρόντες στα όσπρια προκαλώντας αέρια (τυμπανισμό) ή διάρροια στα μονογαστρικά ζώα λόγω έλλειψης ενός ενζύμου α-γαλακτοζιδάσης που είναι απαραίτητο για τη διάσπαση των δεσμών ζάχαρης (Siddhuraju & Becker, 2001; Vinjamoori et al., 2004).

Οι διαιτητικές – φυτικές ίνες (Dietary Fibers DF) διακρίνονται σε λιγνίνη και σε μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες (NSP-Non Starch Polysaccharides) (Knudsen, 1997) και τις συναντάμε στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών (Knudsen, 2001). Βασικές μονάδες της λιγνίνης είναι το φαινυλοπροπένιο (phenylpropanes), οι μη αμυλούχοι πολυσακχαρίτες που διακρίνονται: σε υδατοδιαλυτούς μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες [Soluble Non Starch Polysaccharides (S-NSP)] και σε αδιάλυτους μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες [Insoluble Non Starch Polysaccharides (I-NSP)] (Knudsen, 1997; Knudsen, 2001). Στους S-NSP ανήκουν οι πηκτίνες, τα υδροκολλοειδή, ενώ στα I-NSP συμπεριλαμβάνονται οι κυτταρίνες και ημικυτταρίνες. Τα πιο κοινά μεμονωμένα μόρια και στις δύο ομάδες NSP είναι: η αραβινόζη, η ξυλόζη (πεντόζες), η μαννόζη, η γλυκόζη, η γαλακτόζη (εξόζες), η πανόζη, η 6-δεοξυχεξόζη, το ουρικό οξύ (γλουκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ) (Knudsen, 1997).

Στα ζώα συμπεριλαμβανομένου και των ψαριών υπάρχει έλλειψη ενζύμων για τη διάσπαση των μη αμυλούχων πολυσακχαριτών στο πεπτικό τους σύστημα και μπορεί να γίνει μόνο με ζύμωση με την εντερική χλωρίδα (Dabrowski & Guderley, 2002). Η παρουσία των S-NSP μειώνει το ρυθμό γαστρικής εκκένωσης και αυξάνει το χρόνο εκκένωσης της τροφής στο μικρό έντερο (van der Klis & van Voorst, 1993), ενώ οι αδιάλυτοι πολυσακχαρίτες προκαλούν το αντίθετο αποτέλεσμα (Kirwan et al., 1974).

### 1.3. Αντιθρεπτικοί παράγοντες

Φυτικά υλικά χρησιμοποιούνται στις ιχθυοτροφές αλλά η συμμετοχή τους είναι συχνά περιορισμένη λόγω των χαμηλών επιπέδων διαθεσιμότητας πρωτεΐνης και γευστικότητας σε σύγκριση με τα ζωικά προϊόντα καθώς και λόγω της παρουσίας αντιθρεπτικών παραγόντων (*Antinutritional factors- ANF*) (Tacon, 1993). Σημαντικούς ANF αποτελούν οι αναστολείς πρωτεασών (θρυψίνη και χυμοθρυψίνη), τα φυτικά οξέα (phytates), οι ταννίνες, οι λεκτίνες, οι ολιγοσακχαρίτες, και οι μη αμυλούχοι πολυσακχαρίτες (Francis et al., 2001). Η αδρανοποίηση τους περιλαμβάνει μια ποικιλία από μεθόδους όπως η αποφλοιώση, η βλαστική ικανότητα, η εμβάπτιση, η προσθήκη ενζύμων, η θερμική επεξεργασία (αυτόκαυστο = autoclave, υψηλή θέρμανση = roasting, εξώθηση = extrusion) (Francis et al., 2001). Με βάση την αντοχή τους στη θερμική επεξεργασία διακρίνονται: σε αυτούς που είναι i) θερμικά σταθεροί, όπως οι μη αμυλούχοι πολυσακχαρίτες και ii) θερμικά ευαίσθητοι όπως οι

αναστολείς πρωτεασών, το φυτικό οξύ και οι λεκτίνες. Ενδεικτικά συστατικά των ANF στο μπιζέλι, το ρεβίθι και τη φάβα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.

Αντιθρεπτικοί παράγοντες	μπιζέλι	φάβα	ρεβίθι
Ολιγοσακαχαρίτες (%)	3.69	2.93	1.99
Φυτικό οξύ (%)	0.48	0.66	0.63
Ταννίνες Σύνολο (%)	0.25	0.75	0.49
Δραστικότητα ταννίνων αποφλοιωμένων σπόρων ( $\text{mg g}^{-1}$ )	11.06	21.73	5.43
Δραστικότητα ταννίνων με κοτυληδόνες ( $\text{mg g}^{-1}$ )	0.16	0.22	0.11
Δραστικότητα αναστολέα θρυψίνης ( $\text{mg g}^{-1}$ )	1.01	0.39	4.79
Δραστικότητα αναστολέα χυμοθρυψίνης ( $\text{mg g}^{-1}$ )	1.60	0.40	7.72

#### 1.4. Τι είναι τα ιχθυάλευρα / ιχθυέλαια και από πού προέρχονται;

Τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια είναι τα κυριότερα συστατικά των **ιχθυοτροφών** με τις οποίες τρέφονται τα ψάρια της ιχθυοκαλλιέργειας. Οι ιχθυοτροφές πρέπει να προσδίδουν στο εκτρεφόμενο ψάρι τις απαραίτητες για την ανάπτυξή του πρωτεΐνες και λίπη. **Ως πηγή πρωτεϊνών και λιπών χρησιμοποιούνται τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια.** Τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια προκύπτουν από την επεξεργασία (άλεσμα) ορισμένων ειδών πελαγικών ψαριών τα οποία αλιεύονται κυρίως στον νότιο Ειρηνικό και βόρειο Ατλαντικό και είναι ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση, κυρίως λόγω του μικρού τους μεγέθους και της σκληρής σάρκας τους. Τα είδη αυτά των ψαριών, σχηματίζουν τεράστιους πληθυσμούς, πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και σε μεγάλους αριθμούς, μεγαλώνουν ταχύτατα και έχουν μικρή διάρκεια ζωής. Αλιεύονται σε μεγάλες ποσότητες και αποτελούν σπουδαιότατη πηγή άριστης ποιότητας πρωτεϊνών και ιχθυελαίου όχι μόνο για τις ανάγκες της παγκόσμιας ιχθυοκαλλιέργειας αλλά και της ζωικής παραγωγής εν γένει (κτηνοτροφία, πτηνοτροφία). Συγκεκριμένα, εκτιμάται ότι η ετήσια παγκόσμια παραγωγή ιχθυαλεύρου είναι περί τα 6,5 εκατομμύρια τόνοι, εκ των οποίων μόνο 2 εκατομμύρια τόνοι καταναλώνονται από την ιχθυοκαλλιέργεια. Αντιστοίχως, η ετήσια παραγωγή ιχθυελαίου είναι περί τα 1,2 εκατομμύρια τόνοι, εκ των οποίων η ιχθυοκαλλιέργεια καταναλώνει περίπου 450.000 τόνους.

## **Με τι είδους τροφές τρέφονται τα ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας;**

Τα ψάρια της ιχθυοκαλλιέργειας τρέφονται με τεχνητές ισορροπημένες πλήρεις ιχθυοτροφές που έχουν σύσταση ανάλογη των διατροφικών συνηθειών του κάθε είδους ψαριού στη φύση. Ανήκουν στην κατηγορία των ξηρών τροφών και παράγονται σε δύο μορφές αναλόγως του μεγέθους του εκτρεφόμενου ψαριού: σύμπηκτων (pellets) για τα μεγαλύτερα μεγέθη και κόκκου (granulated meal) για τις μικρές ηλικίες. Η διαδικασία παραγωγής τους περιλαμβάνει την προκατεργασία των νωπών πρώτων υλών που είναι κυρίως ιχθυάλευρα, ιχθυέλαια (fish meal & fish oil) και δημητριακά, την προσθήκη βιταμινών και ιχνοστοιχείων (απαραίτητων για την φυσιολογική ανάπτυξη των ψαριών) και τέλος αμύλου (starch) για τη συγκόλληση των συστατικών μεταξύ τους.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης πλήρων τεχνητών ιχθυοτροφών είναι ότι:

- παράγονται σε **εξειδικευμένες** βιομηχανικές εγκαταστάσεις με χρήση σταθερών συνθηκών παραγωγής και πιστοποιημένων πρώτων υλών με αποτέλεσμα να είναι υγειονομολογικά ασφαλείς
- διαθέτουν **ελεγχόμενα φυσικά χαρακτηριστικά** (σχήμα, μέγεθος, πυκνότητα, χρώμα)
- η σύνθεσή τους είναι ελεγχόμενη και άρα έχουν **σταθερή και γνωστή διατροφική αξία και οργανοληπτικές ιδιότητες**

Τέλος, ακριβώς επειδή οι τεχνητές ιχθυοτροφές έχουν σαν κύρια πρώτη ύλη το ιχθυάλευρο, το οποίο προέρχεται πάλι από ψάρια με αντίστοιχο προφίλ θρεπτικών ουσιών, πρωτεϊνών και κύρια πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, **διατηρούν στο ακέραιο τις πολύτιμες ιδιότητες που έχει το ψάρι ως τρόφιμο, οι οποίες με τη σειρά τους και με βάση την αρχή του «είσαι ότι τρώς» μεταφέρονται αυτούσιες στο ψάρι ιχθυοκαλλιέργειας.**

## **1.5. Σύνθεση των τροφών**

Η επιτυχής παραγωγή ψαριών εξαρτάται από σιτηρέσια που περιέχουν τα βέλτιστα επίπεδα ενέργειας και θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη. Τα διαιτητικά παρασκευάσματα είναι ένας συμβιβασμός μεταξύ της ιδανικής κατάστασης και

πρακτικής θεώρησης (Hardy & Barrows, 2002). Ο κύριος στόχος κατά τη διαμόρφωση μιας τροφής για ψάρια είναι η προσφορά ενός ισορροπημένου μίγματος διατροφής από συστατικά για την υποστήριξη της διατήρησης της ανάπτυξης, της αναπαραγωγής και της υγείας των σε προσιτό κόστος (NRC, 1993). Κρίσιμο ακόμα είναι οι τροφές (σύμπληκτα) να παραμένουν ανέπαφες στο νερό μέχρι να καταναλωθούν από τα ψάρια, ενώ τα θρεπτικά συστατικά θα πρέπει να είναι διαθέσιμα σε μεγάλο βαθμό για την ελαχιστοποίηση των απεκκρίσεων και την αποφυγή δημιουργίας οργανικού ιζήματος στον πυθμένα με πιθανές επιπτώσεις στο ίζημα κάτω και γύρω από τους κλωβούς. (Mente et al., 2006)

## **1.6. Χρησιμοποιούμενα συστατικά και περιορισμοί**

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται σε εμπορικές δίαιτες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως πηγές πρωτεΐνης (αμινοξέα), λίπη (EFA) [Essential Fatty Acid], υδατάνθρακες, βιταμίνες και μέταλλα (NRC 1993). Η διαθεσιμότητα των ιχθυάλευρων είναι περιορισμένη λόγω της σταθερής παραγωγής και αύξησης της ζήτησης (SOFIA, 2006) και για αυτό είναι ακριβό συστατικό (Josupeit, 2008) που συνεισφέρει πολύ στο τελικό κόστος των σιτηρεσίων. Το σογιάλευρο είναι ένα διαθέσιμο συστατικό με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη με ένα από τα καλύτερα προφίλ σε αμινοξέα ανάμεσα σε πλούσιες πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης για ζωοτροφές περιέχοντας τα περισσότερα από τα σημαντικότερα απαιτούμενα αμινοξέα για τα ψάρια (Mohsen, 1989). Έχει χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο των ζωικών πρωτεϊνών για ιχθυοκαλλιέργειες. Οι ANF που απαντώνται στους σπόρους της σόγιας και η μεγάλη αύξηση των τιμών τα τελευταία έτη (Josupeit, 2008) είναι περιοριστικοί παράγοντες για τη χρήση τους στα σιτηρέσια. Επιπλέον οι αυστηροί κανόνες της E.E. που εγκρίθηκαν το 2003 σχετικά με την απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων σπόρων στο περιβάλλον, η ιχθυλασιμότητα, η σήμανση και η χρήση τους στις ζωοτροφές (Euractiv, 2006) αποδείχθηκε περιοριστικός παράγοντας στη χρήση τους στις ιχθυοτροφές.

Χρησιμοποιούνται πολλές άλλες πηγές φυτικών πρωτεϊνών, όπως πρωτεΐνες που εξάγονται από ελαιούχους σπόρους όπως η ελαιοκράμβη, ο ηλίανθος, πρωτεΐνες από δημητριακά όπως το σιτάρι και η γλουτένη αραβοσίτου (Aslaksen et al., 2007). Η

διαθεσιμότητα είναι μεγάλη, αλλά η χρήση τους είναι περιορισμένη είτε λόγω των ANF (Aslaksen et al., 2007), είτε λόγω ανισορροπίας των αμινοξέων όπως για παράδειγμα η ανεπάρκεια λυσίνης στη γλουτένη (Davies et al., 1997; Pereira & Oliva-Teles, 2003).

Φυτικά έλαια όπως σόγιας, κάνολας (Glencross et al., 2003), λιναρόσπορου (Bell et al., 2004), ελαιοκράμβης και φοινικέλαιου (Karalazos, 2007) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα των ιχθυελαίων, αν και η σύνθεση των λιπαρών οξέων τους διαφέρει σημαντικά από τα φυτικά έλαια που περιέχουν χαμηλότερο επίπεδο των ω-3 λιπαρών οξέων (ειδικά ακόρεστα λιπαρά οξέα HUFA-Highly Unsaturated Fatty Acids) απ' ό,τι τα ιχθυέλαια.

Πηγές υδατανθράκων όπως τα δημητριακά βρίσκονται στη διατροφή των ψαριών ως συνδετικό υλικό καθώς είναι μια όχι ακριβή πηγή ενέργειας (Davis & Arnold, 1995).

Πολλά υποπροϊόντα της βιομηχανίας σπόρων όπως για παράδειγμα το σιτάρι, η βρώμη, το καλαμπόκι, το ρύζι ή υποπροϊόντα σίκαλης είναι πολύτιμα συστατικά για τις ζωοτροφές και κατά συνέπεια για τις ιχθυοτροφές (Hardy & Barrows, 2002).

Όσπρια όπως τα μπιζέλια, τα φασόλια και τα ρεβύθια περιέχουν σημαντικές ποσότητες αμύλου που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν από τα ψάρια ως πηγή ενέργειας (Booth et al., 2001). Η χρήση αυτών των φυτικών συστατικών μπορεί να περιοριστεί όταν οι περιεχόμενες ίνες είναι υψηλές (Nengas et al., 1995) ή όταν δεν υποβάλλονται σε επεξεργασία όπως το ανεπεξέργαστο άμυλο που θεωρείται φτωχή πηγή ενέργειας (Peres & Oliva-Teles, 2002).

## **1.7. Η ανάγκη να προσδιοριστούν νέα συστατικά των σιτηρεσίων**

Η σημερινή γενική οικονομική και επισιτιστική κρίση που επέφερε η αύξηση των τιμών του πετρελαίου, καθώς και η επέκταση της βιομηχανίας βιο-αιθανόλης και βιοντίζελ έχουν δημιουργήσει ένα ασταθές μέλλον για την παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών και των τιμών εν γένει. Η αυξανόμενη ζήτηση, οι τιμές και οι διακυμάνσεις στην προσφορά της παγκόσμιας αγοράς για τα ιχθυάλευρα, ιχθυέλαια, σογιάλευρα, τον αραβόσιτο και το σιτάλευρο, τονίζουν την ανάγκη να μειωθεί η ενσωμάτωσή τους στις ιχθυοτροφές και ταυτόχρονα αυξάνουν το φάσμα των πρώτων υλών.

Η παραγωγή των ιχθυάλευρων και των ιχθυελαίων έχει πάνω κάτω σταθεροποιηθεί

κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών (SOFIA, 2006) ενώ φαινόμενα όπως το El Ninio την περίοδο 1997-98 έδειξαν ότι μπορούν να προκαλέσουν απρόβλεπτες αλλαγές στις πρώτες ύλες για την παραγωγή ιχθυελαίων και ιχθυάλευρων για τις ιχθυοκαλλιέργειες τις συγκεκριμένες χρονιές.

Επιπλέον, δεδομένου ότι η ευρωπαϊκή παραγωγή σόγιας είναι εξαιρετικά περιορισμένη, λόγω των κλιματικών και γεωγραφικών περιορισμών (Gouveia & Davies, 1998) αξίζει η διερεύνηση των δυνατοτήτων χρήσης άλλων φυτικών πηγών, που καλλιεργούνται στις ευρωπαϊκές και μεσογειακές χώρες, περιορίζοντας έτσι τις δαπάνες της εισαγωγής. Τα μπιζέλια, τα ρεβύθια, τα φασόλια και η φάβα έχουν υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο και άμυλο και θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν επιτυχώς το σιτάρι και μερικώς τις διατροφικές πρωτεΐνες φυτικής ή ζωικής προέλευσης.

Τα τελευταία χρόνια ένας σημαντικός αριθμός ερευνών διεξάγεται για τη μερική ή ολική αντικατάσταση των διατροφικών πρωτεϊνών των ψαριών από άλλες πηγές πρωτεΐνης εκτός του ιχθυάλευρου (Luquet & Kaushik, 1978; Pfeffer, 1982).

Η ποιότητα μιας διαιτητικής πρωτεΐνης εξαρτάται τόσο από την πεπτικότητα όσο και από το προφίλ των αμινοξέων (Kaushik & Cowey, 1991). Εκτός από την σύνθεση των αμινοξέων που συχνά δεν είναι ισορροπημένη (Liener, 1980; NRC, 1981; Kaushik & Luquet, 1984; Tacon & Cowey, 1985), ενδογενείς αντιθρεπτικοί παράγοντες είναι οι κύριες αιτίες για την περιορισμένη χρήση των φυτικών πρώτων υλών στις ιχθυοκαλλιέργειες (Chubb, 1982; Richardson et al., 1985; Gatlin & Phollips, 1989; Satoh et al., 1989). Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες, όπως αναστολείς πρωτεασών μπορούν να απενεργοποιηθούν με υγρή, θερμική επεξεργασία, ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων διατροφής, τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας και των συνθηκών εργασίας που χρησιμοποιούνται (Hanson, 1974; Rackis 1974; Grant 1989).

Η μείωση των επιπέδων των ιχθυάλευρων στην διατροφή των ψαριών είναι μία μεγάλη πρόκληση για την εντατική ιχθυοκαλλιέργεια. Τα πιθανά υποκατάστατα θα πρέπει να παρέχουν τόσο υψηλό πρωτεϊνικό επίπεδο για τις ανάγκες των ψαριών όσο και τα απαραίτητα αμινοξέα.



## 1.8. Δομή φιλέτου - λευκού μυ

Ο μηχανισμός ανάπτυξης στους τελεόστεους όπως τα σολωμοειδή που φτάνουν σε μεγάλο μέγεθος σώματος στα ενήλικα διαφέρει από τα ανώτερα σπονδυλωτά. Η αύξηση του μυ στα ψάρια επιτελείται τόσο μέσω **υπερτροφίας** (αύξηση του μεγέθους των υπάρχοντων μυϊκών ινών) όσο και **υπερπλασίας** (δημιουργία νέων μυϊκών ινών) όχι μόνο πριν από την εκκόλαψη αλλά κυρίως κατά τα διάρκεια των προνυμφικών σταδίων και του μεγαλύτερου τμήματος της ενήλικης ζωής τους (Rowlerson & Veggetti, 2001). Στους περισσότερους τελεόστεους η αξονική σκελετική μυϊκή μάζα (axial skeletal muscle mass) αντιπροσωπεύει πάνω από το 60% της μάζας σώματος. Αυτοί οι μυς αποτελούνται κυρίως από λευκές ίνες (πάνω από το 90%), καλυπτόμενες από λεπτό επιφανειακό στρώμα ερυθρών μυϊκών ινών και βρίσκονται κάτω από το δέρμα, και ένα στρώμα ενδιάμεσων ινών ανάμεσα από αυτές. Αλλαγές στη σωματική ανάπτυξη των ψαριών κατά κύριο λόγο οφείλονται σε αλλαγές στο σύνολο της ανάπτυξης του λευκού μυ οι οποίες οφείλονται σε διακυμάνσεις της μυϊκής υπερτροφίας ή υπερπλασίας. Αλλαγές στη σχετική συνεισφορά της υπερπλασίας και υπερτροφίας στη μυϊκή ανάπτυξη οδηγούν σε αλλαγές στη μυϊκή κυτταρική κατάσταση (κατανομή του μεγέθους των μυϊκών ινών). Έχει αποδειχθεί ότι στο λευκό ιστό των νεαρών ψαριών τέτοιες αλλαγές της κυτταρικής δομής συνδέονται με αλλαγές σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως αύξηση της θερμοκρασίας (Weatherley et al., 1979, 1980b), της θερμοκρασίας επώασης (Johnston et al., 2000; Alami-Durante et al., 2007), της φωτοπεριόδου (Johnston et al., 2003) και στις εποχιακές εναλλαγές της θερμοκρασίας (Alami-Durante et al., 2007). Τροποποίηση της δομής του λευκού μυ συμβαίνει ακόμα και σε νεαρά ψάρια με αλλαγές στο επίπεδο της διατροφής (Weatherley et al., 1979, 1980b; Kiessling et al., 1989, 1991) και σε αλλαγές στο πρωτεϊνικό επίπεδο διατροφής (Johnston et al., 2002; Bjornevik et al., 2003).

## 1.9. Σπόροι οσπρίων

### Γενικά.

Τα όσπρια ανήκουν στην οικογένεια Fabacea. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διατροφικές συνήθειες των ανθρώπων λόγω της υψηλής θρεπτικής τους αξίας. Είναι

χαμηλά σε λιπαρά και είναι πολύ καλή πηγή πρωτεΐνης, διαιτητικών/φυτικών ινών και ποικίλων ιχνοστοιχείων και φυτοχημικών (Messina,1999). Ο καρπός τους αποτελεί σημαντική πηγή πρωτεϊνών, σύμπλοκων υδατανθράκων, βιταμινών όπως Α, Β1, Β2, Β6, Β12, και ιχνοστοιχείων όπως ασβέστιο, σίδηρο, μαγνήσιο, κάλιο κτλ. Η περιεκτικότητα των οσπρίων σε αμινοξέα, συγκρινόμενη με αυτή του σογιάλεου, είναι πλούσια σε λυσίνη με εξαίρεση τα λούπινα και τα κουκιά, ενώ περιέχουν μειωμένη ποσότητα θειούχων αμινοξέων, μεθειονίνης και κυστίνης.

Τα υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών των οσπρίων, με την προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας μεθειονίνης, καθιστούν τα όσπρια πολλά υποσχόμενα υποψήφια ως υποκατάστατα του ιχθυάλεου και του σογιάλεου στα σιτηρέσια των ιχθύων. Επίσης, το υψηλό ποσοστό των περιεχόμενων πεπτών υδατανθράκων δύναται να υποκαταστήσει τις ήδη χρησιμοποιούμενες πηγές ενέργειας όπως το ζελατινοποιημένο άμυλο και το σίτο. Η περιεκτικότητα τους όμως σε αντιθρεπτικούς παράγοντες, απαραίτητους στο φυτό για την ανάπτυξη και την προστασία του (Gatehouse, 87, Bond & Smith, 89), έχουν αρνητικές συνέπειες στην αξιοποίηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής. Είναι γνωστό ότι μειώνουν την αξιοποίηση της τροφής επηρεάζοντας αρνητικά την αύξηση και την υγεία του ζωικού οργανισμού, περιορίζοντας έτσι τη χρήση τους ως συστατικά των σιτηρεσίων.

### **1.9.1. Τα μπιζέλια (κτηνοτροφικά) ως τροφή στην ιχθυοκαλλιέργεια**

Τα μπιζέλια (*Pisum sativum* L.) είναι ένα όσπριο με δυνατότητες χρήσης λόγω του ότι έχει χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή για πολλά χρόνια ως πηγή ενέργειας και πρωτεΐνης, αλλά μόλις πρόσφατα αξιολογήθηκε για ιχθυοτροφή (Davis et al., 2002). Ο μέσος όρος πρωτεΐνης που περιέχεται είναι γύρω στο 21% που είναι λίγο συγκρινόμενο με τη σόγια και τα λούπινα, αλλά είναι υψηλός σε σχέση με τα δημητριακά, είναι πλούσιο σε άμυλο (γύρω στο 45%) και έχει ενεργειακό περιεχόμενο  $15.8 \text{ kJg}^{-1}$  (Sauvant et al., 2004). Τα μπιζέλια έχουν αξιολογηθεί ως πιθανό συστατικό τροφής, ολόκληρα ή αποφλοιωμένα, ακατέργαστα ή επεξεργασμένα, για αρκετά θαλάσσια είδη συμπεριλαμβανομένου του Ευρωπαϊκού λαυρακιού (Gouveia & Davies, 1998; 2000), της Αυστραλιανής Ασημί πέρκας (Allan et al., 2000), του Ατλαντικού σολωμού (Carter & Hauler, 2000), και άλλων ειδών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.2. Σε γενικές γραμμές οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι τόσο το αποφλοιωμένο μπιζέλι όσο και το εκχύλισμα έχουν υψηλότερο

*Φαινομενικό Συντελεστή Πεπτικότητα* (Apparent Digestibility Coefficients -ADCs) για ενέργεια και ακατέργαστη πρωτεΐνη απ' ότι ολόκληρο ή ακατέργαστο το μπιζέλι αντίστοιχα (Booth et al., 2001, 2002; Davis et al., 2002; Thiessen et al., 2003; Allan & Booth, 2004). Παρουσιάζουν βιολογική δραστικότητα δευτερογενών μεταβολιτών που μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και ασκούν την επίδρασή τους σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες. Ορισμένες κατηγορίες αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών παρουσιάζουν δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των φυσικών οιστρογόνων και είναι γνωστά ως φυτοοιστρογόνα. Οι ισοφλαβόνες, αποτελούν ένα σημαντικό τμήμα της κατηγορίας των φυτοοιστρογόνων και υπάρχουν στα όσπρια, με αποδεδειγμένες συνέπειες για την ανάπτυξη των μυών. Η συγκέντρωση των ισοφλαβίνων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τα είδη των ψυχανθών, την ποικιλία, την περιοχή καλλιέργειας και το χρόνο.

**Πίνακας 1.2: Πεπτικότητα πρωτεΐνης και ενέργειας του μπιζελιού για διάφορα είδη εκτρεφόμενων ψαριών**

Είδος ψαριού	Ποσοστό στην τροφή	Μπιζέλι	% Πεπτικότητα πρωτεΐνης	% Πεπτικότητα ενέργειας	Αναφορές
Silver perch <b>Ασημί πέρκα</b> <i>Bidyanus bidyanus</i>	50%	Πλήρες εκχύλισμα Αποφλοιωμένο εκχύλισμα Πλήρως νωπό Νωπό Αποφλοιωμένο	85.3 90.4 84.3 87.8	71.3 74.9 63.7 70.1	Allan & Booth (2004)
Silver perch <b>Ασημί πέρκα</b>	15%, 30% 45%, 60% 75%	Αποφλοιωμένο	Ο ρυθμός αύξησης μειώνεται καθώς μεγαλώνει το ποσοστό στην τροφή		Booth & Allan (2003)
<b>Ιριδίζουσα πέστροφα</b> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	20%	Πλήρως νωπό Αποφλοιωμένο νωπό Αποφλοιωμένο εκχύλισμα Αερόβια πρωτεΐνη	90.9* 91.4* 93.5* 94.6*	54.6* 56.8* 78.4* 87.0*	Thiessen et al. (2003)
<b>Λευκή γαρίδα</b> <i>Litopenaeus vannamei</i>	25%	Πλήρως νωπό Πλήρες εκχύλισμα Αποφλοιωμένο νωπό Αποφλοιωμένο εκχύλισμα Πλήρως μικροιονισμένο	77.4 81.6 78.1 79 83.3	72.6 76.7 77.3 79.1 78.9	Davis et al. (2002)
<b>Τσίπουρα</b> <i>Sparus aurata</i>	17.5% (1) 35% (1) 19% (2) 37% (2)	1. Αποφλοιωμένο από-ινομένο πολτοποιημένο εκχύλισμα 2. Υπεριώδης ακτινοβολία	92.8 81.4 89.7 90	92.2 77.7 79.7 68.7	Pereira & Oliva-Teles (2002)
Silver perch <b>Ασημί πέρκα</b>	15%	Ψυχρά σύμπηκτα Σύμπηκτα σε ατμό) Εκχύλισμα	78.9 83.7 80.7	58.6 63.5 70.0	Booth et al. (2002)
Silver perch <b>Ασημί πέρκα</b>	30%	Πλήρως αποφλοιωμένο Συμπλήρωμα πρωτεΐνης)	87.6 89.2 92.4	71.6 75.3 82.4	Booth et al. (2001)
<b>Λαβράκι</b> <i>Dicentrarchus labrax</i>	20% 40%	Άλευρο μπιζελίου	88.4 89.1	73.6 72.1	Russell et al. (2001)
<b>Μπλε γαρίδα</b> <i>Litopenaeus stylirostris</i>	30%	Πλήρως νωπό Πλήρες εκχύλισμα Αποφλοιωμένο νωπό Αποφλοιωμένο	87.3 89.3 89.1 88.2 87.7	-	Cruz-Suarez et al. (2001)

		εκχύλισμα πλήρες μικροιονισμένο			
Silver perch Ασημί πέρκα	29.7%	Άλευρο μπιζελιού	81*	51*	Allan et al. (2000)
Λαβράκι <i>Dicentrarchus labrax</i>	10% 20% 30%	Άλευρο μπιζελιού	94.2 94.3 94	90.8 89.6 88.4	Gouveia & Davies (2000)
Σολωμός <i>Salmo salar</i>	20.5 27.5	Εκχύλισμα συμπυκνωμένης πρωτεΐνης	95.2 95.5	88.8 89.2	Carter & Hauler (2000)
Τιλάπια <i>Oreochromis niloticus</i>	30%	Εκχύλισμα αλεύρου μπιζελιού	92.6*	89.2*	Fontainhas- Fernandes et al. (1999)
Λαβράκι <i>Dicentrarchus labrax</i>	20% 40%	Άλευρο μπιζελιού	88.4 89.1	64.8 56.7	Gouveia & Davies (1998)
Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	30%	Άλευρο μπιζελιού	80.4*	59.2*	Gomes et al. (1995a)

\*Ο αστερίσκος αντιπροσωπεύει την φαινομενική πεπτικότητα του συστατικού που συμπεριλαμβάνεται στα διατροφικά τεστ.

### 1.9.2. Τα ρεβύθια ως τροφή στην ιχθυοκαλλιέργεια

Το ρεβύθι (*Cicer arietinum* L.) καλλιεργείται σε τροπικές, υποτροπικές περιοχές και εύκρατες περιοχές ως ετήσια καλλιέργεια και παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην ξηρασία (Bhardwaj et al., 1999). Υπάρχουν δύο κατηγορίες ρεβιθιού, το desi και το kabuli, που διαφέρουν στη θρεπτική σύσταση, με το kabuli να έχει χαμηλότερες ίνες, περισσότερο άμυλο και λίπη απ' ότι ο τύπος desi (Gill et al., 1996). Ο μέσος όρος περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη του Μεσογειακού τύπου kabuli είναι 20%, άμυλο 45% και ενέργεια 17.5kJg<sup>-1</sup> (Sauvant et al., 2004).

Έχει αξιολογηθεί ως πιθανό συστατικό τροφής για ψάρια από τον Allan et al. (2000) και Booth et al. (2001) για την ασημί πέρκα.

**Πίνακας: 1.3. Πρωτεϊνική και ενεργειακή πεπτικότητα του ρεβυθιού σε τροφές ψαριών**

Είδος	Βαθμός Συμπερίληψη	Ρεβύθι	% Πεπτικότητα πρωτεΐνης	% Πεπτικότητα ενέργειας	Αναφορές
Silver perch <b>Ασημί πέρκα</b> <i>Bidyanus bidyanus</i>	29.7%	<b>Ολόκληρο ρεβύθι</b> ( τύπος desi )	82.2*	54.8*	Allan et al. (2000)
Silver perch <b>Ασημί πέρκα</b>	29.7%	<b>Ολόκληρο ρεβύθι αποφλοιωμένο</b>	88.1 87.5	72.1 74.2	Booth et al. (2001)
Silver perch <b>Ασημί πέρκα</b>	29.7%	<b>Ολόκληρο ρεβύθι αποφλοιωμένο</b>	79.2* 79.8*	54.8* 61.3*	Booth et al. (2001)

\*Ο αστερίσκος αντιπροσωπεύει φαινομενική πεπτικότητα του συστατικού στα τεστ διατροφής.

### 1.10. Δείκτες Αύξησης- η MLC2.

Η μυοσίνη είναι το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό του γραμμωτού μυ και αποτελείται από δύο βαριές (MHCs) και τέσσερις ελαφριές αλυσίδες (MLCs) οι οποίες συνδυάζονται για να σχηματίσουν ένα μεγάλο κολλοειδές με α-ελικοειδή ουρά και δύο κεφαλές. Κάθε κεφαλή περιέχει ένα τμήμα δέσμησης ακτίνης και δραστηριότητα ATPσης. Οι ελαφριές αλυσίδες κατηγοριοποιούνται σε δύο κατηγορίες: την αλκαλική και του δινιτροβενζονικού οξέος (DTNB) – αφαιρούμενες ελαφριές αλυσίδες (Weeds & Lowey, 1971). Στο γραμμωτό μυ υπάρχουν δύο διαφορετικές κατηγορίες αλκαλικών ελαφρών αλυσίδων: MLC1 και MLC3. Η σχέση μεταξύ της αλκαλικής ελαφριάς αλυσίδας και τμήματος της κεφαλής της MHC έχει τεκμηριωθεί, πιστεύεται ότι συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση μεταξύ της μυοσίνης και ακτίνης. Υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ του λόγου MLC1/MLC3 και της μειούμενης ταχύτητας κίνησης της συσταλτικής διάταξης, (Lowey & Trybus, 1995).

Η αφαιρούμενη ελαφριά αλυσίδα (DTNB) ονομάζεται MLC2 και έχει ρυθμιστικό αν όχι καταλυτικό ρόλο δέσμευσης ασβεστίου και αναφέρονται ως ρυθμιστικές ελαφριές αλυσίδες, (Weeds & Lowey, 1971). Τόσο η MHCs όσο και MLC υπάρχουν σε πολλαπλές ισομορφές που διαφέρουν ανά ιστό και αναπτυξιακό στάδιο και η έκφραση τους είναι γνωστό ότι θα είναι υπό περιβαλλοντικό και ορμονικό έλεγχο (Whalen et al. 1981; Gauthier et al., 1982; Izumo et al., 1986; Yamato et al., 1994; Hill et al., 2000).

Διαφορετικές ισομορφές έχουν απομονωθεί από τους μύες των ψαριών σε μία προσπάθεια κατανόησης της συνεισφοράς τους στη μυϊκή ανάπτυξη, στις συστατικές ιδιότητες και της ρύθμισής τους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η διατροφή και η άσκηση. (Perzanowska et al., 1978; Rowleson et al., 1985; Ochiai et al., 1988; Johnston, 1994; Hirayama et al., 1997; Hirayama et al., 1998; Johnston et al., 1998; Xu et al., 1999; Hill et al., 2000). Οι μορφές έκφρασης στα ψάρια παρουσιάζουν επιπλέον ενδιαφέρον: αύξηση του γραμμωτού μυ στα ψάρια συμβαίνει τόσο από υπερπλασία και από υπερτροφία στο μεγαλύτερο μέρος του κύκλου ζωής τους σε αντίθεση με τα θηλαστικά στα οποία η υπερπλασία είναι περισσότερο περιορισμένη στην προ- και γενετική περίοδο (Johnston et al., 1998). Μ' αυτόν τον τρόπο το ψάρι παρέχει ένα μοντέλο για τη μελέτη της διαμόρφωσης του μυ και του μηχανισμού διαστρωμάτωσης της κυτταρικής υφής.

Στην τσιπούρα έχουν απομονωθεί δύο ελαφριές αλυσίδες, MLC2 και MLC3 (Moutou et al. 2001), που εκφράζονται μόνο στο λευκό μυ. Η MLC2 εμφανίζεται νωρίτερα στην ανάπτυξη με την έναρξη της σωματογένεσης και η έκφρασή της ρυθμίζεται από τις θυροειδείς ορμόνες (Moutou et al. 2001).

Δύο ισομορφές της MLC2 έχουν απομονωθεί στην τσιπούρα. Η ισομορφή Α κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο 170αα και περιέχει τρία πιθανά πολυαδενιλικά σήματα στο 3' UTR. Και τα τρία εναλλακτικά μετάγραφα της MLC2A έχουν απομονωθεί τα οποία κωδικοποιούν για το ίδιο πεπτίδιο αλλά διαφορετικού μήκους της 3'UTRs (280bp, 788bp και 876bp) και παράγονται με τη χρήση εναλλακτικού σήματος πολυαδενυλίωσης. Η ισομορφή Β της MLC2 αποτελείται επίσης από 170αα. Η ισομορφή Β έχει ανιχνευθεί σε πολλούς ιστούς όπως κόκκινο, λευκό στον καρδιακό μυ, τους νεφρούς, το ήπαρ, τη σπλήνα, τον εγκέφαλο, στα βράγχια, και την επιδερμίδα. Η ισομορφή Α εμφανίζεται νωρίτερα κατά την έναρξη της σωματογένεσης. Το μετάγραφο του παραμένει σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια

της υπερπλασίας και μειώνεται σημαντικά κατά τη μετά μεταμόρφωση. Υβριδισμός *in situ* έδειξε ότι η ισομορφή A εκφράζεται στις νεοσχηματιζόμενες λευκές μυϊκές ίνες και μετά τη μεταμόρφωση η έκφραση περιορίζεται σε μικρά μυογενετικά κύτταρα μεταξύ των ώριμων μυϊκών ινών. Η ισομορφή B εμφανίζεται μετά την εκκόλαψη και η έκφραση του παραμένει χαμηλή κατά τα προνυμφικά στάδια.

Στις μελέτες διατροφής των ψαριών σε ιχθυοκαλλιέργειες είναι δύσκολος ο έλεγχος του μεμονωμένου ταΐσματος και δίνει ξεχωριστές εκτιμήσεις στη συσσώρευση της πρωτεΐνης. Η αύξηση θεωρείται ότι συνδέεται στενά με την πρωτεϊνική συσσώρευση (Carter et al 2001). Ένα μόριο που συνδέει την αύξηση και την πρωτεϊνική συσσώρευση είναι το γονίδιο της μυοσΐνης βαριάς αλυσίδας (MyHC) που είναι παρών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μυ στα ψάρια (Gauvry & Fauconneau, 1996). Κατά την αύξηση, όταν οι λευκές μυϊκές ίνες αυξάνονται σε μέγεθος (υπερτροφική αύξηση) η αύξηση στο σώμα περιφερειακά ενισχύεται από νέες μυϊκές ίνες (υπερπλασία) αλλά σε μεγάλο μέρος οδηγείται από υπερτροφικές ίνες (Johnston et, 2000). Οι Overturf και Hardy (2001) παρατήρησαν διαφορές στα σχετικά επίπεδα έκφρασης MyHC στο μυ ανάμεσα σε ομάδες πέστροφας με διαφορετικό διατροφικό καθεστώς χρησιμοποιώντας *real-time RT-PCR*. Προτάθηκε ότι αυτή η έκφραση στοιχείων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μετρήσει τις διαφορές στην πρωτεϊνική σύνθεση μυών στα ψάρια σε συνδυασμό με ποικίλα θρεπτικά επίπεδα. Η *real-time RT-PCR* είναι μια προτεινόμενη μέθοδος για να συγκρίνει την έκφραση των επιπέδων του mRNA σε διαφορετικό δείγμα πληθυσμού (Orlando et al., 1998; Bystin 2000; Overturf, et, al., 2001).

Η ανάπτυξη στα ψάρια είναι το άθροισμα της απόθεσης πρωτεϊνών και λιπιδίων και είναι λογικό η έκφραση της MyHC να συσχετίζεται καλύτερα με την εναπόθεση πρωτεϊνών στους μύες απ' ότι με τον καθορισμένο δείκτη αύξησης (SGR).

### **1.11. Σκοπός της εργασίας**

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης σιτηρεσίων που περιέχουν ρεβύθι ή μπιζέλι σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στην έκφραση των δύο ισομορφών της MLC2 και της μυογενΐνης στην τσιπούρα. Στόχος είναι να διερευνηθεί η δυνατότητα της MLC2 να αποτελέσει ένα μοριακό δείκτη αύξησης του λευκού μυ.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Εκτροφή ψαριών.

Άτομα τσιπούρας μέσου βάρους  $325,4 \text{ g} \pm 48,8$  μοιράστηκαν τυχαία σε δώδεκα κλωβούς στις εγκαταστάσεις της ΣΕΛΟΝΤΑ ΑΕ στον όρμο Σελόντα. Παρασκευάστηκαν τέσσερα (4) πειραματικά σιτηρέσια από την εταιρεία BIOMAR HELLENIC και το καθένα ταϊζόταν σε τρεις κλωβούς στο προτεινόμενο επίπεδο σύμφωνα με τη θερμοκρασία του νερού και το μέσο βάρος των ψαριών. Η τροφή χορηγούνταν με το χέρι σε δύο γεύματα την ημέρα. Το πείραμα ήταν διάρκειας 230 ημερών από τις 6 Δεκεμβρίου έως τις 27 Ιουλίου. Τα ψάρια υποβλήθηκαν στις φυσικές αλλαγές θερμοκρασίας νερού και φωτοπεριόδου. Το τελικό βάρος των ψαριών ήταν  $451,5 \text{ g} \pm 86,2$ .

#### *Σύνθεση και Σύσταση Πειραματικών Σιτηρεσίων*

Η σύνθεση και η σύσταση των τεσσάρων πειραματικών σιτηρεσίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δίνονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Πίνακας τροφών

	FM	P14		ChP14		ChP20	
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	%	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	%	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	%	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	%
ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ 70%	28	ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ 70%	28,0	ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ 70%	28,0	ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ 70%	28,0
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ 48	19	ΗΛΙΑΛΕΥΡΟ 37	15,0	ΗΛΙΑΛΕΥΡΟ 37	15,0	ΡΕΒΥΘΙ	20,0
ΗΛΙΑΛΕΥΡΟ 37	15	ΜΠΙΖΕΛΙ	14,0	ΡΕΒΥΘΙ	14,0	ΗΛΙΑΛΕΥΡΟ 37	12,1
ΙΧΘΥΕΛΛΑΙΟ	8,9	ΙΧΘΥΕΛΛΑΙΟ	8,6	ΙΧΘΥΕΛΛΑΙΟ	8,7	ΙΧΘΥΕΛΛΑΙΟ	8,2
ΓΛΟΥΤΕΝΗ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ 60	7,5	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ 48	7,5	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ 48	7,5	ΓΛΟΥΤΕΝΗ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ 60	7,5
ΣΟΓΙΕΛΛΑΙΟ	7,3	ΓΛΟΥΤΕΝΗ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ 60	7,5	ΓΛΟΥΤΕΝΗ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ 60	7,5	SA ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ 67%	7,0
SA ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ 67%	7	ΣΟΓΙΕΛΛΑΙΟ	7,3	ΣΟΓΙΕΛΛΑΙΟ	7,1	ΓΛΟΥΤΕΝΗ ΣΙΤΟΥ	7,1
ΓΛΟΥΤΕΝΗ ΣΙΤΟΥ	5	SA ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ 67%	7,0	SA ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ 67%	7,0	ΣΟΓΙΕΛΛΑΙΟ	6,9
ΝΕΡΟ	2	ΓΛΟΥΤΕΝΗ ΣΙΤΟΥ	2,7	ΓΛΟΥΤΕΝΗ ΣΙΤΟΥ	3,2	ΝΕΡΟ	2,9
ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ & ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	0,3	ΝΕΡΟ	2,1	ΝΕΡΟ	1,7	ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ & ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	0,3
	100	ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ & ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	0,3	ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ & ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	0,3		
			100,0		100,0		100,0

Τα σιτηρέσια σχεδιάσθηκαν ώστε να είναι ισοπρωτεϊνικά και ισοενεργειακά. Οι ποικιλίες των κτηνοτροφικών οσπρίων, που χρησιμοποιήθηκαν στα σιτηρέσια της παρούσας μελέτης, ήταν η ποικιλία ρεβυθιού 'Σέριφος' και η ποικιλία μπιζελιού 'Όλυμπος'. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεκριμένες ποικιλίες διότι έχουν μεγάλες αποδόσεις και καλλιεργούνται παραδοσιακά ως συστατικά ζωοτροφών.

Η μία τροφή (FM) που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας περιείχε ιχθυάλευρο και σογιάλευρο ως πηγή πρωτεϊνών. Τα υπόλοιπα τρία σιτηρέσια περιείχαν μπιζέλι ή ρεβύθι, που υποκαθιστούσαν μερικώς το ιχθυάλευρο και πλήρως το αλεύρι σίτου. Σε όλα τα σιτηρέσια προστέθηκαν, ιχθυέλαιο ως πηγή λιπών και μονοφωσφορικό ασβέστιο (MCP) με σκοπό να καλυφθούν οι απαιτήσεις των ψαριών σε ασβέστιο και φώσφορο. Επίσης, προστέθηκε το ακόλουθο εμπορικό μείγμα βιταμινών και ιχνοστοιχείων (Biomar Hellenic) ανά κιλό τροφής:

#### Βιταμίνες

Βιταμίνη A: 12330 IU , βιταμίνη D3: 900 IU, βιταμίνη K3: 18mg, βιταμίνη B1: 36mg, βιταμίνη B2: 40,5mg, βιταμίνη B3: 117mg, βιταμίνη B5: 64,8mg, βιταμίνη B6: 22,5mg, βιταμίνη B8: 0,9mg, βιταμίνη B12: 0,054mg, φυλλικό οξύ: 6,3mg.

#### Ιχνοστοιχεία

Κοβάλτιο: 0,8mg, Χαλκός: 3,2mg, Ιώδιο: 2,18mg, Μαγγάνιο: 99,2mg, Σελήνιο: 0,29mg, Ψευδάργυρος: 128mg.

Εκτός αυτών προστέθηκε βιταμίνη C 600mg, βιταμίνη E 50mg, χολίνη 3000mg, ινοσιτόλη 500mg και FeSO<sub>4</sub> 100mg.

### **Δειγματοληψία και απομόνωση RNA.**

Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στο τέλος του πειράματος. Με τους κατάλληλους χειρισμούς, από κάθε ψάρι αφαιρούνταν περίπου 100 mg λευκού μυός που εμβαπτίζονταν σε RNAlater (Sigma), που εξασφαλίζει για 24 h τουλάχιστον τη μη αποικοδόμηση του ευαίσθητου RNA σε θερμοκρασία δωματίου και διατηρούνταν στους -20°C μέχρι την εξαγωγή ολικού RNA. **Η απομόνωση ολικού RNA** πραγματοποιήθηκε μηχανικά (ομογενοποιητής ULTRA TURAX, IKA-WERKE) από τα δείγματα ιστών σύμφωνα με τις οδηγίες του εμπορικού προϊόντος TRI Reagent (Sigma), ενός φαινολικού διαλύματος για την απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση χλωροφορμίου και ισοπροπανόλης. Τα δείγματα RNA που προέκυψαν κατακρημνίστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 75% και διατηρήθηκαν στους -80°C. Για

την εξασφάλιση της καλύτερης δυνατής ποιότητας RNA, όλη η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διπλά αποστειρωμένων υλικών και DEPC ddH<sub>2</sub>O για την καταστροφή των υπαρχόντων νουκλεασών.

### **Σύνθεση cDNA και έλεγχος.**

Τα δείγματα RNA φυγοκεντρήθηκαν στις 12000 x g για 15 λεπτά και στους 4°C. Η υπερκείμενη αιθανόλη απομακρύνθηκε και τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν μέσα σε πάγο. Ακολούθησε επαναδιαλυτοποίηση των δειγμάτων σε DEPC νερό (Diethyl Pyrocarbonate –Research Organics). Κατόπιν τα δείγματα φωτομετρήθηκαν για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της ποιότητας του RNA σε κάθε δείγμα. Από αυτά δημιουργήθηκαν διαλύματα RNA 5μg/mL με DEPC.

Το συμπληρωματικό DNA (cDNA) συντέθηκε στους 42°C για 50 λεπτά, από τα 5μg ολικού RNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής. Ως εκκινητές της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα, σε χωριστές αντιδράσεις oligo dT<sub>(18)</sub> (Sigma Co, USA) και random hexamers). Το μίγμα της αντίδρασης που προστέθηκε σε κάθε δείγμα περιείχε: 6μL 5x RT buffer, 3μL dNTP's, 3μL DTT (0,1 M), 0,2μL αναστολέα RNAase (RNAase inhibitor), και 0,2μL αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, 200U/μL; GIBCO). Μετά το πέρας της διαδικασίας, ενοποιούνται οι αντιδράσεις κάθε δείγματος στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί εκκινητές, δηλαδή είτε oligo-dT είτε random hexamers και φυλάσσονταν στους –20°C.

Για τον έλεγχο της επιτυχίας της σύνθεσης του cDNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της PCR με εκκινητές για την ενίσχυση της β-ακτίνης. Από κάθε ενοποιημένο πλέον δείγμα χρησιμοποιούνταν 1 μl ως υπόστρωμα. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε:

5 μl 10x PCR buffer

3 μl MgCl<sub>2</sub> (25mM)

1 μl dNTPs (10mM)

1 μl forward primer b-actin BAF 5' GAGGAGCACCCNGTCSTG 3' (100pmol/ μl)

1 μl reverse primer b-actin BAR 5' GGTGGTWCCWCCRGACARYAC 3' (100pmol/ μl)

0,2 μl Taq

37,8 μl dH<sub>2</sub>O

Η αντίδραση ενίσχυσης περιελάμβανε 3 min στους 94°C και 30 επαναλήψεις με 45 sec στους 94°C, 1 min στους 48°C και 1 min στους 72°C.

Με το πέρας της αντίδρασης, τα δείγματα ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%.

### **Ανάπτυξη μεθόδου Real-Time PCR**

- *Διαδικασία real-time PCR*

Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα 3 μl της αντίδρασης RT. Κάθε αντίδραση, εκτός από το δείγμα, περιείχε :

- 21,7 μl SYBER GREEN
- 1 μl forward primer (10 pmol/ μl)
- 1 μl reverse primer (10 pmol/ μl)
- 16.6 μl dH<sub>2</sub>O

έτσι ώστε ο όγκος κάθε δείγματος να ρυθμίζεται στα 43,3 μl. Από αυτό χρησιμοποιούνταν 20 μl για την αντίδραση, η οποία επαναλαμβάνονταν εις διπλούν. Τα δείγματα φυγοκεντρώνταν στιγμιαία, πριν τοποθετηθούν στο μηχάνημα της real-time PCR. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινές για όλα τα ζεύγη εκκινήτων και περιλάμβαναν τα εξής βήματα:

1 min στους 95°C και 40 επαναλήψεις με 1 min στους 95°C, 30 sec στους 60°C και 1min στους 72°C. Ακολουθούσε η αντίδραση αποδιάταξης (dissociation) με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 55 °C στους 95 °C.

- *Πρότυπες καμπύλες-υπολογισμός απόδοσης αντίδρασης*

Για κάθε ιστό δημιουργήθηκε ένα συλλεκτικό δείγμα ενώνοντας 1μl από τις 48 διαφορετικές μεταχειρίσεις του κάθε ιστού. Στη συνέχεια για κάθε συλλεκτικό δείγμα έγιναν οι εξής διαδοχικές αραιώσεις: 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 και 1:1000. Στις αραιώσεις αυτές εφαρμόστηκε η real-time PCR με σκοπό την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών του κάθε ιστού. Μέσω της κλίσης της κάθε καμπύλης υπολογίστηκε ο βαθμός απόδοσης (efficiency) κάθε αντίδρασης χρησιμοποιώντας τον εξής τύπο :

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1,$$

όπου slope η κλίση της πρότυπης καμπύλης.

**Πίνακας 2.2.** Τα γονίδια που μελετήθηκαν, οι αριθμοί πρόσβασης στην GenBank, οι εκκινητές και το μέγεθος του ενισχυμένου προϊόντος

Γονίδιο	Εκκινητής	Μέγεθος προϊόντος
EF1α AF184170	FW 5' TCAAGGCATGGAAGGTTGAG 3'	152 bp
	RV 5' AGTTCCAATACCGCCGAT 3'	
RPS18 AM490061	FW 5' AGGGTGTGTCAGACGTTAC 3'	197 bp
	RV 5' CAGGACCTGGCTGTATTTGC 3'	
MLC2A	FW 5' GCCCCATCAACTTCACCGTCTTT 3'	184 bp
	RV 5' GGTGTCATCTCCTCAGCGG 3'	
MLC2B	FW 5' TCCCTTTGCTATTCTGCCTTC 3'	242 bp
	RV 5' AAATCAGCCCTATTCCCCATA 3'	
Myogenin	FW 5' CAGAGGCTGCCCAAGGTGGAG 3'	183bp
	RV 5' CAGGTGCTGCCCGAACTGGGCTCG 3'	

**Πίνακας 2.3** Αναλυτική παρουσίαση της απόδοσης της αντίδρασης ανά ζεύγος εκκινητών

	EF1a	RPS18	MLC2A	MLC2B	Myogenin
<b>E</b>	0,9662	0,9540	0,9540	0,9898	0,7686

Δεδομένης της απόδοσης της αντίδρασης για κάθε ιστό και γονίδιο, χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος (comparative ct method) για τον προσδιορισμό της ποσότητας του mRNA-στόχου (Čikoš et al. 2007), στην οποία το ct προσδιοριζόταν στο ίδιο επίπεδο φθορισμού για όλα τα δείγματα στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Η αρχική ποσότητα του mRNA-στόχου είναι ανάλογη του φθορισμού στην αρχή της αντίδρασης και προσδιορίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$R_0 = 1/(E+1)^{ct}$$

όπου

$R_0$ , τα επίπεδα φθορισμού στην έναρξη της αντίδρασης, ανάλογα με την αρχική ποσότητα του mRNA-στόχου,

E, η απόδοση της αντίδρασης, και

Ct, ο αριθμός κύκλων αντίδρασης για ένα συγκεκριμένο επίπεδο φθορισμού στην εκθετική φάση της αντίδρασης.

- Γονίδια αναφοράς- υπολογισμός παράγοντα κανονικοποίησης

Στην παρούσα εργασία με την μέθοδο της Real-time PCR χρησιμοποιήθηκαν δύο (2) γονίδια αναφοράς, τα οποία έχουν αποδειχθεί ως τα πλέον σταθερά σε προηγούμενες μελέτες γονιδιακής έκφρασης στο λευκό μυ της τσιπούρας:

- EF1a
- RPS18

Για τον υπολογισμό των επιπέδων  $R_0$  των γονιδίων αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος (comparative ct method). Ο παράγοντας κανονικοποίησης για κάθε δείγμα, υπολογίστηκε ως ο γεωμετρικός μέσος των δύο γονιδίων αναφοράς. Η έκφραση όλων των γονιδίων στόχων κανονικοποιήθηκε σύμφωνα με αυτόν τον παράγοντα κανονικοποίησης:

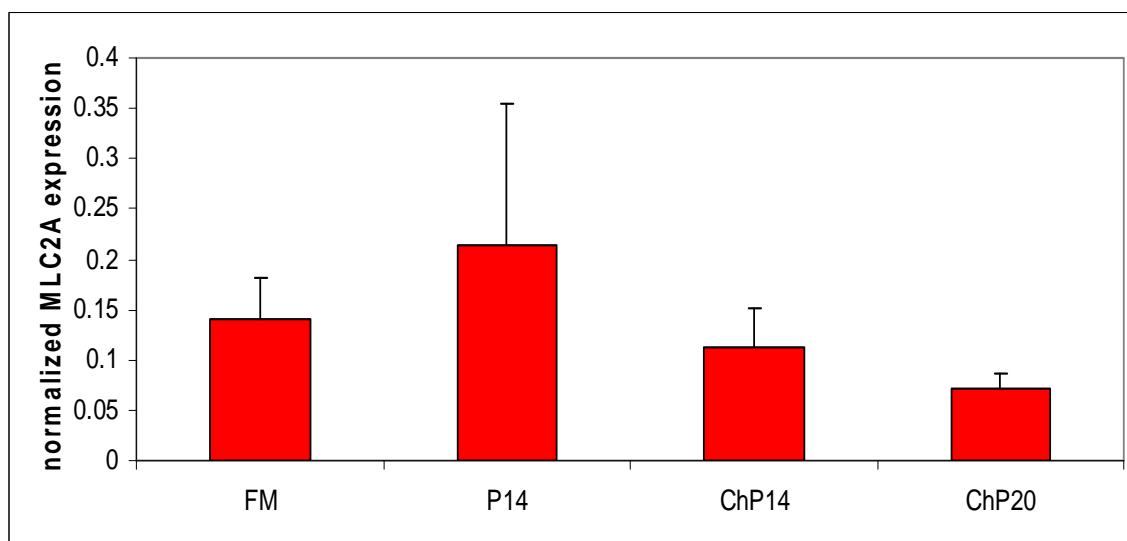
Κανονικοποιημένη έκφραση= έκφραση του γονιδίου/ παράγοντα κανονικοποίησης.

### Στατιστική ανάλυση

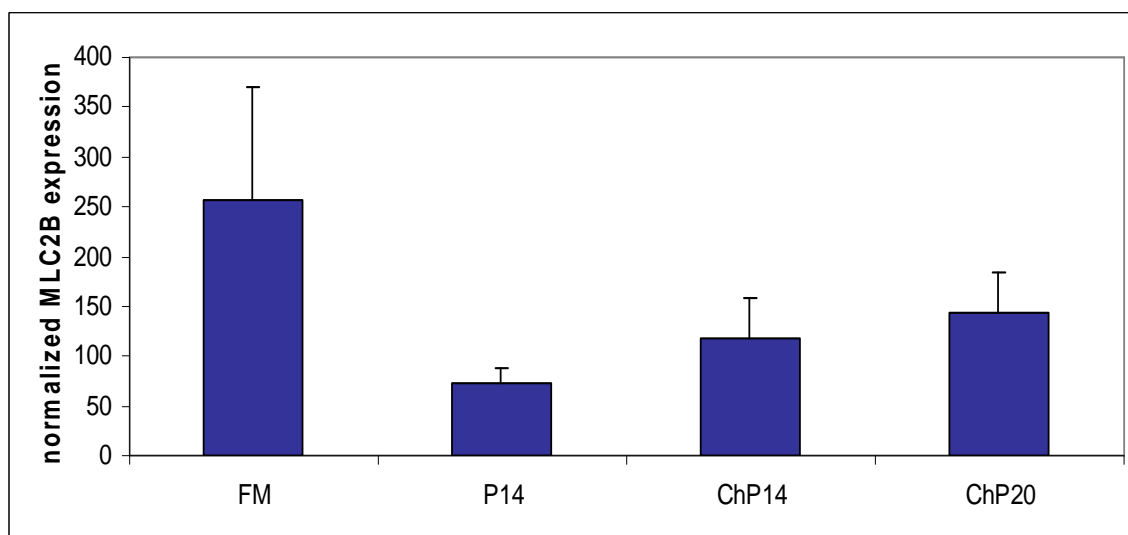
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων θα γίνει με το πρόγραμμα REST 2008 (Pfaffl et al. 2002), το οποίο επιτρέπει την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων με πολλαπλά γονίδια αναφοράς. Το REST 2008 είναι σχεδιασμένο για τη σύγκριση αποτελεσμάτων ανάμεσα σε μια ομάδα μάρτυρα και μια πειραματική ομάδα και υπερβαίνει το πρόβλημα της στατιστικής ανάλυσης αναλογιών που δεν παρουσιάζουν κανονική κατανομή εισάγοντας απλές στατιστικές δοκιμασίες τυχαιοποίησης (randomization tests) και λαμβάνοντας υπόψη το βαθμό απόδοσης κάθε αντίδρασης.

### 3. Αποτελέσματα

Η έκφραση όλων των γονιδίων-στόχων κανονικοποιήθηκε σύμφωνα με τον παράγοντα κανονικοποίησης, όπως αυτός προκύπτει από το geNorm. Τα αποτελέσματα της κανονικοποιημένης έκφρασης (Εικ. 3.1-3.3) υποδεικνύουν ότι η διατροφή με σιτηρέσια που περιείχαν όσπρια δεν είχε στατιστικώς σημαντική επίδραση στην έκφραση των ισομορφών της MLC2 στο λευκό μυ μετά από 230 ημέρες εκτροφής. Συνολικά, τα επίπεδα έκφρασης της MLC2B ήταν σχετικά αυξημένα συγκριτικά με την ισομορφή MLC2A. Αν και η επίδραση των οσπρίων δεν ήταν στατιστικώς σημαντική, η έκφραση των δύο ισομορφών ακολούθησε αντίθετο πρότυπο. Έτσι η αύξηση της περιεκτικότητας σε ρεβύθι οδήγησε σε μείωση της έκφρασης της MLC2A και αύξηση της έκφρασης της MLC2B.

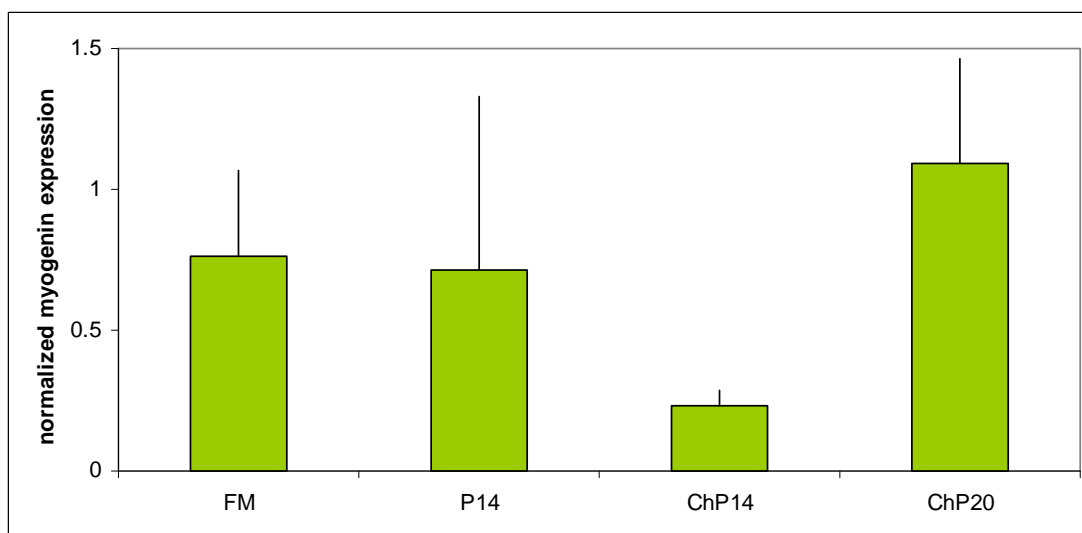


**Εικόνα 3.1.** Κανονικοποιημένη έκφραση (MO+ΤΣ) της MLC2A στο λευκό μυ τσιπούρας που διατράφηκε με σιτηρέσια με διαφορετικές διατροφικές πρωτεΐνες για 230 ημέρες (FM: ιχθυάλευρο, P14: μπιζέλι 14%, ChP14: ρεβύθι 14%, ChP20: ρεβύθι 20%).



**Εικόνα 3.2.** Κανονικοποιημένη έκφραση (MO+ΤΣ) της MLC2B στο λευκό μυ τσιπούρας που διατράφηκε με σιτηρέσια με διαφορετικές διατροφικές πρωτεΐνες για 230 ημέρες (FM: ιχθυάλευρο, P14: μπιζέλι 14%, ChP14: ρεβύθι 14%, ChP20: ρεβύθι 20%).

Τα επίπεδα έκφρασης της μυογενίνης, που αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα της μυογένεσης, ήταν σχετικά σταθερά μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων (Εικ. 3.3). Αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα όπου η έκφραση της μυογενίνης ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης της MLC2A.



**Εικόνα 3.3.** Κανονικοποιημένη έκφραση (MO+ΤΣ) της μυογενίνης στο λευκό μυ τσιπούρας που διατράφηκε με σιτηρέσια με διαφορετικές διατροφικές πρωτεΐνες για 230 ημέρες (FM: ιχθυάλευρο, P14: μπιζέλι 14%, ChP14: ρεβύθι 14%, ChP20: ρεβύθι 20%).



## 4. Συζήτηση

Τα συστατικά ορισμένων οσπρίων όπως του μπιζελιού ή της σόγιας παρουσιάζουν βιολογική δραστηριότητα δευτερογενών μεταβολιτών που μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παρουσιάζουν δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των φυσικών οιστρογόνων και είναι γνωστά ως φυτοοιστρογόνα. Τα ισοφλαβονοειδή είναι η περισσότερη μελετημένη ομάδα από τα φυτοοιστρογόνα. Η σόγια περιέχει εκτός από πρωτεΐνες και λιπίδια υψηλής θρεπτικής αξίας και ουσίες με δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα.

Ο μηχανισμός μέσω των οποίων οι ισοφλαβόνες μπορούν να ασκήσουν αυτές τις λειτουργίες δεν βασίζεται μόνο στις οιστρογονικές ικανότητες των ισοφλαβόνων, αλλά και στο ρόλο τους ως πρωτεΐνες αναστολής της κίνησης της τυροσίνης, ως ρυθμιστές της μεταγραφής των γονιδίων, ρυθμιστές των παραγόντων μεταγραφής, ως αντιοξειδωτικά, καθώς και με την τροποποίηση της δράσης ορισμένων ενζύμων (Consensus Option 2000).

Επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες αναφέρουν ότι δίαιτες πλούσιες σε φυτοοιστρογόνα μπορεί να έχουν προστατευτική δράση σε οιστρογονοεξαρτώμενες καταστάσεις, όπως εμμηνοπαυσιακά συμπτώματα και οιστρογονοεξαρτώμενες ασθένειες όπως ο καρκίνος του μαστού, η οστεοπόρωση και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, στεροειδή και αντιστεροειδή δράση, μετάδοση κυτταρικών σημάτων καθώς και την ανάπτυξη των κυττάρων και τον θάνατο.

Έρευνες σε ζώα και ανθρώπους έχουν δείξει ότι η διαιτητική πρωτεΐνη σόγιας που περιέχει ισοφλαβόνες μείωσε την αρτηριακή πίεση, βελτίωσε το λιπιδικό προφίλ και αποκατέστησε την αγγειακή λειτουργία (Teede et al., 2001). Έχει ευεργετικές επιδράσεις στην καρδιαγγειακή υγεία καθώς μειώνεται το συνολικό ποσό των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL- λιποπρωτεΐνης και χοληστερόλης, αυξάνοντας ταυτόχρονα την HLD-λιποπρωτεΐνη (Potett et al., 1998). Ισοφλαβόνες σόγιας αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των λείων αγγειακών μυών και αυτό συμβάλει στην πρόληψη της αθηροματικής καρδιακής νόσου (Ran et al., 2001).

Μετά την έναρξη της εμμηνοπαύσεως η μείωση παραγωγής ορμονών αλλάζει το μεταβολισμό των σκελετικών μυών, τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Το πρότυπο έκφρασης της μυοσίνης βαριάς αλυσίδας ορίζει την ταχύτητα σύσπασης των μυών και για αυτό είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη λειτουργία των

σκελετικών μυών (Velders et al., 2010). Η έκφραση την MHC σε ποντίκια που τους είχαν αφαιρεθεί οι ωοθήκες και τους χορηγούνταν 17β-οιστραδιόλη και γενιστεΐνη επηρεάστηκε από τα οιστρογόνα και την άσκηση σε ένα είδος μυ με συγκεκριμένο τρόπο και οι επιπτώσεις αυτές συνδέονται κυρίως με τους οιστρογονικούς υποδοχείς (ERb) (Velders et al., 2010).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για τη λήψη αποτελεσματικών αποφάσεων στην διαμόρφωση μιας δίαιτας είναι τι επίπτωση έχει η διατροφή στην ανάπτυξη των μυών. Οι διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για μελέτες αξιολόγησης περιλαμβάνουν μέτρηση του μήκους και του βάρους (Kincaid 1983), τα επίπεδα ανάπτυξης των ορμονών (Farbridge & Leatherland 1991), ανάλυση του λόγου DNA /RNA (Peragon et al 2000), ποσοτικές αλλαγές στην οτολιθική μικροδομή (Wadie et al. 1989), ενσωμάτωση των επονομαζόμενων αμινοξέων (Cowey & Walton 1988: Carter et al. 1994), τη διατήρηση του αζώτου (Kim et al. 1987) και άλλων βιοχημικών παραμέτρων (Bastrop et al. 1992). Επιπλέον είναι σημαντικό για την καλλιέργεια ψαριών να υπάρχει η ικανότητα παρακολούθησης της αύξησης των ψαριών στις εγκαταστάσεις παραγωγής. Σε αυτή την άποψη ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια για την ανάπτυξη των ψαριών, σχετιζόμενο με την εμπορική παραγωγή είναι η παρακολούθηση του μυϊκού βάρους (το φιλέτο) σε σχέση με το σπλαχνικό λίπος. Ως εκ τούτου επειδή η μυοσίνη είναι ένα σημαντικό συστατικό των μυϊκών ινών, αυτό θα ήταν μία εξαιρετική μέθοδος για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των ψαριών στα ιχθυοτροφία. Χρησιμοποιώντας το πρότυπο της real-time RT-PCR εντοπίζουμε διαφορές στα σχετικά επίπεδα της έκφρασης της μυοσίνης ανάμεσα σε ομάδες ψαριών. Αυτή η νέα μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μετρήσει διαφορές στη μυϊκή σύνθεση στα ψάρια συνδυασμένη με διάφορα θρεπτικά επίπεδα, περιβαλλοντικούς παράγοντες, στάδια κύκλου ζωής και κατάσταση υγείας.

Οι MLC2A και MLC2B αποκάλυψαν επικάλυψη στα πρόωρα στάδια ανάπτυξης της τσιπούρας. Και οι δύο MLC εκφράστηκαν αποκλειστικά στο λευκό μυ και δεν παρατηρήθηκε καμία έκφραση στο επιδερμικό στρώμα του ερυθρού μυ. Δύο ξεχωριστές ζώνες πολλαπλασιασμού μυϊκών ινών εμφανίστηκαν στη ραχιαία και κοιλιακή επιφάνεια των λαρβών χαρακτηριζόμενες από ίνες μικρού μυϊκού διαμετρήματος, ενώ η διάμετρος της ίνας σταδιακά αυξάνονταν από τις πλευρικές ζώνες προς το οριζόντιο μυοδιάφραγμα. Παρατηρήθηκε μία αύξηση στην αύξηση της διαμέτρου της ίνας στα βαθύτερα στρώματα του λευκού μυ δίπλα στη νωτοχορδή

ενδεικτικό της υπερτροφικής δραστηριότητας. Την ίδια στιγμή η έκφραση των πρωτεϊνών MLCs γινόταν περιοριστική στην περιφέρεια των ώριμων μυϊκών ινών και ήταν κυρίαρχες στις βλαστικές ζώνες.

Οι δύο ισομορφές MLC2 στην τσιπούρα επιδεικνύουν ένα διαφορετικό πρότυπο ιστικής κατανομής. Η ισομορφή A περιορίζεται στο λευκό μυ, αντιθέτως η ισομορφή B ήταν ευρέως διαδεδομένη σε όλους τους ιστούς που ελέγχθηκαν. Οι διαφορετικές συσταλτικές πρωτεΐνες των δύο ισόμορφων, η παρουσία τους στους διάφορους ιστούς, και η έκφραση τους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τις καθιστούν σημαντική πληροφορία για την κατανόηση της διαμόρφωσης του σχηματισμού των μυών και τη λειτουργία του στην αρχή της ανάπτυξης για τη μελέτη των αποτελεσμάτων προγενετήσιων γεγονότων πάνω στην μετά-γενετήσια ανάπτυξη.

Η οικονομική κρίση που επέφερε η αύξηση των τιμών του πετρελαίου, καθώς και η επέκταση της βιομηχανίας βιο-αιθανόλης και βιοντίζελ έχουν δημιουργήσει ένα ασταθές μέλλον για την παραγωγή ζωοτροφών και των τιμών εν γένει. Η αυξανόμενη ζήτηση, οι τιμές και οι διακυμάνσεις στην προσφορά της παγκόσμιας αγοράς για τα ιχθυάλευρα, ιχθυέλαια, σογιάλευρο, τον αραβόσιτο και το σιτάλευρο, τονίζουν την ανάγκη να μειωθεί η ενσωμάτωσή τους στις ζωοτροφές και ταυτόχρονα αυξάνουν το φάσμα των πρώτων υλών. Λόγω των χαμηλών τιμών και της μεγαλύτερης διαθεσιμότητας στην αγορά φυτικών πηγών προέλευσης υψηλής πρωτεϊνικής σύστασης η προσθήκη αυτών των τροφών στα ψάρια έχει αυξηθεί σημαντικά. Τα λούπινα (*Lupinus* sp.) θεωρούνται ως ένα από τα όσπρια με τις υψηλότερες δυνατότητες λόγω της υψηλής τους πρωτεϊνικής σύστασης (30%-50%) και το χαμηλό κόστος αγοράς. Αρκετές πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το άλευρο από σπόρους λούπινου μπορεί να είναι μια καλή εναλλακτική φυτική πρωτεΐνη με υψηλή θρεπτική αξία όταν χρησιμοποιείται σε επίπεδα πάνω από 30% ή 40% σε δίαιτες για την πέστροφα (De la Higuera et al., 1988; Hughes, 1988; Gomes & Kaushik, 1989). Για την παραγωγή τους γίνεται υπεραλίευση με αποτέλεσμα τη μείωση του θαλασσίου πλούτου. Η χρήση των ιχθυελαίων στις ιχθυοτροφές είναι περιορισμένη λόγω της διαθεσιμότητας, της υψηλής τιμής (SOFIA, 2006) και της πιθανής παρουσίας επιμόλυνσης από διοξίνες ή παρόμοιων με τις διοξίνες πολυχλωριωμένων διφαινυλίων που μπορεί να μεταφερθούν και να συσσωρευτούν στο βρώσιμο τμήμα του εκτρεφόμενου ψαριού. Η μεγάλη αύξηση των τιμών του σογιάλευρου τα τελευταία έτη (Josupeit, 2008) είναι περιοριστικός παράγοντας για τη χρήση του στα

σιτηρέσια. Επιπλέον οι αυστηροί κανόνες της Ε.Ε. που εγκρίθηκαν το 2003 σχετικά με την απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων σπόρων στο περιβάλλον, η ιχνηλασιμότητα, η σήμανση και η χρήση τους στις ζωοτροφές (Euractiv, 2006) αποδείχθηκε περιοριστικός παράγοντας στη χρήση τους ως ιχθυάλευρα.

Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι τα ιχθυάλευρα μπορούν εν μέρει να υποκατασταθούν από εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών αλλά η επιτυχία της συνολικής αντικατάστασης των ιχθυαλεύρων χωρίς δυσλειτουργία ανάπτυξης ήταν πολύ περιορισμένη (Kaushik et al., 1995; Rodehutscord et al., 1995; Watanabe et al., 1998).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Alami-Durante, H., Olive, N., Rouel, M., 2007.** Early thermal history significantly affects the seasonal hyperplastic process occurring in the myotomal white muscle of *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Cell Tissue Res.* 327, 553–570.
- **Allan, G.L., Booth, M.A., 2004.** Effects of extrusion processing on digestibility of peas, lupins, canola meal and soybean meal in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) diets. *Aquac. Res.* 35, 981-991.
- **Allan, G.L., Parkinson, S., Booth, M.A., Stone, D.A.J., Rowland, S.J., Frances, J., Warner-Smith, R., 2000.** Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. *Aquaculture* 186, 293-310.
- **Aslaksen, M.A., Kraugerud, O.F., Penn, M., Svihus, B., Denstadli, V., Jorgensen, H.Y., Hillestad, M., Krogdahl, A., Storebakken, T., 2007.** Screening of nutrient digestibilities and intestinal pathologies in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with legumes, oilseeds, or cereals. *Aquaculture* 272, 541-555.
- **Barnabé G (1990).** *Aquaculture Vol1 & 2* Ellis Horwood ed
- **Bastrop R, Jurss K, & Wacke R. 1992.** Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* *Comparative Biochemistry and Physiology* 102, 151-161.
- **Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 2004.** Replacement of dietary fish oil with increasing levels of linseed oil: Modification of flesh fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using a fish oil finishing diet. *Lipids* 39, 223-232.
- **Bhardwaj, H.L., Rangappa, M., Hamama, A.A., 1999.** Chickpea, Faba Bean, Lupin, Mungbean and Pigeonpea: Potential New Crops for the Mid-Atlantic Region of the United States. Reprinted from: perspectives on new crops and new uses. J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA.

- **Bjornevik, M., Beattie, C., Hansen, T., Kiessling, A., 2003.** Muscle growth in juvenile Atlantic salmon as influenced by temperature in the egg and yolk sac stages and diet protein level. *J. Fish Biol.* 62, 1159–1175.
- **Booth, M.A., Allan, G.L., Evans, A.J., Gleeson, V.P., 2002.** Effects of steam pelleting or extrusion on digestibility and performance of silver perch *Bidyanus bidyanus*. *Aquaculture Research* 33, 1163-1173.
- **Booth, M.A., Allan, G.L., Frances, J., Parkinson, S., 2001.** Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: IV. Effects of dehulling and protein concentration on digestibility of grain legumes. *Aquaculture* 196, 67-85.
- **Bustin, S.A., 2000.** Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol. Endocrinol.* 25 169-193.
- **Cairns P., Morris V. J., Botham R. L., Ring S.G., 1996.** Physicochemical studies on resistant starch in vitro and in vivo. *J. Cereal Sci.* 23, 265-275.
- **Carter G.G., Houliham, D.F., Kiessling, A. MMedale, F., Jobling, M., 2001.** Physiological effects off feeding .In: Houliham, D.F., Boujard, T., Jobling, M (Eds), *Food Intake in Fish*. Blackwell Science Oxford, pp 297-331.
- **Carter, C.G., Hauler, R.C., 2000.** Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 185, 299-311.
- **Carter, Owen, He, Watt, Scrimgeour, Houlihan, & Rennie 1994.** Determination of protein synthesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using a stable isotope. *Journal of Experimental Biology* 189, 279-284.
- **Choct, M., 1997.** Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance. *Feed Milling International* (June issue), pp. 13-26.
- **Čikoš, Š., Bukoská A., Koppel J. (2007).** Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology* 8: 113.
- **Consensus Opinion.** The role of isoflavones in menopausal health: Consensus opinion of the North American Menopause Society. *Menopause* 2000;7:215-229.
- **Cowey C.B & Walton M. J 1988.** Studies on the uptake of <sup>14</sup>c amino acid derived from both dietary <sup>14</sup>c protein and dietary <sup>14</sup>c amino acid by rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson .*Journal of Fish Biology* 33 293-305.

- **Dabrowski, K., Guderley, H., 2002.** Intermediary metabolism. In: Halver, J.E. and Hardy, R.W. 3rd ed. Fish Nutrition. Elsevier Science, Academic Press, pp. 309-365.
- **Davies, S.J., Morris, P.C., Baker, R.T.M., 1997.** Partial substitution of fish meal and full-fat soya bean meal with wheat gluten and influence of lysine supplementation in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquac. Res. 28, 317-328.
- **Davis, D.A., Arnold, C.R., 1995.** Effects of two extrusion processing conditions on the digestibility of four cereal grains for *Penaeus vannamei*. Aquaculture 133, 287-294.
- **Davis, D.A., Arnold, C.R., McCallum, I., 2002.** Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. Aquac. Nutr. 8, 87-94.
- **De La Higuera, M., Garck-Gallego, M., Sanz, A., Cardenete, G., Suarez, M.D. and Moyano, F.J., 1988.** Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein source in feeding of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture, 71: 37-50.
- **Euroactiv, 2006.** <http://www.euractiv.com/en/biotech/genetically-modified-organisms/article-117498>.
- **Farbridge K.J. & Leatherland J.F.(1991).** The development of a noncompetitive enzyme-linked assay for oncorhynchid growth hormone using monoclonal antibodies. General & Comparative Endocrinology 83, 7-17.
- **Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001.** Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture 199, 197-227.
- **Gallant, D.J., Bouchet, B., Buléon, A., Pérez, S., 1992.** Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. Eur. J. Clin. Nutr. 46, S3-S16.
- **Gatlin, D.M. and Phillips, H.F., 1989.** Dietary calcium, phytate and zinc interactions in channel catfish. Aquaculture, 79: 259-266.
- **Gauthier, G. F., Lowey, S., Benfield, P. A. and Hobbs, A. W. (1982).** Distribution and properties of myosin isozymes in developing avian and mammalian skeletal muscle fibres. *J. Cell Biol.* 92, 472–484.

- **Gauvry, L., Fauconneau, B., 1996.** Cloning of a trout fast skeletal myosin heavy chain expressed both in embryo and adult muscles and in myotubes neoformed in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.* 115A 183-190.
- **Gill, J., Nadaj, S., Moreno, M.T., Haro, A., 1996.** Variability of some physico-chemical characters in desi and kabuli chickpea types. *J. Sci. Food Agric.* 71, 179-184.
- **Glencross, B.D., Hawkins, W.E., Curnow, J.G., 2003.** Restoration of the fatty acid composition of red seabream (*Pagrus auratus*) using a fish oil finishing diet after grow-out on plant oil based diets. *Aquac. Nutr.* 9, 409-418.
- **Gomes, E.F. and Kaushik, S.J., 1989.** Incorporation of lupin seed meal, colzapro or triticale as protein/energy substitutes in rainbow trout diets. *Proc. Third Int. Symp. Feeding and Nutrition in Fish*, 28 August-1 September, Toba, Japan, pp. 315-324.
- **Gouveia, A., Davies, S.J. 1998.** Preliminary nutritional evaluation of pea seed meal (*Pisum sativum*) for juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 166, 311-320.
- **Gouveia, A., Davies, S.J., 2000.** Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 182, 183-193.
- **Grant, G., 1989.** Antinutritional effects of soybean: a review. *Prog. Food Nub. Sci.*, 13: 317-348.
- **Hanson, L.P., 1974.** Vegetable Protein Processing. Noyes Data Corporation, London, pp. 308.
- **Hardy, R.W., Barrows, F.T., 2002.** Diet formulation and manufacture. In: Halver, J.E. and Hardy, R.W. 3rd ed. *Fish Nutrition*. Elsevier Science, Academic Press, pp. 2-54.
- **Hemre, G.I., Mommsen, T.P., Kroghdahl, A., 2002.** Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac. Nutr.* 8, 175-194.
- **Hill, J. A., Kiessling, A. and Devlin, R. H. (2000).** Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for a growth hormone gene construct exhibit increased rates of muscle hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 939–950.



- **Hirayama, Y., Kanoh, S., Nakaya, M. and Watabe, S. (1997).** The two essential light chains of carp fast skeletal myosin, LC1 and LC3, are encoded by distinct genes and change their molar ratio following temperature acclimation. *J. Exp. Biol.* 200, 693–701.
- **Hirayama, Y., Kobiyama, A., Ochiai, Y. and Watabe, S. (1998).** Two types of mRNA encoding regulatory light chain in carp fast skeletal muscle differ in their 3' non-coding regions and expression patterns following temperature acclimation. *J. Exp. Biol.* 201, 2815–2820.
- **<http://www.fishbase.org>**
- **Hughes, S.G., 1988.** Assessment of lupin flour as a diet ingredient for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 71: 379-385.
- **Izumo, S., Nadal-Ginard, B. and Mahdavi, V. (1986).** All members of MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science* 231, pp. 597–600.
- **Jauncey, K., 1998.** Tilapia, Feed and feeding by Kim Jauncey. Pisces Press Ltd: Stirling, Scotland, pp. 27-33.
- **Johnston, I. A., Cole, N. J., Abercromby, M. and Vieira, V. L. A. (1998).** Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. *J. Exp. Biol.* 201, 623–646.
- **Johnston, I. A. (1994).** Development and plasticity in fish muscle with growth. *Basic Appl. Myol.* 4, pp.353–364.
- **Johnston, I.A., Alderson, R., Sandham, C., Mitchell, D., Selkirk, C., Dingwall, A., Nickell, D., Baker, R., Robertson, B., Wlyte, D., Springate, J., 2000.** Patterns of muscle growth in early and late maturing population of Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Aquaculture* 189, 307-333.
- **Johnston, I.A., Manthri, S., Smart, A., Campbell, P., Nickell, D., Alderson, R., 2003.** Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation. *J. Exp. Biol.* 206, 3425–3435.
- **Johnston, I.A., McIay, H.A., Abercromby, M., Robins, D., 2000.** Early thermal experience has different effects on growth and muscle fibre recruitment in spring- and autumn-running Atlantic salmon populations. *J. Exp. Biol.* 203, 2553–2564.

- **Josupeit, H., 2008.** Fishmeal market report for FAO Globefish. Fishmeal prices up, but might decline soon  
<http://www.thefishsite.com/articles/452/fismeal-market-report> .
- **Karalazos, V., 2007.** Sustainable alternatives to fishmeal and fish oil in fish nutrition: effects on growth, tissue fatty acid composition and lipid metabolism. Thesis submitted in Institute of Aquaculture, University of Stirling.
- **Katerina A. Moutou, Adelino V.M. Canario, Zissis Mamouris and Deborah m., 2001.** Power Molecular cloning and Sequence of Sparus aurata skeletal myosin light chains expressed in white muscle: developmental expression and thyroid regulation.
- **Kaushik, S.J. and Cowey, C.B., 1991.** Dietary factors affecting nitrogen excretion by fish. In: C.B. Cowey and C.Y. Cho (Editors), Nutritional Strategies and Aquaculture Waste. Guelph, Ontario, pp. 3-20.
- **Kaushik, S.J. and Luquet, P., 1984.** Relationship between protein intake and voluntary energy intake as affected by body weight with an estimation of maintenance needs in rainbow trout. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 51( 1-2): 57-69.
- **Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M., 1995.** Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout. Aquaculture 133, 257–274.
- **Kiessling, A., Storebakken, T., Asgard, T., Andersson, I.L., Kiessling, K.-H., 1989.** Physiological changes in muscle of rainbow trout fed different ration levels. Aquaculture 79, 293–301.
- **Kiessling, A., Storebakken, T., Asgard, T., Kiessling, K.-H., 1991.** Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age—I. Growth dynamics. Aquaculture 93, 335–356.
- **Kim, Kayes, & Amundson 1987.** Effect of dietary tryptophan levels on growth, feed/gain, carcass, composition and liver glutamate dehydrogenase activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comparative Biochemistry and Physiological B 88, 737-741.

- **Kincaid h.L., (1983).** Result from six generation of selection for accelerated growth rate in rainbow trout population. Abstracts. The Future of Aquaculture in North America. First Culture Selection of the American Fisheries society, pp.26-27.
- **Kirwan, W.O., Smith, A.N., Mcconell, A.A., Mitchell, W.D., Eastwood, M.A., 1974.** Action of different bran preparations on colonic function. Br. Med. J. 4, 187-189.
- **Knudsen Bach, K.E., 2001.** The nutritional significance of ‘dietary fibre’ analysis. Anim. Feed Sci. Technol. 90, 3-20.
- **Knudsen, K.E.B., 1997.** Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. Anim. Feed Sci. Technol. 67, 319-338.
- **Krogdahl, A., Hemre, G.I., Mommsen, T.P., 2005.** Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. Aquac. Nutr. 11, 103-122.
- **Liener, I.E., 1980.** Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, 2nd edition. Academic Press, London, 502 pp.
- **Liu, K. and Markakis, P., 1989.** An improved calorimetric method for determining antitryptic activity in soybean products. Am. Assoc. Cereal Chem., Inc., 66(5): 415-422.
- **Lowey, S. and Trybus, K. M. (1995).** Role of skeletal and smooth muscle myosin light chains. Biophys. J. 68, 120s-127s.
- **Luquet, P. and Kaushii, S.J., 1978.** Progr& recent dans le domaine de l’alimentation proteique des salmonides: Bpargne des proteines et mat&es premieres de substitution a la farine de poisson. Piscicult. Fr., 53-54: 14- 17.
- **Mente, E., Graham, J., Pierce, Santos M.B., Neofitou., C., 2006.** Effect of feed and feeding in the culture of salmonids on the marine aquatic environment: a synthesis for European aquaculture. Aquac. Internat. 14, 499-522.
- **Messina, M.J., 1999.** Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. Am. J. Clin. Nutr. 70, S439-450.
- **Mohsen, A.A., 1989.** Substituting animal protein sources into corn-soybean meal catfish diets. M.S. thesis. Auburn University, Auburn, Alabama.
- **Nengas, I., Fountoulaki, E., Alexis, M.N., Papoutsis, E., 1997.** Measurements of digestibility of fish feeds in seabream (*Sparus aurata* L.), testing different levels of protein and lipid. Preliminary results. 5th

- Panhellenic Oceanography and Fisheries Symposium. Kavala 1997, pp 161-164.
- **NRC (National Research Council), 1981.** Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes. National Academy Press, Washington, DC, pp. 102
  - **NRC, 1993.** Nutrient Requirement of Fish. Committee on Animal Nutrition. Board on Agriculture, National Research Council. National Academy Press. Washington, D.C. 1993.
  - **Ochiai, Y., Watabe, S. and Hashimoto, K. (1988).** Physicochemical and immunological properties of myosin light chains from the ordinary muscle of marine teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B, 347–353.
  - **Orlando, C., Pinzani, P., Pazzagli, M., 1998.** Development in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 36 255-269.
  - **Overturf, K., Hardy, R.W., 2001.** Myosin expression levels in trout muscle: a new method for monitoring specific growth rates for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) on varied place of nutrition. *Aquacult. Res.* 32, 315-322.
  - **Pan W, Ikeda K, Takebe M, and Yamori Y (2001).** Genistein, daidzein and glycitein inhibit growth and DNA synthesis of aortic smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 131: 1154-1158.
  - **Peragon J, Baroso J.B., Garcia-Salguero L, de la Higuera M, & Lupianex J.A (2000).** Dietary alteration in protein, carbohydrates and fat increase liver protein turnover rate and decrease overall growth rate in the rainbow trout. *Molecular Cel Biochemistry* 209, 97-104.
  - **Pereira, T.G., Oliva-Teles, A., 2003.** Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquac. Res.* 34, 1111-1117.
  - **Peres, H., Goncalves, P., Oliva-Teles, A., 1999.** Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179, 415-423.
  - **Perzanowska, A., Gerday, Ch. and Focant, B. (1978).** Light chains of trout myosin, isolation and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 60B, 295–301.

- **Pfaffl M.W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e 45.
- **Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. (2002).** Relative Expression Software Tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: e 36.
- **Pfeffer, E., 1982.** Utilization of dietary protein by salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B: 51-57.
- **Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW Jr.** Soya protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1998; 68 (Supp); 11375S-1379S.
- **Rackis, J.J., 1974.** Biological and physiological factors in soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51: 161-174.
- **Richardson, N.L., Higgs, D.A., Beames, R.M. and McBride, J.R., 1985.** Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth and histopathology in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Nutr.*, 115: 553-567.
- **Rodehutscord, M., Mandel, S., Pack, M., Jacobs, S., Pfeffer, E., 1995.** Free amino acids can replace protein-bound amino acids in test diets for studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr.* 125, 956–963.
- **Rowlerson, A., Scapolo, P. A., Mascarello, F., Carpene, E. And Veggetti, A. (1985).** Comparative study of myosins present in the lateral muscle of some fish: species variations in myosin isoforms and their distribution in red, pink and white muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 6, 601–640.
- **Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001.** Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*, Fish Physiology Series, vol. 18. Academic Press, San Diego, pp. 103–140.
- **Saini, H.S., 1995.** Anti-nutritional characteristics of grains and mechanisms to minimize their effects. In: Eichner, A.B. (Ed.) *The Use of Agricultural Grains and Legumes in Aquaculture Feeds*. Proceedings of the Grains Research and Development (GRDC) Workshop, Grain Use in Aquaculture Feeds, 29-30 May 1995. A South Australian Research and Development Institute (SARDI) Publication.

- **Satoh, S., Poe, W.E. and Wilson, R.P., 1989.** Effect of supplemental phytate and/or tricalcium phosphate on weight gain, feed efficiency and zinc content in vertebrae of channel catfish. *Aquaculture*, 80: 155-161.
- **Sauvant, D., Perez, J.-M., Tran, G., 2004.** Tables of composition and nutritional value of feed materials. Pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses and fish. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands and INRA, Paris, France, pp. 144-158.
- **Shiau, S.Y., 1997.** Utilization of carbohydrates in warmwater fish with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture* 151, 79-96.
- **Siddhuraju, P., Becker, K., 2001.** Effect of various indigenous processing methods on the a-galactoside and mono- and disaccharide content of an Indian tribal pulse, *Mucuna pruriens var utilis*. *J. Sci. Food Agric.* 81, 718-725.
- **SOFIA, 2006.** The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2007.
- **Tacon, A.G.J. and Cowey, C.B., 1985.** Protein and amino acid requirements. In: P. Tytler and P. Calow (Editors), *Fish Energetics: New Perspectives*. Croom Helm, London, pp. 155-183.
- **Tacon, A.G.J., 1993.** Feed ingredients for warmwater fish: Fish meal and other processed feedstuffs, *FAO Fish. Circ. No. 856*, FAO, Rome, Italy.
- **Teede HJ, Dalais FS, Kotsopoulos D, Liang YL, Davis S, and McGrath BP (2001).** Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3053-3060.
- **Thiessen, D.L., Campbell, G.L., Adelizi, P.D., 2003.** Digestibility and growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. *Aquac. Nutr.* 9, 67-75.
- **Van Der Klis, J.D., Van Voorst, A., 1993.** The effect of carboxy methyl cellulose (a soluble polysaccharide) on the rate of marker excretion from the gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Sci.* 72, 503-512.
- **Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002).** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: research 0034.

- **Velders M, Solzbachera M., Schleipena B., Laudenbacha U., Fritzemeierb K.H and Diela P.** The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Volume 120, Issue 1, 1 May 2010, Pages 53-59.
- **Vinjamoori D.V., Byrum, J.R., Hayes, T., Das, P.K., 2004.** Challenges and opportunities in the analysis of raffinose oligosaccharides, pentosanes, phytate and glycosinolates. J. Anim. Sci. 82, 319-328.
- **Wadie W.F, ReskallaS.I, & DowidarN.M ( 1989).** Age and growth studies of the Sphraenidae family in the south-eastern Mediterranean based on otolith measurement. Folia Morphologica (Praha) 37, 38-58
- **Wadie W.F, ReskallaS.I, & DowidarN.M ( 1989).** Age and growth studies of the Sphraenidae family in the south-eastern Mediterranean based on otolith measurement. Folia Morphologica (Praha) 37, 38-58.
- **Watanabe, T., Verakunpiriya, V., Watanabe, K., Viswanath, K., Satoh, S., 1998.** Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. Fish. Sci. 63, 258–266.
- **Weatherley, A.H., Gill, H.S., Rogers, S.C., 1979.** Growth dynamics of muscle fibres, dry weight, and condition in relation to somatic growth rate in yearling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Zool. 57, 2385–2392.
- **Weatherley, A.H., Gill, H.S., Rogers, S.C., 1980a.** The relationship between the mosaic muscle fibres and size in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish Biol. 17, 603–610.
- **Weeds, A. G. and Lowey, S. (1971).** Substructure of the myosin molecule.II. The light chains of myosin. J. Mol. Biol. 61, 701–725.
- **Whalen, R. G., Sell, S. M., Butler-Browne, G. S., Schwartz, K., Bouveret, P. and Pinset-Harstrom, I. (1981).** Three myosin heavy chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature* 292, 805–809.
- **Wilson, R.P., 1994.** Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124, 67-80.
- **www.Fao.com**
- **www.selonda.com**
- **Xu, Y., He, J., Tian, H. L., Chan, C. H., Liao, J., Yan, T., Lam, T. J. and Gong, Z. (1999).** Fast skeletal muscle-specific expression of a zebrafish myosin light chain 2 gene and characterization of its promoter by direct injection into skeletal muscle. *DNA Cell Biol.* 18, 85–95.

- **Yamano, K., Takano-Ohmuro, H., Obinata, T. and Inui, Y. (1994).** Effect of thyroid hormone on developmental transition of myosin light chain during flounder metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93, 321–326.