

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανάλυση πεπτικών ενζύμων σε τσιπούρες *Sparus aurata* εκτρεφόμενες
με μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες (ΜΖΠ)**

**ΟΝΟΜΑ: Χατζηπλάτων Ιωάννα
Α.Μ: 1315**

Βόλος, Φεβρουάριος 2016

Ανάλυση πεπτικών ενζύμων σε τσιπούρες *Sparus aurata* εκτρεφόμενες με μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες (ΜΖΠ)

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Έλενα Μεντέ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Φυσιολογία θρέψης ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα

Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης, Επίκουρος Καθηγητής, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

*Στους γονείς μου
Χαράλαμπο και Σοφία,
στα αδέρφια μου
Γιώργο και Αναστασία
Και στον αρραβωνιαστικό μου
Θανάση*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής διατριβής μου την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Έ. Μεντέ, για την υπόδειξη του θέματος, καθώς και για την καθοδήγηση, την υποστήριξη της ερευνητικής μου προσπάθειας, την εμπιστοσύνη και τις πολύτιμες συμβουλές της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Π. Παναγιωτάκη, τον Επίκουρο καθηγητή κ. Ι. Καραπαναγιωτίδη, καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Κ. Μούτου για την σημαντική βοήθεια τους κατά την ερευνητική διαδικασία. Επιπρόσθετα, θέλω να ευχαριστήσω όλους εκείνους τους ανθρώπους, που βοήθησαν στο να εκτιμηθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της τσιπούρας (*Sparus aurata* L). Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω της ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την απεριόριστη συμπαράστασή και προ πάντων κατανόηση και ανοχή όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα άλευρα που προέρχονται από υποπροϊόντα μεταποίησης πουλερικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πολύτιμη πηγή ζωικών πρωτεϊνών στη διατροφή της τσιπούρας. Έρευνα σε αρκετές χώρες κάτω από εργαστηριακές συνθήκες και πρακτική έχει δείξει ότι είναι δυνατή η αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων στα σιτηρέσια της τσιπούρας με διάφορα είδη πουλερικών υποπροϊόντων. Στη παρούσα μελέτη μετρήσαμε τη δραστικότητα της θρυψίνης (ενός πεπτικού ενζύμου που είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση των πρωτεϊνών) σε 23 άτομα του είδους *Sparus aurata* οποία χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες των 8 ατόμων ανάλογα με το σιτηρέσιο που είχαν λάβει. Τα σιτηρέσια ήταν τα εξής: το FM, που ήταν σιτηρέσιο που προερχόταν από 100% ιχθυάλευρο, το FeM50 που ήταν σιτηρέσιο που προερχόταν από 50% ιχθυάλευρο και 50% πτεράλευρο και το PM50 που προερχόταν από 50% ιχθυάλευρο και 50% πτηνάλευρο. Όσον αφορά τα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$) ανάμεσα στα επίπεδα δραστικότητας της θρυψίνης των τριών μεταχειρίσεων. Ωστόσο, εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους ηπατοσωματικούς δείκτες, καθώς ο ηπατοσωματικός δείκτης της μεταχείρισης FeM50 ήταν υψηλότερος ($P < 0.05$) από τον ηπατοσωματικό δείκτη της μεταχείρισης FM και της μεταχείρισης PM50. Τέλος παρατηρήθηκε ότι οι ιχθύς με το υψηλότερο βάρος ($P < 0,05$) ήταν αυτοί που ταΐστηκαν με το σιτηρέσιο που περιείχε 100% ιχθυάλευρο, δηλαδή με την μεταχείριση FM.

ABSTRACT

Research under laboratory conditions has shown that it is possible to replace fishmeal for cultured seabream with different types of poultry by-products in aqua feeds for farmed seabream. In the present study we measured the activity of trypsin, a digestive enzyme responsible for the breakdown of protein, in 23 individuals seabreams *Sparus aurata*. They were divided into three groups of 8 fish according to the feed, which they had been offered. The diets were: the FM, which contained 100% fishmeal, FeM50 which contained 50% feather meal and 50% fish meal and PM50 which had 50% fish meal and 50% poultry meal. The results showed no statistically significant differences between the trypsin activity levels of the three treatments. However, statistically significant differences were detected among the hepatosomatic indexes, since hepatosomatic index of the first treatment (FM) was higher ($P < 0,05$) from the hepatosomatic index of the other two treatments. Finally, it was observed that the fish with the highest weight were those who were fed the diet containing 100% fish meal, i.e. the treatment of FM. Meals derived from poultry by-products, can be used as a valuable source of animal protein in the diet for sea bream (*Sparus aurata*).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ	8
1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΘΡΕΨΗΣ ΙΧΘΥΩΝ	10
1.2.1 ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ	12
1.3 ΠΕΨΗ	13
1.3.1 ΧΗΜΙΚΗ ΠΕΨΗ	14
1.3.2 ΠΕΨΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ.....	14
1.3.2.1 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ.....	14
1.3.2.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ	15
1.4 ΠΕΠΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ.....	15
1.5 ΤΡΟΦΕΣ	17
1.6 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ	18
1.7 ΣΚΟΠΟΣ	19
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΖΩΑ	19
2.2 ΠΥΛΩΡΙΚΑ ΤΥΦΛΑ	19
2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	20
2.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ	22
2.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	22
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	23
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	30
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46
5.1 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46
5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46
5.3 ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ

Συνομοταξία: Chordata

Υποσυνομοταξία: Vertebrata

Υπερομοταξία: Gnathostomata

Ομοταξία: Osteichthyes

Υπέρταξη: Teleostei

Τάξη: Perciformes

Υπόταξη: Percoidei

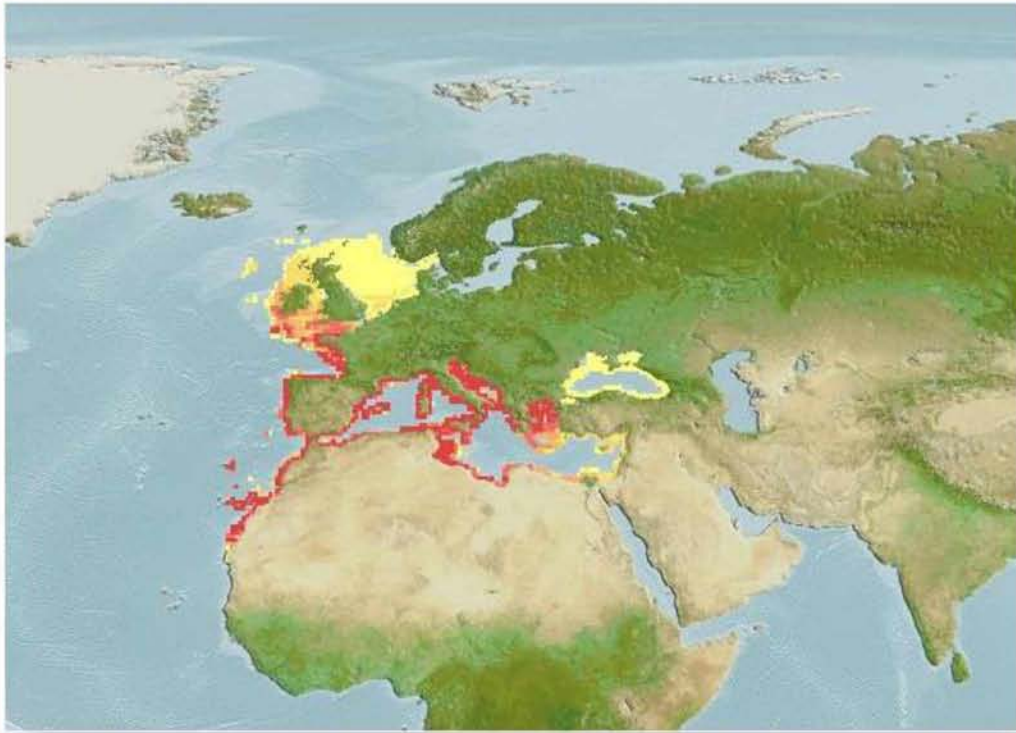
Οικογένεια: Sparidae

Γένος: Sparus

Είδος: *S. Aurata*

Η τσιπούρα συναντάται στη Μεσόγειο και στον Ατλαντικό ωκεανό, από τη Σενεγάλη μέχρι τα βρετανικά νησιά, όπου σπανίζει (Εικόνα 1). Ενδημεί κοντά στις ακτές και μπορεί να φτάσει σε βάθος 60 μέτρων. Προτιμά λιμνοθαλάσσια οικοσυστήματα, στα οποία εισχωρεί την άνοιξη, παραμένει όλο το καλοκαίρι και τα εγκαταλείπει στο τέλος του φθινοπώρου (FAO, 2009).

Τα περισσότερα είδη Sparidae δημιουργούν ομάδες (κοπάδια) τα οποία ζουν σε αμμώδεις, λασπώδεις ή βραχώδεις πυθμένες. Έχουν ωοειδές σώμα, πλευρικά συμπιεσμένο και σχετικά μικρό στόμα. Η τσιπούρα έχει ψηλό σώμα με μεγαλύτερο ύψος στο μπροστινό τμήμα. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του είδους είναι η κίτρινη γραμμή ανάμεσα στα μάτια (Εικόνα 2) (Παπουτσόγλου, 1994).



Εικόνα 1. Γεωγραφική εξάπλωση της τσιπούρας(www.fishbase.org).



Εικόνα 2. Τσιπούρα *S. aurata*(www.fishbase.org).

Πρόκειται για κατεξοχήν σαρκοφάγο ιχθύ. Διατρέφεται συνήθως με διάφορα μαλάκια, καρκινοειδή, εχινόδερμα, τελεόστεους, πολύχαιτους. Η διατροφή του κάθε ατόμου διαφέρει ανάλογα με το μέγεθος του και τη διαθεσιμότητα της τροφής (Wassef&AbuWafaa,1985).

Η φυσική αναπαραγωγή της τσιπούρας λαμβάνει χώρα στις ακτές της Μεσογείου και ειδικότερα στις νοτιότερες ακτές κατά το διάστημα Οκτωβρίου- Δεκεμβρίου όπου η θερμοκρασία μειώνεται από τους 17°C στους 13°C. Κατά την περίοδο αυτή σημειώνεται μετανάστευση κατά κοπάδια από τα λιμνοθαλάσσια συστήματα προς τη θάλασσα (Κασπίρης, 1998).

Όσον αφορά την εκτροφή της τσιπούρας οι πρώτες προσπάθειες πρόκλησης γεννητικής ωρίμανσης της, ξεκίνησαν στην Γαλλία και στην Ιταλία και αργότερα στην Ισπανία (Παπουτσόγλου, 1994). Σήμερα η τεχνητή αναπαραγωγή της τσιπούρας γίνεται με επιτυχία μεγαλύτερη του 95%, με διάφορες τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί. Εν συνεχεία, για την ανάπτυξη των νεαρών ιχθυδίων, χρησιμοποιούνται διάφορες φυσικές τροφές όπως διάφορα κωπήποδα αλλά και τεμαχισμένα μύδια και τεμάχια ιχθύων ανάλογα με την ηλικία. Στο τελικό στάδιο της πάχυνσης τα νεαρά άτομα τσιπούρας μεταφέρονται κατά κανόνα σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς και επιτυγχάνουν το εμπορεύσιμο βάρος σε 18 με 20 μήνες (Παπουτσόγλου, 1994).

1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΘΡΕΨΗΣ ΙΧΘΥΩΝ

Τα ψάρια έχουν την ικανότητα να προσαρμόζουν τη δίαιτα τους σε μια μεγάλη διατροφική ποικιλία, προσπαθώντας κάθε φορά να εκμεταλλευτούν με τον πιο αποτελεσματικό τρόπο τη διαθέσιμη τροφή στο ενδιαίτημα τους (Moyle&Cech, 1982). Είναι δε χαρακτηριστική η παρουσία των περισσότερων πεπτικών ενζύμων σε όλα τα είδη ψαριών(Πίνακας 1), ανεξάρτητα των διατροφικών τους συνηθειών (Hidalgo et al., 1999).

Πίνακας 1. Τα πεπτικά ένζυμα των ψαριών, η προέλευση και περιοχή δράσης, το υπόστρωμα και το τελικό προϊόν τους.

	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΡΑΣΗΣ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΟΪΟΝ
Πεψίνη	στομάχι	στομάχι	πρωτεΐνες	πεπτίδια
Θρυψίνη	πάγκρεας	έντερο	πρωτεΐνες/πεπτίδια	πεπτίδια
Χυμοθρυψίνη	πάγκρεας	έντερο	πρωτεΐνες/πεπτίδια	πεπτίδια
Καρβοξυπεπτιδάσες	πάγκρεας	έντερο	πρωτεΐνες/πεπτίδια	αμινοξέα
Αμινοπεπτιδάσες	έντερο	έντερο	πρωτεΐνες/πεπτίδια	αμινοξέα/ πεπτίδια
Λιπάση	πάγκρεας	έντερο	τριγλυκερίδια	λιπαρά οξέα/ μονογλυκερίδια
Εστεράση	πάγκρεας	έντερο	εστέρες	αλκοόλες/ λιπαρά οξέα
Αμυλάση	πάγκρεας	έντερο	άμυλο	δισακχαρίτες
Χιτινάση	πάγκρεας, εντερική χλωρίδα	έντερο	χιτίνη	N-ακετυλ- γλυκοσαμίνη

1.2.1 ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ

Το πεπτικό σύστημα των σαρκοφάγων ιχθύων όπως η τσιπούρα αποτελείται από:

- Το στόμα, με τη βοήθεια του οποίου λαμβάνεται η τροφή και το νερό από τον ιχθύ. Το σχήμα και το μέγεθος του στόματος κάθε ιχθύος καθώς και η μορφολογία των χειλιών ποικίλλουν κυρίως ανάλογα με τον διατροφικό τους τύπο και την ηθολογία της διατροφής τους.
- Τον οισοφάγο, που ο ρόλος του δεν είναι εμφανής. Πρόκειται για ένα ευδιάκριτο όργανο λόγω των μυών του και είναι πλήρως ή εν μέρει ραβδοειδής και συσπάται εθελούσια. Σε πολλούς ιχθύς η διάκριση του οισοφάγου από τον φάρυγγα και τον στομάχο είναι δύσκολη, εξαιτίας κυρίως του σχετικά μικρού του μήκους, όχι όμως και στη τσιπούρα.
- Τον στομάχο, ο οποίος δεν υπάρχει στο λαρβικό στάδιο και εμφανίζεται στο χρονικό διάστημα της μεταμόρφωσης ή μερικές φορές και αργότερα. Σε πολλά είδη το στομάχι είναι απλώς ένας μακρύς σωλήνας, αλλά στα περισσότερα σαρκοφάγα είδη με μεικτή διαίτα από ψάρια, καρκινοειδή και σκώληκες, το στομάχι έχει τη μορφή σάκου.
- Τον πυλωρό, που ταυτίζεται με το τέλος του στομάχου. Ελέγχει τη διέλευση της επεξεργασμένης τροφής από τον στομάχο στο λεπτό έντερο και αποτρέπει την παλινδρόμηση της από το λεπτό έντερο στον στομάχο.
- Τα πυλωρικά τυφλά, είναι αποφύσεις του λεπτού εντέρου, που αυξάνουν την επιφάνεια απορρόφησης
- Το έντερο (πρόσθιο, κεντρικό, ακραίο και τελικό τμήμα), όπου ολοκληρώνεται η πέψη και απορρόφηση των τροφών
- Το ήπαρ, είναι ένας μεγάλος αδένας που σε ορισμένα είδη μπορεί να φτάσει το 20% του σωματικού του βάρους και βρίσκεται είτε πάνω είτε γύρω από ο στομάχι. Η λειτουργικότητα του περιλαμβάνει την έκκριση της χολής, την αποθήκευση του γλυκογόνου και άλλες βιοχημικές λειτουργίες
- Την έδρα, που αποτελεί την κατάληξη του πεπτικού σωλήνα των ιχθύων (Νεοφύτου, 1997; Παπουτσόγλου, 2008)

Αν και το στόμα και ο οισοφάγος είναι κύρια σημεία του πεπτικού σωλήνα, δεν υπάρχουν αποδείξεις για την έκκριση ενζύμων στα τμήματα αυτά. Στους ιχθύες τα πεπτικά ένζυμα δρουν σε όλα τα τμήματα του πεπτικού σωλήνα και στις περιπτώσεις που υπάρχει στόμαχος είναι το πρώτο τμήμα στο οποίο αρχίζουν οι διεργασίες αυτές. Οι ουσίες που κυρίως δρουν στο στομάχο είναι το υδροχλωρικό οξύ και το πρωτεολυτικό ένζυμο πεψίνη (Μεντέ και συν. 2011).

1.3 ΠΕΨΗ

Η πέψη αρχίζει στο σημείο που τα θρεπτικά συστατικά απελευθερώνονται από τις πολύπλοκες ενώσεις των τροφών και γίνεται η απορρόφηση από τον οργανισμό. Οι τροφές μπορούν να παραμείνουν στο στομάχι των ψαριών για σχετικά μεγάλες περιόδους (συχνά δεκάδες ώρες), όταν η θερμοκρασία είναι μικρότερη από 10°C. Η συμβολή αυτού του οργάνου είναι θεαματική στην ομάδα εκείνων των ψαριών που καταπίνουν το σύνολο των θηραμάτων τους. Υπό αυτές τις συνθήκες η πέψη αρχίζει στους εξωτερικούς υμένες και εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της έντονης πρωτεολυτικής δραστηριότητας (ειδικότερα της δραστηριότητας της ελαστάσης) μαζί με τη δραστηριότητα της χιτινάσης (Μεντέ και συν.2011). Θεωρείται επίσης, σημαντικό να αναφερθεί ότι η ενεργότητα των ποικίλων ενζύμων που συμμετέχουν στη διαδικασία της πέψεως είναι δυνατόν να διαφοροποιείται μεταξύ των διαφόρων ειδών των ιχθύων, ακόμα και στη περίπτωση που δεν εντοπίζεται καμία διαφορά όσον αφορά το διατροφικό τους τύπο. Γενικά, η ενεργότητα των ενζύμων αυτών επηρεάζεται και ενδέχεται να μεταβάλλεται σε συνάρτηση με την τιμή του PH που επικρατεί στον πεπτικό σωλήνα του μικροοργανισμού, αλλά και την επίδραση ποικίλων παραγόντων του περιβάλλοντος που διαβιούν (Παπουτσόγλου, 2008).

Σε πολλά είδη ψαριών, συμπεριλαμβανομένου και της τσιπούρας, το έντερο εμφανίζει διαιρέσεις και τυφλές απολήξεις, γνωστές ως πυλωρικά τυφλά, που βρίσκονται στο πάνω μέρος κοντά στο πυλωρικό άνοιγμα. Στα περισσότερα είδη ψαριών είναι η κυριότερη περιοχή έκκρισης πεπτικών ενζύμων, ενώ ταυτόχρονα η αύξηση της επιφάνειας τους συμβάλλει στη μεγιστοποίηση της απορρόφησης των θρεπτικών (Jobling, 1995). Καθώς οι πρωτεΐνες μετακινούνται κατά μήκος του εντέρου η

διάσπασή τους συνεχίζεται σε αλκαλικό περιβάλλον. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην εντερική πέψη προέρχονται από δύο κυρίως πηγές, το πάγκρεας και τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Το πάγκρεας παράγει μεγαλύτερη ποικιλία και ποσότητα πεπτικών ενζύμων σε σχέση με τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Τα σημαντικότερα πρωτεολυτικά ένζυμα που παράγονται και εκκρίνονται από τα κυψελιδικά κύτταρα του παγκρέατος είναι η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η καρβοξυπεπτιδάση, ενώ από τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου η αμινοπεπτιδάση, οι διπεπτιδάσες και οι τριπεπτιδάσες (Jobling, 1995).

1.3.1 ΧΗΜΙΚΗ ΠΕΨΗ

Η χημική πέψη πραγματοποιείται με όξινο pH και την δράση των πεπτικών ενζύμων στον πεπτικό σωλήνα. Η χημική πέψη περιλαμβάνει εκείνες τις διεργασίες που επιτελούνται με τη δράση χημικών ουσιών στην προσληφθείσα τροφή και των οποίων το αποτέλεσμα είναι η αποδόμηση των συστατικών της. Τα ένζυμα που μετέχουν στη χημική πέψη είναι υδρολάσες που καταλύουν την υδρόλυση πρωτεϊνών, εστέρων, υδατανθράκων. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συγκρότηση της εικόνας των ενζύμων της χημικής πέψεως των τελεόστεων ιχθύων μπορεί να μεταβληθεί και να προσαρμοστεί ακόμη και σε επίπεδο διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους και σε χρονικό διάστημα μερικών ημερών, ανάλογα με τη χημική σύσταση της τροφής τους (Παπουτσόγλου, 2008).

1.3.2 ΠΕΨΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

1.3.2.1 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες αποτελούν πολύπλοκες οργανικές ενώσεις, που υπάρχουν σε όλα τα ζωντανά κύτταρα (φυτικά και ζωικά) και είναι συστατικά διαφόρων ιστών και οργάνων (Καραπαναγιωτίδης και συν., 2013). Η παρουσία των πρωτεϊνών στην διατροφή των περισσότερων ψαριών είναι περισσότερο σημαντική από εκείνη των

υδατανθράκων και των λιπών. Ανεπαρκής πρόσληψη πρωτεϊνών προκαλεί μείωση ή διακοπή του ρυθμού ανάπτυξης και απώλεια βάρους, σκολίωση και άλλες παθολογικές καταστάσεις. Αντίθετα, σε περίπτωση υπερβολικής κατανάλωσης πρωτεϊνών, ένα μέρος χρησιμοποιείται για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών και το υπόλοιπο μετατρέπεται σε ενέργεια (Μεντέ και συν.2011). Τα ψάρια έχουν καθημερινές διατροφικές ανάγκες για να επιτελέσουν τις διάφορες μεταβολικές τους διεργασίες, όπως η συντήρηση, ο καταβολισμός, ο αναβολισμός. Οι ποιοτικές απαιτήσεις των ψαριών σε πρωτεΐνη αναφέρονται στις απαιτήσεις τους σε αμινοξέα, τα οποία αποτελούν τις δομικές μονάδες των πρωτεϊνών και διακρίνονται σε απαραίτητα αμινοξέα (τα οποία ο οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει σε επαρκείς ποσότητες), μη απαραίτητα αμινοξέα (τα οποία συντίθενται από τον οργανισμό) και τα ημι-απαραίτητα αμινοξέα (τα οποία συντίθενται από τον οργανισμό από άλλα απαραίτητα και μη αμινοξέα) (Καραπαναγιωτίδης και συν., 2013).

1.3.2.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Οι πρωτεΐνες αποθηκεύονται σε μικρές ποσότητες στους μαλακούς ιστούς (ήπαρ, έντερο, νεφρός). Όταν η αποθηκευμένη ποσότητα φτάσει ένα ανώτατο όριο, κάθε αμινοξύ που προσλαμβάνεται με την διατροφή χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πρωτεϊνών (αμινομάδα), ή αποθηκεύεται σαν λίπος (λιπογένεση) ή χρησιμοποιείται για τη διαδικασία της νεογλυκογένεσης (καρβοξυλομάδα)(Rui, 2014). Ο καταβολισμός των αμινοξέων πραγματοποιείται κυρίως στο ήπαρ. Τα περισσότερα ψάρια είναι αμμωνιοτελικά αλλά μέρος των αζωτούχων εκκρίσεων τους γίνεται με την μορφή ουρίας. Η συγκέντρωση της αμμωνίας στο πλάσμα επηρεάζεται από την πρόσληψη πρωτεϊνών και αρχίζει να αυξάνεται 3-8 ώρες μετά από ένα γεύμα. Επειδή η αμμωνία είναι τοξική, πρέπει να αποβάλλεται σχετικά γρήγορα για να παρεμποδιστεί συσσώρευσή της στους ιστούς. Σχεδόν όλες οι αζωτούχες εκκρίσεις των ψαριών λαμβάνουν χώρα από τα βράγχια (Παπουτσόγλου, 2008).

1.4 ΠΕΠΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Η πέψη διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα είδη ψαριών. Στα ψάρια με στομάχι, το στομάχι εκκρίνει υδροχλωρικό οξύ και πεψινογόνο για την πέψη των πρωτεϊνών. Όταν δεν υπάρχει στομάχι τέτοιες ουσίες δεν εκκρίνονται και η διάσπαση και η πέψη των πρωτεϊνών πραγματοποιείται μόνο μέσω ενζύμων, όπως π.χ., η θρυψίνη σε ουδέτερο έως αλκαλικό PH (Μεντέ, 2011). Τα πεπτικά ένζυμα αποτελούνται από υδρολάσες, δηλαδή ενώσεις που καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης. Ανάλογα με τη φυσιολογική τους δράση διαχωρίζονται σε :

- πρωτεάσες (ένζυμα πρωτεόλυσης)
- εστεράσες (ένζυμα λιπόλυσης)
- καρβοϋδράσες (αμυλολυτικά ένζυμα).

Τα πεπτικά ένζυμα παράγονται στο στομάχι, στο πάγκρεας και στο έντερο και χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- Ένζυμα που εκκρίνονται στο πάγκρεας και, σε έναν μικρότερο βαθμό από το στομάχι υπό μορφή ζυμογόνων κόκκων ή ανενεργών προενζύμων και αναμιγνύονται σε έναν πεπτικό χυμό με συγκεκριμένη ιοντική σύνθεση και συγκεκριμένο pH.
- Συνδεδεμένα ένζυμα που βρίσκονται σε μικρό ποσοστό στον πεπτικό χυμό, αλλά υπό κανονικές συνθήκες αντιδρούν μόνο όταν συνδέονται με μια μεμβράνη μικρολαχνών.
- Κυτταρικά ένζυμα της πεπτικής οδού που τοποθετούνται στις περιοχές εκτός από το τοίχωμα, όπως στα λυσοσώματα (Μεντέ, 2011)

Δεν παρουσιάζονται όλα τα πεπτικά ένζυμα σε όλα τα ψάρια. Η πεψίνη απουσιάζει στα ψάρια που δεν έχουν στομάχι και η χιτινάση βρέθηκε μόνο σε ορισμένα είδη. Κάποια κύρια πεπτικά ένζυμα που εκκρίνονται υπό μορφή προενζύμων στα ψάρια είναι:

- η πεψίνη, η θρυψίνη, η χιτίνη, η χυμοθρυψίνη και η ελαστίνη που εκκρίνονται στο στομάχι,
- η αμυλάση, η λιπάση, η εστεράση, η χιτινάση και η πεψίνη που είναι γαστρικές εκκρίσεις,
- η πρωτεάση, η αμυλάση, η λιπάση, η χιτινάση που εμφανίζονται στο πάγκρεας,
- η χοληστερόλη εκκρίνεται στο συκώτι,

- η αμινοπεπτιδάση και η λεκιθινάση βρίσκονται στο έντερο (Naz et al., 2009).

1.5 ΤΡΟΦΕΣ

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των ιχθυοτροφών ποικίλουν ανάλογα με το είδος του ψαριού προς εκτροφή (σαρκοφάγα-φυτοφάγα-παμφάγα), την οικονομικότητά τους, αλλά και την προτίμηση των ίδιων των ψαριών. Αυτές οι πρώτες ύλες ταξινομούνται σε πρωτεΐνες, σε λίπη και έλαια, σε υδατάνθρακες, σε πηγές βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την παραγωγή ιχθυοτροφών είναι:

- τα ιχθυάλευρα αυτά είναι τα άλευρα που παρασκευάζονται από διάφορα είδη ψαριών, κυρίως πελαγικών όπως γαύρος, ρέγγα, καπελάνος, φρίσσα κ.λπ. Τα ιχθυάλευρα παρασκευάζονται από ολόκληρα ψάρια, είτε από υπολείμματα της φιλετοποίησης και μεταποίησης των ψαριών, όπως π.χ. άλευρα από μπακαλιάρο του Ατλαντικού, κίτρινο μπακαλιάρο, ρέγγα και σολομό. Τα ιχθυάλευρα είναι η κύρια πηγή πρωτεϊνών (Καραπαναγιωτίδης και συν., 2011)
- τα υποπροϊόντα της βιομηχανίας των ιχθύων
- τα πτηνάλευρα και τα πτεράλευρα, που είναι υποπροϊόντα των πτηνοσφαγείων. Κάποια πειράματα με πέστροφα έδειξαν ότι αν συνδυαστεί το πτεράλευρο με το πτηνάλευρο στο σιτηρέσιο τότε η αποδοτικότητα τους είναι συγκρίσιμη με εκείνη του ιχθυάλευρου (Bureau et al., 2000).
- όσπρια (φασόλια, κουκιά, ρεβίθια, μπιζέλια, σόγια) που θεωρούνται από τις καλύτερες φυτικές πρωτεϊνικές πηγές
- φυτικά υποπροϊόντα (βίτες, γλουτένη σίτου, γλουτένη καλαμποκιού)
- άλευρα που προέρχονται από ελαιούχους καρπούς (βαμβακόσπορος, αραχιδάλευρο, ηλιάλευρο, σησαμάλευρο, άλευρο σπόρων ελαιοκράμβης, φοινικάλευρο, λινάλευρο)
- δημητριακοί καρποί (σιτάρι, αραβόσιτος, σίκαλη, ρύζι, βρώμη)
- λίπη και έλαια (ιχθυέλαια, φυτικά έλαια, ζωικά λίπη)
- ζωντανή τροφή (φυτοπλαγκτόν, ζωοπλαγκτόν, κωπήποδα, αρτέμια)

- διατροφικά συμπληρώματα (μείγματα βιταμινών, μείγματα ιχνοστοιχείων, συγκολλητικές ουσίες, χρωστικές ουσίες, προβιοτικά και ένζυμα)
(Παπουτσόγλου, 2008; Saleh et al., 2013)

1.6 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ

Όπως στους υπόλοιπους ζωικούς οργανισμούς, έτσι και στους ιχθύς η διατροφή αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που όχι μόνο επηρεάζει, αλλά και καθορίζει άμεσα ή και έμμεσα τόσο το ρυθμό ανάπτυξης, την ποιότητα όσο και το κόστος παραγωγής τους. Η συνολική εκτίμηση της διατροφής περιλαμβάνει τη χημική σύσταση της τροφής, τη μορφή της, την ποσότητα της, τον τρόπο και τη συχνότητα παροχής της, τη διαδικασία παραγωγής και συντήρησής της (Καπελος, 2011).

Έχει αποδειχθεί ότι οι διατροφικές συνήθειες της τσιπούρας στο φυσικό της περιβάλλον εξαρτώνται από το μέγεθος της. Τα μικρής ηλικίας ιχθύδια τρέφονται κυρίως με πολύχαιτους και μικρού μεγέθους καρκινοειδή. Τα μεγαλύτερα με μύδια, γαστερόποδα, καρκινοειδή (Χώτος, Ρογδάτης, 2010).

Οι διαιτητικές ανάγκες σε πρωτεΐνες στη τσιπούρα ποικίλουν ανάλογα με το βιολογικό της στάδιο (Παπουτσόγλου, 2008). Στα αναπτυσσόμενα άτομα της, οι απαιτήσεις της είναι υψηλές, έτσι οι δίαιτες που προορίζονται για την εκτροφή της πρέπει να περιέχουν 45-55 % πρωτεΐνη (σε ξηρές τροφές με υγρασία 9,5-10 %) (Olivia-Teles, 2000). Οι ποιοτικές απαιτήσεις σε αμινοξέα στις αναπτυσσόμενες τσιπούρες, συμφωνούν και με άλλα είδη ιχθύων (Olivia-Teles, 2000). Τα 10 απαραίτητα αμινοξέα (AA) είναι αργινίνη, ιστιδίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη, βαλίνη (Καραπαναγιωτίδης & Μεντέ, 2009). Ωστόσο, έχει καταστεί ανάγκη χορήγησης ξηρών τροφών στην τσιπούρα με εμπλουτισμό απαραίτητων και μη αμινοξέων, σε συγκεκριμένα ποσοστά (Παπουτσόγλου, 2008). Επιπρόσθετα, το ιχθυάλευρο, λόγω της θρεπτικής σύνθεσής του, είναι καλύτερη πρωτεϊνική πηγή για τα σιτηρέσια των ιχθύων. Εντούτοις, η υψηλή τιμή του και η μειωμένη διαθεσιμότητά του στη διεθνή αγορά επιβάλλει την αντικατάστασή του με εναλλακτικές πρωτεϊνικές πηγές (Olivia-Teles, 2000). Τα μειονεκτήματα της αντικατάστασης αυτής, αφορούν την μείωση της ελκυστικότητας των χορηγούμενων τροφών, της πιθανότητας παρουσίασης

αντιδιαιτητικών παραγόντων καθώς και την πιθανότητα προκαλούμενης ανισορροπίας και ελλείψεως απαραίτητων αμινοξέων (π.χ. μεθειονίνη), (Παπουτσόγλου, 2008).

1.7 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη των πεπτικών ενζύμων των πυλωρικών τυφλών από τσιπούρες που ταϊστήκαν με διαφορετικές δίαιτες. Οι τροφές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. 100% ιχθυάλευρο
2. αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου κατά 50% με πτηνάλευρο
3. αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου κατά 50% με υδρολυμένο πετράλευρο

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΖΩΑ

Στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας ελήφθησαν δείγματα από τσιπούρες που είχαν χωριστεί σε 3 ομάδες των 8 ατόμων: 1)αυτές που ταϊστήκαν με τροφές που περιείχαν 50% ιχθυάλευρο και 50% πτηνάλευρο(PM50), 2)αυτές που ταϊστήκαν με 100% ιχθυάλευρο(FM), 3)αυτές που ταϊστήκαν με 50%ιχθυάλευρο και 50% υδρολυμένο πετράλευρο(FeM50).Τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν, μετρήθηκε το μήκος τους και ζυγίστηκαν. Στη συνέχεια, αποκόψαμε το πεπτικό σύστημα, αδειάσαμε το περιεχόμενο του, κρατήσαμε τα πυλωρικά τυφλά και τα καταψύξαμε το συντομότερο στους -80 °C.

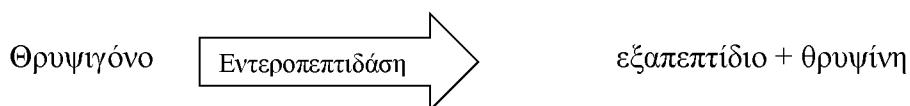
2.2 ΠΥΛΩΡΙΚΑ ΤΥΦΛΑ

Ο προσδιορισμός της δραστηρότητας της θρυψίνης έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Μετά τη λήψη των

πυλωρικών τυφλών, ακολούθησε μηχανική ομογενοποίηση σε ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris- HCL, PH = 7,5 και φυγοκεντρίσαμε σε 16,000 rpm για 30 min στους 4° C. Στη συνέχεια αποθηκεύτηκε το υπερκείμενο σε θερμοκρασία -80 ° C μέχρι τη ανάλυση.

2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Τα ένζυμα είναι ουσίες πολύπλοκης δομής που δρουν καταλυτικά σε βιοχημικές αντιδράσεις αυξομειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης μιας αντίδρασης. Τα περισσότερα πεπτικά ένζυμα σχηματίζονται σε μορφή ανενεργών προδρόμων, που ονομάζονται ζυμογόνα ή προένζυμα για την αποφυγή της δημιουργίας ενεργών πρωτεολυτικών ενζύμων μέσα στο κύτταρο, γεγονός που θα είχε ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του ίδιου του κυττάρου. Τα ζυμογόνα μετατρέπονται σε ενεργά ένζυμα μετά από πρωτεολυτική διάσπαση. Το προένζυμο θρυψινογόνο αποτελεί την πρόδρομη μορφή της θρυψίνης αφού μετατρέπεται σε ενεργή θρυψίνη από την εντεροπεπτιδάση σύμφωνα με την αντίδραση:



Η δραστηριότητα της θρυψίνης μετρήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο του Bernard et al. (1961). Η μέτρηση της θρυψίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εκλεκτικού υποστρώματος, εξειδικευμένο όπως αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία. Για την πραγματοποίηση του φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού του ενζύμου της θρυψίνης στην κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου προστίθενται τα απαραίτητα αντιδραστήρια στο δείγμα. Ακολούθως παρακολουθείται η εξέλιξη της αντίδρασης στο λ_{\max} που απορροφά το υπόστρωμα παρατηρώντας συνεχώς τη μείωση ή αύξηση της οπτικής απορρόφησης της αντίδρασης αντιστοίχως σε συνάρτηση με το χρόνο (Ψόχιου, 2006). Για την δραστηριότητα της θρυψίνης έγινε ισορρόπηση 10 μl του υποστρώματος 10mM Na-Benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide BAPNA(μητρικό διάλυμα 10mM σε

DMSO) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCL που περιείχε 10 mM CaCl₂, PH = 8.2 στους 25 ° C (Πίνακας 2). Σύμφωνα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο, 0,47ml από το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCL, 0,5ml BAPNA και 0,3ml δείγματος ιστού τοποθετήθηκαν στη κυψελίδα τελικού όγκου 1,5ml και στη συνέχεια ακολούθησε φωτομέτρηση και προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου. Η οπτική πυκνότητα του υπερκείμενου προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στα 405 nm. Χρησιμοποιήθηκε επίσης και κυψελίδα μάρτυρας που δεν περιείχε το δείγμα αλλά αποσταγμένο νερό.

Για κάθε μέθοδο ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικοί έλεγχοι σε 3 επαναλήψεις έκαστος με σκοπό τον καθορισμό :

- της συγκέντρωσης του υποστρώματος
- του προστιθέμενου όγκου ακατέργαστου ενζυμικού εκχυλίσματος και
- της χρονικής διάρκειας της αντίδρασης για κάθε ιστό και για τα αντίστοιχα πειράματα.

Οι παράμετροι που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις μετρήσεις, για τα δείγματα του αντίστοιχου πειράματος. Το σύνολο των μετρήσεων ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε σε 3 επαναλήψεις στους 25 °C, που θεωρείται η βέλτιστη θερμοκρασία περιβάλλοντος για την τσιπούρα. Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα εκφράστηκε ως pmol p-nitroaniline που παρήχθη σε mg protein⁻¹ min⁻¹ (U/mg protein), (ειδικός συντελεστής απορρόφησης e=8,8 mM⁻¹ cm⁻¹).

Πίνακας 2. Παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της δραστηριότητας της θρυψίνης

	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ (μl)	ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ (min)
ΘΡΥΨΙΝΗ	BAPNA	10mM	30	4-6

2.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Ο υπολογισμός του ηπατοσωματικού δείκτη έγινε με τη χρήση του τύπου

$$\text{ΗΠΑΤΟΣΩΜΑΤΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ (HSI)} = (W_L/W_F) * 100$$

Όπου

W_L =το βάρος του ήπατος

W_F =το βάρος σώματος του ιχθύος

2.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Όλοι οι μέσοι όροι δίνονται με το τυπικό σφάλμα τους (μέσος όρος± τυπικό σφάλμα). Πριν τη στατιστική ανάλυση των ποσοστιαίων δεδομένων και προκειμένου να ακολουθήσουν κανονική κατανομή, πραγματοποιήθηκε μετατροπή τους με τη μέθοδο arcsin (Zar,1984). Η ανάλυση παραλλακτικότητας ενός παράγοντα (one way ANOVA), χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν οι μέσοι όροι των μετρούμενων παραμέτρων μεταξύ των διατροφικών μεταχειρίσεων, ενώ επίσης χρησιμοποιήθηκε το Tukey test (Zar,1984). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα PAST. Τα αποτελέσματα θεωρούνταν στατιστικά σημαντικά στο επίπεδο $P < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όλα τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή (επίπεδα θρυψίνης, βάρος σώματος, βάρος ήπατος, ηπατοσωματικός δείκτης). Οι ενζυμικές δραστηριότητες εκφράστηκαν ως U/mgπρωτεΐνης. Οι διαφορές των τιμών του βάρους σώματος των ιχθύων υπήρξαν στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$), με τους ιχθύς που ταΐστηκαν με ιχθυάλευρο να διαφέρουν των υπολοίπων δυο μεταχειρίσεων και να χαρακτηρίζονται από τα υψηλότερα βάρη (Πίνακας 3, 4).

Το βάρος σώματος W_F των δειγμάτων, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5 είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο στα ψάρια που ταΐστηκαν με 100% ιχθυάλευρο (FM) ($41,4 \pm 2,93$) συγκριτικά με τα ψάρια που ταΐστηκαν με τροφές που περιείχαν 50% πτηνάλευρο ($30,65 \pm 1,44$) και 50% υδρολυμένο πτεράλευρο ($27,85 \pm 1,93$). Επίσης, εντοπίστηκε σημαντική στατιστική διαφορά ανάμεσα στους ηπατοσωματικούς δείκτες των τριών μεταχειρίσεων ($P < 0,05$), καθώς οι τιμές του ηπατοσωματικού δείκτη της μεταχείρισης FeM50 ήταν υψηλότερες από αυτές της μεταχείρισης FM και από τις τιμές της μεταχείρισης PM50 (Πίνακας 5) (Σχήμα 1,2,3).

Πίνακας 3. Βάρος σώματος και βάρος ήπατος δειγμάτων ανά μεταχείριση

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	FeM50		FM		PM50	
	ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΗΠΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΗΠΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΗΠΑΤΟΣ
1	21,82	0,323	44,20	0,526	37,24	0,440
2	22,02	0,333	35,27	0,380	36,00	0,645
3	34,79	0,321	55,65	0,484	31,45	0,404
4	28,87	0,360	39,65	0,330	28,97	0,371

5	35,78	0,594	35,88	0,338	27,43	0,256
6	29,84	0,394	31,25	0,427	27,47	0,408
7	23,48	0,375	50,85	0,350	26,07	0,154
8	26,20	0,440	38,41	0,264	30,63	0,316

Πίνακας 4. P και F value από την στατιστική ανάλυση για τον ηπατοσωματικό δείκτη και το βάρος σώματος των ιχθύων.

	P Value	F value
ΗΠΑΤΟΣΩΜΑΤΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ	0,014	5,239
ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ	0,00065	10,62

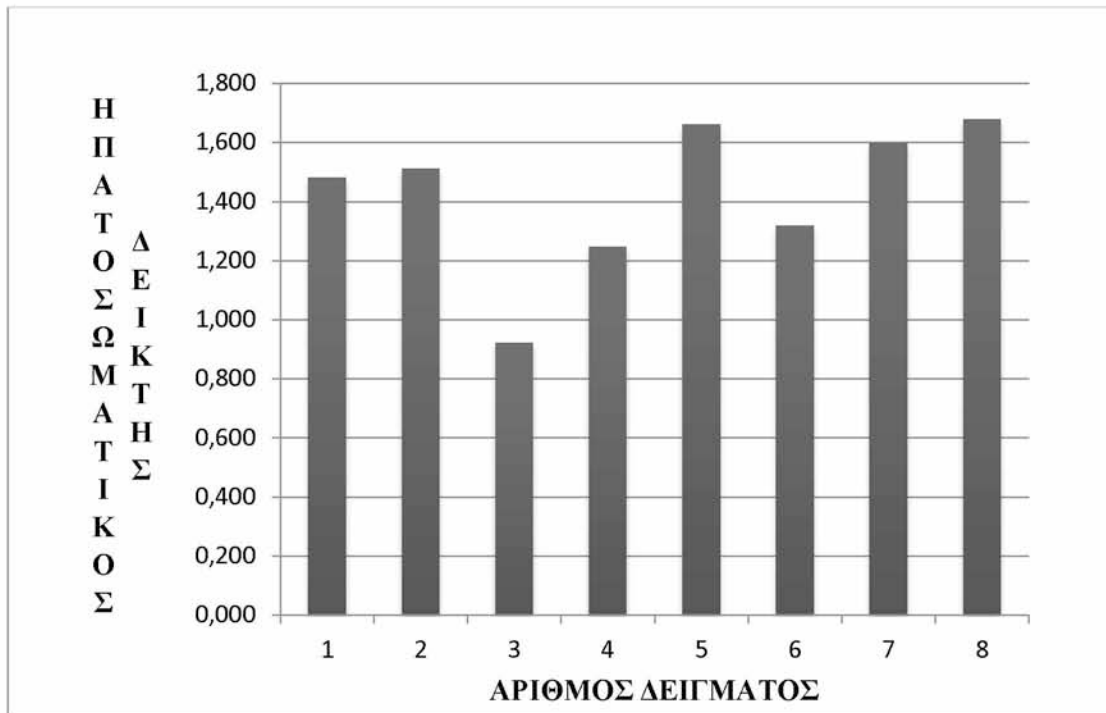
Πίνακας 5. Βιομετρικοί παράμετροι τσιπούρας ανα μεταχείριση.

	FM	PM50	FeM50
ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ $W_F(g)$	41,4±2,93 ^a	30,65±1,44 ^b	27,85±1,93 ^b
ΒΑΡΟΣ ΗΠΑΤΟΣ $W_L(g)$	0,38±0,03	0,37±0,05	0,39±0,03
ΗΠΑΤΟΣΩΜΑΤΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ	0,95±0,08 ^a	1,19±0,12 ^a	1,42±0,09 ^b

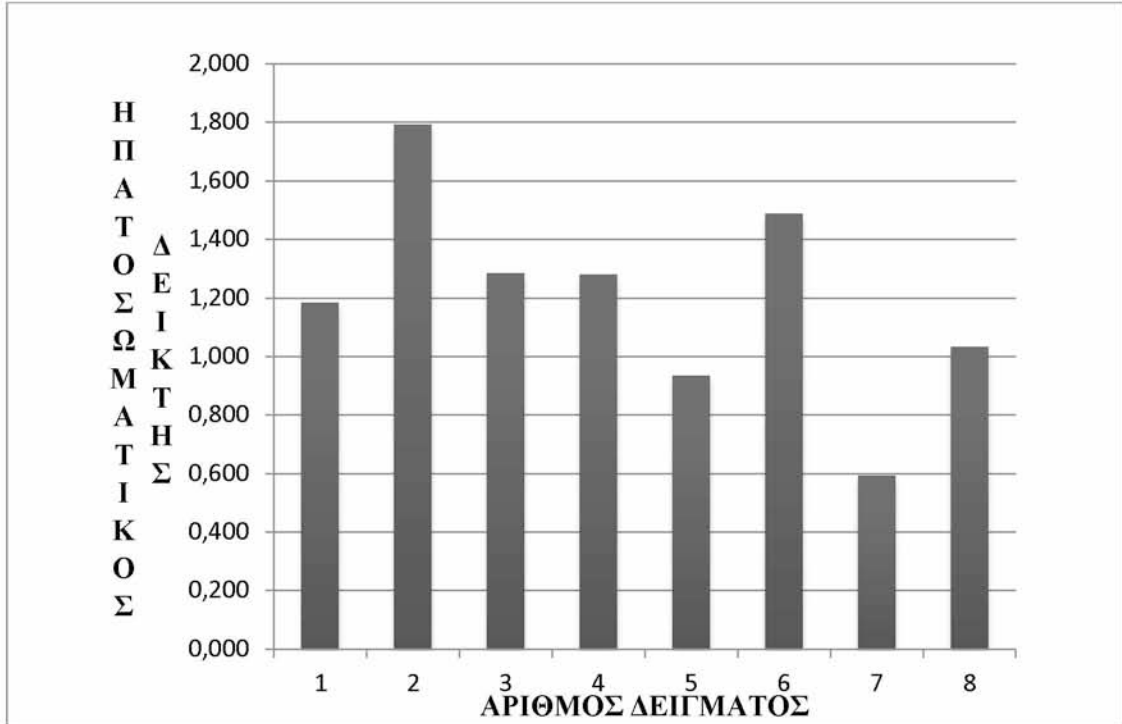
Οι μέσοι όροι του βάρους σώματος και των ηπατοσωματικών δεικτών στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικοί ($P < 0,05$) μεταξύ τους.

Όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα οι μετρήσεις του ηπατοσωματικού δείκτη του κάθε δείγματος διαφέρουν μεταξύ των τριών μεταχειρίσεων. Οι τιμές του ηπατοσωματικού δείκτη των ψαριών που ταΐστηκαν με την τροφή που περιείχε υδρολυμένο πτεράλευρο ($\max=1,69$, $\min=0,92$)(FeM50) (Σχήμα 1), είναι μικρότερες

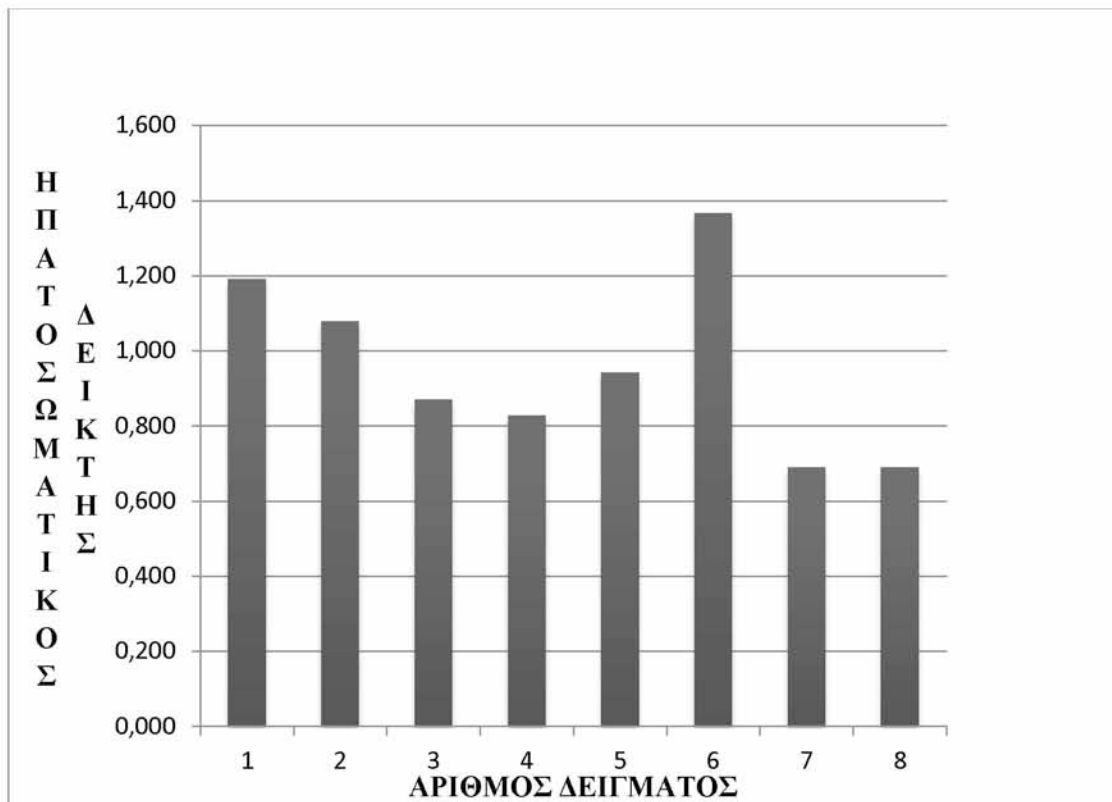
από τις τιμές του ηπατοσωματικού δείκτη των ψαριών που ταΐστηκαν με την τροφή που περιείχε πτηνάλευρο (PM50) ($\max=1,79$, $\min=0,92$) (Σχήμα 2). Ενώ παρατηρείται ότι οι τιμές του ηπατοσωματικού δείκτη των ψαριών που ταΐστηκαν με 100% ιχθυάλευρο (FM) είναι πολύ μικρότερες ($\max=1,36$, $\min=0,68$)(Σχήμα 3).



Σχήμα 1. Κατανομή τιμών ηπατοσωματικού δείκτη στη μεταχείριση FeM50.



Σχήμα 2. Κατανομή τιμών ηπατοσωματικού δείκτη στη μεταχείριση PM50.

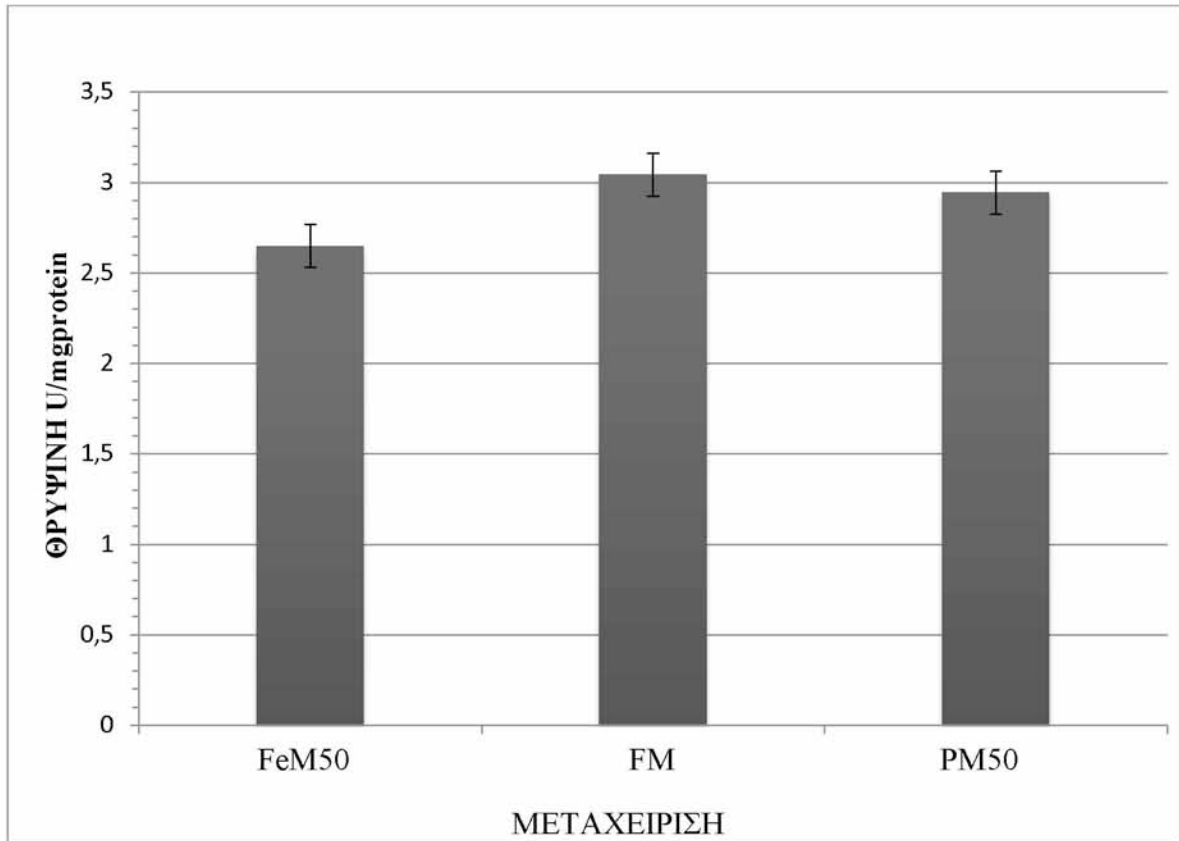


Σχήμα 3. Κατανομή τιμών ηπατοσωματικού δείκτη στη μεταχείριση FM

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές στατιστικές διαφορές ($P>0,05$) στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πλωρικών τυφλών ανάμεσα στις μεταχειρίσεις. Η δραστηριότητα της θρυψίνης δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών μεταχειρίσεων ($P=0,8993$ και $F= 0,1067$) (Πίνακας 6). Όσον αφορά, τους μέσους όρους των δραστηριοτήτων θρυψίνης στις τρεις μεταχειρίσεις που απεικονίζονται στο Σχήμα 4, φαίνεται ότι ο μέσος όρος της δραστηριότητας της θρυψίνης στη μεταχείριση FM($3,042 \pm 0,66$) είναι μεγαλύτερος αλλά χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από το μέσο όρο της δραστηριότητας στη μεταχείριση PM50 ($2,944 \pm 0,51$) και της δραστηριότητας της θρυψίνης στη μεταχείριση FeM50 και FM ($2,648 \pm 0,68$).

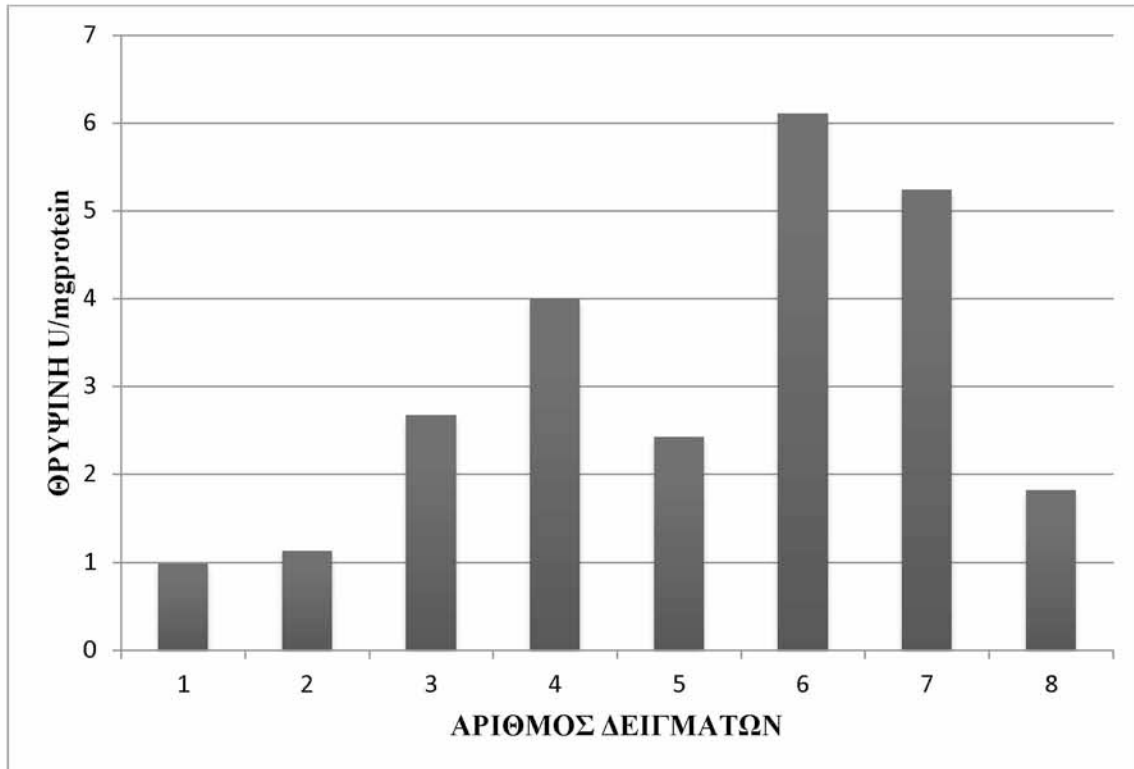
Πίνακας 6. Δραστηριότητα θρυψίνης (U/mgπρωτεΐνης) σε κάθε μεταχείριση

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	FeM50	FM	PM50
1	0,293	0,980	1,591
2	6,55	1,125	1,809
3	2,618	2,668	1,375
4	4,195	3,995	2,950
5	2,694	2,423	3,872
6	1,316	6,100	4,578
7	1,766	5,234	4,435
8	1,752	1,815	-

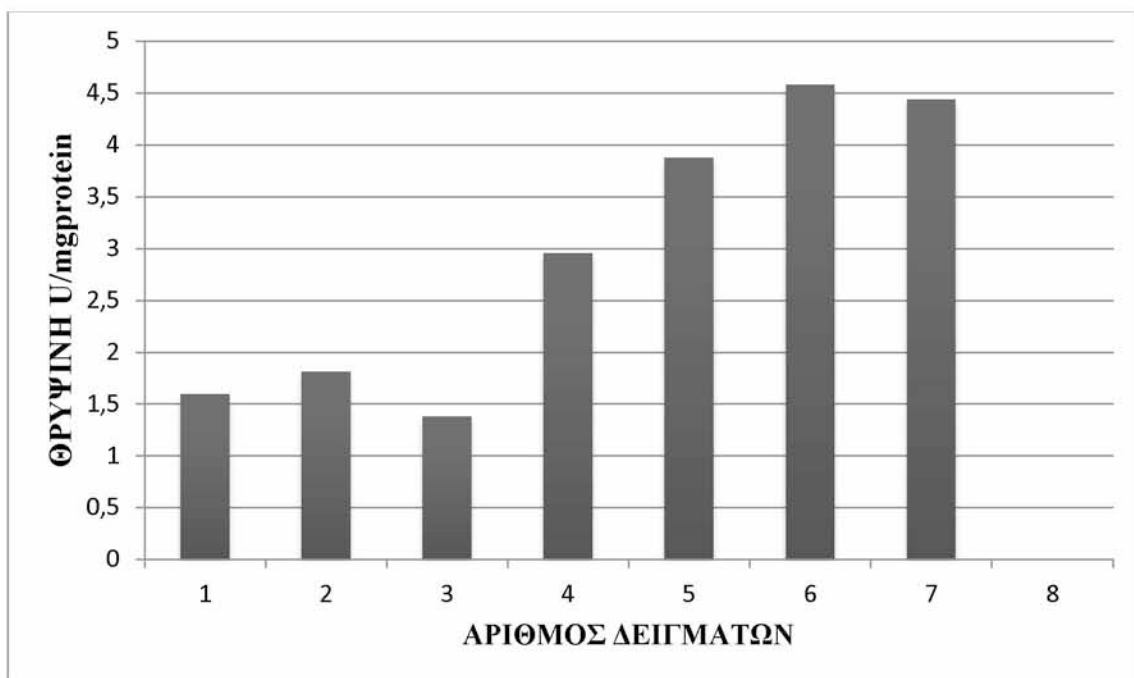


Σχήμα 4. Μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα θρυψίνης (U/mgπρωτεΐνης) ανά μεταχείριση.

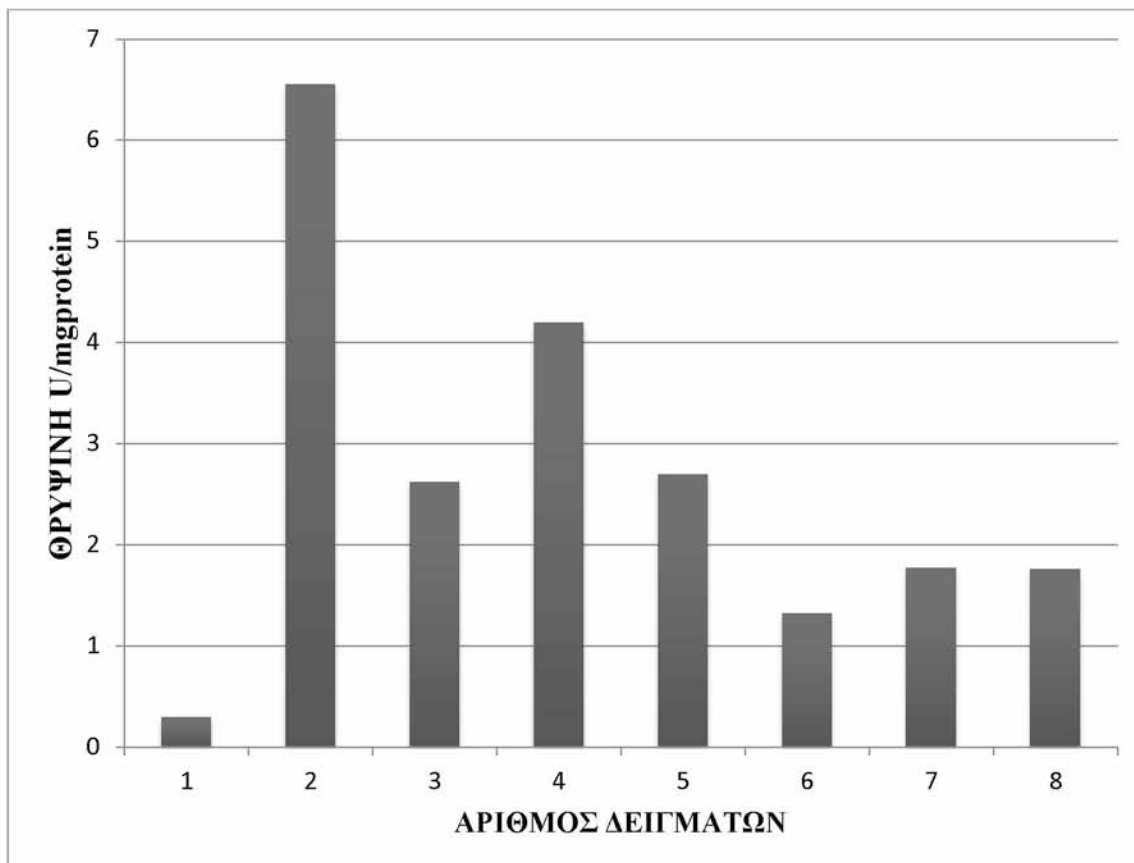
Τα σχήματα της κατανομής (Σχήματα 5, 6, 7) δείχνουν ακριβώς πώς κατανέμονται οι τιμές της δραστηρότητας της θρυψίνης ανα μεταχείριση και το εύρος των αριθμητικών τιμών τους δηλαδή η διαφορά της ελάχιστης από τη μέγιστη καταγεγραμμένη παρατήρηση. Στο Σχήμα 5 είναι αντιληπτό ότι υπάρχουν διακυμάνσεις στα επίπεδα δραστηρότητας θρυψίνης ανάμεσα στα οκτώ δείγματα, ωστόσο οι διακυμάνσεις αυτές, που ακολουθούν την κανονική κατανομή, δε φαίνεται να είναι μεγάλες, σε σύγκριση με τις διακυμάνσεις των τιμών της δραστηρότητας της θρυψίνης που απεικονίζονται στο Σχήμα 7, όπου η τυπική απόκλιση φτάνει το 1,95.



Σχήμα 5. Κατανομή τιμών δραστικότητας θρυψίνης (U/mgπρωτεΐνης) στη μεταχείριση FM



Σχήμα 6. Κατανομή τιμών δραστικότητας θρυψίνης (U/mgπρωτεΐνης) στη μεταχείριση PM50



Σχήμα7.Κατανομή τιμών δραστικότητας θρυψίνης (U/mgπρωτεΐνης) στη μεταχείριση FeM50.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η έρευνα για τα πεπτικά ένζυμα της τσιπούρας είναι πολύ περιορισμένη, αν και ένας αριθμός ενζύμων έχουν ταυτοποιηθεί (Gutierrez et al, 1985; Moyano&Sarasqueta, 1993; Sarasqueta et al., 1993; Moyano et al, 1996; Munilla-Moran&Saborido-Rey, 1996). Επίσης, η γνώση σχετικά με το πώς η σύνθεση των συστατικών των ιχθυοτροφών επηρεάζει τις δραστικότητες διαφόρων ενζύμων και ως εκ τούτου την πεπτικότητα στη τσιπούρα είναι περιορισμένη (Deguara et al, 2003). Δεν έχουν διεξαχθεί πολλές έρευνες για τον προσδιορισμό των σχετικών δραστηριοτήτων των ενζύμων στα διάφορα τμήματα του πεπτικού σωλήνα ή για τις διακυμάνσεις του pH που επικρατούν στο έντερο μετά το τάισμα. Εκτός από την πεψίνη, οι δραστικότητες όλων των ενζύμων δεν περιορίζονται σε ένα συγκεκριμένο τμήμα του εντέρου. Η δραστικότητα της πεψίνης που παρατηρείται στη *S. aurata* περιορίζεται στο στομάχι. Οι δραστικότητες της

θρυψίνης και της αμυλάσης είναι σημαντικά χαμηλότερες στο στομάχι από όλες τις άλλες περιοχές (Deguara et al., 2003).

Σε μελέτη των Deguara et al., (2003), αν και όλα τα ένζυμα εκτός της πεψίνης ανιχνεύθηκαν σε κάθε περιοχή του εντέρου της *S. aurata*, οι σχετικές δραστηριότητες μεταξύ περιοχών διέφερε από το ένα ένζυμο στο άλλο. Έτσι, ενώ οι δραστηριότητες της θρυψίνης και της αμυλάσης ήταν σημαντικά χαμηλότερες στο στομάχι από όλες τις άλλες περιοχές αυτό δεν συνέβη και με τη χυμοθρυψίνη, τη καρβοξυπεπτιδάση Α ή τη δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β. Αντίθετα με τις προσδοκίες, στην τελευταία ομάδα των ενζύμων οι μέσες δραστηριότητες στο στομάχι ήταν παρόμοιες, και σε ορισμένες περιπτώσεις υψηλότερες από τις δραστηριότητες που παρατηρήθηκαν σε άλλα μέρη του εντέρου. Λαμβάνοντας υπόψη τα PHs στο στομάχι του *S. aurata*, και το βέλτιστο PH των επιμέρους ενζύμων, φαίνεται ότι αν και τα ένζυμα ανιχνεύθηκαν στο στομάχι, στην πραγματικότητα η πραγματική συμβολή τους στην πέψη θα ήταν πιθανώς πολύ χαμηλή.

Σε έρευνα που πραγματοποίησαν οι Santigosa et al. το 2008, η αντικατάσταση των ιχθυάλευρων από φυτικές πηγές πρωτεΐνης είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πεπτική δραστηριότητα στην πέστροφα και την τσιπούρα. Ωστόσο, τόσο η πέστροφα και η τσιπούρα έδειξε μηχανισμούς αντιστάθμισης, όπως η αύξηση στο σχετικό εντερικό μήκος (RIL) και μία ανοδική ρύθμιση της δραστηριότητας θρυψίνης στη τσιπούρα, ώστε να επιτευχθεί μια ισορροπία του πεπτικού και οι ρυθμοί ανάπτυξης ήταν παρόμοιοι με εκείνους που παρατηρήθηκαν για την ομάδα που ταΐστηκε με ιχθυάλευρο. Με βάση τα αποτελέσματά τους, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με έως 75% φυτικές πρωτεΐνες μπορεί να είναι οικονομικά βιώσιμη χρήση των μικτών πηγών φυτικών πρωτεϊνών.

Οι Munilla-Moran and Saborido-Rey μελέτησαν το 1996 τη δράση της αμυλάσης στο έντερο της τσιπούρας (*Sparus aurata*), του καλκανιού (*Scophthalmus maximus*) και του κοκκινόψαρου (*Sebastes mentella*) χρησιμοποιώντας διαλυτό άμυλο ως υπόστρωμα και βρήκαν ότι υψηλές συγκεντρώσεις άλατος ανέστειλαν τη δραστηριότητα αμυλάσης της τσιπούρας και του καλκανιού και ενεργοποίησαν την δραστηριότητα στο κοκκινόψαρο. Η σταθερότητα των τιμών των πεπτικών ενζύμων στη τσιπούρα ήταν απόλυτα εξαρτημένη από τα ιόντα ασβεστίου. Αντιθέτως, η δραστηριότητα στο κοκκινόψαρο

ανιχνεύθηκε μόνο εν απουσία αυτού του μετάλλου. Ο διαχωρισμός των ειδών των πεπτικών ενζύμων σε 11 τελεόστεους ιχθύς γλυκού νερού σύμφωνα με τις εξειδικευμένες διατροφικές του συνήθειες μελετήθηκε από τους Chakrabarti et al. (1995). Στην παρούσα μελέτη, η δραστηριότητα εστεράσης ανιχνεύεται στον οισοφάγο όλων των ψαριών σχεδόν. Επίσης παρατηρήθηκε μικρή έως μέτρια δραστηριότητα εστεράσης στο ήπαρ όλων των υπό μελέτη ψαριών, αλλά η δραστηριότητα δεν είναι ποτέ περισσότερη από ό, τι έχει καταγραφεί στα άλλα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα.

Η έρευνα των Hidalgo et al., (1999) έδειξε ότι, η πρωτεολυτική ενεργότητα που προσδιορίζεται στην πεπτική οδό μαζί με το ήπαρ ήταν υψηλότερη 100% στην πέστροφα. Η αμέσως υψηλότερη τιμή αντιστοιχούσε σε κυπρίνους 99,8%, που ακολουθείται από το γλήνι 69,8%, τα χρυσόψαρα 58,4%, τη τσιπούρα 25% και τα χέλια 13,4%. Δεν βρέθηκαν διαφορές στην πρωτεολυτική δραστηριότητα που να δικαιολογούνται από την κατάταξη των ψαριών ως παμφάγα ή σαρκοφάγα. Η δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων λιπάσης, α-αμυλάση και δισακχαριδασών μελετήθηκε από τους Langeland et al., (2013), σε αργή ανάπτυξη και ταχέως αναπτυσσόμενες ομάδες της εκτρεφόμενης Ευρασιατικής πέρκας (*Perca fluviatilis*) διαφορετικών ηλικιών. Η δραστηριότητα του καρβοϋδράσης (δισακχαριδασών και α-αμυλάση), λιπάση, χυμοθρυψίνη και θρυψίνη συγκρίθηκαν επίσης μεταξύ της Ευρασιατικής πέρκας (*Perca fluviatilis*) και του αρκτικού σαλβελίνου (*Salvelinus alpinus*). Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του ρυθμού ανάπτυξης και η ηλικία για τις δραστηριότητες του πεπτικού ενζύμου στην Ευρασιατική πέρκα. Η συνολική δραστηριότητα της λιπάσης ήταν υψηλότερη από ό, τι συνολική συνδυασμένη δραστηριότητα καρβοϋδράσης και στα δύο είδη. Σε σύγκριση με τον αρκτοσαλβελίνο, η Ευρασιατική πέρκα είχε υψηλότερη ενεργότητα της λιπάσης στο πάγκρεας και χαμηλότερη δραστηριότητα της λιπάσης στα πυλωρικά τυφλά και μέσα στο έντερο. Η συνολική δραστηριότητα της χυμοθρυψίνης ήταν υψηλότερη από τη συνολική δραστηριότητα θρυψίνης και στα δύο είδη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΕΠΤΙΚΩΝ ENZYΜΩΝ

ΤΕΧΝΙΚΕΣ	ΙΣΤΟΙ	ΠΕΠΤΙΚΑ ENZYΜΑ	ΨΑΡΙΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΨΑΡΙΩΝ (cm)	ΔΙΑΙΤΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΠΗΓΗ
Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της πεψίνης διεξήχθη χρησιμοποιώντας καζεΐνη ως υπόστρωμα	πεπτικός σωλήνας	πεψίνη	τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	150g	Τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα ήταν σε νηστεία επί 40 ώρες πριν από τη δειγματοληψία	Εκτός από την πεψίνη, οι δραστηριότητες όλων των ενζύμων δεν περιορίζονται σε ένα συγκεκριμένο τμήμα του έντερο. Η δραστηριότητα της πεψίνης που παρατηρείται στη <i>S. aurata</i> περιορίζεται στο στομάχι. Οι δραστηριότητες της θρυψίνης και της αμυλάσης ήταν σημαντικά χαμηλότερες στο στομάχι από όλες τις άλλες περιοχές στον πεπτικό σωλήνα.	Deguara S., Jauncey K., Agius C.2003
Η δραστηριότητα της θρυψίνης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας Na-p-toluenesulphonyl-L-arginine μεθύλεστερα (TAME) ως υπόστρωμα		θρυψίνη					
Άμυλο χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για	έντερο	αμυλάση	τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	18-22,5	ημίξηρη τροφή	Υψηλές συγκεντρώσεις άλατος ανέστειλαν τη δραστηριότητα αμυλάσης της τσιπούρας και του	R. Munilla-Moran and F. Saborido-Rey,

τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της αμυλάσης						καλκανιού και ενεργοποίησαν την δραστηριότητα στο κοκκινόψαρο. Η δραστηριότητα στη τσιπούρα ήταν απόλυτα εξαρτημένη από τα ιόντα ασβεστίου. Αντιθέτως, η δραστηριότητα στο κοκκινόψαρο ανιχνεύθηκε μόνο εν απουσία ασβεστίου.	1996
διαλυτό άμυλο ως υπόστρωμα, όπως περιγράφεται από τους Munilla-Moran and Stark	έντερο	αμυλάση	καλκάνι (<i>Scophthalmus aximus</i>)	26,5-32	ημίξηρη τροφή		R. Munilla-Moran and F. Saborido-Rey, 1996
Bernfeld (1955) χρήση αμυλοπηκτικής, (Sigma, U.S.A.) ως υπόστρωμα	έντερο, συκώτι	α-αμυλάση	<i>C. mrigala</i> <i>L. calbasu</i> <i>C. catla</i> <i>N. notopterus</i>	*	παμφάγο (Λεπτά μέρη των φυτών με μικρές ποσότητες λάσπης, μικρά καρκινοειδή, κάποιες προνύμφες εντόμων, τροχόζωα, φυτοπλαγκτόν)	Ο οισοφάγος και το έντερο είχαν τη μέγιστη δραστηριότητα α-αμυλάσης στα περισσότερα από τα ψάρια. Η δραστηριότητα της α-Αμυλάσης ήταν σε ένα ελάχιστο στα ήπατα όλων των ψαριών	I. Chakrabarti, Md. A. Gani, K. K. Chaki, R. Sur and K. K. Misra, 1995
Seligman and Nachlas (1963) με χρήση /I-naphthyllaurate (Sigma, U.S.A.) ως υπόστρωμα	έντερο, συκώτι	εστεράση	<i>C. mrigala</i> <i>L. calbasu</i>	*		Οισοφάγος και έντερο ήταν οι θέσεις της μέγιστης οστεόλυσης στα περισσότερα από τα ψάρια. Ωστόσο, υψηλότερη δραστηριότητα εστεράσης καταγράφηκε από το έντερο του	I. Chakrabarti, Md. A. Gani, K. K. Chaki, R. Sur and K. K. Misra, 1995

						<i>Cmrigala</i> . Στο στόμαχο του <i>Lcalbase</i> εμφανήθηκε μέγιστη δραστηριότητα εστεράσης μεταξύ όλων των οργάνων του πεπτικού συστήματος	
Μέθοδος της υδρόλυσης καζεΐνης του Kunitz(1947) όπως τροποποιήθηκε από τον Walter το 1984. Ο προσδιορισμός έγινε σε pH=1,5	συκώτι, πεπτικό σύστημα	αμυλάση	τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	ενήλικο	σαρκοφάγο	Στην τσιπούρα η δραστηριότητα της αμυλάσης είναι υψηλότερη (0,843 U/mg στους 37 °C και 0,413 U/mg στους 25 °C) απ ότι στην ιριδίζουσα πέστροφα που είναι μηδενική και στις 2 θερμοκρασίες	M.C. Hidalgo, E. Urea, A. Sanz, 1999
Μέθοδος της υδρόλυσης καζεΐνης του Kunitz(1947) όπως τροποποιήθηκε από τον Walter το 1984. Ο προσδιορισμός έγινε σε pH= 8,5	συκώτι, πεπτικό σύστημα	αμυλάση	ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	ενήλικο	σαρκοφάγο		M.C. Hidalgo, E. Urea, A. Sanz, 1999
καζεΐνη ως υπόστρωμα	πυλωρικά τυφλά, στόμαχος, έντερο	πρωτεάσες	μουσμούλι (<i>Pagellus acarne</i>)		δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες	Μια διατροφή πλούσια σε πρωτεΐνες, όπως εντόσθια ψαριών, οδήγησε σε υψηλότερες	G. Caruso, M.G. Denaro

						ποσότητες πρωτεασών στα δείγματα που αναλύθηκαν, ενώ τα επίπεδα αμυλάσης και της λιπάσης ήταν μεγαλύτερα στα ψάρια που η διατροφή τους περιείχε υψηλότερα ποσοστά μη-πρωτεϊνικών ενώσεων στη σύνθεσή τους.	and L. Genovese, 2009
ανάγνωση μικροπλάκας	πάγκρεας	α-αμυλάση	πέρκα(<i>Perca fluviatilis</i>)	ενήλικο	εμπορικές ισοαζωτούχες ιχθυοτροφές	Η δραστηριότητα της α-αμυλάσης ήταν υψηλότερη στο πάγκρεας από ό,τι σε όλους τους άλλους ιστούς (P <0.001),	M. Langeland, J. E. Lindberg and T. Lundh, 2013
Για τη θρυψίνη, ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε benzoylarginine-ρ-νιτροανιλίδιο	πάγκρεας	θρυψίνη	πέρκα(<i>Perca fluviatilis</i>)	ενήλικο	εμπορικές ισοαζωτούχες ιχθυοτροφές	Η θρυψίνη και χυμοθρυψίνη οι δραστηριότητες ήταν υψηλότερες στα πυλωρικά τυφλά από ό,τι στο έντερο (P <0,05).	M. Langeland, J. E. Lindberg and T. Lundh, 2013
Για τη χυμοθρυψίνη, ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε . N-βενζοϋλο-L-τυροσίνης	συκώτι	χυμοθρυψίνη	αρκτικός σαλβελίνος (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	ενήλικο	εμπορικές ισοαζωτούχες ιχθυοτροφές	Η συνολική δραστηριότητα χυμοθρυψίνης (193 U/mg ανα δείγμα) ήταν σημαντικά υψηλότερη από τη	M.Langeland, J. E. Lindberg and T. Lundh, 2013

αιθυλεστέρας						συνολική δραστικότητα θρυψίνης (0.24 U/ mg ανα δείγμα).	
Bezerra <i>et al.</i> (2005) (πρωτεάση) 3,5–dinitrosalicylic acid (DNS) method (Bernfeld, 1951)(αμυλάση). Markweg <i>et al.</i> (1995) (λιπάση)	συκώτι, ψευδοστόμαχος, έντερο	πρωτεάση, αμυλάση, λιπάση	τιλάπια (<i>Tilapia nilotica</i>)	5,7 gr.	Τα ψάρια τράφηκαν για μία εβδομάδα δύο φορές την ημέρα με 28, 30 και 35% πρωτεϊνούχες ζωοτροφές	Η δραστικότητα της πρωτεάσης από το ψευδο στόμαχο, το έντερο και το ήπαρ ήταν υψηλότερη σε PH 9, Το επίπεδο δραστικότητας αμυλάσης από το ήπαρ, ψευδοστόμαχο, το έντερο ήταν υψηλότερη σε PH 6.	R. Klahan, N. Areechon, R. Yoonpundh and A. Engkagul, 2009
Bezerra <i>et al.</i> (2005)(πρωτεάση) 3,5–dinitrosalicylic acid (DNS) method (Bernfeld, 1951) (αμυλάση). Markweg <i>et al.</i> (1995)(λιπάση)	συκώτι, ψευδοστόμαχος, έντερο	πρωτεάση, αμυλάση,	τιλάπια (<i>Tilapia nilotica</i>)	35.8 gr	Τα ψάρια τράφηκαν για μία εβδομάδα δύο φορές την ημέρα με 28, 30 και 35% πρωτεϊνούχες ζωοτροφές	Η δραστικότητα της πρωτεάσης από το ψευδοστόμαχο, το έντερο και το ήπαρ ήταν υψηλότερη σε PH 8, 10, 9 και 10. Το επίπεδο δραστικότητας της αμυλάσης από αυτά τα όργανα ήταν υψηλότερη σε PH 7, 8, 6 και 7	R. Klahan, N. Areechon, R. Yoonpundh and A. Engkagul, 2009

Bezerra <i>et al.</i> (2005)(πρωτεάση) 3,5– dinitrosalicylic acid (DNS) method (Bernfeld, 1951) (αμυλάση). Markweg <i>et al.</i> (1995)(λιπάση)	συκώτι, ψευδοστόμα χος , έντερο	πρωτεάση,α μυλάση,	τιλάπια (<i>Tilapia nilotica</i>)	92,1 gr	Τα ψάρια τράφηκαν για μία εβδομάδα δύο φορές την ημέρα με 28, 30 και 35% πρωτεϊνούχες ζωοτροφές	Η δραστικότητα της πρωτεάσης από το ψευδο στόμαχο, το έντερο και το ήπαρ ήταν υψηλότερη σε PH 9, 10, 10 και 9. Το επίπεδο δραστικότητας της αμυλάσης από αυτά τα όργανα ήταν υψηλότερη σε PH=2	R. Klahan, N. Areechon, R. Yoonpundh and A. Engkagul, 2009
Οι δραστικότητες της αμυλάσης και της θρυψίνης προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τους Metais and Bieth (1968) and Tseng <i>et al.</i> (1982), leucine alanine peptidase (leu-ala προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τους Bessey <i>et al.</i> (1946),	όλο το σώμα	αμυλάση, θρυψίνη,	τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	7.00±0.007	<i>Artemia Nauplii</i> Enriched with Free Histidine	Υπήρξε μικρή διαφορά στη δραστικότητα της αμυλάσης ανάμεσα στο controlgroup (2.68±0.14 (U/mg protein)) και εκείνο που ταΐστηκε με εμπλουτισμένη τροφή (2.54±0.03 (U/mg protein)). Υπήρξε μικρή διαφορά στη δραστικότητα της θρυψίνης ανάμεσα στο controlgroup (108.27±0.55 mU/mg protein) και εκείνο που ταΐστηκε με εμπλουτισμένη τροφή (109.20±0.26 mU/mg	M. Naz and M. Turkmen, 2008

						protein)	
Οι δραστηριότητες της αμυλάσης και της θρυψίνης προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τους Metais and Bieth (1968) και Tseng et al.(1982)	όλο το σώμα	αμυλάση, θρυψίνη,	τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	7.68±0.07	<i>Artemia Nauplii</i> Enriched with Free Histidine	Υπήρξε αρκετή διαφορά στη δραστηριότητα της αμυλάσης ανάμεσα στο controlgroup (22.20±0.28 (U/mg protein) και εκείνο που ταΐστηκε με εμπλουτισμένη τροφή (7.97±0.18 (U/mg protein). Όπως επίσης, στη δραστηριότητα της θρυψίνης ανάμεσα στο controlgroup (143.99±0.84mU/mg protein) και εκείνο που ταΐστηκε με εμπλουτισμένη τροφή (115.28±0.16mU/mg protein)	M. Naz and M. Turkmen, 2008
Οι δραστηριότητες της αμυλάσης και της θρυψίνης προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τους Metais and Bieth (1968) και Tsengetal.(1982)	όλο το σώμα	αμυλάση, θρυψίνη,	τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	10.41±0.01	<i>Artemia Nauplii</i> Enriched with Free Histidine	Υπήρξε αρκετή διαφορά στη δραστηριότητα της αμυλάσης ανάμεσα στο controlgroup (25.84±0.6 (U/mg protein) και εκείνο που ταΐστηκε με εμπλουτισμένη τροφή (12.74±0.20 (U/mg protein). Μεγαλύτερη διαφορά στη δραστηριότητα της	M. Naz and M. Turkmen, 2008

						θρυψίνης παρατηρήθηκε ανάμεσα στο controlgroup (159.60±1.01 mU/mg protein) και εκείνο που ταΐστηκε με εμπλουτισμένη τροφή (122.44±0.49 mU/mg protein)	
Οι δραστηριότητες της αμυλάσης και της θρυψίνης προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τους Metais and Bieth (1968) και Tseng et al.(1982)		αμυλάση, θρυψίνη,	τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	9.45±0.68	<i>Artemia Nauplii</i> Enriched with Free Histidine	Υπήρξε αρκετή διαφορά στη δραστηριότητα της αμυλάσης ανάμεσα στο controlgroup (11.00±0.41 (U/mg protein) και εκείνο που ταΐστηκε με εμπλουτισμένη τροφή (2.74±0.06 (U/mg protein). Όπως επίσης, στη δραστηριότητα της θρυψίνης ανάμεσα στο controlgroup (138.61±1.23mU/mg protein) και εκείνο που ταΐστηκε με εμπλουτισμένη τροφή (58.85±0.70mU/mg protein)	M. Naz and M. Turkmen, 2008
η δραστηριότητα της α- αμυλάσης αναλύθηκε στους	έντερο	α- αμυλάση	πέστροφα (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	FM 154.1±4.5 PP50	4 διατροφές:	Η αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων από φυτικές πρωτεΐνες προκάλεσε	E. Santigosa, J. Sánchez, F.

20 ° C χρησιμοποιώντας μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου που περιγράφεται από τον Dold et al. (1995).				138.3±4.7 PP75 136.3±4.3 PP100 120.3±13.8	1)100% ιχθυάλευρο; 2) 50% το ιχθυαλεύρου αντικαταστάθηκε με πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης 3)75% του ιχθυαλεύρου αντικαταστάθηκε με πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης 4) 100% του ιχθυαλεύρου αντικαταστάθηκε με πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης.	μείωση του ρυθμού αύξησης τόσο στην πέστροφα όσο και στην τσιπούρα. Και στα δύο είδη, η δραστηριότητα α- αμυλάσης ήταν χαμηλότερη από τις συνολικές τιμές δραστικότητας πρωτεάσης, και ήταν υψηλότερη στη τσιπούρα απ' ό, τι στην πέστροφα για όλες τις δίαιτες που δοκιμάστηκαν.	Médale, S. Kaushik, J. Pérez- Sánchez, M.A. Gallardo, 2008
Το σύνολο της δραστηριότητας της αλκαλικής πρωτεάσης (TPA) μετρήθηκε φασματοφωτομετ ρικά στα ομογενοποιημένα υλικά σύμφωνα με Moyano et al. (1996).		αλκαλική πρωτεάση	τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	FM 89.7±1.8P P50 80.3±1.6 PP75 76.9±1.7 PP100 64.6±1.7			
Χανάλυση της α- αμυλάσης στα πυλωρικά τυφλά και το έντερο ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Dold, Fleit, Χαν	πυλωρικά τυφλά, έντερο	α-αμυλάση	τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	*	Τέσσερις πειραματικές δίαιτες το ιχθυέλαιο αντικαταστάθηκε στο 0%, 33%, 66% και 100% (FO, 33, 66 και 100VO)	Η δραστηριότητα της α- αμυλάσης στα δείγματα απο τα πυλωρικά τυφλά και το έντερο 5 ώρες μετά το τάισμα δεν τροποποιήθηκε σημαντικά από την αντικατάσταση του ιχθυελαίου από φυτικά	E. Santigosa, I. Garcia-Meilan, J.M. Valentin, I. Navarro, J. Perez- Sanchez & M.A. Gallardo,

και Coop (1995), όπως τροποποιήθηκε από τον Santigosa κ.ά.. (2008)					φυτικά έλαια (VOs? κράμβη, λιναρόσπορο και έλαια φοίνικα). Οι δίαιτες συμπληρώθηκαν με L-λυσίνη και το DHA	έλαια. Δεν βρέθηκε μεταξύ των δύο εντερικών περιοχών σημαντική διαφορά στη δραστικότητα της α- αμυλάσης σε οποιαδήποτε τροφική ομάδα.	2011
Η δραστικότητα της αλκαλικής πρωτεάσης μετρήθηκε με τη χρήση 5 gL ⁻¹ αζοκαζείνης σε 50 mMTris-HCl (pH 9.0).	έντερο	Αλκαλική πρωτεάση	γλώσσα (<i>Solea senegalensis</i>)	22.3 ± 2.5	ταΐστηκαν σε πέντε δίαιτες με μερική αντικατάσταση των ιχθυάλευρων από σόγια, συμπύκνωμα πρωτεΐνης σόγιας, προϊόν απομόνωσης πρωτεΐνης σόγιας, άλευρο γλουτένης σίτου ή συμπύκνωμα πρωτεΐνης μιτζελιού.	Η γλώσσα δείχνει να έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την πεπτική έκκριση πρωτεάσης όταν η συγκέντρωση ή η πηγή διαιτητικών πρωτεϊνών τροποποιείται. Η εντερική δραστηριότητα πρωτεάσης επηρεάστηκε από ποσοτικές αλλαγές στις διατροφικές πρωτεΐνες.	A. Rodiles, M. Herrera, I. Hachero- Cruzado, M. L. Cordero, E. Santigosa, Alar- co 'nF. J., S. Marti 'nez- Llorens, S. P. Lall, 2012

*δεν υπάρχουν πληροφορίες

Το ποσοστό της παραγωγής ιχθυαλεύρων παγκοσμίως που χρησιμοποιείται σε ιχθυοτροφές έχει αυξηθεί σημαντικά κατά τα τελευταία 10 χρόνια. Σήμερα λοιπόν αναζητούνται εναλλακτικές λύσεις ώστε να μην απειλούνται τα ιχθυαποθέματα. Οι Dong et al. (1993) ανέφεραν ότι τα υποπροϊόντα πουλερικών είναι ένα συστατικό που ποικίλει σημαντικά στην ποιότητα ανάλογα για ποιο υποπροϊόν πρόκειται, κάτι που μετράται με τη φαινόμενη πεπτικότητα της πρωτεΐνης.

Οι δοκιμές εκτροφής που περιλαμβάνουν άλευρα από υποπροϊόντα πουλερικών έχουν δείξει ότι μέχρι 40% του ιχθυάλευρου θα μπορούσε να αντικατασταθεί με υποπροϊόν των πουλερικών χωρίς μείωση της ανάπτυξης της πέστροφας, αλλά η προσπάθεια αντικατάστασης σε υψηλότερο ποσοστό είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ανάπτυξη. Η πεπτικότητα πρωτεΐνης της ιχθυοτροφής από υποπροϊόντα πουλερικών, που μετρήθηκε σε πέστροφα, ήταν 94-95% (Sugiura et al., 1998), αλλά τα πρόσφατα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν ότι η διαθεσιμότητα ορισμένων αμινοξέων σε άλευρα πουλερικών είναι χαμηλότερη από το μέσο όρο πεπτικότητας πρωτεϊνών.

Οι Tiews et al. (1976), έδειξαν ότι τα ιχθυάλευρα μπορούν να αντικατασταθούν εξ ολοκλήρου, χωρίς μείωση της αποτελεσματικότητας των ζωοτροφών σε δίαιτες για την ιριδίζουσα πέστροφα από ένα γεύμα που απαρτίζεται από μίγμα υποπροϊόντων των πουλερικών και φτερών μαζί με συμπληρώματα λυσίνης, D, L-μεθειονίνης και τρυπτοφάνης. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με το έργο των Gropp et al. (1979), όπου μια πλήρης αντικατάσταση των ιχθυάλευρων από παραπροϊόντα πουλερικών, οδήγησε μόνο σε μια ελαφρά κατάπτωση των παραμέτρων ανάπτυξης. Ο Steffens το 1985 επίσης έδειξε ότι το άλευρο από υποπροϊόντα πουλερικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μερικό υποκατάστατο; 30%. για τα ιχθυάλευρα στις ζωοτροφές που προορίζονται για την πέστροφα. Τα υποπροϊόντα πουλερικών (χωρίς φτερά) έχουν χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα ως συστατικό των ιχθυοτροφών. Σύμφωνα με τους Higgs et al. (1979) τουλάχιστον το 28% των υποπροϊόντων πουλερικών μπορεί να περιλαμβάνονται στη διατροφή του σολομού Coho χωρίς συμπλήρωση αμινοξέων. Όταν πραγματοποιείται αύξηση της αναλογίας των αλεύρων πουλερικών υποπροϊόντων μέχρι την ολική αντικατάσταση του ιχθυάλευρου, έχουμε ως αποτέλεσμα την κακή μετατροπή της τροφής.

Επίσης οι Naz et al., (2008) μελετώντας τα πεπτικά ένζυμα και τις ορμόνες σε τσιπούρες που ταΐστηκαν με προνύμφες Artemia εμπλουτισμένες με ιστιδίνη βρήκαν ότι, μετά από 16 ημέρες από την κατανάλωση Artemia εμπλουτισμένη με ιστιδίνη, το μέσο βάρος των ομάδων ήταν υψηλότερο από εκείνο της ομάδας ελέγχου, δείχνοντας ότι ο εμπλουτισμός Artemia με ιστιδίνη έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη της τσιπούρας.

Ο Fowler (1991) είχε μια επιτυχή εκτροφή σολομού Chinook με μια διαίτα που περιείχε 20% των υποπροϊόντα πουλερικών χωρίς συμπλήρωση αμινοξέων. Οι Alexis et al. όταν ασχολήθηκαν με την ιριδίζουσα πέστροφα, έλαβαν πολύ καλά αποτελέσματα με μία τροφή που περιείχε 25% υποπροϊόντα πουλερικών, με προσθήκη μεθειονίνης.

Οι Santigosa et al. (2011) μελέτησαν την αντικατάσταση έως και 66% των ιχθυελαίων από μείγμα φυτικών ελαίων, όταν το 75% των ιχθυαλεύρων αντικαθίσταται από φυτικές πηγές πρωτεϊνών και συμπέραναν ότι επιβραδύνεται η πέψη πρωτεΐνης, και υπάρχει αύξηση της αναλογίας θρυψίνη / χυμοθρυψίνη σε 5 ώρες μετά τη σίτιση ως απάντηση στην ένταξη φυτικού ελαίου. Δεν βρέθηκαν διαφορές στην ικανότητα απορρόφησης αμινοξέων. Η συνολική αντικατάσταση του ιχθυελαίου οδήγησε σε μειωμένη συνολική δραστηριότητα της πρωτεΐνης και αύξησε τη συσσώρευση λιπιδίων στα εντεροκύτταρα του εγγύς εντέρου.

Το υδρολυμένο πετράλευρο μπορεί να περιλαμβάνεται σε δίαιτες για την ιριδίζουσα πέστροφα με ανώτατο όριο 20-25% χωρίς συμπλήρωση αμινοξέος (Henrichfreise, 1989). Οι υψηλότερες αναλογίες οδήγησαν σε μείωση της πρόσληψης τροφής, καθώς και σε μείωση του δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής και, ως εκ τούτου οδήγησε σε επιβράδυνση της ανάπτυξης. Η ανεπαρκής προσφορά απαραίτητων αμινοξέων υπό τις συνθήκες αυτές γίνεται εμφανής με χαμηλότερα επίπεδα πρωτεϊνών και υψηλότερα επίπεδα του λίπους του ψαριού.

Η διαφοροποίηση των δραστηριοτήτων πεπτικού ενζύμου ως προς τη διατροφή είναι κοινή, αλλά όχι καθολική μεταξύ των σπονδυλωτών (Sabat et al., 1999). Η δράση των πεπτικών ενζύμων σχετίζεται με τη διαφοροποίηση της διατροφής και μπορεί να εξηγηθεί από την "υπόθεση προσαρμοστικής διαμόρφωσης", η οποία αναφέρει ότι η

μεταβολή στη διατροφή θα πρέπει να προσδώσει στα ζώα την ικανότητα να ρυθμίζουν αναλόγως την πεπτική ενζυμική δραστηριότητα τους, ενώ είδη και με λιγότερο ποικίλες δίαιτες δεν θα πρέπει να δείχνουν καμία τέτοια δυνατότητα (Karason 1992).

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της προσθήκης πτηνάλευρου ή πτεράλευρου στην διατροφή της τσιπούρας, *Sparus aurata*, στα επίπεδα θρυψίνης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 23 άτομα. Η διαδικασία της διερεύνησης αναλύεται στο κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι».

Με βάση την παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα θρυψίνης στα δείγματα των τριών μεταχειρίσεων. Οι Lazzari et al. σε μελέτη τους το 2010 παρατήρησαν ότι τα επίπεδα θρυψίνης ήταν υψηλότερα σε ιχθύς που ταΐστηκαν με δίαιτες που περιείχαν πηγές ζωικών πρωτεϊνών. Τα επίπεδα θρυψίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της ποιότητας των πρωτεϊνών ή την ικανότητα πέψης του οργανισμού (Sunde et al., 2004).

Εν κατακλείδι η τσιπούρα φαίνεται να είναι σε θέση να αξιοποιήσει καλής ποιότητας άλευρα από υποπροϊόντα πουλερικών (πτηνάλευρο και πτεράλευρο). Ως εκ τούτου τα άλευρα αυτά είναι πολλά υποσχόμενα ως προς την καταλληλότητα της χρήσης τους στα σιτηρέσια της τσιπούρας. Η χαμηλή αποδοτικότητα τους ως προς την ανάπτυξη των ιχθύων μπορεί να οφείλεται σε ανεπαρκή αμινοξέα ή σε περιεκτικότητα λιπαρών οξέων ή παράγοντες, όπως τις συνθήκες επεξεργασίας, την πεπτικότητα, ή οποιοδήποτε συνδυασμό παραγόντων.

Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να πραγματοποιηθούν για την αξιολόγηση της πεπτικότητας διαφορετικών συστατικών των τροφών για την τσιπούρα σε ένα εύρος επιπέδων ένταξης και για τη δημιουργία κάθε θρεπτικής ή βλαβερής αλληλεπίδρασης μεταξύ των διατροφικών συστατικών.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

www.fishbase.org

5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Καπελος Π. Κ..2011.Διερεύνηση των δυνατοτήτων της χρησιμοποίησης προβιοτικών στη διατροφή της τσιπούρας *Sparus aurata*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Καραπαναγιωτίδης Ι., Μεντέ Ε. 2011. Τεχνολογία ιχθυοτροφών. Πανεπιστημιακές παραδόσεις. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Γεωπονικών Επιστημών. Τμήμα Ιχθυολογίας και υδάτινου περιβάλλοντος.

Κασπίρης Π. ,1998. Πανεπιστημιακές παραδόσεις Ιχθυολογίας. Πάτρα: Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας, 1998.

Μεντέ Ε., Νέγκας Ι..2011. Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών. Εκδόσεις Παπαζήση. 2 73-107, 9 377-403.

Νεοφύτου Ν.Χ.. 1997. Ιχθυολογία. University Studio Press.2 62-69

Παπουτσόγλου Ε.Σ., 1994. Μαθήματα Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας. Ειδικό μέρος: Εκτροφές Υδρόβιων Οργανισμών. Αθήνα: Τυπογραφείο Γ.Π.Α., 1994. 93-96

Παπουτσόγλου Ε.Σ. 2008. Διατροφή ιχθύων. Εκδόσεις Αθ.Σταμούλης.3,128-156 ,225-245

Χώτος Γ., Ρογδάκης Ι. 2010.Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών λαβράκι & τσιπούρα. ΕκδόσειςΙΩΝ.2 42-43

Ψόχιου Ε. 2006. Μοριακή κλωνοποίηση των γονιδίων και χαρακτηρισμός των κύριων πρωτεασών της σερίνης του ευρύαλου τελεόστεου *Sparus aurata*: Αλατότητα και ορμονική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και ενζυμικής δραστηριότητας. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

5.3 ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Barlow, S., 1989. Fishmeal - world outlook to the year 2,000. *Fish Farmer*, 40-41, 43.

Bernard, F., Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.

Bureau, D.P., Azevedo, P.A., Salazar, M.T., Cuzon, T. (2000). Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp: potential implications and applications. *Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion*, Acunvola, Merida, Yucatan, Mexico, 111-140

Castro C. , Pérez-Jiménez A. , Coutinho F., Pousão-Ferreira P., Brandão T. M., Oliveira Teles A., Peres H. 2013 Digestive enzymes of meagre (*Argyrosomus regius*) and white seabream (*Diplodus sargus*). Effects of dietary brewer's spent yeast supplementation *Aquaculture* 416–417, 322–327

Caruso G., Denaro M.G., Genovese L. 2009. Digestive Enzymes in Some Teleost Species of Interest for Mediterranean Aquaculture *The Open Fish Science Journal* 2, 74-86

Chakrabarti I., Gani Md. A., Chaki K. K., Sur R., K.K. Misra. 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and segregation. Pergamon. Elsevier. pp 167-177

Deguara S., Jauncey K., Agius C. 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology* 62, 1033–1043

Dong, F.M., Hardy, R.W., Haard, N.F., Barrows, F.T.B., Rasco, B.A., Fairgrieve, W.T., Forster, I.P. 1993. Chemical composition and protein digestibility of poultry by-product meals for salmonid diets. *Aquaculture*, 116, 149-158.

FAO. 2009. The state of world fisheries and aquaculture 2008. Fisheries and aquaculture department. Rome, 2009

Garcia-Carreno, F.L., 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnol. Educ.* 3, 145-150

Fountoulaki E., Alexis M., Nengas I., Venou B. 2005. Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive enzyme levels of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*. 36. 1243- 1251.

Gropp, J., Koops, H., Tiews, K., Beck, H., 1979. Replacement of fish meal in trout feeds by other feedstuffs. In: Pillay, T.V.R., Dill, W.A. _Eds., *Advances in Aquaculture*. Fishing News Books, Surray, U.K. pp. 596–601.

Hidalgo M.C., Urea E., Sanza A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267–283

Jobling M. (1995) *Environmental Physiology of Fishes*, 1st ed..Chapman & Hall, London.

Karasov W.H. 1992. Test of the adaptive modulation hypothesis for dietary control of intestinal transport. *Am J Physiol* 267:496–502.

Kolkovski S., Tandler A., Izquierdo M.S. 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 148 ,3 13-322

Kolkovski S. .2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200. 181–201

Koven W., Kolkovski S., Hadas E., Gamsiz K. , Tandler A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194. 107–121

Kolkovski S., Tandler A., Kissil G. Wm. and Gertler A. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae *Fish Physiology and Biochemistry* vol. 12 no. 3 pp 203-209

Langeland M., Lindberg J.E. and Lundh T. 2013. Digestive Enzyme Activity in Eurasian Perch (*Perca Fluviatilis*) and Arctic Charr (*Salvelinus Alpinus*). *Aquaculture Research & Development*.

Lazzari R., Neto R.J., Pedron F.A., Loro V.L., Pretto A., Gioda C.R., 2010. Protein sources and digestive enzyme activities in jundia (*Rhambia quelen*). *Sci. Agric.* v.67, n.3 p.259-266.

Lupatsch I., Kissil G., Sklan D., Pfeffer E. 1998. Energy and protein requirements for maintenance and growth in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition*. 4 165-173

Moyle, P. B. , and Cech J. J., Jr. 1982. *Fishes: An Introduction to Ichthyology*, (2nd Edition, 1988). Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. pp593.

Munilla-Moran R., Saborido-Rey F. 1996. Digestive Enzymes in Marine Species. II. Amylase Activities in Gut from Seabream (*Sparus aurata*), Turbot (*Scophthalmus maximus*) and Redfish (*Sebastes mentella*) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 113B, No. 4, pp. 827-834

Naz M. and Turkmen M. 2008. Digestive Enzymes and Hormones in Gilthead Seabream Larvae (*Sparus aurata*) Fed *Artemia* Nauplii Enriched with Free Histidine *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 60(4), , 230-236

Naz M., Turkmen M. 2009. The changes in digestive enzymes and hormones of gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*, L 1758) fed on *Artemia nauplii* enriched with free methionine. *AquacultInt* .17:243–256

Olivia- Teles A. (2000). Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition, *Aquaculture International*, 8: 477-92.

RuiL.2014.Energy Metabolism in the Liver .Department of Molecular and Integrative Physiology, University of Michigan Medical School4 (1): 177–197

Sabat P., J.A. Lagos, and F. Bozinovic. 1999. Test of the adaptive modulation hypothesis in rodents: dietary flexibility and enzyme plasticity. *Comp Biochem Physiol A* 123:83–87.

Saleh R., Betancor M.B., Roo J., Hernandez- Cruz C.M., Moyano F-J, Inquierdo M., 2013. Optimum soybean lecithin contents in microdiets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture Nutrition*.

Santigosa E., Garcia-Meilan I., Valentin JM., Navarro I., Perez-Sanchez J., Gallardo MA. (2011). Plant oils inclusion in high fish meal- substituted diets: effect of digestion and nutrient absorption in gilthead seabream (*Sparus aurata*).*Aquac. Res* 42:962-974

Santigosa E., Sanchez J., Medale F., Kaushik S., Perez-Sanchez J., Gallardo MA. (2008). Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and seabream (*Sparus aurata*) in response to dietary fishmeal replacement by plant protein sources. *Aquaculture* 282:68-74

Sarasquete M.C. , Polo A., Ydfera M. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 130 79-92

Steffens, W., 1985. Poultry waste meal as a protein source in the feed of rainbow trout. *Arch. Tierernaehr.* 35, 361–368.

Sugiura, S.H., Dong, F.M., Rathbone, C.K., Hardy, R.W., 1998. Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonids . *Aquaculture*, 159, 177-200

Sunde, J.; Eiane, S.A.; Rustad, A.; Jensen, H.B.; Opstvedt, J.; Nygard, E.; Venturini, G.; Rungruangsak-Torrissen, K. 2004. Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 10: 261-277

Tiewis, K., Groppe, J., Koops, H., 1976. On the development of optimal rainbow trout pelleted feeds. *Arch. Fischereiwiss.* 27, 1–29.

Wassef E., Abu Wafaa M., 1985. Food and feeding habits of wild and reared gilthead bream *Sparus aurata* L. Ph.D. Thesis Cairo: Faculty of science, Cairo University. 233-241

Zar, J.H., 1984. *Biostatistical Analysis* 2nd edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, UK.