

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

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Σύγκριση της ενεργότητας της χυμοθρυψίνης σε τσιπούρες *Sparus aurata* που διατράφηκαν με ιχθυάλευρο και υποπροϊόντα πουλερικών .**

**ΟΝΟΜΑ: Δημάκου Ελένη  
Α.Μ: 1611**

**Βόλος, Ιούνιος 2017**

**Σύγκριση της ενεργότητας της χυμοθρυψίνης σε τσιπούρες *Sparus aurata* που διατράφηκαν με ιχθυάλευρο και υποπροϊόντα πουλερικών .**

**Διμελής Εξεταστική Επιτροπή**

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

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

*Στους γονείς μου  
Χρήστο και Παρασκευή  
και στον αδερφό μου  
Γιώργο.*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής διατριβής μου την 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, 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 στην εργαστηριακή διαδικασία για τον εντοπισμό και τη κατανόηση των χαρακτηριστικών 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 υποπροϊόντα των πουλερικών σύμφωνα με ερευνητικές μελέτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διατροφή της τσιπούρας αποδίδοντας υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης. Στη παρούσα μελέτη μετρήσαμε τη δραστηριότητα της χυμοθρυψίνης σε 23 άτομα του είδους *Sparus aurata* τα οποία χωρίστηκαν σε δυο ομάδες των 8 ατόμων και μια των 7 ατόμων ανάλογα με το σιτηρέσιο που είχαν λάβει. Τα σιτηρέσια ήταν τα εξής: το FM, ήταν σιτηρέσιο που περιείχε αποκλειστικά ιχθυάλευρο (100%) ως πηγή ζωικής πρωτεΐνης, το FeM50 ήταν σιτηρέσιο όπου το ιχθυάλευρο είχε υποκατασταθεί κατά 50% από υδρολυμένο πετράλευρο και το PM50 όπου το ιχθυάλευρο είχε υποκατασταθεί κατά 50% από πτηνάλευρο. Όσον αφορά τα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0,05$ ) ανάμεσα στα επίπεδα δραστηριότητας της χυμοθρυψίνης των τριών μεταχειρίσεων. Συμπερασματικά η μερική αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου (50%) με υποπροϊόντα πουλερικών σε ιχθυοτροφές δε δημιουργεί προβλήματα στη φυσιολογία θρέψης της τσιπούρας σωματικού βάρους 27-41gr όσο αφορά την δραστηριότητα της χυμοθρυψίνης. Επιπρόσθετες μελέτες είναι αναγκαίες να πραγματοποιηθούν για την ανάλυση και περαιτέρω πεπτικών ενζύμων έτσι ώστε να διευκρινιστεί αν είναι κατάλληλη η μερική αντικατάσταση ιχθυαλεύρου με τα υποπροϊόντα πουλερικών .

**Λέξεις κλειδιά:** χυμοθρυψίνη, υποπροϊόντα πουλερικών, ιχθυάλευρο, τσιπούρα

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>4</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>i</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΑ – ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 ΦΥΣΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ – ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5 ΕΚΤΡΟΦΗ</b> .....	<b>5</b>
<b>1.5.1 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΨΑΡΙΩΝ, ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΚΑΙ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΣ</b> <b>7</b>	
<b>1.6 ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ</b> .....	<b>10</b>
<b>1.7 ΠΕΨΗ- ΠΕΠΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ</b> .....	<b>14</b>
<b>1.8 ΧΥΜΟΘΡΥΨΙΝΗ</b> .....	<b>15</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 ΣΤΑΔΙΑ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ</b> .....	<b>19</b>
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>20</b>
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>24</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>32</b>
<b>5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>32</b>
<b>5.3 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>33</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>36</b>

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ**

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Εικόνα 1.1) είναι ψάρι της οικογένειας των Σπαριδών που απαντάται στη Μεσόγειο και στις ακτές του βορειοανατολικού Ατλαντικού (Νεοφύτου,2015). Η τσιπούρα είναι ένα ψάρι με ένα χαρακτηριστικό άσημο-γαλάζιο χρώμα στην κορυφή της ράχης της και ασημί, γαλάζιες γκρι αποχρώσεις στα πλευρά. Το σώμα του έχει ωοειδές σχήμα και έχει μία μαύρη κηλίδα στο κάλυμμα των βραγχίων, στην αρχή της πλευρικής γραμμής. Επίσης, εμφανίζει έναν χρυσοκίτρινο χρωματισμό ανάμεσα στους οφθαλμούς (Νεοφύτου,2015).

Ο Έλληνας φιλόσοφος και βιολόγος Αριστοτέλης ήταν ο πρώτος που ταξινόμησε τους οργανισμούς με βάση τις δομικές τους ομοιότητες. Στη συνέχεια ο Κάρολος Ληναίος σχεδίασε το σημερινό σύστημα ταξινόμησης. Σήμερα έχουν επεκταθεί οι ταξινομικές βαθμίδες και περιλαμβάνουν το βασίλειο, το φύλο την κλάση, τη τάξη, την οικογένεια, το γένος και το είδος (Hickman et al.,2011).

Η συστηματική κατάταξη της τσιπούρας είναι η εξής:

- Βασίλειο: Ζώα (*Animalia*)
- Φύλο: Χορδωτά (*Chordata*)
- Κλάση: Ακτινοπτερύγιοι (*Actinopterygii*)
- Τάξη: Περκόμορφα (*Perciformes*)
- Οικογένεια: Σπαρίδες (*Sparidae*)

- Γένος: *Sparus*
- Είδος: *Sparus aurata*



**Εικόνα 1.1** *Sparus aurata* (www.fishbase.org)

### **1.1 ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΑ – ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ**

Όσο αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Sparus aurata*, παρατηρούμε ότι το μέγεθός του είναι, συνήθως, 30-35 cm στα ενήλικα άτομα και το μέγιστο αναφερόμενο στην βιβλιογραφία είναι 60cm (Νεοφύτου,2015). Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί άτομο με μήκος 76cm (Γαλλία 2000, Florn Estuary, Brest). Αν και το μέγιστο βάρος ψαριού που έχει δημοσιευτεί για το είδος αγγίζει τα 17,2kg , συνήθως το βάρος του κυμαίνεται γύρω στα 300 gr με 600 gr. Το σώμα του είναι επίμηκες, παχύ και συμπιεσμένο πλευρικά καλυμμένο από λέπια. Διαθέτει κυρτή ράχη καθώς και ένα ενιαίο ραχιαίο και ένα εδρικό



περύγιο (Νεοφύτου,2015). Το κεφάλι του είναι μεγάλο με απότομο, κοντό ρύγχος που εκτείνεται ως το ύψος του μέσου των οφθαλμών. Το στόμα του είναι μικρό με 6 κυνόδοντες και στην κάτω γνάθο του διαθέτει πολλά μικρά στρογγυλεμένα δόντια σε 2-4 σειρές τα οποία χρησιμεύουν για να συνθλίβει την τροφή του ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

## **1.2 ΦΥΣΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ – ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ**

Το *Sparus aurata* ζει σε υποτροπικά κλίματα (62°N – 15°N, 17°W – 43°E)

([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)). Λόγω των ευρύαλων και ευρύθερμων συνηθειών του, το είδος βρίσκεται τόσο στο θαλάσσιο χώρο όσο και σε υφάλμυρες παράκτιες λιμνοθάλασσες και σε εκβολές ποταμών καθώς και σε θαλάσσια λιβάδια Ποσειδωνίας (Κλαουδάτος,2012).

Λόγω των παραπάνω, το *Sparus aurata* είναι κοινό στη Μεσόγειο, είναι παρόν κατά μήκος των ανατολικών ατλαντικών ακτών από τη Μεγάλη Βρετανία στη Σενεγάλη, και είναι σπάνιο στη Μαύρη Θάλασσα. Αντιπρόσωποι του είδους βρίσκονται και γύρω από τα Κανάρια Νησιά ([www.fao.org](http://www.fao.org)). Η τσιπούρα βρίσκεται συνήθως σε βραχώδη βυθό με φύκι αλλά μπορεί να την συναντήσουμε και σε αμμώδη μέρη. Τα νέα ψάρια παραμένουν στο χαμηλό

βάθος (μέχρι 30 μέτρα), ενώ οι ενήλικοι μπορούν να φθάσουν στα πιο μεγάλα θαλάσσια βάρη (μέγιστο βάθος 150 μέτρα) (Νεοφύτου,2015).

### **1.3 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ**

Η τσιπούρα είναι στατικό ψάρι και ζει είτε απομονωμένο είτε σε μικρές συναθροίσεις στο φυσικό περιβάλλον. Πρόκειται για κυρίως σαρκοφάγο ψάρι, το οποίο μεταναστεύει χαρακτηριστικά την άνοιξη προς τις υφάλμυρες παράκτιες λιμνοθάλασσες στην αναζήτηση άφθονης τροφής και των ηπιότερων θερμοκρασιών (τροφική μετανάστευση). Πολύ ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες (το χαμηλότερο θανατηφόρο όριο είναι 4°C), στα τέλη του φθινοπώρου επιστρέφουν στην ανοικτή θάλασσα, όπου τα ενήλικα ψάρια αναπαράγουν (Κλαουδάτος,2012).

Η μέση ηλικία της τσιπούρας δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως όμως έχει παρατηρηθεί άτομο να ξεπερνά τα 10 χρόνια ζωής και η μέγιστη δημοσιευμένη ηλικία του να είναι 11 χρόνια (Κλαουδάτος,2012).

### **1.4 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ**

Οι τσιπούρες είναι πρωτανδρικά, ερμαφρόδιτα ψάρια, δηλαδή γεννιούνται πρώτα ως αρσενικά και μετά το πέρας περίπου 3 χρόνων κάνουν αναστροφή φύλου και γίνονται θηλυκά ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)). Οι τσιπούρες ενηλικιώνονται σεξουαλικά ως αρσενικά όταν γίνουν 2 χρονών (μήκος περίπου 30 εκατοστά,

βάρος 250 με 300 γραμμάρια). Όταν γίνουν 3 χρονών (μήκος 35 εκατοστά, βάρος 400 γραμμάρια περίπου) οι τσιπούρες γίνονται θηλυκά (Κλαουδάτος,2012). Αναπαράγονται από τον Οκτώβριο μέχρι το Δεκέμβριο σε βαθιά νερά (Κλαουδάτος,2012). Κάθε θηλυκό γεννά 20.000 με 80.000 αυγά την ημέρα. Τα ιχθύδια γεννιούνται στα ανοικτά νερά και στη συνέχεια κολυμπούν την άνοιξη μέχρι τα ρηγά νερά, όπου είναι πιο ασφαλή και η τροφή πιο άφθονη. Μένουν εκεί μέχρι τον Οκτώβριο. Μετά ενσωματώνονται στο αρχικό κοπάδι, λαμβάνουν μέρος στην αναπαραγωγή και θα το ακολουθούν 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 ξανά παράγει σπέρμα για την ερχόμενη αναπαραγωγική περίοδο.

### **1.5 ΕΚΤΡΟΦΗ**

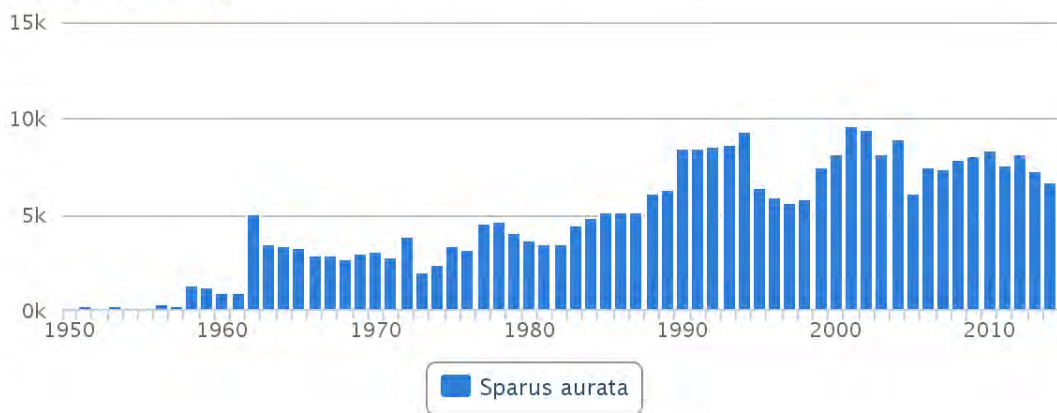
Η εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών, τα τελευταία χρόνια, αναπτύσσεται ραγδαία. Η τσιπούρα είναι το κύριο εκτρεφόμενο ψάρι της Μεσογείου. Είναι στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος καθώς έχει υψηλό ρυθμό ανάπτυξης, χαμηλή θνησιμότητα και κατάλληλο διατροφικό τύπο ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

Το 2014, η παραγωγή της τσιπούρας παγκοσμίως ήταν ίση με 6.703 τόνους ([www.fao.org](http://www.fao.org)). Η τσιπούρα είναι χαρακτηριστικό είδος τόσο της εκτατικής όσο και της εντατικής καλλιέργειας. Η εντατική καλλιέργεια έχει ως βάση τη δημιουργία των γεννητόρων στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς έτσι ώστε να δημιουργούνται καλής ποιότητας αυγά, εκεί απελευθερώνονται γύρω στα

20.000 αυγά καθημερινά. Η διαδικασία παραγωγής αυγών μπορεί να γίνει είτε φυσικά είτε τεχνητά. Στη συνέχεια, γίνεται η διαδικασία της επώασης των αυγών ώστε να παραλάβουμε τις προνύμφες όπου με τη σειρά τους θα τοποθετηθούν σε δεξαμενές όπου μετά τη κατανάλωση του λεκιθικού τους σάκου θα ξεκινήσει η χορήγηση της τροφής. Όταν φτάσουν το 1-1,5 γραμμάριο είναι η στιγμή που θα τοποθετηθούν σε εγκαταστάσεις προπάχυνσης και θα τροφοδοτούνται με συνθετική τροφή (Κλαουδάτος,2012). Η παραγωγή της τσιπούρας σε συνδυασμό με το λαβράκι είναι τα είδη που κυριαρχούν στην ιχθυοκαλλιέργεια με πρωτοπόρα χώρα τη Τουρκία και στη συνέχεια την Ελλάδα για το 2016 ενώ στη συνέχεια η Ιταλία και η Ισπανία ακολουθούν ([www.feap.info](http://www.feap.info)). Η Ελλάδα, γενικά, είναι βασική χώρα στην ιχθυοκαλλιέργεια καθώς αποτελεί το 40% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής με τη παραγωγή τσιπούρας- λαβράκι ([www.nireus.com](http://www.nireus.com)). Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1.1) τοποθετείται η αύξηση της παραγωγής τσιπούρας παγκοσμίως.

### Global Capture Production for species (tonnes)

Source: FAO FishStat



**Σχήμα 1.1** Ποσότητες παραγωγής ιχθύων από το 1950- 2014 (FAO fishery statistics)

### **1.5.1 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΨΑΡΙΩΝ, ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ ΚΑΙ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΣ**

Η διατροφή των ιχθύων είναι το πιο σημαντικό μέρος της εκτροφής για διάφορους λόγους όπως η ανάπτυξη, η ομοιόσταση, η θνησιμότητα κ.α έτσι ώστε να υπάρχει σωστά προγραμματισμένη μονάδα υδατοκαλλιεργειών (Παπουτσόγλου,2008). Παράλληλα, διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο και στη ποιότητα του τελικού προϊόντος (Comprany et al., 1999).

Αν λάβουμε υπ όψη και την οικονομική κατεύθυνση τότε το κόστος συντήρησης και παραγωγής καθορίζεται από τις δαπάνες και τις εργασίες που απαιτούνται για τη διατροφή των εκτρεφόμενων ειδών (Kissil et al,1997, Watanabe 2002, Anderson and De Silva,2003).

Στις υδατοκαλλιέργειες ,τα εντατικά συστήματα παραγωγής τροφοδοτούνται με σύμπηκτα (πελέτες), προσπαθώντας να καλυφτούν οι ημερήσιες θρεπτικές και οι ενεργειακές ανάγκες με το λιγότερο κόστος (Southgate,2003). Εξασφαλίζοντας στον οργανισμό οικονομικότερη τροφή θα πρέπει να ληφθεί υπ όψιν πως η ποιότητα δε θα πρέπει να είναι χαμηλή καθώς και να είναι ένα προϊόν εύκολο στη πέψη και να τηρεί τους όρους της πεπτικότητας.

Η τροφή θα πρέπει να παρέχει στα ψάρια όλα εκείνα τα θρεπτικά (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια) συστατικά που χρειάζονται για την ανάπτυξη τους και την ενέργεια που χρειάζονται για τη φυσιολογική λειτουργία τους και καλή υγεία τους. Οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών είναι τα αμινοξέα και 22 χρησιμοποιούνται για την διατροφή των ψαριών (Πίνακας 1). Πέρα από την εμπλοκή τους στην πρωτεϊνοσύνθεση (ως δομικά συστατικά των πρωτεϊνών) και την προσφορά ενέργειας στα ψάρια , επηρεάζουν διάφορες άλλες λειτουργίες

όπως π.χ. όρεξη, οσμωρύθμιση, ανάπτυξη, ανοσοποιητικό σύστημα, γενικότερη κυτταρική λειτουργία, αντι-οξειδωτική άμυνα του οργανισμού, παραγωγή ορμονών, αποβολή αμμωνίας, ρύθμιση του μεταβολισμού, χρωματισμός, μεταμόρφωση λαρβών, συμπεριφορά κ.λπ. Οι πρωτεϊνικές διατροφικές ανάγκες των ψαριών χωρίζονται σε ποσοτικές και ποιοτικές (τα απαραίτητα αμινοξέα για τον οργανισμό). Οι πρωτεΐνες αποτελούν το 65-75% του συνολικού βάρους των ιχθύων (Halver & Hardy,2015).

**Πίνακας 1.** Αμινοξέα στη διατροφή των ιχθύων (Halver & Hardy,2015).

Απαραίτητα Αμινοξέα	Μη απαραίτητα Αμινοξέα-Ημι-απαραίτητα
Αργινίνη (Arg)	Αλανίνη (Ala)
Ιστιδίνη (His)	Ασπαριγγίνη (Asn)
Ισολευκίνη (Ile)	Ασπαρτικό οξύ (Asp)
Λευκίνη (Leu)	Γλουταμίνη (Gln)
Λυσίνη (Lys)	Γλουταμινικό οξύ (Glu)
Μεθειονίνη (Met)	Γλυκίνη (Gly)
Φαινυλαλανίνη (Phe)	Προλίνη (Pro)
Θρεονίνη (Thr)	Σερίνη (Ser)
Τρυπτοφάνη (Trp)	Κυστεΐνη (Cys)
Βαλίνη (Val)	Τυροσίνη (Tyr)

Ταΐζοντας ένα ψάρι σωστά εξασφαλίζουμε ότι θα μεγαλώσει ικανοποιητικά, θα αντιμετωπίσει ευκολότερα τις ασθένειες και θα αναπαραχθεί με μεγαλύτερη επιτυχία.

**Πίνακας 1.2.** Απαραίτητα θρεπτικά συστατικά στη διατροφή των νεαρών ατόμων τσιπούρας σε ποσοστά (Halver & Hardy,2015).

Πρωτεΐνη	40%
Λιπίδια	1,5-5,5%
Υδατάνθρακες	2-18%

Υπάρχουν δυο μέθοδοι διατροφής των ιχθύων:

A) σε επίπεδο κορεσμού

B) σε επίπεδο διατροφής μικρότερου κορεσμού (Hardy,1998).

Τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια αποτελούν την κύρια σύσταση των ιχθυοτροφών, με τις οποίες τρέφονται τα ψάρια της ιχθυοκαλλιέργειας. 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 (Miles & Charman, 2006). Εκτιμάται ότι η ετήσια παγκόσμια παραγωγή ιχθυαλεύρου είναι 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 ([www.selonda.com](http://www.selonda.com)).

Ταυτόχρονα, γίνονται μελέτες για τη χορήγηση μεταποιημένων ζωικών πρωτεϊνών, κυρίως για τη μείωση του κόστους αλλά και για περιβαλλοντικούς σκοπούς, όπου εξετάζουν αν η ανάπτυξη των ιχθύων είναι φυσιολογική.

Ωστόσο, τα εναλλακτικά συστατικά των τροφών αυτών θα πρέπει να περιέχουν τα απαραίτητα θρεπτικά για την ανάπτυξη και τη ποιότητα των ιχθυοκαλλιιεργειών (Santigosa et al, 2008).

## **1.6 ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ**

Το πεπτικό σύστημα των ιχθύων αποτελείται από το πεπτικό κανάλι που περιλαμβάνει το στόμα, τον οισοφάγο, το στομάχι, έντερο (πρόσθιο και οπίσθιο), ήπαρ και το πάγκρεας (Μεντέ & Νέγκας, 2011). Το στόμα εξυπηρετεί κυρίως την πρόσληψη τροφής (Βουλτσιάδου, 2015). Ο οισοφάγος συσπάτε ώστε να επιτραπεί η αναμάσηση της τροφής, εάν χρειάζεται και το στομάχι είναι το όργανο αποθήκευσης, ανάμειξης και πρωτογενούς πέψης της τροφής (Βουλτσιάδου, 2015).

Τα πυλωρικά τυφλά της τσιπούρας, αποτελούν το 10% του συνολικού βάρους της καθώς και περίπου το 6% του πεπτικού σωλήνα όπου το μεγαλύτερο ποσοστό του καταλαμβάνεται από το μικρό σε μήκος έντερο της (Παπουτσόγλου, 2008). Η κύρια απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών πραγματοποιείται στις μεταγαστρικές περιοχές ή σε αντίστοιχες αυτών και στα πυλωρικά τυφλά με τη μεσολάβηση εξειδικευμένων μορίων ή μέσω της διάχυσης (Βουλτσιάδου, 2015). Παράλληλα, το μήκος του εντέρου ποικίλλει και υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στο μήκος εντέρου και το ολικό μήκος σώματος του ψαριού. Το έντερο διακρίνεται στο πρόσθιο, το μέσο-έντερο ή μεσεντέριο (κεντρικό και ακραίο) και το τελικό τμήμα. Στο τελικό άκρο του



εντέρου υπάρχει ο εδρικός σφιγκτήρας. Στα είδη που έχουν στόμαχο, το κεντρικό τμήμα του εντέρου φέρει συχνά ένα τυφλό τελείωμα ή τυφλό έντερο, ή ακόμη και έναν ποικίλο αριθμό πυλωρικών τυφλών. Η λειτουργία του τυφλού δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ενώ το ακραίο τμήμα του εντέρου, το οποίο συχνά αναφέρεται ως ειλεός, συμβάλει επίσης στην ωσμορρύθμιση (Βουλτσιάδου, 2015). Το ήπαρ, συμβάλει στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπιδίων καθώς και των πρωτεϊνών αλλά επίσης βοηθά και στην απορρόφηση βιταμινών (Βουλτσιάδου, 2015).

Η ανατομία του πεπτικού συστήματος διαφέρει από είδος σε είδος ανάλογα με τη τροφή για παράδειγμα μπορεί να υπάρχουν είδη με πεπτικό σύστημα με ή χωρίς στομάχι και διαφοροποιημένο έντερο (Μεντέ & Νέγκας, 2011).

Αν και το στόμα και ο οισοφάγος είναι βασικά σημεία για πρόσληψη, κατάποση και το τεμαχισμό της τροφής, ωστόσο δεν έχει αποδειχθεί η έκκριση ενζύμων εκεί. Σε αντίθεση με το έντερο όπου υπάρχουν ένζυμα που περιλαμβάνουν εντερικής προέλευσης πρωτεάσες, καρβουδράσες, εστεράσες, παγκρεατικής προέλευσης πρωτεάσες (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, καρβοξυπεπτιδάση και ελαστάση), καρβουδράσες και εστεράσες καθώς και μικροχλωριδικής προέλευσης αμυλάσες ή πρωτεάσες, εστεράσες. Οι εικόνες 1.2-1.5 δείχνουν το πεπτικό σύστημα της τσιπούρας.



**Εικόνα 1.2.** Τσιπούρα από το εργαστήριο στα πλαίσια του μαθήματος Φυσιολογία Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών (Πηγή: προσωπικό αρχείο)



**Εικόνα 1.3** Ανατομία πεπτικού συστήματος τσιπούρας (Πηγή: προσωπικό αρχείο)



**Εικόνα 1.4.** Έντερο τσιπούρας (Πηγή: προσωπικό αρχείο)



**Εικόνα 1.5.** Πυλωρικά τυφλά τσιπούρας (Πηγή: προσωπικό αρχείο)

## **1.7 ΠΕΨΗ- ΠΕΠΤΙΚΑ ENZYMA**

Πολλά από τα οργανικά συστατικά της τροφής βρίσκονται σε μορφή αδιάλυτων μεγαλομοριακών ενώσεων, που πρέπει να διασπαστούν σε μικρότερες και απλούστερες πριν περάσουν στο αίμα και στη λέμφο. Η διαδικασία της διάσπασης ονομάζεται πέψη (Ζερβάς,2005). Η πέψη αρχίζει από το στόμα και τον φάρυγγα με τη μηχανική διάσπαση των τροφών, χωρίς έκκριση πεπτικών ενζύμων (Βουλτσιάδου,2015). Η τροφή για να αποδώσει τα θρεπτικά συστατικά που περιέχει, πρέπει να υποστεί ειδική κατεργασία εντός του πεπτικού σωλήνα του ζώου που πραγματοποιείται με τη λειτουργία της πέψης (Ζερβάς,2005). Η διαδικασία της πέψης διαφέρει ανάλογα με το είδος του ψαριού (Μεντέ & Νέγκας, 2011). Σημαντικό ρόλο στη πέψη έχει η κίνηση του εντέρου η οποία είναι περισταλτική η οποία επιτρέπει τη κίνηση του εντερικού περιεχομένου (Βουλτσιάδου, 2015).

Τα όργανα που παράγουν τα πεπτικά ένζυμα είναι: το στομάχι, το πάγκρεας και το έντερο. Φυσικά, για τη διαδικασία της πέψης ενεργοποιούνται και κατάλληλα ένζυμα τα οποία διαφέρουν ή μεταβάλλονται ανάλογα με τη τιμή του pH του πεπτικού σωλήνα (Παπουτσόγλου, 2008). Οι πρωτεάσες είναι σημαντικές για τη διαδικασία της πέψης. Το πάγκρεας εκκρίνει αλκαλικές πρωτεάσες ως ανενεργά προένζυμα τα οποία αναμιγνύονται στο χυμό (Santigosa et al, 2008). Η πέψη, ολοκληρώνεται στο έντερο όπου εκεί γίνεται και η απορρόφηση των εναπομείναντα θρεπτικών συστατικών εφόσον στα πυλωρικά τυφλά έχει γίνει μεγάλο μέρος της απορρόφησης τους. Στα πυλωρικά τυφλά και στο έντερο

δρουν πρωτεάσες (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, ελαστάση) οι οποίες βοηθούν στην υδρόλυση των πρωτεϊνών (Santigosa.2008). Τα πεπτικά ένζυμα χαρακτηρίζουν οι υδρολάσες και χωρίζονται σε πρωτεάσες, εστεράσες, καρβουδράσες.

Τα ένζυμα που βοηθούν στη πέψη είναι κυρίως παγκρεατικά ή εντερικά ενώ στο στομάχι εκκρίνονται τα σημαντικότερα: θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, καρβοξυπεπτιδάση και από το έντερο: αμινοπεπτιδάση, διπεπτιδάσες και τριπεπτιδάσες (Jobling, 1995). Οι δραστηριότητες των πεπτικών ενζύμων αλλά και η δράση των τροφών παίζουν σπουδαίο ρόλο στη πεπτικότητα των θρεπτικών ουσιών (Fountoulaki et al., 2005).

## **1.8 ΧΥΜΟΘΡΥΨΙΝΗ**

Τα ένζυμα είναι πρωτεϊνικά μόρια που αποτελούνται από μια ή από περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενώ γενικό συμπέρασμα είναι ότι τα ένζυμα επιταχύνουν ή επιβραδύνουν τις αντιδράσεις κατά τρόπον ώστε η σταθερή κατάσταση, να μη τροποποιείται σημαντικά (Ζερβάς,2005).

Η χυμοθρυψίνη, διασπά επιλεκτικά πεπτιδικούς δεσμούς στη καρβοξυλική πλευρά ενός μεγάλου υδρόφοβου αμινοξέος όπως είναι η τρυπτοφάνη, η τυροσίνη, η φαινυλαλανίνη και η μεθειονίνη (Biochemistry,2012).

Η χυμοθρυψίνη εκκρίνεται στο στομάχι μαζί με τη πεψίνη, τη θρυψίνη, τη χιτίνη και τη ελαστίνη όπως επίσης και το HCl. Τα παραπάνω είναι ικανά για τη μείωση του pH του εντέρου(Biochemistry,2012). Η ενεργότητα των πεπτικών

ενζύμων όπως η πεψίνη και η χιτινάση γίνεται μέγιστη σε χαμηλή τιμή pH (Halver & Hardy,2015).

Η χυμοθρυψίνη καταλύει την υδρόλυση του καρβοξυλικού τμήματος των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων ( τυροσίνης, τρυπτοφάνης και φαινυλαλανίνης), καθώς και των μεγάλων υδρόφοβων καταλοίπων, όπως της μεθειονίνης.

Η χυμοθρυψίνη συντίθεται ως ανενεργό πρόδρομο μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας που ονομάζεται χυμοθρυψινογόνο. Η καταλυτική τριάδα της χυμοθρυψίνης απαρτίζεται από τα αμινοξέα His57, Asp102 και Ser195 και είναι απαραίτητη για τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού. Η διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών γίνεται σε δύο στάδια (Stryer,1994).

Η χυμοθρυψίνη καταλύει την υδρόλυση των πεπτιδικών ή εστερικών δεσμών σε δύο βήματα, την ακυλίωση και την αποακυλίωση. Αρχικά, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο ένζυμο- υπόστρωμα με το συνδυασμό π- νιτροφαινυλο-οξικού με τη χυμοθρυψίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διάσπαση του εστερικού δεσμού του υποστρώματος και απελευθερώνεται από το ένζυμο ένα από τα προϊόντα η π-νιτροφαινόλη και η ακετυλομάδα του υποστρώματος προσδένεται ομοιοπολικά στο ένζυμο. Το σύμπλοκο ακετυλομάδας και ενζύμου που σχηματίζεται προσβάλλεται από ένα μόριο ύδατος και σχηματίζει ένα ιόν οξικού για να αναγεννηθεί το ένζυμο. Η απελευθέρωση της π-νιτροφαινόλης αντιστοιχεί στο σχηματισμό του συμπλόκου ακετυλοενζύμου (Stryer,1994).

Στο δεύτερο βήμα της αποακυλίωσης προσδιορίζεται η συνολική ταχύτητα

υδρόλυσης των εστερών από τη χυμοθρυψίνη. Απομονώνεται το σύμπλοκο του ακετυλοενζύμου καθώς είναι σταθερό (Stryer,1994).

## **1.9 ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάλυση του της ενζυμικής δραστηριότητας του πεπτικού ενζύμου χυμοθρυψίνης σε τσιπούρες *Sparus aurata*, οι οποίες έχουν τραφεί με τρία διαφορετικά σιτηρέσια για διάστημα 100 ημερών.

## **2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη πειραματική διαδικασία ήταν τσιπούρες, οι οποίες είχαν ταϊστεί για 100 ημέρες με τρία διαφορετικά σιτηρέσια. Τα σιτηρέσια ήταν: 1) 100% ιχθυάλευρο (FM), 2) μερική αντικατάσταση με 50% πτηνάλευρο (PM) και 3) μερική αντικατάσταση με 50% υδρολυμένο πετράλευρο (FeM). Στο τέλος της εκτροφής οι τσιπούρες χωρίστηκαν τυχαία σε 3 ομάδες των 8 ατόμων. Αρχικά τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν και αφού καταγράφηκε το σωματικό τους βάρος και θανατώθηκαν, ακολούθησε ανατομία του πεπτικού τους συστήματος και κρατήθηκαν το πρόσθιο τμήμα του εντέρου

και τα πυλωρικά τυφλά για αναλύσεις του πεπτικού ενζύμου της χυμοθρυψίνης. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2.2 ΣΤΑΔΙΑ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής & Συγκριτικής Βιολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η μεθοδολογία του ενζυμικού εκχυλίσματος της χυμοθρυψίνης έχει χωριστεί σε 2 βασικά στάδια.

Το πρώτο στάδιο, αφορά την ομογενοποίηση του ιστού έτσι ώστε να παρατηρήσουμε τη δραστηριότητα του ενζύμου. Αρχικά, παίρνουμε αναλογία 100mg ιστού ανά ml διαλύματος (περίπου 0,2 g ιστό από τα πυλωρικά τυφλά και το, ομογενοποιούμε (ομογενοποιητής ULTRA TURRAX, IKA-WERKE) στις 17,500 στροφές (I/min), για 40 sec περίπου σε ψυχρό 50mM Tris-HCl buffer,  $\text{pH}=7.5$ . Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 16,000 rpm για 40 min στους  $4^{\circ}\text{C}$  (Alarcon et al, 1998. Το υπερκείμενο το αποθηκεύουμε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Στο δεύτερο στάδιο, χρησιμοποιούμε ειδικό πρωτόκολλο για τη μέτρηση της



ενζυμικής δραστηριότητας της χυμοθρυψίνης. Το στάδιο αυτό το επαναλαμβάνουμε για 3 φορές. Αρχικά, βάζουμε 10 μl ένζυμο στη κάθε κυψελίδα μαζί με 985 μl buffer χυμοθρυψίνης, (ρυθμιστικό διάλυμα 44.4 mM Tris-HCl pH=7.8, 55.5 mM CaCl<sub>2</sub> (Alarcon et al, 1998). Ταυτόχρονα, τοποθετούμε ως υπόστρωμα N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE, Sigma B1625), 5 μl BTEE πυκνό και το αναμιγνύουμε με το buffer. Τέλος, τα εναποθέτουμε στο φασματοφωτόμετρο και μετρούμε την απορρόφηση σε μήκος κύματος 256nm σε χρονικό διάστημα 2.5min και σε θερμοκρασία 25°C. Η διαδικασία περιλαμβάνει και 3 επαναλήψεις ανά δείγμα για κάθε μεταχείριση. Βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηριότητα της χυμοθρυψίνης εκφράζεται σε pg BTEE υδρολύθηκε mg protein<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (ειδικός συντελεστής απορρόφησης. Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα της χυμοθρυψίνης εκφράστηκε σε μg BTEE που υδρολύθηκε σε mg protein<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (U/mg protein), (ειδικός συντελεστής απορρόφησης e=9648 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

## **2.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ**

Για τα αποτελέσματα και την ανάλυση της ενζυματικής δραστηριότητας της χυμοθρυψίνης μεταξύ των τριών ομάδων χρησιμοποιούμε αναλύσεις ενός παράγοντα (one-way ANOVA) οι οποίες εκτελέστηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS. Ελέγξαμε τα δεδομένα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 0,05 (P<0.05).

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Τα Σχήματα 3.1, 3.2 και 3.3 απεικονίζουν την κατανομή της δραστικότητας της χυμοθρυψίνης ανά διατροφική ομάδα. Ο έλεγχος κανονικότητας Shapiro- Wilk ( $P > 0,05$ ) μας έδωσε τα αποτελέσματα του Πινάκα 3.1. Το test Shapiro- Wilk χρησιμοποιεί την αρχική μηδενική υπόθεση για να ελέγξει αν τα δείγματα προέρχονται από κανονική κατανομή του πληθυσμού (Shapiro & Wilk, 1965).

**Πίνακας 3.1:** Έλεγχος κανονικότητας Shapiro- Wilk μεταξύ των τριών διατροφικών ομάδων.

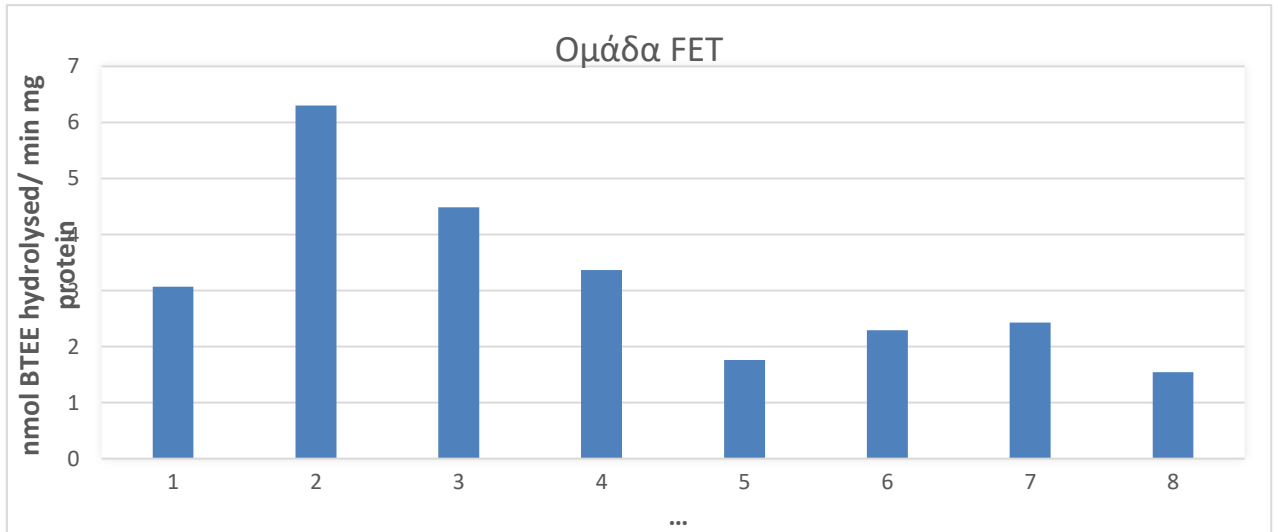
Ομάδα	Statistics	Βαθμοί ελευθερίας	Τιμή P
FET	0.9	8	0.27
FM	0.92	8	0.42
PM	0.84	7	0.1

Εφόσον η τιμή P για κάθε ομάδα είναι μεγαλύτερη από 0,05 δεν απορρίπτουμε την μηδενική υπόθεση κανονικότητας (Razali & Wah, 2011). Για την ομοιογένεια των διακυμάνσεων χρησιμοποιήθηκε το test Levene (Πίνακας 3.2) όπου υποδεικνύει ισότητα των διασπορών των δειγμάτων, αφού η τιμή P είναι μεγαλύτερη από το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 0,05 (Martin & Bridgmon, 2012).

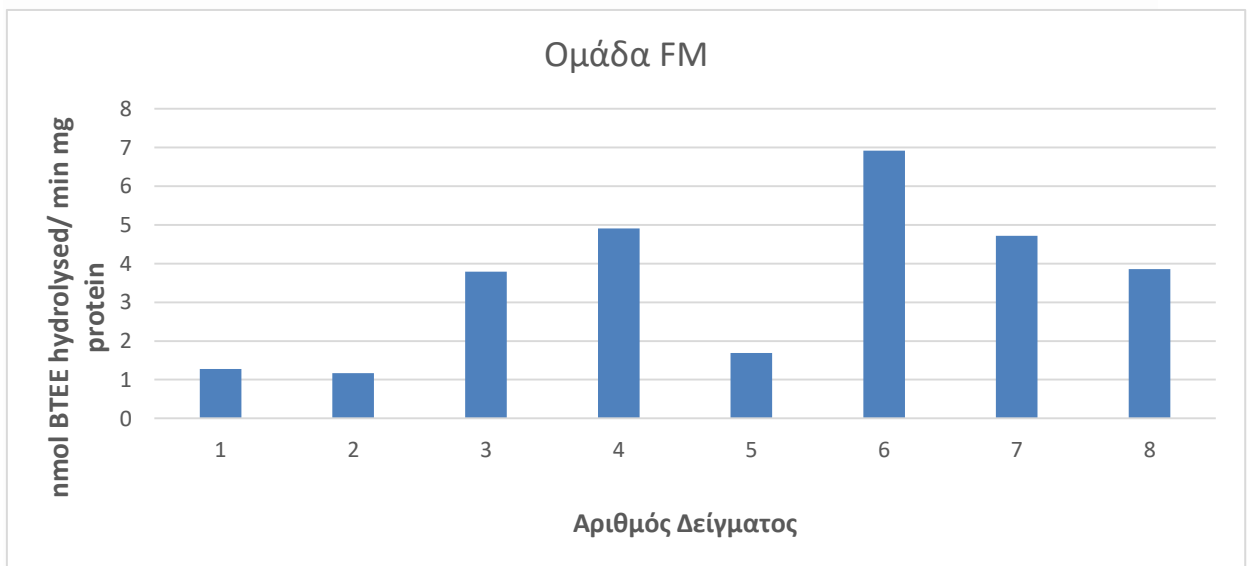
**Πίνακας 3.2:** Test Levene, ισότητα των διασπορών των δειγμάτων της χυμοθρυψίνης.

Levene Statistic	df1	df2	Τιμή P
0.44	2	20	0.65

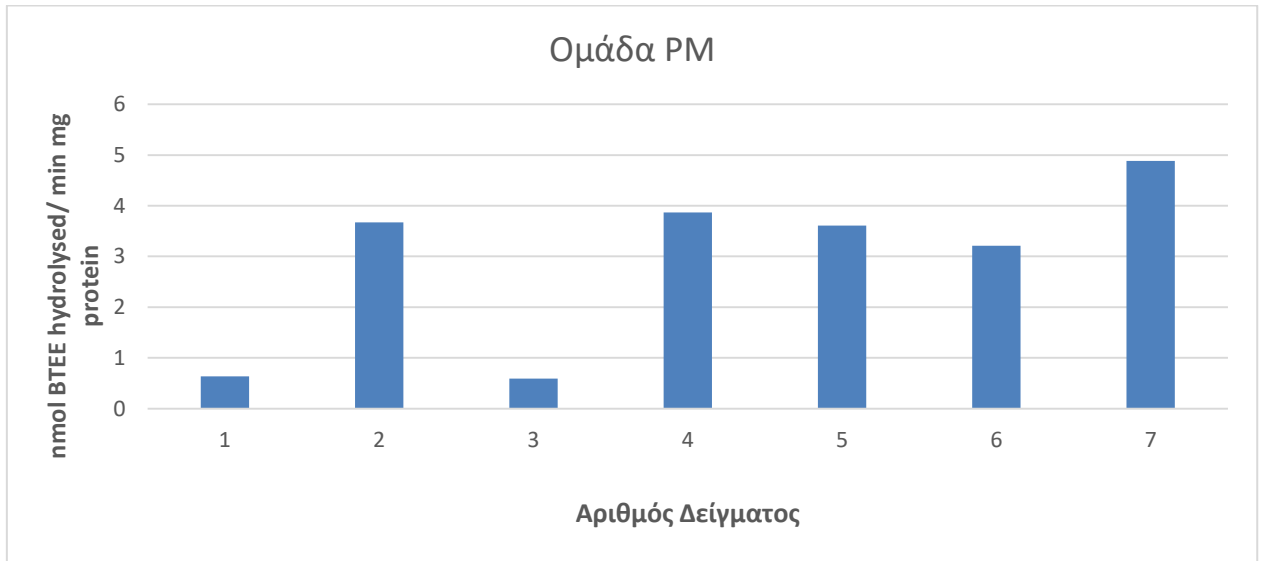
Τα σχήματα της κατανομής της δραστικότητας της χυμοθρυψίνης ανά διατροφική ομάδα παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.1, 3.2, 3.3 ).



**Σχήμα 3.1:** Κατανομή τιμών δραστικότητας χυμοθρυψίνης (U/mgπρωτεΐνης) στην ομάδα FET, για τα 8 ψάρια.



**Σχήμα 3.2 :** Κατανομή τιμών δραστικότητας χυμοθρυψίνης (U/mgπρωτεΐνης) στην ομάδα FM, για τα 8 ψάρια.



**Σχήμα 3.3 :** Κατανομή τιμών δραστικότητας χυμοθρυψίνης (U/mgπρωτεΐνης) στην ομάδα PM, για τα 7 ψάρια.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3 ) παρουσιάζεται η δραστικότητα της χυμοθρυψίνης (U/mg πρωτεΐνης) ανά διατροφική ομάδα.

**Πίνακας 3.3:** Δραστικότητα χυμοθρυψίνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση και τυπικό σφάλμα) εκφρασμένη σε U/mg πρωτεΐνης ανά διατροφική ομάδα.

Ομάδα	Μέγεθος	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα
FET	8	3.16	1.58	0.56
FM	8	3.54	2.03	0,72
PM	7	2.92	1.66	0.53
Total	23	3.22	1.71	0.36

Συμπερασματικά, αφού ελέγξαμε τις προϋποθέσεις συνεχίζουμε με την Ανάλυση Διακύμανσης. Πραγματοποιήσαμε την Ανάλυση Διακύμανσης-ANOVA, για να ελέγξουμε την ισότητα των μέσων των δειγμάτων σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 0,05 (Πίνακας 3.4). Οι βαθμοί ελευθερίας μεταξύ των ομάδων είναι ίσοι με το πλήθος των ομάδων μειωμένο κατά 1, ενώ μέσα στις ομάδες είναι ίσοι με το σύνολο των παρατηρήσεων μείων το πλήθος των ομάδων. Το excel μας προσφέρει το κριτήριο F σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0,05$  και 2 και 20 βαθμούς ελευθερίας.

**Πίνακας 3.4:** ANOVA για τον έλεγχο της ισότητας των μέσων των δειγμάτων της χυμοθρυψίνης.

Προέλευση διακύμανσης	SS	Βαθμοί ελευθερίας	MS	F	Τιμή P
Μεταξύ ομάδων	1.46	2	0.73	0.23	0.8
Μέσα στις ομάδες	63.05	20	3.15		
Σύνολο	64.51	22			

Η δραστηκότητα της χυμοθρυψίνης προσδιορίστηκε, στα πυλωρικά τυφλά και δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των των πειραματικών ομάδων ανά διαφορετική δίαιτα (ANOVA,  $P>0.05$ ). Συνεπώς, η ενζυμική δραστηκότητα της χυμοθρυψίνης δεν επηρεάστηκε από σίτιση με διαφορετικά σιτηρέσια στις τσιπούρες.

#### **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η έρευνα σε ότι αφορά τα πεπτικά ένζυμα τα τελευταία χρόνια ολοένα και αυξάνεται καθώς οι ερευνητές προσπαθούν να βρουν λύσεις ώστε οι οργανισμοί να μην επηρεάζονται αρνητικά με τις τροφές που τους χορηγούνται. Είναι γνωστό πως η πέψη και η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών είναι αλληλένδετα με τη δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων και κυρίως εκείνων που ευθύνονται για τη διάσπαση και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών (Silva et al. 2010). Σύμφωνα με τον Deguara et al το 2003 έχει παρατηρηθεί η παρουσία της θρυψίνης, της χυμοθρυψίνης, των καρβοξυπεπτιδασών Α και Β όπως επίσης και της αμυλάσης, στο στομάχι οπότε και οι έρευνες περιορίζονται στο στομάχι αλλά και στο έντερο.

Σε μια έρευνα από τους Dong et al. (1993) παρατηρήθηκε πως το πτηνάλευρο μπορεί να διαφέρει στη χημική σύνθεση του και στην πεπτικότητα των πρωτεϊνών του ανάλογα με την επεξεργασία που θα υποστεί.

Με τη πάροδο των χρόνων, λοιπόν, οι μελέτες για τα πεπτικά ένζυμα συνεχώς αυξάνονται και ο Deguara το 2003 μελέτησε το πεπτικό σωλήνα και το στομάχι σε τσιπούρες 150 γραμμάρων ταΐζοντας τες 1-2 φορές τη μέρα, για να παρατηρήσει τη δραστηριότητα της πεψίνης, της θρυψίνης, της χυμοθρυψίνης, των καρβοξυπεπτιδασών Α και Β καθώς και της αμυλάσης με τη χρήση των κατάλληλων υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η πεψίνη ήταν αυξημένη στο στομάχι ενώ η θρυψίνη και η αμυλάση εκεί βρέθηκαν σε χαμηλά επίπεδα και η χυμοθρυψίνη εμφανίζεται σχετικά ίδια στα διάφορα τμήματα του

πεπτικού σωλήνα. Η καρβοξυπεπτιδάση A έχει αυξημένη δράση στο έντερο σε σχέση με τα πυλωρικά τυφλά σε αντίθεση με τη καρβοξυπεπτιδάση B.

Το 2005 οι Fountoulaki et al μελετώντας τσιπούρες 100-130 γραμμάρια, οι οποίες είχαν ταϊστεί με 6 δίαιτες που διέφεραν ως προς το ποσοστό της περιεχόμενης πρωτεΐνης (40,45,50%) πρωτεΐνη και του περιεχόμενου λίπους (11 και 21%) λίπος και 14-36% άμυλο, περιορίστηκαν στην ανάλυση του πεπτικού σωλήνα ( $20 \pm 1$  °C) και στη μελέτη της α- αμυλάσης. Τα αποτελέσματα είχαν ως εξής: με το υψηλότερο επίπεδο λίπους οι οργανισμοί έχουν μείωση στη πεπτικότητα του αμύλου, του λίπους αλλά και της πρωτεΐνης. Άρα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το λίπος επηρεάζει τα επίπεδα της α- αμυλάσης.

Οι Santigosa et al το 2008 στα κατάλληλα υποστρώματα, pH και θερμοκρασία μελέτησαν τα πυλωρικά τυφλά και το έντερο ώστε να δούν τη δραστηριότητα των αλκαλικών πρωτεασών και της α- αμυλάσης. Παρέλαβαν πέστρφες *Oncorhynchus mykiss* καθώς και τσιπούρες στα  $19,2 \pm 0,2$  γρ. και  $16,5 \pm 0,2$  γρ. αντίστοιχα οι οποίες είχαν ταϊστεί με 50, 75 και 100% φυτική πρωτεΐνη σε αντικατάσταση πρωτεΐνης ιχθυαλεύρου. Ως αποτέλεσμα, η αμυλάση είχε χαμηλή δραστηριότητα σε σχέση με τις λοιπές πρωτεάσες. Με 50 και 75% αντικατάσταση οι αλκαλικές πρωτεάσες έδειξαν ελαφριά αυξημένη δραστηριότητα μετά το τάισμα, παρόμοια αύξηση και στα 2 είδη. Ενώ με 100% αντικατάσταση τα αποτελέσματα έδειξαν πτώση της δραστηριότητας στο 21,9%.

Λίγο πιο πρόσφατα, το 2012, η Ana Rodiles et al μελέτησε το έντερο του είδους *Senegalese sole* για τη δραστηριότητα της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης. Τα

ζώα είχαν βάρος  $22,3 \pm 2,5$  γραμμάρια και είχαν ταϊστεί με δίαιτες που περιείχαν 36, 46, 56, 67 % πρωτεΐνη. Η πρωτεολυτική δραστηριότητα στο έντερο επηρεαζόταν από τις διαιτητικές πρωτεΐνες. Ενώ στο ίδιο πείραμα οι *Senegalese sole* ταΐστηκαν με μερική αντικατάσταση ιχθυαλεύρου με σόγια, με συμπύκνωμα πρωτεΐνης σόγιας, απομονωμένη πρωτεΐνη σόγιας, γλουτένη σίτου και απομονωμένη πρωτεΐνη από μπιζέλια και τα αποτελέσματα έδειξαν 95% επιβίωση και παρατηρήθηκε πώς το είδος έχει τη δυνατότητα να διαφοροποιεί την έκκριση των πεπτικών πρωτεασών όταν η πηγή της πρωτεΐνης τροποποιείται.

Τέλος, ο Langeland το 2013 μελέτησε σε *Salvelinus fontinalis* το συκώτι και τη δραστηριότητα της χυμοθρυψίνης ταϊσμένο με ιχθυάλευρο και παρατήρησε η δραστηριότητα της ήταν σε αυξημένα επίπεδα σε σχέση με τη θρυψίνη. Ενώ ο ίδιος μελέτησε τη δραστηριότητα της θρυψίνης και της α-αμυλάσης στο πάγκρεας στο είδος *Perca fluviatilis* και κατέληξε στο συμπέρασμα πως η αμυλάση ήταν αυξημένη στο πάγκρεας ενώ η θρυψίνη στα πυλωρικά τυφλά.



**Πίνακας 4.1:** Μελέτες με τη δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων στα διάφορα όργανα.

ΜΕΘΟΔΟΙ - ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	ΙΣΤΟΙ-ΟΡΓΑΝΑ	ΠΕΠΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ	ΕΙΔΟΣ	ΒΑΡΟΣ	ΔΙΑΙΤΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΠΗΓΗ
Πεψίνη: καζείνη	Πεπτικός σωλήνας	Πεψίνη	<i>Sparus Aurata</i>	150g	1 με 2 γεύματα τη μέρα, δεν αναφέρεται τροφή	Πεψίνη: Στομάχι	Deguara, 2003
Θρυψίνη: TAME	Στομάχι	Θρυψίνη				Θρυψίνη: Χαμηλή στο στομάχι	
Χυμοθρ.: BTEE		Χυμοθρυψίνη				Χυμοθρυψίνη: Δε διαφέρει σημαντικά στα διάφορα σημεία του πεπτικού σωλήνα	
Καρβοξ. Α: σε 0.2 ml δείγμα προσθέτουν 6 ml από 0.001 M hippuryl-L-phenylalanine σε Tris buffer		Καρβοξυπεπτιδάση Α				Α: Αυξημένη δράση στο έντερο	
Καρβοξ. Β: σε 0.2 ml δείγμα προσθέτουν 6 ml από 0.001 M hippuryl-L-arginine σε Tris buffer		Καρβοξυπεπτιδάση Β				Β: Αυξημένη δράση στα πυλωρικά τυφλά	
Αμυλάση: 1 ml σωστά αραιωμένου ενζύμου επωάζεται σε 3' σε 1 ml 1% αμύλου		Αμυλάση				Αμυλάση: Χαμηλή στο στομάχι	
Μέτρηση πεπτικού σωλήνα στους $20 \pm 1$ °C	Πεπτικός σωλήνας	α-αμυλάση	<i>Sparus Aurata</i>	100-130 g	40, 50, 45 % πρωτεΐνη, 11 & 21% λίπος, 14-36% άμυλο	Στο υψηλό επίπεδο λίπους, χαμηλή πεπτικότητα αμύλου, λίπους και πρωτεΐνης	Fountoulaki et al, 2005

50mM Tris HCl σε pH=9, buffer με 1% καζεΐνη για 1h στους 4 °C	Πυλωρικά τυφλά	αλκαλικές πρωτεάσες α-αμυλάση	<i>Oncorhynchus mykiss</i> και <i>Sparus Aurata</i>	19.2 ± 0.2 g 16.5 ± 0.2 g	50% 75% 100% Αντικατάσταση με φυτική πρωτεΐνη	Η α-αμυλάση είχε χαμηλή δραστηριότητα σε σχέση με τις λοιπές πρωτεάσες. Με 50-75% οι αλκαλικές πρωτεάσες είχαν ελαφριά αύξηση μετά το τάισμα και στα 2 είδη. Με το 100%: πτώση της δραστηριότητας 21.9%	Santigosa et al, 2008
<p>Για τις όξινες πρωτεάσες: 5g L<sup>-1</sup> αιμογλοβίνη σε 0.1 γλυκίνη - HCl (pH=2).</p> <p>Για τις αλκαλικές: 5g L<sup>-1</sup> αζοκαζεΐνη σε 50mM Tris HCl (pH=9).</p> <p>Χυμοθρυψίνη &amp; θρυψίνη: 0.5mM BARNA και 0.2 mM σε υπόστρωμα 50mM Tris HCl σε pH=9</p>	Έντερο	Πρωτεάσες Χυμοθρυψίνη Θρυψίνη	<i>Senegalese Sole</i>	22.3 ± 2.5 g	36% 46% 56% 67% πρωτεΐνη	Η πρωτεολυτική δραστηριότητα στο περιφερικό έντερο επηρεαζόταν από τις διαιτητικές πρωτεΐνες	Ana Rodiles et al, 2012

<p>Αλκαλικές πρωτεάσες: 10μL εκχυλίσματος διατροφής επωάζονται σε 10μL τυποποιημένα εκχυλίσματα ενζύμων του είδους σε 0.5 ml από 50mM Tris-HCl με pH=9 για 1h σε 25 °C. Λοιπές πρωτεάσες: 0.5mL από 5g L<sup>-1</sup> αζοκαζείνη</p>	Έντερο	Πρωτεάσες	<i>Senegalese Sole</i>	22.3 ± 2.5 g	<p>Μερική αντικατάσταση FM με: σόγια, συμπλήρωμα πρωτεΐνης σόγιας, απομονωμένη πρωτεΐνη σόγιας, γλουτένη σίτου, απομονωμένη πρωτεΐνη από μπιζέλια</p>	<p>95% επιβίωση. Το είδος έχει την ικανότητα να διαφοροποιεί την έκκριση των πεπτικών πρωτεασών όταν η συγκέντρωση της πηγής της πρωτεΐνης τροποποιείται</p>	Ana Rodiles et al, 2012
<p>N-βενζούλιο-L-τυροσίνης, αιθυλεστεράς</p>	συκώτι	Χυμοθρυψίνη	<i>Salvelinus fontinalis</i>	-	FM	<p>Χυμοθρυψίνη πιο αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με τη θρυψίνη</p>	Langeland et al 2013
<p>benzo y larginine-p-νιτρανιλίδιο</p>	πάγκρεας	θρυψίνη α-αμυλάση	<i>Perca fluriotilis</i>	-	FM	<p>αυξημένη αμυλάση στο πάγκρεας και η θρυψίνη στα πυλωρικά τυφλά</p>	Langeland et al 2013

Στην έρευνα των Nengas et al το 1999 αντικαταστάθηκε το ιχθυάλευρο με 75 και 100% αντίστοιχα από πτηνάλευρο υψηλής ποιότητας αλλά και 75 και 100% από μείγμα κρέατος πουλερικών και γεύμα φτερών. Η έρευνα έδειξε οι ομάδες των ψαριών που τράφηκαν με 75 και 100% πτηνάλευρο έχουν μια μικρή μείωση στις παραμέτρους ανάπτυξης σε σύγκριση με τα ψάρια που τράφηκαν με ιχθυάλευρο αλλά δεν ήταν στατιστικά σημαντικό ( $P < 0,05$ ), παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και το μείγμα κρέατος. Με υποκατάσταση 50% δε παρουσιάζει σημαντική μείωση στην ανάπτυξη της τσιπούρας ωστόσο με 75% πρωτεΐνη είχαμε μείωση στην ανάπτυξη.

Σε μια παρόμοια έρευνα αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου με υποπροϊόντα πτηναλεύρου σε ιριδίζουσα πέστροφα 20 γραμμάρια, τα αποτελέσματα έδειξαν πως με 75% αντικατάσταση η ανάπτυξη δεν ήταν υψηλή και με το 100% παρατηρήθηκε χαμηλό ποσοστό επιβίωσης. Κατέληξε στο συμπέρασμα πως με 50% και κάτω αντικατάσταση δεν επηρεάζεται αρνητικά η ανάπτυξη της πέστροφας (Mehran Javaherl Babali et al 2013).

Οι Psofakis et al το 2015 μελέτησαν την ανάπτυξη της τσιπούρας με αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με 50 και 100% πτηνάλευρο και πετράλευρο και παρατηρήθηκαν τα ίδια αποτελέσματα με την παραπάνω έρευνα, δηλαδή η ανάπτυξη δε επηρεάζεται αρνητικά ενώ με 100% είχαμε σημαντική θνησιμότητα. Σε δεύτερο πείραμα με αντικατάσταση 25% είχαμε ιδανική ανάπτυξη.

Με βάση και τα αποτελέσματα της έρευνας της παρούσας μελέτης καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως ειδικότερα η τσιπούρα είναι ικανή να δεχτεί μεταποιημένη

ζωική πρωτεΐνη από υποπροϊόντα πτηνών σε ένα ιδανικό ποσοστό 25- 50%.  
Περισσότερες μελέτες θα πρέπει να γίνουν ώστε να βρεθούν λύσεις για την αντικατάσταση του μειωμένου πια ιχθυαλεύρου αλλά και να βρεθεί μία τροφή που δε θα επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των οργανισμών.

## **5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **5.1 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία**

[www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)

[www.fao.org](http://www.fao.org)

<http://www.fao.org/fishery/species/2384/en>

<http://www.feap.info/default.asp?SHORTCUT=617>

<http://www.nireus.com/>

<http://www.selonda.com/>

### **5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία**

Hickman, Roberts, Keen, Larson, L' Anson, Eisenhour (2011). Ζωολογία Ολοκληρωμένες Αρχές, εκδόσεις Utopia, Αθήνα σελ. 275.

Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko (2014). Βιοχημεία, εκδόσεις Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης σελ. 159, 160.

Γεώργιος Εμμ. Χάλκος (2011). Στατιστική, Θεωρία, εφαρμογές και χρήση στατιστικών προγραμμάτων σε Η/Υ, εκδόσεις Τυπωθητο σελ. 282, 283.

Γεώργιος Π. Ζερβός (2005). Φυσιολογίας Θρέψης Παραγωγικών Ζώων, εκδόσεις Αθ. Σταμούλης σελ. 155, 156, 189.

Έλενα Μεντέ- Ιωάννης Νέγκας (2011). Στοιχεία Φυσιολογίας Θρέψεως και εφαρμοσμένη Διατροφή Ιχθύων και καρκινοειδών, εκδόσεις Παπαζήση σελ. 77, 83, 84, 87,393.

Παπουτσόγλου Σ. Ε (2008). Διατροφή ιχθύων, εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα σελ. 25, 128, 156, 225, 245,851

Χρήστος Ν. Νεοφύτου (2004). Ιχθυολογία, εκδόσεις University studio press, Θεσσαλονίκη 1997 και ανατύπωση 2004 σελ 62, 77, 93.

John E. Halver & Ronald W. Hardy (2015). Διατροφή ιχθύων, εκδόσεις Πεδίο Αθήνα σελ. 134, 137, 148, 202, 409.

Lubert Stryer (1994). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης σελ. 229, 230.

Ελένη Βουλτσιάδου, Θεόδωρος Ι. Αμπατζόπουλος, Ευθυμία Αντωνοπούλου, Κωνσταντίνος Γκάνιας, Σπύρος Γκέλης, Αλεξάνδρα Στάικου, Αλέξανδρος Τριανταφυλλίδης (2015). ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ, Οργανισμοί, συστήματα παραγωγής, προοπτικές σελ. 54, 57, 58, 59.

Χατζηπλάτων Ιωάννα (2016). Ανάλυση πεπτικών ενζύμων σε τσιπούρες *Sparus aurata* εκτρεφόμενες με μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες (ΜΖΠ). Προπτυχιακή διπλωματική εργασία.

### **5.3 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία**

Anderson T., De Silva S., (2003). Nutrition In ‘‘Aquaculture: farming aquatic animals and plants ‘‘ Eds. J.S Lucas and P.C. Southgate, publ. Blackwell Publishing Oxford, England.

Comprany R., Caldush- Giner J. A, Kaushik S, Perez – Sánchez J., (1999). Growth performance and adiposity in gilthead seabream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture*, 171: 279-292

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.

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

Eleni Fountoulaki, Maria N. Alexis, Ioannis Nengas and Barbara Venou (2005). Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive enzyme levels of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture research*, 36: 1243-1251.

Flavia C.P. Silva, Jacques R. Nicoli, Jose L. Zambonino- Infante, Maria-Madeleine Le Gall, Sadasivam Kaushik, Francois- Joel Cutesoupe (2010). Influence of partial substitution of dietary fish meal on activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus*

aurata and goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture* Vol. 306 Issues 1-4: 233-237.

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

Hardy R.W. (1998). Feeding salmon and trout. In ‘ ‘ Nutrition and feeding of fish’’. Ed. T. Lovell, Publ. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA

Hoe-Young Kim (2013). Statistical notes of clinical researchers: assessing normal distribution (2) using skewness and kurtosis. *Restor Dent Endod* 38(1): 52-54.

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

Kissil G.W., Lupatsch I., Higgs D.A., Hardy R.W. (1997). Preliminary evaluation of rapeseed protein concentrates as an alternative to fish meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh*, 49: 135- 143

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*.

Mehran Javaheri Boboli & Mehran Dawodi Alnollah Gorjipor (2013). Effect of replacement fishmeal by poultrymeal on growth, survival and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* Vol,5(3): 296-300

National Research Council (1993). *Nutrient requirements of fish*. National Research Council of the United States, committee on Animal Nutrition, Publ. National Academy Press, Washington, D.C

Nengas I., Alexis M., Davies S. (1999). High inclusion levels of poultrymeal and related byproducts in diets for gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, Vol. 179, 13-23

Normadiah Mohd Razali & Yap Bee Wah (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov- Smirnov, Lilliefors and Anderson- Darling test. *Journal of Statistical Modeling and Analytics* 1: 21-33.

Psoufakis P., Daskalopoulou E., Theodorou A., Mende E., Karapanagiotidis I. 2015. Effect of replacing fishmeal with poultrymeal and



hydrolysed feathermeal on growth and feed efficiency of gilthead seabream (*Sparus aurata*). European Aquaculture Society, International Conference October 20-23, Rotterdam, Netherlands

Southgate P. (2003). Feeds and feed production. In 'Aquaculture: farming aquatic animals and plants' Eds. J.S. Lucas and P.C. Southgate, Publ. Blackwell Publishing, Oxford, England.

Watanabe T. (2002). Strategies for future development of aquatic feeds. *Fisheries Science*, 68: 242- 253

William E. Martin, Krista D. Bridgman (2012). *Quantitative and Statistical Research Methods: From Hypothesis to Results*. Publ. John Wiley & Sons, San Francisco, 231-278.

R. D. Miles and F.A. Chapman (2006). *The benefits of fish meal in aquaculture diets*. University of Florida.

Shapiro S.S & Wilk M.B. (1965). "An analysis of variance test for normality (complete samples)". *Biometrika*. 52 (3-4): 591-611

## **Abstract**

Processed animal proteins and specifically poultry by-products meal can be used, as a partial fishmeal replacement in the diet of gilthead sea bream *Sparus aurata*. In the current study, we measured the levels of chymotrypsin enzyme in 23 sea breams (*Sparus aurata*), which were divided into two groups of 8 fish per group and 7 fish in another group. The sea breams were fed, three diets which were: a 100% fishmeal diet (FM), a 50% fishmeal/ 50% feather meal diet (FeM50), and 50% fishmeal/50% poultry meal diet (PM50), for 30 days. There was no statistically significant difference in the three groups' in the levels of chymotrypsin activity. Therefore, we conclude that partial replacement of fishmeal with poultry by-products meal could be used for the *Sparus aurata*'s nutrition.