

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Η απόκριση των πεπτικών πρωτεασών του τελεόστεου *Sparus
aurata* σε νηστεία κυμαινόμενης διάρκειας

Διπλωματική εργασία: Γεωργίου Στέλλα

Λάρισα, 2006





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5203/1
Ημερ. Εισ.: 08-03-2007
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΓΕΩ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087656

Ευχαριστίες

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

Η επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής εργασίας είναι η επίκουρος καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μούτου Κατερίνα. Η εξεταστική επιτροπή απαρτίζεται από την επιβλέπουσα καθηγήτρια και τους:

- Μαμούρης Ζήσης, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την καθηγήτριά μου, κ. Μούτου Κατερίνα για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστούμε και για την πολύτιμη αρωγή της στη διεξαγωγή και συγγραφή της εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες στα μέλη του εργαστηρίου κ. Ζαρκάδα Γιάννη, που στάθηκε σημαντικός σύμβουλος, στον κ. Σταμάτη Κώστα και στην κ. Ψόχιου Ελένη για την εύρυθμη συνεργασία μας.

Περίληψη

Η νηστεία αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την αύξηση των ψαριών. Αρκετά πειραματικά δεδομένα συσχετίζουν την ικανότητα πέψης συναρτήσει περιόδων νηστείας και επαναδιατροφής. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι μεταβολές των κύριων πεπτικών ενζύμων μετά από νηστεία κυμαινόμενης διάρκειας.

Νεαρά άτομα τοπούρας μέσου βάρους 110,9g χωρίστηκαν τυχαία στις τέσσερις μεταχειρίσεις, τρεις επαναλήψεις η κάθε μια. Οι ομάδες που προέκυψαν ήταν: i) των μαρτύρων M, η οποία ταϊζόταν καθημερινά για 8 εβδομάδες, ii) η A, με 1 εβδομάδα ασιτία και 7 ταΐσμα, iii) η B, με 2 εβδομάδες ασιτία και 6 ταΐσμα και iv) η Γ, με 3 εβδομάδες ασιτία και 5 ταΐσμα. Προσδιορίστηκαν οι ενζυμικές δραστηριότητες των κύριων πεπτικών πρωτεασών, της πεψίνης, της θρυψίνης, της χυμοθρυψίνης και των ολικών αλκαλικών πρωτεασών στο τέλος κάθε εβδομάδας νηστείας και στη λήξη της περιόδου εκτροφής.

Μέχρι το τέλος της περιόδου εκτροφής η ομάδα A είχε αντισταθμίσει πλήρως την περίοδο νηστείας και δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στο μέσο βάρος των μαρτύρων και της ομάδας A. Επίσης, δε διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στο μέσο βάρος των ατόμων της ομάδας B και αυτών της ομάδας Γ, τα οποία όμως ήταν στατιστικώς σημαντικά μικρότερα από τα μέση βάρη των μαρτύρων και της ομάδας A. Οι κύριες πεπτικές πρωτεάσες δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τη νηστεία. Σε όλες τις περιπτώσεις στο τέλος της νηστείας η μέση δραστηριότητα δε διέφερε σημαντικά ανάμεσα στους μάρτυρες και στα άτομα που νήστεψαν. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στο τέλος της περιόδου εκτροφής (ημέρα 56) χωρίς όμως να μπορούν να αξιολογηθούν φυσιολογικά και να συσχετιστούν με το φαινόμενο της αντιστάθμισης. Επιπρόσθετες μελέτες είναι αναγκαίες για να διευκρινιστεί ο ρόλος άλλων παραμέτρων που μπορεί να συμβάλλουν στην αύξηση αντιστάθμισης, η χρήση του οποίου μπορεί να έχει σημαντικό οικονομικό όφελος για τους ιχθυοκαλλιεργητές.

Εισαγωγή

Ο τελεόστεος *Sparus aurata*, γνωστός ως τσιπούρα (Εικόνα 1), είναι ένα όμορφο και με οικονομικό ενδιαφέρον ψάρι. Ζει σε παράκτιες θαλάσσιες περιοχές, με αμμώδεις βυθούς και μαύρες φυκιάδες (*Posidonia oceanica*) και σε βάθη από 15-30m το καλοκαίρι ενώ το χειμώνα πιο βαθιά (150m), προκειμένου να αποφύγει τις χαμηλές θερμοκρασίες και να αναπαραχθεί. Συναντάται από τον Τροπικό Ατλαντικό ως τη Μεγάλη Βρετανία, τη Μεσόγειο και τις Ελληνικές θάλασσες ενώ σπανίζει στη Μαύρη θάλασσα.

<i>Sparus aurata</i>	
Υπόφυλο	Vertebrata
Υπέρκλαση	Osteichthyes
Κλάση	Actinopterygii
Υπόκλαση	Teleostei
Τάξη	Percinoformes
Οικογένεια	Sparidae



Εικόνα 1. Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Η τσιπούρα είναι σαρκοφάγο ψάρι και στις διατροφικές της προτιμήσεις περιλαμβάνονται δίθυρα μαλάκια, όπου χάρη στην ισχυρή οδοντοστοιχία της σπάει το κοχύλι τους, μαλακόστρατα, σκουλήκια, μικρά ψάρια, καρκινοειδή και εχινόδερμα. Αναπαράγεται την περίοδο Οκτώβρη-Δεκέμβρη. Είναι πρώτανδρο ψάρι και πιο συγκεκριμένα, τα άτομα του είδους ξεκινούν τη ζωή τους ως αρσενικά, για να εγκαταλείψουν μετά από τρία περίπου έτη αυτή τη φυλετική ταυτότητα, μετατρέπόμενα σε θηλυκά (www.fishbase.org). Το φιλέτο της τσιπούρας είναι άσπρο, τρυφερό και αποτελεί εξαιρετικής ποιότητας τροφή για τον άνθρωπο. Η χημική σύσταση του κρέατος περιλαμβάνει 81,10% νερό, 17,00% πρωτεΐνες, 0,93% λίπη και 0,97% τέφρα. Η απόδοση σε φιλέτο προσεγγίζει το 50%, γεγονός που καθιστά το ψάρι οικονομικά ενδιαφέρον για τους ιχθυοκαλλιεργητές (Πανταρίδης, 2005).

Η ιχθυοκαλλιέργεια στη χώρα μας εμφανίζεται τη δεκαετία του 1980 και αφορά δύο είδη: την τσιπούρα και το λαβράκι. Στην αρχή λειτούργησαν τρεις μονάδες, ενώ στα τέλη της δεκαετίας λειτουργούσαν 30. Ενώ το 1985 η παραγωγή της μεσογειακής καλλιέργειας ψαριών ήταν μόλις 374 τόνοι τσιπούρας και λαβρακιού, ως το 1990 η παραγωγή είχε αυξηθεί στις 3.876 τόνους, όπου η Ελλάδα, η Ισπανία και η Ιταλία κυριαρχούσαν με σχεδόν 80% όλης της παραγωγής. Το 2000 η συνδυασμένη μεσογειακή παραγωγή ξεπέρασε τις 130.000 τόνους. Και αυτή την περίοδο αρχίζει η κυριαρχία της Ελλάδας με σχεδόν το 50% (70.000 τόνοι) όλης της παραγωγής, ενώ οι άλλες σημαντικές χώρες παραγωγοί είναι η Τουρκία (20%, 28.500 τόνοι), η Ιταλία (12%, 17.000 τόνοι) και η Ισπανία (10%, 14.140 τόνοι). Η κοσμογονία για τον κλάδο έρχεται αργότερα, και σήμερα λειτουργούν περίπου 250 μονάδες, των οποίων η παραγωγή είναι 85.000-100.000 τόνοι (Πανταρίδης, 2005). Από τα παραπάνω αντιλαμβανόμαστε την εμπορική σημασία της τσιπούρας για την ελληνική οικονομία, γεγονός που δικαιολογεί τη συνεχιζόμενη έρευνα πάνω σε αυτόν τον τομέα. Η Ελλάδα, εξάλλου, είναι πρωτοπόρος στην ανάπτυξη της ιχθυοπαραγωγής και καλλιέργειας τσιπούρας σε ευρωπαϊκό επίπεδο. Η καλλιέργειά της απαιτεί την παροχή τροφής με υψηλά ποσοστά ζωικών πρωτεϊνών, στις οποίες οφείλεται και το ιδιαίτερα αυξανόμενο κόστος των ιχθυοτροφών. Καθώς η τεχνολογία των υδατοκαλλιεργειών έχει αναπτυχθεί και η παραγωγή έχει εντατικοποιηθεί, έχει ανακύψει η ανάγκη για μεγαλύτερη παραγωγή με ταχεία σωματική αύξηση των ιχθύων και χαμηλότερο κόστος παραγωγής. Σε πολλές μονάδες εντατικής παραγωγής το κόστος των ιχθυοτροφών ξεπερνά το 50% του συνόλου των διαφόρων λειτουργικών εξόδων. Για το λόγο αυτό διενεργούνται μελέτες με αντικείμενο τη μείωση της παρεχόμενης τροφής σε σχέση με τις επιπτώσεις στην ανάπτυξη των ψαριών.

Αύξηση αντιστάθμισης

Η αύξηση και ανάπτυξη στα ψάρια επηρεάζεται από εσωτερικούς (νευρικούς, ενδοκρινολογικούς και νευροενδοκρινολογικούς), βιοτικούς (θρέψη, μετακίνηση, ωρίμανση και κοινωνική συμπεριφορά) και εξωτερικούς παράγοντες (θερμοκρασία, φωτοπερίοδος, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου και αλατότητα) (Jobling et al, 1994). Ο ρυθμός αύξησης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα πέψης και απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών (Belanger et al, 2002), οπότε εύλογα

γεννούνται ερωτήματα σχετικά με τους παράγοντες που περιορίζουν την αύξηση στα ψάρια. Ο σημαντικότερος αυτών ίσως είναι η θρέψη και αντίστοιχα η στέρηση τροφής.

Αρκετά ζώα στη φύση βιώνουν φυσικές περιόδους στέρησης τροφής και τα ψάρια δεν αποτελούν εξαίρεση. Όταν αποκαθίσταται η παροχή τροφής μετά τη στέρηση, τα ψάρια αποκαθιστούν τα ενεργειακά τους αποθέματα (Belanger et al, 2003) και μπορεί να εμφανίσουν το φαινόμενο της *αύξησης αντιστάθμισης*. Αύξηση αντιστάθμισης είναι το φαινόμενο κατά το οποίο οργανισμοί παρουσιάζουν ταχύτερη αύξηση στη διάρκεια της ανάκαμψής τους μετά από μια περίοδο ολικής ή μερικής νηστείας, απ' ό,τι σε περιόδους συνεχούς διατροφής (Πανταρίδης, 2005). Άτομα τα οποία υπέστησαν μια περίοδο νηστείας αυξάνονται στο ίδιο μέγεθος σε συνάρτηση με την ηλικία, σε σχέση με τα άτομα που σιτίζονταν διαρκώς. Το φαινόμενο αυτό αντικατοπτρίζει την ικανότητα των ψαριών να αξιολογούν την πορεία αύξησής τους και οποιαδήποτε παρέκκλιση από αυτή να ενεργοποιεί αντισταθμιστικούς μηχανισμούς (Hubbell et al, 1971, Broekhuizen et al, 1994). Η έκφραση της ρύθμισης της αύξησης εξαρτάται από τη φύση, τη σφοδρότητα και τη διάρκεια της ημιδιατροφής ή της στέρησης τροφής, το στάδιο ανάπτυξης στην αρχή της νηστείας, την ηλικία που επέρχεται σεξουαλική ωριμότητα και το πρότυπο της επαναδιατροφής. Η άμεση συνέπεια της αύξησης αντιστάθμισης είναι η επίτευξη του ίδιου μεγέθους του οργανισμού που στερήθηκε τροφής με το μέγεθος του οργανισμού που διατρεφόταν συνεχώς.

Η αύξηση αντιστάθμισης λαμβάνει τη μορφή της πλήρους αντιστάθμισης όταν τα άτομα που στερήθηκαν τροφής αποκτούν το ίδιο μέγεθος με τα άτομα που διατρεφόταν συνεχώς. Στη μερική αντιστάθμιση, τα άτομα που στερήθηκαν τροφής αποτυγχάνουν να αποκτήσουν το ίδιο μέγεθος με τα άτομα που διατρεφόταν συνεχώς, αλλά εμφανίζουν υψηλότερους ρυθμούς αύξησης και ενδέχεται να έχουν καλύτερη μετατρεψιμότητα τροφής κατά τη διάρκεια της επαναδιατροφής. Όταν τα άτομα που στερήθηκαν τροφής ξεπερνούν σε μέγεθος τα άτομα που διατρεφόταν συνεχώς, τότε το φαινόμενο ονομάζεται υπερ-αντιστάθμιση. Καταγεγραμμένα περιστατικά υπερ-αντιστάθμισης εμφανίζονται όταν υπάρχουν συνεχείς κύκλοι νηστείας-κορεσμού (Ali et al, 2003).

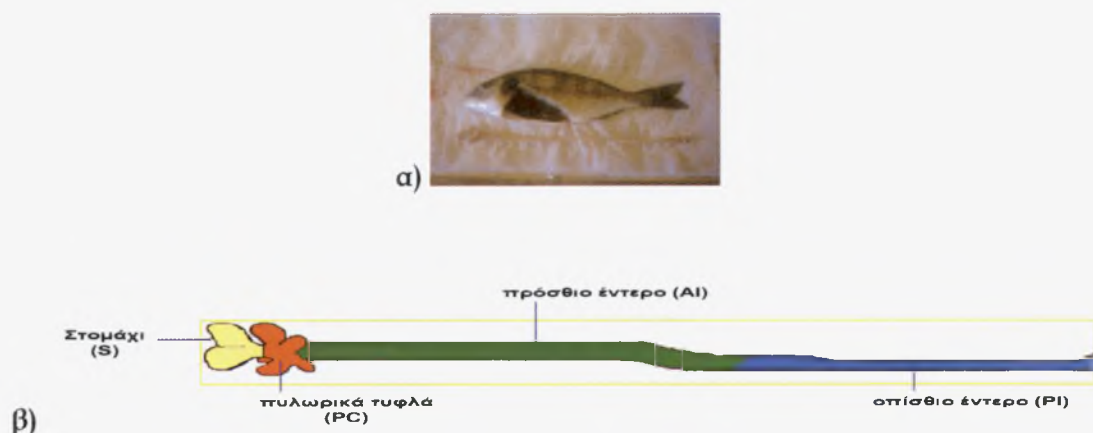
Οι μηχανισμοί που διέπουν αυτό το φαινόμενο έχουν μελετηθεί κυρίως σε σολομοειδή, ενώ απουσιάζουν εκτεταμένες αναφορές για την τσιπούρα. Προκειμένου να διερευνηθούν το φαινόμενο σε ψάρια, αρκετές μελέτες πέτυχαν αύξηση αντιστάθμισης με μερική ή ολική στέρηση τροφής, με μεταβολή στην ποιότητα της

τροφής (Björnsson et al, 1992) ή με ασυνήθιστες για την εποχή θερμοκρασίες, που μείωσαν το ρυθμό κατανάλωσης τροφής σε αρκετά είδη ψαριών, όπως στον σολομό (*Salmo salar*; Mortensen et al, 1993; Nicieza & Metcalfe, 1997; Maclean & Metcalfe, 2001). Αύξηση αντιστάθμισης εμφάνισε και ο βακαλάος του Ατλαντικού (*Gadus morhua*, Purchase & Brown 2001) και η ιριδιζούσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*, Speare et al, 1997). Στην τσιπούρα παρατηρήθηκε μερική αύξηση αντιστάθμισης με αρχική σταδιακή απώλεια βάρους κατά τη νηστεία, ενώ με τη χορήγηση της τροφής παρατηρήθηκε αύξηση του βάρους (Πανταρίδης 2005, Lund 2000, Şahin et al 2000).

Φυσιολογία πέψης

Οι πρωτεΐνες συνιστούν το 65-75% του ξηρού τους βάρους των ψαριών (Jobling et al, 1995). Οι απαιτήσεις της τσιπούρας σε πρωτεΐνη είναι υψηλές ενώ σε υδατάνθρακες και λίπη χαμηλότερες, καθώς πρόκειται για σαρκοφάγο είδος. Προκειμένου να επιτύχει μέγιστη αύξηση, η τσιπούρα απαιτεί το 45-46% της τροφής να είναι πρωτεΐνη (Teles et al, 2000). Εκτός από την ποιότητα και την ποσότητα, σημαντική παράμετρος αύξησης είναι η διαθεσιμότητα των διατροφικών πρωτεϊνών, η οποία σε μεγάλο βαθμό καθορίζεται από την πεπτικότητα και τη δράση των πεπτικών πρωτεασών (Jobling et al, 1995).

Ο πεπτικός σωλήνας της τσιπούρας αρχίζει από το στόμα και τη στοματική κοιλότητα, συνεχίζει στο φάρυγγα και τον οισοφάγο, το στομάχι, το έντερο με τα τέσσερα πυλωρικά τυφλά και το απευθυσμένο, για να καταλήξει στην έδρα (Εικόνα 2). Η διαδικασία της πέψης ξεκινά στο στόμα και το φάρυγγα με τη μηχανική διάσπαση των τροφών, ενώ δεν παρατηρείται έκκριση πεπτικών ενζύμων, οπότε η διάσπαση της τροφής παραμένει καθαρά μηχανική. Κατά τη διόδο της τροφής από τον οισοφάγο, τα επιθηλιακά του κύτταρα εκκρίνουν βλέννα, που παίζει ρόλο λιπαντικού για τη διευκόλυνση της κατάποσης, ενώ έχει επιπρόσθετα και προστατευτικό ρόλο, για να αποφεύγεται η καταστροφή των τοιχωμάτων του οισοφάγου. Τα κύτταρα του οισοφάγου δεν έχουν εκκριτικό ρόλο (Jobling et al, 1995), αλλά πρόσφατα έχει διαλευκανθεί ο ρόλος τους στην οσμορύθμιση. Μετά τον οισοφάγο, η τροφή εισέρχεται στο στομάχι τύπου Υ.



Εικόνα 2 α) Πεπτικός σωλήνας τσιπούρας σε πλήρη έκταση. β) Σχηματικό διάγραμμα του πεπτικού σωλήνα, όπου επισημαίνονται τα επιμέρους τμήματα.

Οι λειτουργίες του στομάχου είναι η προσωρινή αποθήκευση, ανάμειξη και πρωτογενής πέψη της τροφής (Cataldi et al, 1987). Το στομάχι διαχωρίζεται μορφολογικά και λειτουργικά στην καρδιακή μοίρα, με λεπτά ελαστικά τοιχώματα και στην πυλωρική μοίρα με παχιά μυώδη τοιχώματα. Η πυλωρική μοίρα τελειώνει με τον πυλωρικό σφιγκτήρα που είναι η είσοδος στο άνω τμήμα του εντέρου. Στο στομάχι πραγματοποιείται η ενζυμική πέψη της τροφής, με τη βοήθεια πεψινών σε όξινο περιβάλλον. Μόνο ένας κυτταρικός τύπος στους γαστρικούς αδένες των ψαριών έχει βρεθεί να παράγει υδροχλωρικό οξύ και πεψίνες, ενώ συναντώνται και βλεννογόνα κύτταρα. Οι πεψίνες εκκρίνονται ως ανενεργά ζυμογόνα, τα οποία ενεργοποιούνται σε όξινες συνθήκες με pH χαμηλότερο του 6. Είναι ενδοπεπτιδάσες, οι οποίες υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ αρωματικών και δικαρβοξυλικών αμινοξέων. Έτσι, οι πεψίνες διασπούν πολύ λίγους από τους δεσμούς μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας καταλήγοντας σε μικρότερα πολυπεπίδια, που χρήζουν συμμετοχής άλλων πρωτεασών (Jobling et al, 1995).

Το όξινο μίγμα αφήνει το στομάχι από τον πυλωρό και εισέρχεται στο έντερο, που είναι ένας μακρύς περιελιγμένος σωλήνας όπου ολοκληρώνεται η πέψη των τροφών και πραγματοποιείται η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, νερού και ηλεκτρολυτών. Δύο τύποι κυττάρων καλύπτουν το εντερικό επιθήλιο, τα βλεννογόνα και τα κυλινδρικά μονόστιβα επιθηλιακά, καλυμμένα με μικρολάχνες, στα οποία συντελείται η απορρόφηση. Στο οπίσθιο έντερο αυξάνεται ο αριθμός των βλεννογόνων κυττάρων πλουσιών σε κενοτόπια με ηωσινόφιλο περιεχόμενο, τα οποία έχουν την ικανότητα απορρόφησης και πέψης πρωτεϊνών με πινοκυττάρωση (Cataldi et al, 1987).

Ο εντερικός σωλήνας της τσιπούρας εμφανίζει τέσσερις τυφλές απολήξεις στο πάνω μέρος κοντά στο πυλωρικό άνοιγμα, που ονομάζονται πυλωρικά τυφλά. Η κύρια λειτουργία τους είναι η αύξηση της επιφάνειας απορρόφησης των θρεπτικών, εξειδικευμένη απορρόφηση λιπών και υδρογονανθράκων και η έκκριση πεπτικών ενζύμων. Το επιθήλιό τους είναι απλό κυλινδρικό, με πιο απομακρυσμένες και μεγαλύτερες μικρολάχνες σε σχέση με το έντερο. Έχει προταθεί ότι τα πυλωρικά τυφλά σχετίζονται με την αποθήκευση των αλκαλικών πρωτεασών ώσπου το pH του όξινου βλωμού να γίνει ουδέτερο από άλλες παγκρεατικές εκκρίσεις (Jobling et al, 1995).

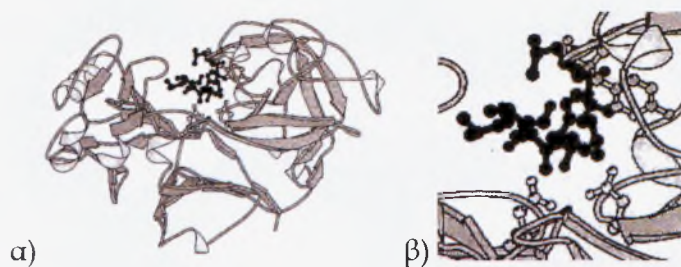
Κατά τη μετακίνηση της τροφής κατά μήκος του εντέρου πραγματοποιείται η πέψη της τροφής. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην εντερική πέψη προέρχονται από το πάγκρεας και τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου, με το πάγκρεας να συμμετέχει παρέχοντας τη μεγαλύτερη ποικιλία και ποσότητα πεπτικών ενζύμων. Το κυρίαρχο πρωτεολυτικό ένζυμο του εντέρου που παράγεται από το πάγκρεας είναι η θρυψίνη και ακολουθούν η χυμοθρυψίνη και οι καρβοξυπεπτιδάσες. Δι- και τριπεπτιδάσες καθώς και μια αμινοπεπτιδάση παράγονται από το εντερικό επιθήλιο. Τα προαναφερθέντα ένζυμα εμφανίζουν μέγιστη δραστικότητα σε ελαφρά αλκαλικές συνθήκες (pH 7-9) (Πανεπιστημιακές παραδόσεις, 2000). Στην τσιπούρα το πάγκρεας δεν είναι ένα συμπαγές όργανο, αλλά παγκρεατικές νησίδες βρίσκονται διάχυτες στο ήπαρ, στο πρόσθιο τμήμα του πεπτικού σωλήνα και κατά μήκος του εντέρου (Cataldi et al, 1987). Προκειμένου να εξασφαλιστούν οι κατάλληλες αλκαλικές συνθήκες για τη δράση των ενζύμων, οι παγκρεατικές εκκρίσεις περιέχουν και δικαρβονικά ιόντα για την εξουδετέρωση των οξέων και την αύξηση του pH. Σε αυτή τη λειτουργία συμμετέχουν και τα χολικά οξέα, που παράγονται στο ήπαρ.

Όξινες πρωτεάσες

Κατά την έλευση του βλωμού στο στομάχι εκκρίνεται το ανενεργό πεψινογόνο, το οποίο ενεργοποιείται σε όξινες συνθήκες και δίνει την πεψίνη. Το όξινο περιβάλλον εξασφαλίζεται από την έκκριση HCl, που όπως και οι πεψίνες εκκρίνονται από τα κύτταρα των γαστρικών αδένων του στομάχου. Σε pH 2-2,5 το ανενεργό πεψινογόνο δρα αυτοκαταλυτικά και μετατρέπεται σε πεψίνη. Το πεψινογόνο υποβάλλεται σε περιορισμένη πρωτεόλυση και αποκόπεται τελικά από αυτό ένα τμήμα από το αμινοτελικό άκρο. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει ενδιάμεσα βήματα, με το σχηματισμό ενδιάμεσων πεπτιδίων και τελικό προϊόν είναι η πεψίνη (Handbook of proteolytic enzymes, 2004).

Πεψίνη

Η πεψίνη ανήκει στην οικογένεια των πεπτιδασών του ασπαραγινικού και συγκεκριμένα στην οικογένεια A1 της ομάδας AA. Οι ασπαραγινικές πεπτιδάσες διαφέρουν από τις πρωτεάσες σερίνης στο ότι το νουκλεόφιλο που επιτίθεται στον επιδεκτικό πεπτιδικό δεσμό είναι ένα ενεργοποιημένο μόριο νερού παρά μια νουκλεοφιλική πλευρική αλυσίδα ενός αμινοξέος. Σε κρυσταλλικές δομές το μόριο της πεψίνης παρουσιάζεται με δύο λοβούς, ανάμεσα στους οποίους βρίσκεται το ενεργό κέντρο. Για την κατάλυση είναι απαραίτητα δύο κατάλοιπα ασπαραγινικού, το Asp215 και το Asp32, ενώ όπως φαίνεται στο λοβό που βρίσκεται στη δεξιά πλευρά της Εικόνας 3 υπάρχει μια θηλιά, που σχηματίζεται από β-πτυχωτό φύλλο, η οποία καλύπτει το ενεργό κέντρο και ονομάζεται 'flap'. Η θηλιά αποτελείται από αμινοξέα σημαντικά για την εξειδίκευση του ενζύμου, που μπορεί να αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα και είναι μέρος της S1 θέσης.

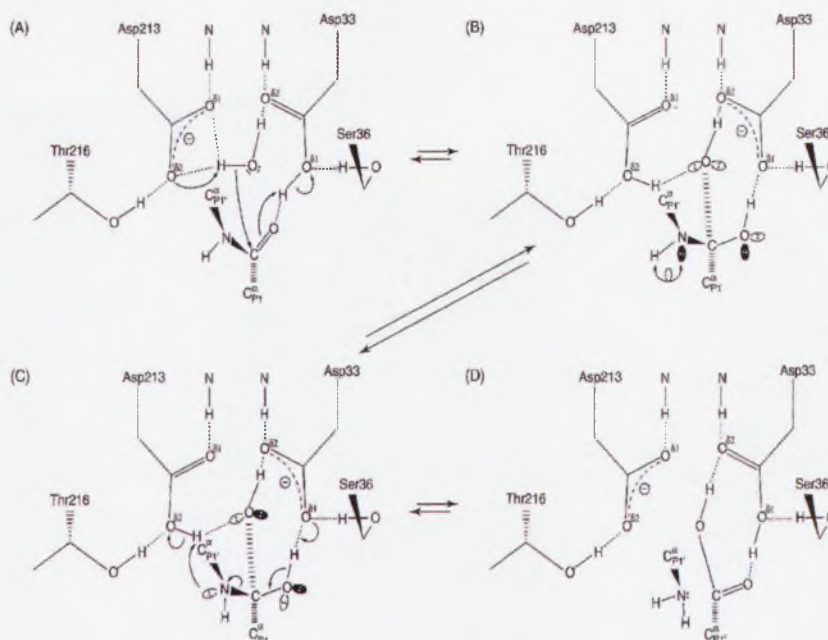


Εικόνα 3 α) Διάγραμμα Richardson του συμπλόκου ανθρώπινης πεψίνης A/ pepstatin. β) Τα καταλυτικά αμινοξέα παρουσιάζονται: Asp32, Asp215, Tyr75. Η pepstatin (αναστολέας της πεψίνης) παρουσιάζεται με έντονο μαύρο χρώμα (Handbook of proteolytic enzymes, 2004).

Η σχισμή στην οποία προσδένεται το υπόστρωμα της A1 οικογένειας των πρωτεασών του ασπαραγινικού σχηματίζεται εκεί όπου το N-τελικό άκρο συναντά το C-τελικό άκρο και έχει μέγεθος 7 ή 8 αμινοξέα (Handbook of proteolytic enzymes, 2004). Η αλληλεπίδραση αναγκάζει την αλληλουχία του υποστρώματος να λάβει μια εκτεταμένη διαμόρφωση β-πτυχωτής επιφάνειας και εκθέτει περισσότερο τον προς διάσπαση πεπτιδικό δεσμό (Dunn et al, 2000). Κεντρικά εντοπίζονται στη σχισμή τα δύο ασπαραγινικά κατάλοιπα, με τις καρβοξυλικές τους ομάδες να βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο καθώς και το μόριο νερού που δεσμεύεται με αυτές να εντοπίζεται και αυτό στο ίδιο επίπεδο. Χαρακτηριστικό του καταλυτικού μηχανισμού είναι ο σχηματισμός τετραεδρικού ενδιάμεσου, όπως και στις πρωτεάσες της σερίνης, με τη διαφορά ότι το

νουκλεόφιλο είναι η καρβοξυλική ομάδα του μορίου του νερού, που μετατρέπεται σε ιόν υδροξειδίου από το καρβοξύλιο του Asp215, που φέρεται σαν γενική βάση.

Το υπόστρωμα προσεγγίζει το ενεργό κέντρο με την P1 πλευρική αλυσίδα στην S1 θέση πρόσδεσης. Σε αυτό το μηχανισμό (Εικόνα 4), τη νουκλεόφιλη προσβολή του επιδεκτικού πεπτιδικού δεσμού από το ενεργοποιημένο μόριο νερού (OH^-) ακολουθεί η μεταφορά του πρωτονίου του Asp32 στο καρβονυλικό οξυγόνο του επιδεκτικού πεπτιδικού δεσμού. Η επίθεση του υδροξυλίου στο καρβονυλικό άτομο άνθρακα υποβοηθάται από το στερεοηλεκτρονικό φαινόμενο, στο οποίο το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του καρβονυλικού οξυγόνου και του αζώτου του επιδεκτικού πεπτιδικού δεσμού διευθετώνται στο ίδιο επίπεδο αλλά αντίθετα με την κατεύθυνση της προσβολής του ιόντος υδροξειδίου. Το συνακόλουθο τετραεδρικό ενδιάμεσο λαμβάνει διαμόρφωση *gem*-διόλης που συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με την καρβοξυλική ομάδα του Asp32, που τώρα έχει φορτιστεί αρνητικά. Το τετραεδρικό ενδιάμεσο σταθεροποιείται επίσης από το φαινολικό δακτύλιο της Tyr75 (Στην εικόνα 4 παραλείπεται). Προκειμένου να διασπαστεί ο πεπτιδικός δεσμός, το άτομο αζώτου του επιδεκτικού πεπτιδικού δεσμού (που είναι τώρα ένα sp^3 άτομο αζώτου) πρέπει να πρωτονιωθεί, για να σχηματίσει την ομάδα $-\text{NH}_2$ που πρόκειται να απομακρυνθεί. Για να γίνει η πρωτονίωση από το Asp213, το άτομο αζώτου πρέπει να αντιστρέψει τη διαμόρφωσή του έτσι ώστε να τοποθετηθεί το τροχιακό με το μονήρες ζεύγος κατάλληλα ώστε να δεχθεί το πρωτόνιο. Η διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού υποβοηθάται και από τα μονήρη ηλεκτρόνια καθενός από τα άτομα οξυγόνου της *gem*-διόλης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η μεταφορά πρωτονίου από το εξωτερικό άτομο οξυγόνου της *gem*-διόλης στο καρβοξύλιο του Asp33 (που δρα σαν γενική βάση τώρα), με αποτέλεσμα τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού και την απελευθέρωση μιας νέας αμινο-ομάδας ($\text{R}'-\text{NH}_2$) και μιας νέας καρβοξυλικής ομάδας ($\text{R}-\text{COOH}$). Η αποσύνδεση αυτών των ομάδων και η επανασύνδεση των καρβοξυλικών ομάδων με το μόριο νερού στο ενεργό κέντρο αναγεννά την ενεργό μορφή του ενζύμου.



Εικόνα 4 Αναπαράσταση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος και του σχηματισμού τετραεδρικού ενδιάμεσου (βλέπε κείμενο) (Handbook of proteolytic enzymes, 2004).

Η πεψίνη είναι μια ενδοπεπτιδάση με ευρεία εξειδίκευση, γεγονός που επιβεβαιώνει το ρόλο της ως γενική πρωτεάση του στομάχου. Η κύρια αντίδραση που καταλύει είναι η υδρόλυση N- και C- τελικώς δεσμευμένων πεπτιδίων, όπως Glu-Tyr και Phe-Phe, αλλά με μικρή απόδοση. Η ιδανική τιμή pH για τη δράση της είναι 2. Η απαιτούμενη ενέργεια για την αντίδραση έχει προταθεί ότι προέρχεται από την πτώση της ελεύθερης ενέργειας συνδεδεμένη με την αποκατάσταση του μορίου νερού του ενεργού κέντρου της πεψίνης.

Στην τσιπούρα, η μέγιστη δραστηριότητα της πεψίνης επιτυγχάνεται σε pH 2-2,5 και σε θερμοκρασία 40°C. Βάση ζυμογραμμάτων, απαντάται σε δύο ισομορφές, την πεψίνη I και II. Η πεψίνη της τσιπούρας εμφανίζει αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά: διακρίνεται για την ασυνήθιστη σταθερότητα του ενζύμου σε αυξημένες τιμές pH, πιθανώς λόγω των της υψηλής αναλογίας σε υδρόφοβα αμινοξέα σε σχέση με την πεψίνη των θηλαστικών. Ακόμη, λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση του pH εξαιτίας της τροφής και της κατάποσης νερού σε σχέση με την ανάγκη για το κατάλληλο pH, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η όξινη πρωτεόλυση δεν πραγματοποιείται μέχρι η έκκριση του οξέος να επαρκεί για τη μείωση του pH (Alarcon et al, 1998).

αλκαλικές πρωτεάσες

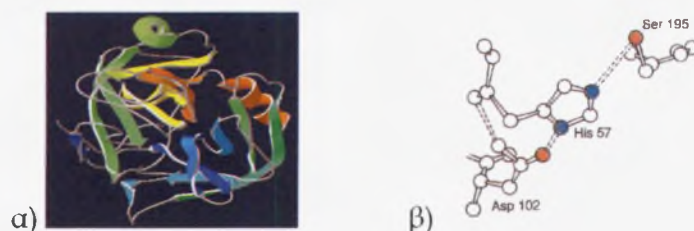
Η πέψη των τροφών συνεχίζεται και ολοκληρώνεται στο έντερο με τη βοήθεια των αλκαλικών πρωτεασών, που συντίθενται στο πάγκρεας. Αποτελούνται από δύο μεγάλες οικογένειες, τις καρβοξυπεπτιδάσες και τις πρωτεάσες της σερίνης. Οι καρβοξυπεπτιδάσες ανήκουν στην οικογένεια των M14A των μεταλλοπρωτεασών, που απαιτούν ένα ιόν ψευδαργύρου για την καταλυτική τους δράση και διακρίνονται σε καρβοξυπεπτιδάση Α και καρβοξυπεπτιδάση Β. Συμμετέχουν στο μηχανισμό της πέψης διασπώντας περαιτέρω πεπτίδια που προκύπτουν από τη δράση της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης, που είναι πρωτεάσες σερίνης. Πιο συγκεκριμένα, η καρβοξυπεπτιδάση Α είναι μια εξωπεπτιδάση που αποσπά αμινοξέα από το καρβοξυτελικό άκρο πεπτιδικών αλυσίδων που έχουν αρωματικές ή ογκώδεις αλειφατικές, μη πολικές πλευρικές αλυσίδες ενώ η καρβοξυπεπτιδάση Β είναι εξειδικευμένη να αποσπά τα πολικά καρβοξυτελικά αμινοξέα λυσίνης και αργινίνης.

Η οικογένεια των πρωτεασών της σερίνης συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον της ενζυμικής πέψης, με πρωταγωνιστές την θρυψίνη και τη χυμοθρυψίνη. Υπάρχουν περίπου 50 οικογένειες, που διαχωρίζονται με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία. Ο καταλυτικός τους μηχανισμός περιλαμβάνει την νουκλεόφιλη προσβολή του πεπτιδικού δεσμού από την υδροξυλομάδα ενός καταλοίπου σερίνης. Η πιο σημαντική οικογένεια είναι η S1 της ομάδας PA(S), που περιλαμβάνει την θρυψίνη και τη χυμοθρυψίνη.

Χυμοθρυψίνη

Η χυμοθρυψίνη ανήκει στην οικογένεια S1A της ομάδας PA(S) των πρωτεασών σερίνης. Έχει μοριακό βάρος 25KDa και αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που είναι συνδεδεμένες με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Το μόριο είναι συμπαγές και ελλειψοειδές, με αρκετές περιοχές αντιπαράλληλης β-πτυχωτής επιφάνειας και λίγες περιοχές α-έλικας (Εικόνα 5). Συντίθεται ως ανενεργό πρόδρομο μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας που ονομάζεται χυμοθρυψινογόνο και διακρίνεται σε χυμοθρυψινογόνο I και χυμοθρυψινογόνο II. Στην τσιπούρα, τα χυμοθρυψινογόνα I και II μοιράζονται 61% ομοιότητα, με το χυμοθρυψινογόνο I να εκφράζεται στο οπίσθιο έντερο και το χυμοθρυψινογόνο II στο πρόσθιο. Η ενεργοποίηση του μορίου

συντελείται με τη διάσπαση του δεσμού Arg15-Ile16 από τη θρυψίνη (Ψόχιου, αδημοσίευτα δεδομένα). Ανάλογα με το ρυθμό της ενεργοποίησης προκύπτουν η α-χυμοθρυψίνη και η β-χυμοθρυψίνη, με αργό και γρήγορο ρυθμό αντίστοιχα. Τα δύο προαναφερθέντα μόρια έχουν πανομοιότυπες πρωτοταγείς δομές αλλά διαφέρουν ως προς τις ενζυμικές δραστηριότητες και σταθερότητες.



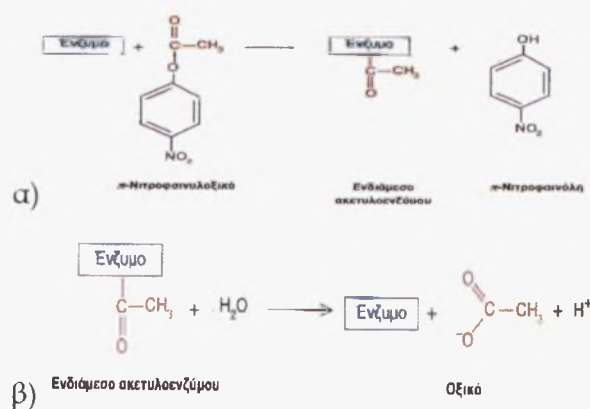
Εικόνα 5 α) Μοντέλο χυμοθρυψίνης, β) Στερεοδιάταξη της καταλυτικής τριάδας σερίνης-ιστιδίνης-ασπαραγινικού στη χυμοθρυψίνη (Stryer et al, 1997).

Η καταλυτική τριάδα της χυμοθρυψίνης (Εικόνα 5β) απαρτίζεται από τα αμινοξέα His57, Asp102 και Ser195 και είναι απαραίτητη για τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού. Εντοπίζεται στην είσοδο της θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος και η συντηρημένη διάταξή τους σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου. Αυτά τα τρία αμινοξέα είναι ιδιαίτερα συντηρημένα ανάμεσα στις πεπτιδάσες της οικογένειας S1, μέλη της οποίας είναι η θρυψίνη και η χυμοθρυψίνη. Η Ser214 είναι συνδεδεμένη με δεσμό υδρογόνου με το Asp102 και με την κύρια αλυσίδα του ατόμου αζώτου του επιδεκτικού πεπτιδικού δεσμού. Αυτό το κατάλοιπο συμβάλλει σημαντικά στο πολικό περιβάλλον που σταθεροποιεί το φορτίο που φέρει το Asp102. Οι πεπτιδικές αμινομάδες της Gly193 και της Ser195 στη δομική μονάδα καλούνται *κοιλότητα του οξυανιόντος* και συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου με την καρβονυλική ομάδα του επιδεκτικού πεπτιδικού δεσμού. Οι προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις είναι ουσιαστικής σημασίας για την κατάλυση, καθώς προσανατολίζουν τον επιδεκτικό δεσμό NH στην His57 και στην Ser195.

Η χυμοθρυψίνη καταλύει την υδρόλυση του καρβοξυλικού τμήματος των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων της τυροσίνης, της τρυπτοφάνης και της φαινυλαλανίνης, καθώς και των μεγάλων υδρόφοβων καταλοίπων, όπως της μεθειονίνης. Η υδρόλυση των εστερικών ή πεπτιδικών δεσμών γίνεται σε δύο βήματα. Κατά τη διαδικασία σχηματίζονται ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και ένα ενδιάμεσο ακυλο-ενζύμου. Κατά το πρώτο βήμα η παραγωγή του προϊόντος είναι

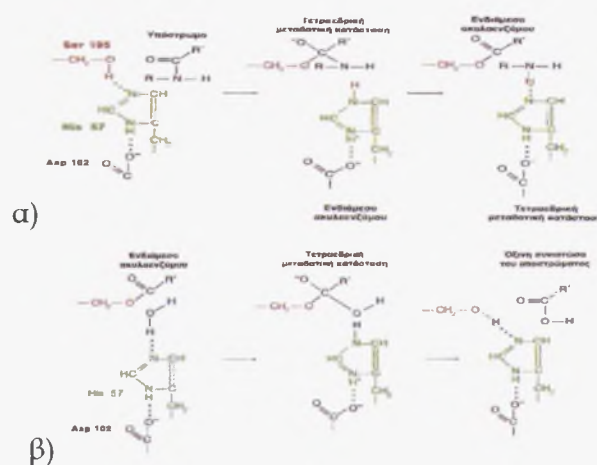
ταχεία και στο δεύτερο η αντίδραση φθάνει σε σταθερή κατάσταση και η ταχύτητα της αντίδρασης είναι μειωμένη. Το δεύτερο βήμα είναι και το ρυθμιστικό βήμα της αντίδρασης της χυμοθρυψίνης (Handbook of proteolytic enzymes, 2004).

Τα δύο βήματα επεξηγούνται από την αντίδραση της πυρηνόφιλης σερίνης με το υποστρώμα (π-νιτροφαινυλοξικό) για το σχηματισμό του ομοιοπολικά συνδεδεμένου ενδιάμεσου ενζύμου-υποστρώματος. Αρχικά, η ιδιαίτερα δραστική ομάδα υδροξυλίου της Ser195 αντιδρά με το καρβονύλιο του υποστρώματος για το σχηματισμό του ακυλο-ενζύμου, απελευθερώνοντας την π-νιτροφαινόλη (ή μια αμίνη αν το υποστρώμα είναι αμίδιο και όχι εστέρας) (Εικόνα 6α). Έπειτα, το ακυλο-ένζυμο υδρολύεται, για να απελευθερώσει την ομάδα καρβοξυλικού οξέος του υποστρώματος και να αναγεννήσει το ελεύθερο ένζυμο (Εικόνα 6β). Το σύμπλοκο ακετυλοενζύμου διακρίνεται για τη σταθερότητά του, και επομένως μπορεί να απομονωθεί.



Εικόνα 6 α) Ακυλίωση: Ο σχηματισμός του ενδιάμεσου ακυλο-ενζύμου στην κατάλυση από τη χυμοθρυψίνη. β) Αποακυλίωση: Η υδρόλυση του ενδιάμεσου ακυλο-ενζύμου (Stryer et al, 1997).

Ο πιθανός μηχανισμός κατάλυσης της χυμοθρυψίνης περιλαμβάνει την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού με προσβολή του καρβονυλικού ατόμου άνθρακα του πεπτιδικού δεσμού από την υδροξυλομάδα της Ser195. Τα τέσσερα άτομα του καρβονυλικού ατόμου άνθρακα είναι διατεταγμένα όπως σε ένα τετράεδρο και σχηματίζεται μια μεταβατική τετραεδρική δομή, με το φορτίο του οξυγόνου του καρβονυλικού ατόμου άνθρακα να είναι αρνητικό. Αυτό το φορτίο σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοτελικών ομάδων της Gly193 και της Ser195, στην κοιλότητα του οξυανιόντος (Stryer et al, 1997) (Εικόνα 7α). Το ενδιάμεσο ακυλοενζύμου προσβάλλεται από ιόν υδροξειδίου, που προκύπτει από ένα μόριο νερού (Εικόνα 7β).



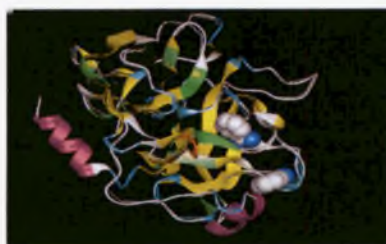
Εικόνα 7 α) Ακυλίωση: Σχηματίζεται μια τετραεδρική μεταβατική κατάσταση, κατά την οποία διασπάται ο πεπτιδικός δεσμός. Στη συνέχεια, η αμίνη του υποστρώματος απομακρύνεται ταχέως αφήνοντας ένα ενδιάμεσο ακυλο-ενζύμου. β) Αποακυλίωση: Το ενδιάμεσο ακυλο-ενζύμου υδρολύεται από το νερό (Stryer et al, 1997).

Η πρωτοταγής ειδικότητα του ενζύμου καθορίζεται από τις εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του ενζύμου με το υπόστρωμα, και συγκεκριμένα της P1 θέσης του ενζύμου με την S1 θέση του υποστρώματος. Η S1 κοιλότητα κατέχει σημαντικό ρόλο για το ένζυμο καθώς είναι μια βαθιά, σχετικά υδρόφοβη κοιλότητα, της οποίας η δομή σταθεροποιείται από τον δισουλφιδικό δεσμό της Cys191-Cys220. Ένας άλλος δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των Cys1-Cys220 του χυμοθρυψινογόνου φαίνεται να σταθεροποιεί τη διαμόρφωσή του, να το αποτρέπει από λανθασμένη ενεργοποίηση ενώ πολύ μικρό ρόλο έχει στην εξειδίκευση του ενζύμου. Ο δεσμός αυτός απουσιάζει από την θρυψίνη (Handbook of proteolytic enzymes, 2004).

Θρυψίνη

Η θρυψίνη ανήκει στην οικογένεια S1A της ομάδας PA(S) των πρωτεασών σερίνης. Έχει μοριακό βάρος 25KDa, συντίθενται στο πάγκρεας ως ανενεργό θρυψινογόνο και το προένζυμο αποθηκεύεται στα εκκριτικά κυστίδια του εντέρου. Στην τσιπούρα, το θρυψινογόνο II εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε όλο το μήκος του πεπτικού σωλήνα, συμπεριλαμβανομένου και του όξινου στομάχου (Ψόχιου, αδημοσίευτα δεδομένα). Πρωτεολύει τον πεπτιδικό δεσμό μετά από κατάλοιπα Arg ή Lys σε συνθήκες ελαφρά αλκαλικές, με ιδανική τιμή pH8. Το ενεργό μόριο της θρυψίνης αποτελείται από μια μοναδική πολυπεπτιδική αλυσίδα, στην οποία τα

καταλυτικά κατάλοιπα γεφυρώνουν δύο περιοχές β-βαρελίου (Handbook of proteolytic enzymes, 2004) (Εικόνα 8). Άλλες μορφές (α , γ και π) στις οποίες ο σκελετός του πολυπεπτιδίου έχει λάβει άλλη διαμόρφωση εμφανίζουν μικρότερη δραστικότητα που ποικίλει (Higaki & Light, 1985). Όπως και στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των σερινοπρωτεασών αξιοσημείωτο ρόλο έχει η καταλυτική τριάδα His57-Asp102-Ser195, με αυτή τη σειρά. Ο καταλυτικός μηχανισμός είναι ο ίδιος με της χυμοθρυψίνης, όπου το οξυγόνο της Ser195 προσβάλλει πυρηνόφιλα το υπόστρωμα δημιουργώντας ένα ενδιάμεσο ακυλοενζύμου. Στην καταλυτική τριάδα η His57 δρα σαν μια βάση και δέχεται το πρωτόνιο από την -OH της Ser195. Ο ρόλος της ομάδας -COO⁻ του Asp102 έγκειται στη σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης της θετικά φορτισμένης His57 και στη σταθεροποίηση του σωστού ταυτομερούς της. Αντικατάσταση οποιουδήποτε από τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας συνεπάγεται μείωση περισσότερο από 10⁴ φορές της δραστικότητας του ενζύμου. Εκτός, όμως, από αυτά τα αμινοξέα, και άλλες θέσεις αμινοξέων διαδραματίζουν ρόλο στην κατάλυση, όπως αποδεικνύεται από πειράματα με μεταλλαξιγένεση θέσης, ενώ αρκετά μέρη του μορίου της θρυψίνης συμβάλλουν στη σωστή αναγνώριση του υποστρώματος (Handbook of proteolytic enzymes, 2004).



Εικόνα 8 Μοντέλο της θρυψίνης.

Το θρυψινογόνο έχει ένα αμινοτελικό πεπτίδιο που πρέπει να αποκοπεί πρωτεολυτικά προκειμένου να προκύψει το δραστικό μόριο της θρυψίνης. Η αντίδραση καταλύεται από την εντεροκινάση ή την ίδια την θρυψίνη με αυτοκαταλυτικό τρόπο. Η αποκοπή του προπεπτιδίου έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση του δεσμού υδρογόνου μεταξύ της His40 και του Asp194, που ακολουθείται από περιστροφή του Asp194, έτσι ώστε να αλληλεπιδράσει με το νέο N- τελικό άκρο στη Ile16. Αυτή η δομική αλλαγή ολοκληρώνει το σχηματισμό της κοιλότητας του οξυανιόντος και των θέσεων πρόσδεσης. Η νέα διαμόρφωση σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις υδροφοβικού χαρακτήρα της πλευρικής αλυσίδας της Ile16. Η θηλιά

της αυτοκατάλυσης αποτελείται από τα κατάλοιπα 143-151 και είναι πολύ ευέλικτη στην θρυψίνη και στο θρυψινιγόνο. Αποκοπή της Lys145 της θηλιάς αποδίδει την α-θρυψίνη που διατηρεί κάποια ενζυμική δραστικότητα (Handbook of proteolytic enzymes, 2004).

Κατά την αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος, το υποστρώμα σχηματίζει ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο με τη θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Η εξειδίκευση του υποστρώματος καθορίζεται από την πλευρική αλυσίδα του Asp189, που βρίσκεται στη βάση της S1 θέσης πρόσδεσης. Σε μικρά συνθετικά υποστρώματα, ο σχηματισμός του ενδιάμεσου ακυλο-ενζύμου είναι συνήθως το καθοριστικό βήμα για την διάσπαση των αμιδικών δεσμών από την θρυψίνη, ενώ η υδρόλυση του ενδιάμεσου είναι το καθοριστικό βήμα για τη διάσπαση του εστέρα. Ο μηχανισμός κατάλυσης της θρυψίνης είναι ίδιος με της χυμοθρυψίνης, με την ίδια καταλυτική τριάδα να έχει τον ίδιο ρόλο (Handbook of proteolytic enzymes, 2004).

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της νηστείας κυμαινόμενης διάρκειας

1. στο φαινόμενο της αύξησης αντιστάθμισης
2. στην ενζυμική δραστικότητα των ολικών όξινων πρωτεασών, των ολικών αλκαλικών πρωτεασών, της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης

στον τελεόστεο *Sparus aurata*.

Τα ψάρια υποβλήθηκαν σε νηστεία κυμαινόμενης διάρκειας, 1-3 εβδομάδων και έπειτα επαναδιατράφηκαν για διάστημα 8 εβδομάδων συνολικά. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν οι ενζυμικές δραστικότητες σε τέσσερα μέρη του πεπτικού σωλήνα, στομάχι, πυλωρικά τυφλά εντέρου καθώς και στο πρόσθιο και οπίσθιο έντερο, αναλόγως που εντοπίζεται η καθεμία.

Όλικά και μέθοδοι

Η πειραματική διαδικασία διήρκησε οκτώ εβδομάδες, από τις 26/2/2005 ως 23/4/2005 και έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Χρησιμοποιήθηκαν άτομα τσιπούρας ηλικίας ενός έτους, που μεταφέρθηκαν από τους ιχθυοκλωβούς της μονάδας πάχυνσης ΙΧΘΥΟ Α.Ε., που βρίσκεται στο Μαλιακό κόλπο. Αμέσως μετά τη μεταφορά τους οι τσιπούρες τοποθετήθηκαν στις δεξαμενές αποστείρωσης, όπου παρέμειναν σε διάλυμα Nitrofurandom 20p.p.m. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στις κυλινδρικών δεξαμενές του εργαστηρίου ενώ το θαλασσινό νερό παρέχονταν με κλειστό κύκλωμα.

Τα ψάρια εγκλιματίστηκαν στις συνθήκες του εργαστηρίου για περίπου δύο εβδομάδες σε δώδεκα κυλινδρικών δεξαμενές. Κάθε δεξαμενή περιείχε 500l θαλασσινού νερού και στα ψάρια προσφέρονταν τροφή καθημερινά. Μία ημέρα προτού ξεκινήσει το πείραμα, 164 ψάρια ζυγίστηκαν και μετρήθηκαν με σκοπό την ομοιομορφία στο βάρος και στο συντελεστή παραλλακτικότητας, και κατόπιν χωρίστηκαν τυχαία στις τέσσερις μεταχειρίσεις (3 δεξαμενές / μεταχείριση), μέσου βάρους 110,9g (max 161.5g και min 47.7g). Οι ομάδες που προέκυψαν ήταν: i) των μαρτύρων M, η οποία ταϊζόταν καθημερινά για 8 εβδομάδες, ii) η A, με 1 εβδομάδα ασιτία και 7 τάισμα, iii) η B, με 2 εβδομάδες ασιτία και 6 τάισμα και iv) η G, με 3 εβδομάδες ασιτία και 5 τάισμα. Τα ψάρια ταϊζόνταν 5 ημέρες την εβδομάδα, ενώ έμεναν άσιτα κάθε Παρασκευή, ώστε το Σάββατο που ζυγίζονταν να μειώνονταν όσο το δυνατόν περισσότερο η πιθανότητα στρεσαρισμάτων τους.

Στα ψάρια προσφέρονταν εμπορικό σιτηρέσιο (Biomar, Ecolife 15, σφίπηκτα 4,5mm) δύο φορές την ημέρα (08.00 και 15.00). Η σύσταση ήταν η ακόλουθη: 45% πρωτεΐνη, 16% λίπη, 20,3% υδατάνθρακες, 1,6% κυτταρίνη και 8,3% τέφρα. Η προσφερόμενη ποσότητα τροφής ήταν η προτεινόμενη από τους πίνακες εκτροφής της Biomar (συναρτήσεως της θερμοκρασίας και του μεγέθους των ψαριών) και αναπροσαρμόζονταν σύμφωνα με το βάρος των ψαριών που ζυγίστηκαν.

Το θαλασσινό νερό (αλατότητας 25‰) ήταν από την ευρύτερη περιοχή του λιμανιού του Βόλου και ανακυκλώνονταν κατά τη διάρκεια της ημέρας, διερχόμενο από το εσωτερικό αντλιών για μηχανικό και βιολογικό καθαρισμό και στη συνέχεια

δεχόταν υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Η μέση θερμοκρασία του ήταν 20,5°C (max 22.5°C και min 18.3°C) και διατηρούνταν έτσι με τη βοήθεια κλιματισμού. Οι τιμές του διαλυμένου οξυγόνου, οι οποίες καταγράφονταν κάθε μέρα μετά το δεύτερο τάισμα, ήταν πάνω από 5p.p.m. Τα συστήματα παροχής του αέρα ήταν δύο, έτσι ώστε να αποτραπεί η μη οξυγόνωση του νερού, λόγω βλάβης ενός εκ των δύο παροχέων. Η αλατότητα και το pH μετρούνταν εβδομαδιαίως. Η αμμωνία κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές. Τα ψάρια εκτέθηκαν σε φυσική φωτοπερίοδο.

Η αναισθητοποίηση των ψαριών γινόταν με τη χρήση 50 ppm MS-222.

Δειγματοληψίες

Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν πέντε δειγματοληψίες. Την πρώτη μέρα, μετά το σχηματισμό τεσσάρων ομάδων (ημέρα 0), λήφθηκαν δείγματα από τρία τυχαία επιλεγμένα άτομα από κάθε ενυδρείο. Αρχικά τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν και αφού καταγράφηκε το σωματικό τους βάρος, θανατώθηκαν, αφαιρέθηκε ο πεπτικός σωλήνας, ο οποίος και καθαρίστηκε από το περιεχόμενό του, διαιρέθηκε σε τέσσερα τμήματα, στομάχι (stomach, S), πυλωρικά τυφλά (pyloric caeca, PC), πρόσθιο έντερο (anterior intestine, AI) και οπίσθιο έντερο (posterior intestine, PI) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Οι δειγματοληψίες συνεχίστηκαν με τον ίδιο τρόπο για τις ημέρες 7, 14, 21 και 56.

Προετοιμασία ενζυμικών εκχυλισμάτων

Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν μηχανικά (ομογενοποιητής ULTRA TURRAX, IKA-WERKE) στις 17,500 στροφές (1/min), για 40sec περίπου σε ψυχρό 50mM Tris-HCl buffer, pH=7.5 για τα τμήματα του εντέρου καθώς και των πυλωρικών τυφλών, και σε αποσταγμένο νερό για το στομάχι, σε αναλογία 100mg ιστού ανά ml διαλύματος, και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 13,500rpm για 35min στους -4°C (Alarcon et al, 1998). Το υπερκείμενο διαιρέθηκε σε τρεις σωλήνες eppendorf και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Μέτρηση πρωτεϊνικού περιεχομένου

Η μέτρηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Lowry (Lowry et al, 1951).

Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ολικών όξινων πρωτεασών

Για κάθε μια από τις ενζυμικές αναλύσεις προηγήθηκαν προκαταρκτικές δοκιμές προκειμένου να ταυτοποιηθεί η ακριβής συγκέντρωση ενζύμου και υποστρώματος, λαμβάνοντας μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων των ενζυμικών εκχυλισμάτων και του υποστρώματος αντίστοιχα.

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της πεψίνης βασίστηκε στη μέθοδο του Anson (Anson et al, 1938), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την αιμογλοβίνη (Hemoglobin from bovine blood, Sigma H2625) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1mM glycine-HCl, pH=2. Η αντίδραση άρχισε με την προσθήκη 5μl ενζυμικού εκχυλίσματος, σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 2% αιμογλοβίνη και συνολικό όγκο 1,4ml στους 25°C. Με την πάροδο 10min προστέθηκε 20% TCA, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 4°C για 60min και κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν στις 12,000rpm για 35min στους 4°C. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκειμένου σε φασματοφωτόμετρο CARY 50Bio σε μήκος κύματος 280nm. Βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηριότητα της πεψίνης εκφράζεται σε μg τυροσίνης που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ (ειδικός συντελεστής απορρόφησης τυροσίνης $0.005 \text{ ml } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ολικών αλκαλικών πρωτεασών

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας των ολικών αλκαλικών πρωτεασών βασίστηκε στο πρωτόκολλο του Alarcon (Alarcon et al, 1998), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την καζεΐνη (casein from bovine milk, Fluka 22080) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl pH=9. Η αντίδραση άρχισε με την προσθήκη 30μl ενζυμικού εκχυλίσματος για τα πυλωρικά τυφλά, το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο, σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 0,5% καζεΐνη και συνολικό όγκο 1,4ml στους 25 °C. Με την πάροδο 10min για το πρόσθιο έντερο και τα πυλωρικά τυφλά, και 20min για το οπίσθιο έντερο, προστέθηκε 8% TCA, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 4°C για 60min και κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν στις 12,000rpm για 35min στους 4°C. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκειμένου σε φασματοφωτόμετρο CARY 50Bio σε μήκος κύματος 280nm. Βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηριότητα της πεψίνης εκφράζεται σε μg τυροσίνης που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ (ειδικός συντελεστής απορρόφησης τυροσίνης $0.005 \text{ ml } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Προσδιορισμός της δραστηριότητας της θρυψίνης

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας αμιδάσης των αλκαλικών πρωτεασών (θρυψίνης) έγινε, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 10mM benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilide (BAPNA, Sigma B3279) 10mM σε DMSO, σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl pH=8.2, 10mM CaCl₂ (Alarcon et al, 1998). Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 20-40μl ενζυμικού εκχυλίσματος για το πρόσθιο έντερο, 30-40μl για το οπίσθιο έντερο και 20μl για τα πυλωρικά τυφλά σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 0,5mM στην κυψελίδα και συνολικό όγκο αντίδρασης 1,5ml. Μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο CARY 50Bio σε μήκος κύματος 405nm σε χρονικό διάστημα 4min και σε θερμοκρασία 25 °C. Βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηριότητα της θρυψίνης εκφράζεται σε pmol p-nitroaniline που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ (ειδικός συντελεστής απορρόφησης $e=8,8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Προσδιορισμός της δραστηριότητας της χυμοθρυψίνης

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της χυμοθρυψίνης χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE, Sigma B1625), σε ρυθμιστικό διάλυμα 44.4mM Tris-HCl pH=7.8, 55.5mM CaCl₂ (Alarcon et al, 1998). Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 30μl ενζυμικού εκχυλίσματος για το πρόσθιο, το οπίσθιο έντερο και τα πυλωρικά τυφλά σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 1.07mM στην κυψελίδα και συνολικό όγκο αντίδρασης 1,5ml. Μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο CARY 50 Bio σε μήκος κύματος 256nm σε χρονικό διάστημα 2.5min και σε θερμοκρασία 25 °C. Βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηριότητα της χυμοθρυψίνης εκφράζεται σε μg BTEE που υδρολύθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ (ειδικός συντελεστής απορρόφησης $e=964\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Συγκεντρωτικός πίνακας ενζυμικών μετρήσεων

Ενζυμική δραστηριότητα	Υπόστρωμα	Τελική συγκέντρωση υποστρώματος	Ποσότητα ενζυμικού εκχυλίσματος	Χρόνος αντίδρασης (min)	Μήκος κύματος (nm)
Ολικές όξινες πρωτεάσες	Αιμογλοβίνη	2%	5μl	10	280
Ολικές αλκαλικές πρωτεάσες	Καζεΐνη	0,5%	30μl	10	280
Θρυψίνη	BAPNA	0.5mM	20-40μl	4	405
Χομοθρυψίνη	BTEE	1.07mM	30μl	2,5	256

Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MS EXCEL (Office 2000), με το οποίο εκτελέστηκαν αναλύσεις ενός παράγοντα (one-way ANOVA) καθώς και το STATISTIKA (Office 2000). Ακόμη, έγινε χρήση του μη παραμετρικού συντελεστή Spearman, ενώ ως διάστημα εμπιστοσύνης ορίστηκε το 95% ($P < 0.05$).

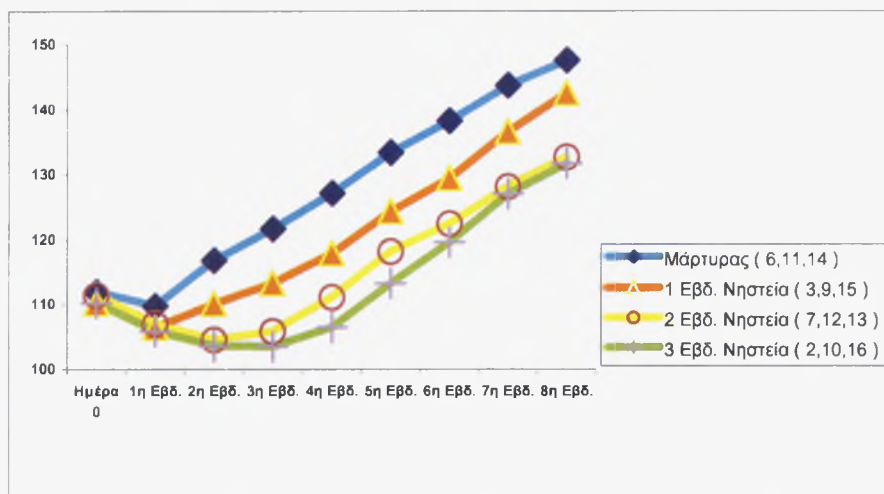
Αποτελέσματα

Διακόμανση βάρους

Η διακόμανση του βάρους των ατόμων που συμμετείχαν στο πείραμα παρουσιάζεται στην Εικόνα 9. Την πρώτη εβδομάδα νηστείας παρατηρείται μείωση του βάρους των ατόμων και στις τέσσερις ομάδες: στους μάρτυρες που σιτίζονταν διαρκώς και στα ψάρια που νήστεψαν για μία, δύο ή τρεις εβδομάδες. Οι μάρτυρες άρχισαν να αυξάνουν σε βάρος μετά την πρώτη εβδομάδα, πιθανώς λόγω προσαρμογής στις συνθήκες του πειράματος. Στα άτομα που στερήθηκαν τροφής για μια εβδομάδα παρατηρήθηκε αύξηση σωματικού βάρους από τη δεύτερη εβδομάδα και έπειτα, όταν σιτίστηκαν και πάλι. Τα άτομα που νήστεψαν για δύο και τρεις εβδομάδες ξεκίνησαν να αυξάνονται σε βάρος μετά τη δεύτερη και τρίτη εβδομάδα, αντίστοιχα, οπότε και λάμβαναν ξανά τροφή.

Στο τέλος της περιόδου εκτροφής (8^η εβδομάδα) δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στο μέσο βάρος των μαρτύρων και των ατόμων της ομάδας A που είχε νηστέψει μία εβδομάδα (Εικόνα 9). Επίσης δε διαπιστώθηκε

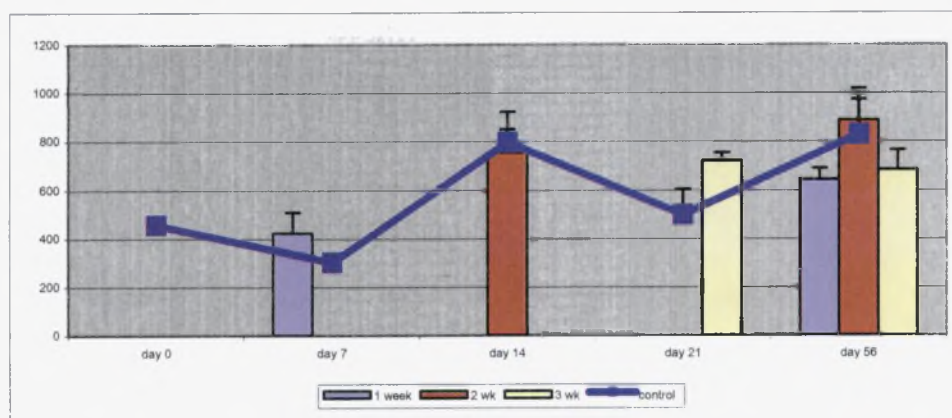
στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στο μέσο βάρος των ατόμων της ομάδας Β και αυτών της ομάδας Γ, τα οποία όμως ήταν στατιστικώς σημαντικά μικρότερα από τα μέση βάρη των μαρτύρων και της ομάδας Α.



Εικόνα 9. Εξέλιξη του μέσου βάρους των ψαριών στις τέσσερις πειραματικές ομάδες. Στις παρενθέσεις δίνονται οι αριθμοί των δεξαμενών που αντιστοιχούν στις επαναλήψεις κάθε ομάδας.

Ολικές όξινες πρωτεΐνες

Η δραστικότητα των ολικών όξινων πρωτεασών (πεψίνη) προσδιορίστηκε στο στομάχι στο τέλος κάθε εβδομάδας επεξεργασίας (ημέρα 7, 14, 21 και 56). Στην ομάδα των μαρτύρων δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διακυμάνσεις στη διάρκεια της περιόδου εκτροφής και σε κανένα χρονικό σημείο δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μαρτύρων και των ψαριών που υποβλήθηκαν σε νηστεία (Εικόνα 10).

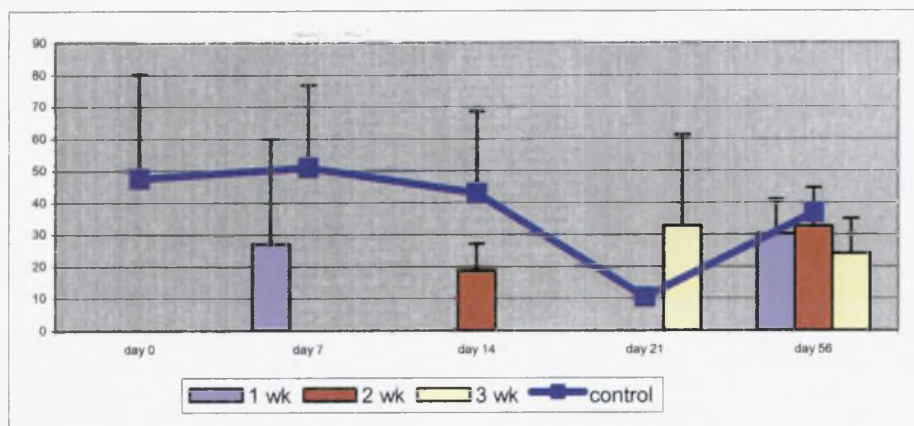


Εικόνα 10. Ειδική δραστηριότητα της πεψίνης (μέση τιμή + τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε μg τυροσίνης που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ στην περιοχή του στομάχου σε τσιπούρες που υποβλήθηκαν σε νηστεία μιας, δύο ή τριών εβδομάδων (1, 2, 3 weeks) και μαρτύρων (control).

Ολικές αλκαλικές πρωτεάσες

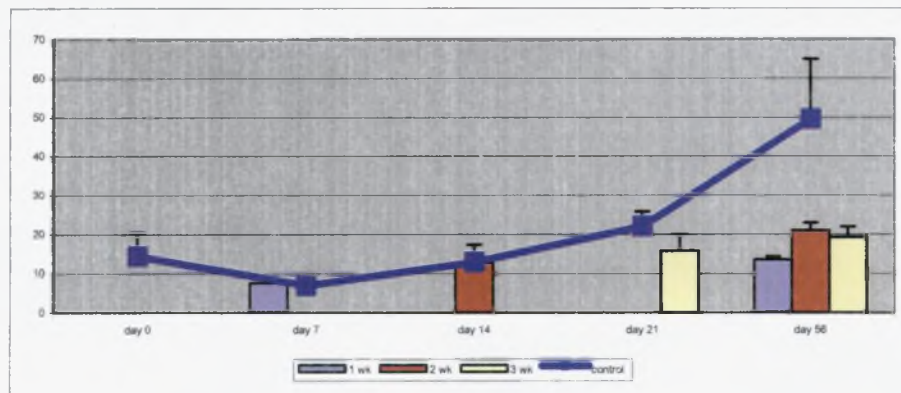
Η δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών προσδιορίστηκε σε τρεις περιοχές του πεπτικού σωλήνα, τα πυλωρικά τυφλά, το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο στο τέλος κάθε εβδομάδας νηστείας και στο τέλος της εκτροφής (ημέρα 7, 14, 21 και 56). Οι υψηλότερες τιμές αλκαλικών πρωτεασών παρατηρήθηκαν στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών. Η ομάδα των μαρτύρων παρουσίασε μεγάλη διακύμανση ολικών αλκαλικών πρωτεασών μεταξύ των ημερών δειγματοληψίας, η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο στην περιοχή του οπίσθιου εντέρου.

Στα πυλωρικά τυφλά δεν διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων σε καμία ημέρα δειγματοληψίας (Εικόνα 11).



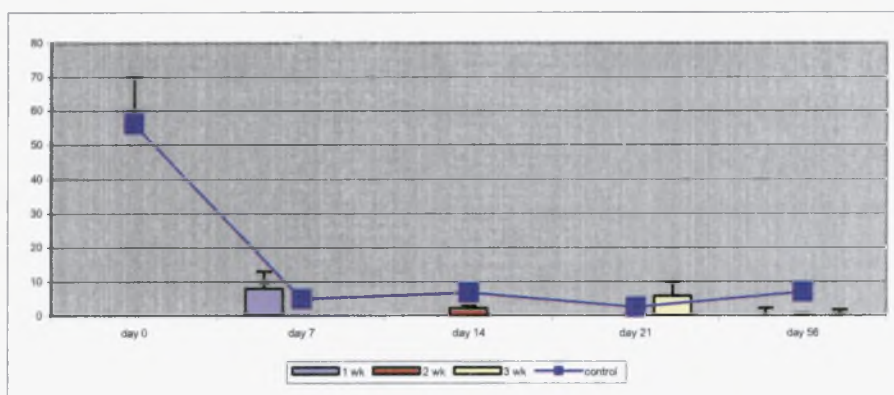
Εικόνα 11. Ειδική δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών (μέση τιμή + τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε μg τυροσίνης που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ στα πλωρικά τυφλά σε τσιπούρες που υποβλήθηκαν σε νηστεία μιας, δύο ή τριών εβδομάδων (1, 2, 3 weeks) και μαρτύρων (control).

Στο τέλος της εκτροφής (ημέρα 56) η δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών στην περιοχή του πρόσθιου εντέρου ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στους μάρτυρες από ότι στις ομάδες που είχαν υποβληθεί σε νηστεία ($P < 0,05$) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Ειδική δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών (μέση τιμή + τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε μg τυροσίνης που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ στο πρόσθιο έντερο σε τσιπούρες που υποβλήθηκαν σε νηστεία μιας, δύο ή τριών εβδομάδων (1, 2, 3 weeks) και μαρτύρων (control).

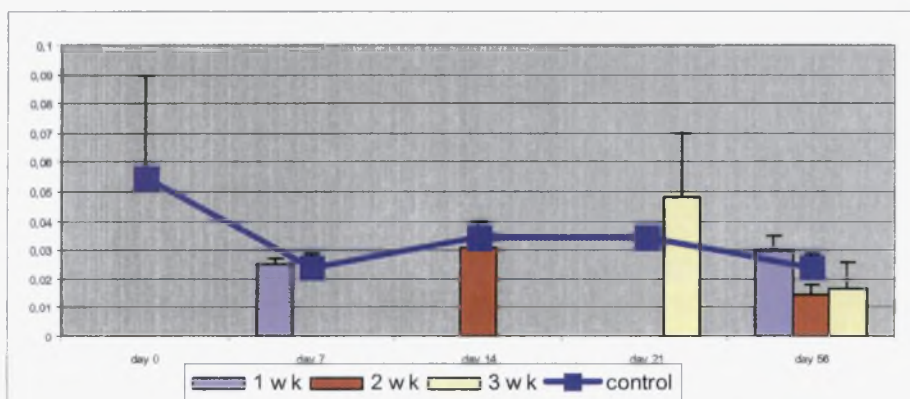
Αντιθέτως, στο οπίσθιο έντερο δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε καμία ημέρα δειγματοληψίας (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Ειδική δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών (μέση τιμή + τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε μg τυροσίνης που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ στο οπίσθιο έντερο σε τσιπούρες που υποβλήθηκαν σε νηστεία μιας, δύο ή τριών εβδομάδων (1, 2, 3 weeks) και μαρτύρων (control).

Θρυψίνη

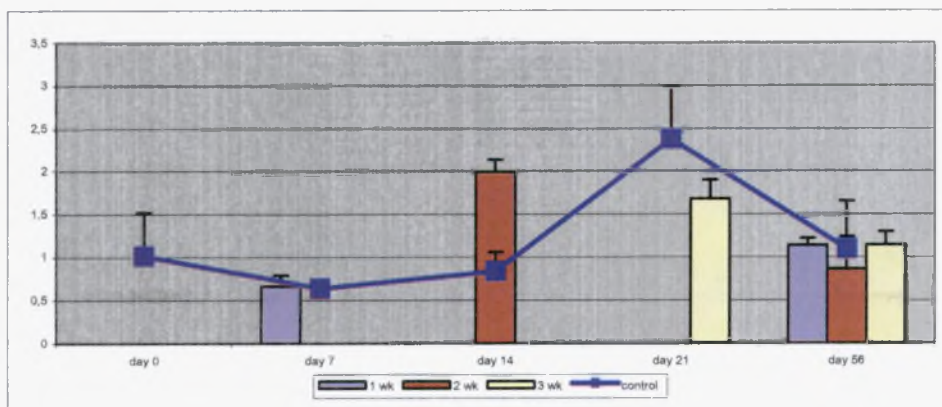
Η δραστηριότητα της θρυψίνης προσδιορίστηκε σε όλο το αλκαλικό τμήμα πεπτικού σωλήνα, στα πυλωρικά τυφλά, στο πρόσθιο και στο οπίσθιο έντερο. Η νηστεία δεν είχε σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα της θρυψίνης ούτε στα πυλωρικά τυφλά ούτε στο πρόσθιο έντερο (Εικόνες 14-15).



Εικόνα 14 Ειδική δραστηριότητα της θρυψίνης (μέση τιμή + τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε $\text{pmol p-nitroaniline}$ που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ στα πυλωρικά τυφλά σε τσιπούρες που υποβλήθηκαν σε νηστεία μιας, δύο ή τριών εβδομάδων (1, 2, 3 weeks) και μαρτύρων (control).

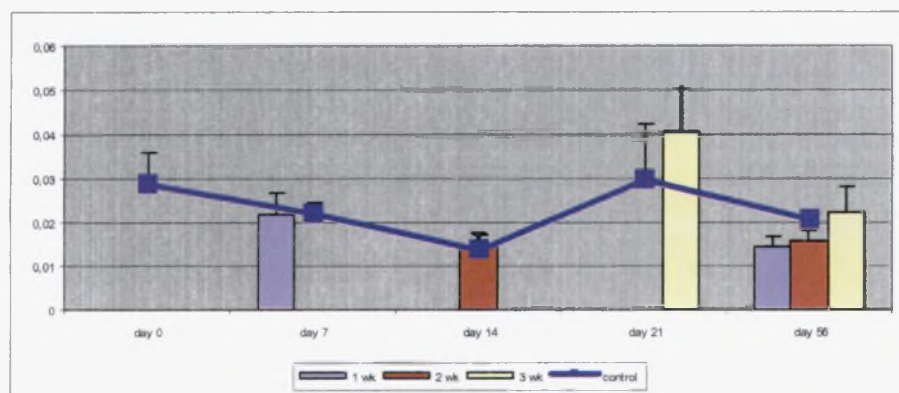
Στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στη δραστηριότητα της θρυψίνης στο πρόσθιο έντερο στην ομάδα των μαρτύρων μεταξύ των ημερών

δειγματοληψίας. Αξιοσημείωτο είναι ότι το πρόσθιο έντερο ήταν και η περιοχή που εμφάνισε συνολικά τα υψηλότερα επίπεδα θρυψίνης σε όλες τις ομάδες.



Εικόνα 15 Ειδική δραστηριότητα της θρυψίνης (μέση τιμή + τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε pmol p-nitroaniline που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ στο πρόσθιο έντερο σε τσιπούρες που υποβλήθηκαν σε νηστεία μιας, δύο ή τριών εβδομάδων (1, 2, 3 weeks) και μαρτύρων (control).

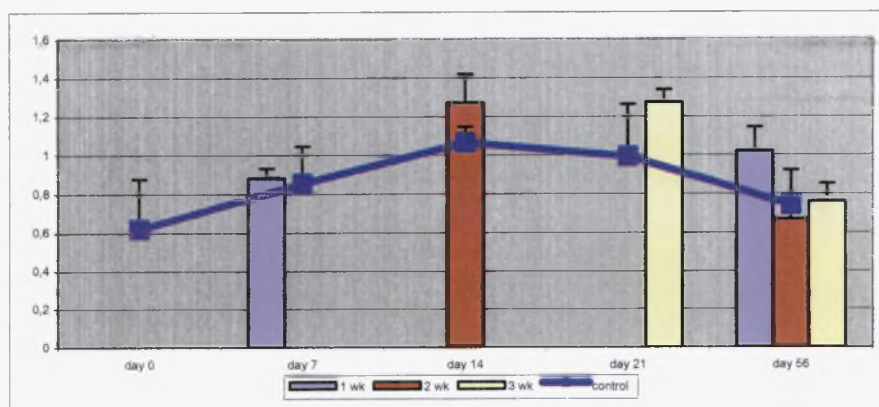
Το οπίσθιο έντερο εμφάνισε χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας, χωρίς στατιστικώς σημαντικές διακυμάνσεις μέσα στην ομάδα των μαρτύρων. Στη λήξη της περιόδου εκτροφής ωστόσο, η ομάδα που είχε νηστέψει για μία εβδομάδα είχε στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη δραστηριότητα θρυψίνης από τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες (P=0,04) (Εικόνα 16).



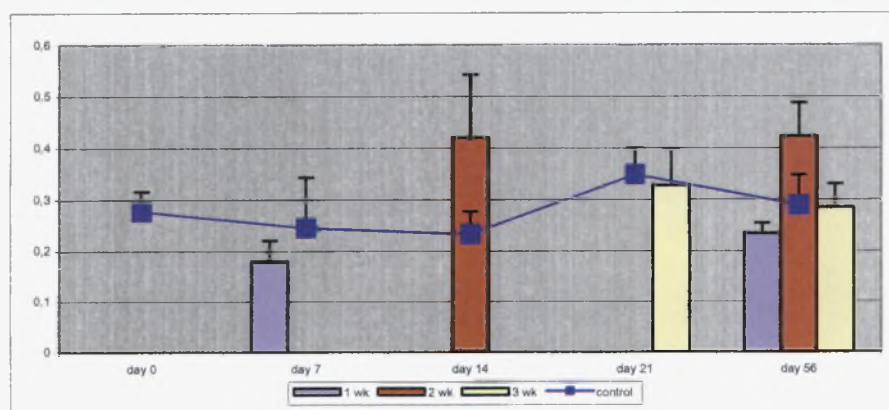
Εικόνα 16 Ειδική δραστηριότητα της θρυψίνης (μέση τιμή + τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε pmol p-nitroaniline που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ στο οπίσθιο έντερο σε τσιπούρες που υποβλήθηκαν σε νηστεία μιας, δύο ή τριών εβδομάδων (1, 2, 3 weeks) και μαρτύρων (control).

Χυμοθρυψίνη

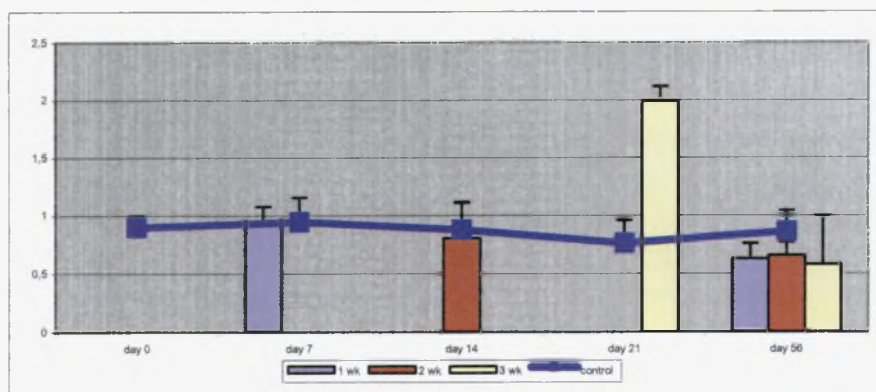
Η δρατικότητα της χυμοθρυψίνης προσδιορίστηκε, επίσης κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα, στα πυλωρικά τυφλά, στο πρόσθιο και στο οπίσθιο έντερο. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ημερών επεξεργασίας και των πειραματικών ομάδων σε καμία περιοχή του εντέρου (Εικόνες 17-19).



Εικόνα 17 Ειδική δρατικότητα της χυμοθρυψίνης (μέση τιμή + τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε mg τυροσίνης που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ στα πυλωρικά τυφλά σε τσιπούρες που υποβλήθηκαν σε νηστεία μιας, δύο ή τριών εβδομάδων (1, 2, 3 weeks) και μαρτύρων (control).



Εικόνα 18 Ειδική δρατικότητα της χυμοθρυψίνης (μέση τιμή + τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε mg τυροσίνης που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ στο πρόσθιο έντερο σε τσιπούρες που υποβλήθηκαν σε νηστεία μιας, δύο ή τριών εβδομάδων (1, 2, 3 weeks) και μαρτύρων (control).



Εικόνα 19 Ειδική δραστηριότητα της χυμοθρυψίνης (μέση τιμή + τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε μg τυροσίνης που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ στο οπίσθιο έντερο σε τσιπούρες που υποβλήθηκαν σε νηστεία μιας, δύο ή τριών εβδομάδων (1, 2, 3 weeks) και μαρτύρων (control).

Οι σχέσεις μεταξύ των δραστηριοτήτων των ενζύμων σε κάθε διαμέρισμα του εντέρου σε όλες τις πειραματικές ομάδες διερευνήθηκαν με τη χρήση του μη παραμετρικού συντελεστή Spearman (Πίνακας 1). Η καλύτερη συσχέτιση προκύπτει για τη θρυψίνη και τη χυμοθρυψίνη στο οπίσθιο έντερο. Όταν η δραστηριότητα της χυμοθρυψίνης είναι υψηλή στο οπίσθιο έντερο, τότε και η θρυψίνη είναι υψηλή στην ίδια περιοχή στα ψάρια-μάρτυρες και στα ψάρια που στερήθηκαν τροφής μια και τρεις εβδομάδες. Αντίστοιχα, όταν η θρυψίνη είναι αυξημένη στα πυλωρικά τυφλά, τότε και η χυμοθρυψίνη είναι αυξημένη στο ίδιο τμήμα μόνο στα ψάρια που υποβλήθηκαν σε νηστεία δυο και τριών εβδομάδων.

Επιπρόσθετα, όταν η δραστηριότητα της θρυψίνης είναι αυξημένη στα πυλωρικά τυφλά, τότε αυξάνεται η δραστηριότητα της θρυψίνης στο πρόσθιο έντερο στα ψάρια που νήστεψαν τρεις εβδομάδες. Όταν η θρυψίνη είναι αυξημένη στα πυλωρικά τυφλά, τότε αυξάνεται η θρυψίνη στο οπίσθιο έντερο στα ψάρια που νήστεψαν τρεις εβδομάδες. Όταν οι ολικές αλκαλικές είναι αυξημένες στο πρόσθιο έντερο, τότε αυξάνεται η θρυψίνη στο πρόσθιο έντερο στα ψάρια που νήστεψαν μια εβδομάδα.

Πίνακας 1. Μη παραμετρικός συντελεστής συσχέτισης Spearman μεταξύ των μελετούμενων πειραματικών παραμέτρων. PC: πυλωρικά τυφλά, AI: πρόσθιο έντερο, PI: οπίσθιο έντερο, TA: ολικές αλκαλικές, TRP: θρυψίνη και CHTR: χυμοθρυψίνη. *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001

	<i>Συντελεστής Spearman</i>			
	<i>Μάρτυρες</i>	<i>Ομάδα Α</i>	<i>Ομάδα Β</i>	<i>Ομάδα Γ</i>
Πεψίνη & PC TA	-0.64	0.28	-0.27	0.24
Πεψίνη & AI TA	0.55*	0.07	-0.08	-0.25
Πεψίνη & PI TA	0.15	0.24	0.012	-0.08
PC TA & AI TA	0.47*	-0.19	0.20	-0.01
PC TA & PI TA	0.27	0.15	0.23	-0.09
AI TA & PI TA	-0.06	-0.13	0.28	0.30
PC TRP & AI TRP	0.18	0.16	0.31	0.54*
PC TRP & PI TRP	0.24	-0.06	-0.01	0.64*
AI TRP & PI TRP	0.23	-0.20	0.23	0.30
PC CHTR & AI CHTR	-0.25	-0.19	0.14	0.22
PC CHTR & PI CHTR	-0.23	0.06	0.35	0.23
AI CHTR & PI CHTR	-0.57**	0.17	-0.013	-0.22
PC TA & PC TRP	-0.042	-0.01	-0.43	0.30
PC TA & PC CHTR	0.333	0.07	-0.42	0.43
PC TRP & PC CHTR	0.043	0.25	0.78***	0.85***
AI TA & AI TRP	0.30	0.57*	0.37	-0.25
AI TA & AI CHTR	0.25	0.68	0.16	0.46
AI TRP & AI CHTR	0.28	0.04	-0.06	0.09
PI TA & PI TRP	-0.09	0.40	-0.15	-0.29
PI TA & PI CHTR	-0.10	0.40	-0.19	-0.27
PI CHTR & PI TRP	0.49*	0.70**	-0.13	0.56*

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της νηστείας κυμαινόμενης διάρκειας στην αύξηση αντιστάθμισης και στη δραστικότητα των πεπτικών πρωτεασών στην τσιπούρα. Οι πρωτεάσες που μελετήθηκαν ήταν οι ολικές όξινες και ολικές αλκαλικές πρωτεάσες καθώς και η θρυψίνη και η χυμοθρυψίνη. Η ενζυμική τους δραστικότητα δεν επηρεάστηκε από τη νηστεία κυμαινόμενης διάρκειας. Πιθανώς, άλλα ένζυμα που συμβάλλουν στη δραστικότητα των ολικών πρωτεασών και δεν έχουν μελετηθεί στην παρούσα εργασία ευθύνονται για την αύξηση αντιστάθμισης που παρατηρείται. Τέτοια ένζυμα είναι οι καρβοξυπεπτιδάσες Α και Β καθώς και η ελαστάση.

Έχει ήδη αποδειχθεί ότι η δραστικότητα της θρυψίνης αυξάνεται σε απάντηση του περάσματος της τροφής από το έντερο (Venou et al, 2003). Εκτός από την πεψίνη, οι δραστικότητες των κυριότερων αλκαλικών πεπτικών πρωτεασών δεν περιορίζονται σε συγκεκριμένη περιοχή του πεπτικού σωλήνα της τσιπούρας. Αντίθετα, οι σχετικές δραστικότητες των ενζύμων διαφοροποιούνται κατά μήκος του σωλήνα. Αρκετοί συγγραφείς έχουν αποδώσει αυτή την έλλειψη εντοπισμού των πρωτεασών στα ψάρια ως μία προσαρμογή στην ποικίλη διαίτα που ενδέχεται να καταναλώσουν τα ψάρια στη φύση (Deguara et al, 2003). Το κύριο μέρος της αλκαλικής πρωτεολυτικής πέψης πραγματοποιείται στο πρόσθιο κομμάτι του εντέρου, όπως αποδεικνύεται από τη μείωση της δραστικότητας της θρυψίνης από το πρόσθιο προς το οπίσθιο έντερο στην τσιπούρα (Sarasquete et al, 1993). Ίσως αυτός να είναι και ο λόγος για τον οποίο στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου η απορρόφηση είναι πιο έντονη (Cataldi et al, 1986).

Η μελέτη της αύξησης αντιστάθμισης έχει πραγματοποιηθεί κυρίως σε σολομοειδή (*Salmo salar*; Mortensen & Damsgård, 1993; Nicieza & Metcalfe, 1997; Maclean & Metcalfe, 2001) ενώ υπάρχουν ελλείψεις αναφορές για την τσιπούρα (Πανταρίδης, 2005, Lund, 2000, Şahin et al, 2000). Σε επίπεδο πεπτικών ενζύμων, η αύξηση αντιστάθμισης έχει μελετηθεί στο βακαλάο του Ατλαντικού (*Gadus morhua*, Lemieux et al, 1998), όπου η θρυψίνη θεωρείται να περιορίζει το ρυθμό αύξησης, και ιδιαίτερα ένα ισοένζυμο της θρυψίνης (TRP-2*92) (Lemieux et al, 1998, Belanger et al, 2003), σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ένζυμα του εντέρου, όπως η αλκαλική φωσφατάση (Lemieux et al, 1998).

Από τι προκαλείται η αύξηση αντιστάθμισης

Η αύξηση αντιστάθμισης που επάγεται μετά από μια περίοδο ολικής ή μερικής νηστείας πιθανόν να επηρεάζεται και από άλλες παραμέτρους, πέραν της τροφής και είναι πιθανό να επιβραδύνουν την αύξηση. Η αύξηση αντιστάθμισης που παρατηρήθηκε για τις τσιπούρες που στερήθηκαν τροφής δε σχετίζεται με τις δραστηριότητες των πεπτικών ενζύμων κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα που μελετήθηκαν. Οι παράγοντες που μπορεί να επενεργούν είναι η κατανάλωση τροφής σε μεγαλύτερο βαθμό (υπερφαγία), η ενισχυμένη ικανότητα των ψαριών για αύξηση, οι μειωμένοι μεταβολικοί ρυθμοί και η μειωμένη δαπάνη ενέργειας. Ακόμη, αυξημένες μετατρεψιμότητες τροφής ή και παράγοντες που σχετίζονται με τη συμπεριφορά των ψαριών σε έλλειψη τροφής, ενδέχεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο.

Η υπερφαγία αποτελεί τον πιο κοινό μηχανισμό αύξησης αντιστάθμισης. Η εμφάνισή της δεν περιορίζεται από προηγούμενες περιόδους στέρησης ή έλλειψης τροφής. Συνιστά τον ρυθμό κατανάλωσης τροφής που είναι σημαντικά υψηλότερος από των ψαριών που σιτίζονται συνεχώς *ad libitum*. Προκαλείται από αυξημένο αριθμό ή ποσότητα γευμάτων, ενώ τα υπερφαγικά ψάρια κατορθώνουν να φθάσουν ή και να ξεπεράσουν σε μέγεθος τα ψάρια που σιτίζονται διαρκώς.

Ο μεταβολικός ρυθμός των ψαριών που υποβάλλονται σε στέρηση τροφής μπορεί να μειώνεται ή να προσαρμόζεται ανάλογα με τη διαθεσιμότητα της τροφής. Ο Weiser (1992) πρότεινε τέσσερις φάσεις ως απάντηση στη νηστεία και στην επακόλουθη επανασίτιση: α) η φάση του stress, όπου τα ψάρια υπερδραστηριοποιούνται για αναζήτηση τροφής, β) η φάση της αλλαγής με τη συνεχιζόμενη στέρηση τροφής, όπου μειώνεται ο κανονικός ρυθμός της αναπνοής, η κινητικότητα και εξασθενεί η δραστηριότητα γλυκολυτικών και γλυκογενολυτικών ενζύμων των μυών, που βοηθούν στην κολύμβηση, γ) η φάση της προσαρμογής, όπου ο μεταβολισμός σταθεροποιείται σε χαμηλά επίπεδα και δ) η φάση της ανάκαμψης, όπου αυξάνεται ραγδαία η κατανάλωση οξυγόνου και η αύξηση, και η αύξηση συσχετίζεται θετικά με τη διάρκεια της περιόδου νηστείας. Για παράδειγμα, σε νεαρά κυπρινοειδή, ο ρυθμός μεταβολισμού ελαττώθηκε κατά 30-40% έπειτα από δύο ημέρες νηστείας, σε σχέση με άτομα που είχαν διατραφεί πρόσφατα (Wieser et al, 1992).

Από την άλλη, η κατανάλωση ενέργειας κατά την περίοδο στέρησης τροφής μπορεί να περιοριστεί με ελάττωση της κινητικότητάς τους. Ο περιορισμός της κινητικότητας κατά την επανασίτιση, θα μπορούσε να εξασφαλίσει ένα ποσό ενέργειας που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί από τα ψάρια για αύξηση αντιστάθμισης. Νεαρά τσιρόνια μείωσαν την κολυμβητική τους ικανότητα μετά από τρεις εβδομάδες αστίας, η οποία επανήλθε σε κανονικά επίπεδα με την επανασίτισή τους (van Dijk et al, 2002).

Αποτελεσματικότητα της αύξησης αντιστάθμισης

Οι Dobson & Holmes (1984) πρότειναν ότι η αύξηση αντιστάθμισης στα ψάρια μπορεί να αποδοθεί σε αυξημένη αποτελεσματικότητα χρήσης της τροφής. Μελέτες σε μεμονωμένα ψάρια κατέδειξαν βελτιωμένη μετατρεψιμότητα, που βασίζεται στην αύξηση σε μάζα, και στην ποσότητα της τροφής που καταναλώνεται στην περίοδο επανασίτισης στον Αρκτικό σαλβελίνο (*Salvelinus alpinus*) και στον Ευρωπαϊκό φοξίνο (*Phoxinus phoxinus*) (Miglav & Jobling, 1989, Russel & Wootton, 1992). Διαπιστώθηκε ότι η βελτιωμένη μετατρεψιμότητα τροφής και η καλύτερη χρήση της ενέργειας και των πρωτεϊνών των επανασιτιζόμενων ψαριών ήταν ανώτερη από τους μάρτυρες που διατρέφονταν ως κορεσμού του *Paractus brachyromus*. Ενώ στην ιριδιζουσα πέστροφα μια μελέτη απέδωσε την αύξηση αντιστάθμισης να προκαλείται εξολοκλήρου από την ενισχυμένη ικανότητα των ψαριών για αύξηση, χωρίς αντίδραση υπερφαγίας, το ίδιο δεν ισχύει για το κανάλισιο γατόψαρο, όπου δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των μαρτύρων και των ψαριών που νήστεψαν (Boujard et al, 2000).

Προκειμένου να εξακριβωθεί αν η αποτελεσματικότητα αύξησης είναι υψηλότερη κατά την αύξηση αντιστάθμισης, συγκρίνεται η αύξηση των μαρτύρων και των ψαριών κατά την επανασίτιση, όταν και οι δύο ομάδες τράφηκαν με πανομοιότυπες αναλογίες. Εξ' αιτίας της πιθανής αντίστροφης σχέσης του ρυθμού κατανάλωσης τροφής και μετατρεψιμότητας, η αξιολόγηση της συμβολής της καλύτερης μετατρεψιμότητας της τροφής στην αύξηση αντιστάθμισης απαιτεί επαρκή έλεγχο στο ρυθμό πρόσληψης τροφής.

Κόστος της αύξησης αντιστάθμισης

Από εξελικτική σκοπιά, η αύξηση αντιστάθμισης και οι επερχόμενες μεταβολές σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών, όπως κολύμβηση, μεταβολισμός, διαχείριση ενέργειας, ίσως παρουσιάζουν κάποιο εξελικτικό αντίκτυπο. Για να διατηρήσουν ένα μεγάλο σωματικό βάρος, τα ψάρια πρέπει να δουλεύουν με μεγάλους μεταβολικούς ρυθμούς, για να επιτύχουν μέγιστη αύξηση. Το γεγονός ότι ψάρια που τρέφονται καθημερινά εμφανίζουν μικρότερους ρυθμούς κατανάλωσης τροφής και αύξησης σε σχέση με τους ρυθμούς των επανασστιζόμενων ψαριών, υποδηλώνει ότι ο πληθυσμός πρέπει να πληρώσει κάποιο εξελικτικό κόστος.

Σε ένα πειραματικό σχεδιασμό η αύξηση αντιστάθμισης πρέπει να διαχωριστεί από τη μεγάλης διάρκειας αύξηση, και μπορεί να συνοδεύεται από υψηλό ενεργειακό κόστος. Απαιτείται μια προσεκτική ανάλυση των συστατικών που αποθηκεύονται κατά την αύξηση αντιστάθμισης, σε συνδυασμό με λεπτομερές ενεργειακό περιεχόμενο. Η άποψη αυτή δεν υποστηρίζεται από την ιριδιζουσα πέστροφα, όπου δεν υπάρχει ασνήθιστη εναπόθεση λιπιδίων ή πρωτεϊνών κατά την περίοδο αύξησης αντιστάθμισης (Boujard et al, 2000).

Οι οργανισμοί που λειτουργούν με υψηλούς ρυθμούς “πληρώνουν” με μεγάλες θνησιμότητες. Αυτό προτείνει ότι μεγάλης διάρκειας ρυθμοί αύξησης αντιπροσωπεύουν την ιδανική λύση στην ρύθμιση του ισοζυγίου αύξησης και θνησιμότητας, που μεγιστοποιεί την αρμοστικότητα του πληθυσμού. Μεγαλύτεροι ρυθμοί αύξησης εμπεριέχουν φυσιολογικές προσαρμογές που αυξάνουν τη θνησιμότητα κάτω από αντίξοες συνθήκες. Αυτό είναι και το κόστος που καλείται να πληρώσει ο πληθυσμός.

Επιπλέον, υψηλοί ρυθμοί αύξησης μπορεί να σχετίζονται με μεγαλύτερο ρίσκο για την εμφάνιση ανωμαλιών κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού. Το πιθανό κόστος της αύξησης αντιστάθμισης αντικατοπτρίζεται περισσότερο στα αρχικά στάδια ανάπτυξης, όπου οι ρυθμοί ανάπτυξης και αύξησης είναι ιδιαίτερα αυξημένοι. Για παράδειγμα, στο *Lepomis gibbosus*, συγκρίσεις μεταξύ πληθυσμών αλλά και μέσα στον ίδιο πληθυσμό, αποκάλυψαν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ στο σφρίγος των λεπιών και το ρυθμό αύξησης (Arendt et al, 2001). Στο ψάρι *Anaploporoma fimbria*, η μειωμένη

αντισταθμιστική ικανότητα μεσολαβείται από αλλαγή της κατεύθυνσης της ενέργειας που θα χρησιμοποιούνταν για κολύμβηση (Sogard et al, 2002).

Κόστος μπορεί να υπάρχει και σε επίπεδο αναπαραγωγικής ικανότητας παράλληλα με αλλαγές στο μεταβολισμό. Ομαδοποιημένα νεαρά ιχθύδια σολομού του Ατλαντικού, που είχαν στερηθεί τροφής για μια περίοδο και έπειτα παρουσίασαν πλήρη αντιστάθμιση το φθινόπωρο, έδωσαν ενδεικτικά χαμηλότερους ρυθμούς αύξησης και αποθέματα λίπους την επόμενη άνοιξη σε σχέση με τους μάρτυρες, όπου η τροφή ήταν απεριόριστη. Στο θηλυκό σολομό, που είχε εμφανίσει αύξηση αντιστάθμισης, ο ρυθμός ωρίμανσης το επόμενο φθινόπωρο είχε ελαττωθεί. Παρ' όλα αυτά, στα ψάρια της οικογένειας *Gasterosteidae*, τα οποία εκτέθηκαν σε μικρές περιόδους στέρησης τροφής και επαναδιατροφής το μήνα πριν την αναπαραγωγική περίοδο, γέννησαν την ίδια χρονική περίοδο, στο ίδιο μέγεθος και είχαν την ίδια αναπαραγωγική ικανότητα με τα ψάρια που τρέφονταν *ad libitum* (Morgan et al, 2001).

Τέλος, η υπερφαγία, που συνδέεται με την αύξηση αντιστάθμισης, μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη συμπεριφορά. Η αυξανόμενη αναζήτηση τροφής μπορεί να οδηγήσει το ζώο σε μεγαλύτερα ρίσκα θήρευσης. Η αναζήτηση τροφής στα νεαρά ιχθύδια του σολομού *Oncorhynchus kisutch* έδειξε ότι η αύξηση αντιστάθμισης ήταν ισχυρότερη παρουσία ενός θηρευτή, από ότι στους μάρτυρες. Η υπερφαγία μπορεί αν επάγει υψηλότερα επίπεδα ενδοειδικού ανταγωνισμού καθώς τα άτομα συναγωνίζονται για τροφή, με αυξημένο κόστος που αναφέρεται σε υψηλότερους ρυθμούς δαπάνης ενέργειας και αυξημένο ρίσκο θνησιμότητας. Για παράδειγμα, νεαρά ιχθύδια σολομού του Ατλαντικού, που είχαν υποβληθεί σε νηστεία, έδειξαν αυξημένη επιθετικότητα (Nicieza et al, 1997).

Συμπεράσματα και μελλοντικές κατευθύνσεις της έρευνας

Συμπερασματικά, σε ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο, όπως η αύξηση αντιστάθμισης, πρέπει να ελέγχονται όλες οι πιθανές παράμετροι που μπορεί να επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα. Γνωρίζουμε ελάχιστα για την ένταση του φαινομένου, την επίδραση, τις συνέπειες και τη σημασία της στους φυσικούς πληθυσμούς. Οι περισσότερες διαθέσιμες πληροφορίες βασίζονται σε πλάγιες

μεθόδους, όπως τον προς τα πίσω υπολογισμό της αύξησης από τα λέπια ή τους ωτόλιθους, ενώ υπάρχει μια τάση για μελέτη εμπορικών ειδών.

Στην πλειοψηφία τους οι διαθέσιμες εργασίες στο αντικείμενο της αύξησης αντιστάθμισης εστιάζουν στο συνολικό μέγεθος (μήκος ή βάρος), ενώ υπάρχουν λίγα δεδομένα για το πώς η πορεία της αύξησης αντιστάθμισης επηρεάζει τη μορφολογία. Μένουν να εξακριβωθούν οι ακριβείς προσαρμογές που υφίσταται ο μεταβολισμός καθώς και ο λόγος για τον οποίο συμβαίνουν.

Οποιοσδήποτε μηχανισμός και να λειτουργεί, η αύξηση αντιστάθμισης αντιπροσωπεύει μια προσωρινή, σε επίπεδο ατόμου φαινοτυπική πλαστικότητα και πηγή ποικιλότητας, που συχνά παραβλέπεται σε συγκριτικές μελέτες και θεωρητικές αναλύσεις αύξησης. Ακόμα και αν αποδειχθεί ότι διαδραματίζει ένα μικρό ρόλο στους φυσικούς πληθυσμούς, οι αντισταθμιστικές αλλαγές στην όρεξη και στην αύξηση μπορεί να είναι σημαντικές για την ανάπτυξη βελτιστοποιημένων τεχνικών θρέψης στις ιχθυοκαλλιέργειες (Gaylord et al, 2001).

Βιβλιογραφία

- ♦ Alarcon F.J., Diaz M., Moyano F.J., Abellan E. (1998) Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 257-267
- ♦ Ali M., Nicieza A., Wootton R J (2003) Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *FISH and FISHERIES* 4, 147-190
- ♦ Anson M.L. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. From the Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical research, Princeton, New Jersey
- ♦ Arendt J.D., Wilson D.S., Starck E. (2001) Scale strength as a cost of rapid growth in sunfish. *Oikos* 93, 95-100
- ♦ Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (2004) Handbook of proteolytic enzymes, 2nd edn, Elsevier academic press, London
- ♦ Belanger F., Blier P.U., Dutil J. -D., (2003) Digestive capacity and compensatory growth in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 121-128
- ♦ Björnsson B., Sigurthorsson G., Hemre G.I., Lie O. (1992) Growth rate and feed conversion factor on young halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) fed six different diets. *Fiskeridirektoratets Skrifter Ernaering* 5, 25-35
- ♦ Boujard T., Burel C., Medale F., Haylor G. Moisan A. (2000) Effect of past nutritional history and fasting on feed intake and growth in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Living Resources* 13, 129-137
- ♦ Broekhuizen N., Gurney W.S.C., Jones A., Bryant A.D. (1994) Modelling compensatory growth. *Functional Ecology* 8, 770-782
- ♦ Cataldi E., Cataudella S., Monaco G., Rossi A., Tancioni L. (1987) A study of the histology and morphology of the digestive tract of the sea-bream, *Sparus aurata*. *Journal of Fish Biology* 30, 135-145
- ♦ 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
- ♦ van Dijk, P.L.M. Staaks G. and Hardewig I. (2002) The effect of fasting and refeeding on temperature preference, activity and growth of roach *Rutilus rutilus*. *Oecologia* 130, 496-504
- ♦ Diaz M., Moyano F.J., García-Carreño F.L., Alarcon F.J., Sarasquete M.C. (1997) Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquaculture International* 5, 461-471
- ♦ Dobson S.H. and Holmes R.M. (1984) Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 25, 649-656

- Dunn B.M., Hung Su-H. (1999) The two sides of enzyme-substrate specificity: lessons from the aspartic proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 231-240
- Dykes C.W., Kay J. (1975) Conversion of Pepsinogen into Pepsin are not one step process. *Biochemistry Journal* 153, 141-144
- Gaylord T.G., Gatlin D.M. III (2001) Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 194, 337-348
- Hidalgo M.C., Urea E., Sanz A. (1999) Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267-283
- Higaki J.N., Light A. (1985) The identifications of neotrypsinogens in samples of bovine trypsinogen. *Analytic Biochemistry* 148, 111-120
- Hubbell S.P. (1971) Of sowbugs and systems: the ecological bioenergetics of a terrestrial isopod. In: *Systems Analysis and Simulation in Ecology* (ed. B.C. Patten), Academic Press, London, pp.269-323
- Jobling M. (1994) *Fish Bioenergetics*. Chapman & Hall, London
- Jobling M. (1995) *Environmental Biology of fishes*, 175-178
- Lemieux H., Blier P., Dutil J. -D., (1999) Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 293-303
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. From the Department of Pharmacology, Washington University School of Medicine, St. Lewis, Missouri
- Lund I. (2000) Effect of 7 days starvation on the subsequent growth of Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*). *DIFTA*
- Miglavs I., Jobling M. (1989a) The effect of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology* 35, 1-11
- Maclean A., Metcalfe, N.B. (2001) Social status, access to food and compensatory growth in juvenile Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 58, 1331-1346
- Miglavs I., Jobling, M. (1989b) Effects of feeding regime on food consumption, growth rates and tissue nucleic acids in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, with particular respect to compensatory growth. *Journal of Fish Biology* 34, 947-957
- Morgan I.J., Metcalfe N.B. (2001) Deferred costs of compensatory growth after autumnal food shortage in juvenile salmon. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268, 295-301
- Mortensen A., Damsgård B. (1993) Compensatory growth and weight segregation following light and temperature manipulation of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*). *Aquaculture* 114, 261-272.
- Μούτου Κ. (2000) Φυσιολογία θρέψης ιχθύων. Πανεπιστημιακές εκδόσεις

- ✦ Nicieza A.G., Reiriz L., Braña, F. (1994) Variation in digestive performance between geographically disjunct populations of Atlantic salmon: countergradient in passage time and digestion rate. *Oecologia* 99, 243-251
- ✦ Nicieza A.G., Metcalfe N.B. (1997) Growth compensation in juvenile Atlantic salmon: Responses to depressed temperature and food availability. *Ecology* 78, 2385-2400
- ✦ Purchase C.F., Brown J.A. (2001) Stock-specific changes in growth rates, food conversion efficiencies, and energy allocation in response to temperature change in juvenile Atlantic cod. *Journal of Fish Biology* 58, 36-52
- ✦ Πανταρίδης Κ., Κλαουδάτος Σπ., Παναγιωτάκη Π., Νεοφύτου Χ. Αύξηση αντιστάθμισης στην εκτροφή τσιπούρας (*Sparus aurata*). 8^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας & Αλιείας
- ✦ Russell, N.R. and Wootton, R.J. (1992) Appetite and growth compensation in the European minnow, *Phoxinus phoxinus* (Cyprinidae) following short term of food restriction. *Environmental Biology of Fishes* 34, 277-285
- ✦ Şahin T., Akbulut B., Aksungur M. (1998) Compensatory growth in Sea bass (*Dicentrarchus labrax*), Sea bream (*Sparus aurata*) and Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk J Zool* 24, 81-85
- ✦ Sarasquete M.C., Polo A., Gonzales De Canales M.L. (1993) A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L. *Histochemical Journal* 25, 430-437
- ✦ Sogard S.M., Olla B.L. (2002) Contrasts in the capacity and underlying mechanisms for compensatory growth in two pelagic marine fishes. *Marine Ecology: Progress Series* 243, 165-177
- ✦ Speare D.J., Arsenault G.J. (1997) Effects of intermittent hydrogen peroxide exposure on growth and columnaris disease prevention of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 54, 2653-2658
- ✦ Stryer L. (1997) Βιοχημεία, 3^η έκδοση, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- ✦ Teles A. (2000) Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquaculture International* 8, 477-492
- ✦ Venou B., Alexis M.N., Fountoulaki E., Nengas I., Apostolopoulou M., Castrisi-Cathariou I. (2003) Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 225, 207-223
- ✦ Wieser W., Krumschnabel G. and Ojwang-Okwor J.P. (1992) The energetics of starvation and growth after refeeding juveniles of three cyprinid species. *Environmental Biology of Fishes* 33, 63-71
- ✦ www.fishbase.org