

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η επίδραση της αλατότητας στη δραστικότητα των αλκαλικών
πεπτικών πρωτεασών του τελεόστεου *Sparus aurata*

Δεληγιώργη Τριανταφυλλιά

Διπλωματική εργασία

Λάρισα, 2005

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η επίδραση της αλατότητας στη δραστικότητα των αλκαλικών
πεπτικών πρωτεασών του τελεόστεου *Sparus aurata*

Δεληγιώργη Τριανταφυλλιά

Διπλωματική εργασία

Λάρισα, 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4638/1
Ημερ. Εισ.: 7-11-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΔΕΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087863

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η επιβλέπουσα καθηγήτρια της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η επίκουρος καθηγήτρια Μούτου Κατερίνα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής είναι:

Μαμούρης Ζήσης, Αναπληρωτής καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια μου κυρία Μούτου Κατερίνα που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω την συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, καθώς επίσης και για την πολύτιμη συμβολή της στη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Ψόχιου Ελένη για τη βοήθεια της, καθώς και σε όλα τα άτομα του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας.

Δεληγιώργη Τριανταφυλλιά

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αλατότητα αποτελεί ένα σημαντικό οικολογικό παράγοντα που επηρεάζει την αύξηση και την ανάπτυξη των ψαριών. Συχνά παρατηρείται ταχύτερος ρυθμός αύξησης στα ψάρια όταν αυτά μεγαλώνουν σε ενδιάμεσες αλατότητες, δηλαδή σε υφάλμυρο νερό. Στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκε η πιθανότητα της άμεσης επίδρασης της αλατότητας του νερού στη δραστικότητα των πεπτικών ενζύμων.

Άτομα τσιπούρας (*Sparus aurata*) μέσου βάρους 7,5g εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰ με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της αλατότητας στην ενζυμική δραστικότητα της ελαστάσης και των καρβοξυπεπτιδασών Α και Β σε τρία διαφορετικά σημεία του πεπτικού σωλήνα, πυλωρικά τυφλά, πρόσθιο και οπίσθιο έντερο, τις ημέρες 1, 4, 10 και 15 μετά τον εγκλιματισμό.

Ανιχνεύτηκε δραστικότητα των ενζύμων αυτών και στις τρεις περιοχές του πεπτικού σωλήνα που μελετήθηκαν, όμως τα τρία πεπτικά ένζυμα δεν παρουσίασαν ομοιόμορφη κατανομή κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα. Οι καρβοξυπεπτιδάσες εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές δραστικότητας στην υψηλή αλατότητα στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών, την κυριότερη περιοχή έκκρισης πεπτικών ενζύμων. Αντιθέτως η ελαστάση παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές της δραστικότητας της στην ίδια αλατότητα στο οπίσθιο έντερο. Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προέκυψε ότι η αλατότητα επηρέασε τη δραστικότητα των πεπτικών ενζύμων μόνο τις πρώτες ημέρες του πειράματος, διάστημα που πιθανόν αποτελεί τη μεταβατική φάση μετά την αλλαγή της αλατότητας, κατά την οποία επιχειρείται προσαρμογή στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες. Περαιτέρω μελέτες είναι αναγκαίες για να διευκρινιστεί με ποιο τρόπο η αλατότητα επηρεάζει την αύξηση και την ανάπτυξη των ψαριών, με στόχο την κατανόηση της φυσιολογίας θρέψης των εμπορικών ειδών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ*Sparus aurata*

Υπόφυλο: Vertebrata

Υπέρκλαση: Osteichthyes

Κλάση: Actinopterygii

Υπόκλαση: Teleostei

Τάξη: Perciformes

Οικογένεια: Sparidae

Εικόνα 1: Η τσιπούρα (*Sparus aurata*)

(http://www.fishbase.org/Photos/ThumbnailsSummary.cfm?ID=1164).

Ο τελεόστεος *Sparus aurata*, γνωστός ως τσιπούρα (Εικ. 1), ζει σε παράκτιες θαλάσσιες περιοχές, με βυθούς αμμώδεις και φυκιάδες και σε βάθη από 15-30 m το καλοκαίρι, ενώ το χειμώνα περισσότερο βαθιά (μέχρι 150 m) για να αποφύγει τις χαμηλές θερμοκρασίες και για να αναπαραχθεί. Συναντάται από τον Τροπικό Ατλαντικό μέχρι τη Μ. Βρετανία, τη Μεσόγειο και τις Ελληνικές θάλασσες ενώ σπανίζει στη Μαύρη θάλασσα (http://www.malawicichlidhomepage.com/other/sparus_aurata.html). Είναι κυρίως σαρκοφάγο και συνήθως τρέφεται με ψάρια και οστρακόδερμα συμπεριλαμβανομένων μύδια και στρείδια, σπάζοντας το κοχύλι τους με μεγάλη ευκολία, χάρη στην ισχυρή της οδοντοστοιχία. Είναι ερμαφρόδιτο, πρώτανδρο ψάρι και αναπαράγεται τον Οκτώβρη – Δεκέμβρη.

Η τσιπούρα είναι ευρύαλο αλλά στενόθερμο ψάρι. Αντέχει επίπεδα αλατότητας που κυμαίνονται από 20-45‰, γι' αυτό την άνοιξη κατορθώνει να μετακινείται στις λιμνοθάλασσες (υφάλμυρο νερό) και στις εκβολές ποταμών (γλυκό νερό) για να βρει τροφή (http://www.istitutoveneto.it/venezia/divulgazione/valli/index.php?id=25). Εμφανίζει όμως μεγάλη ευαισθησία στο κρύο. Με τα πρώτα κρύα εγκαταλείπει τα ρηχά νερά και πηγαίνει στην ανοικτή θάλασσα. Προτιμά τα υφάλμυρα νερά (λιμνοθάλασσες), όπου και αναπτύσσεται πιο γρήγορα και το κρέας της παίρνει μια χαρακτηριστική γεύση.

Το κρέας της τσιπούρας είναι άσπρο, τρυφερό και θεωρείται εξαιρετικής ποιότητας τροφή για τον άνθρωπο. Η τσιπούρα εκτρέφεται για το γευστικό της κρέας σε όλη τη Μεσόγειο θάλασσα, με μεγάλη επιτυχία, σε καλά οργανωμένες υδατοκαλλιέργειες που έχουν ως στόχο υψηλή ποιότητα παραγωγής σε συνδυασμό με χαμηλό κόστος. Το 80% της ελληνικής παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού εξάγεται, κυρίως στην

Ιταλία και την Ισπανία, αποτελώντας την τρίτη μεγαλύτερη εξαγωγική δραστηριότητα μετά το ελαιόλαδο και τον καπνό. Συνεπώς η τσιπούρα είναι ένα είδος με αυξημένη εμπορική σημασία και υπάρχει ανάγκη συνεχής έρευνας στον τομέα της καλλιέργειας της (<http://www.euro2day.gr/articles/80024/>).

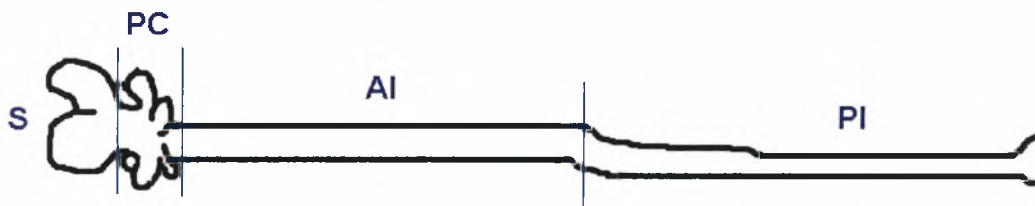
Η αύξηση και η ανάπτυξη στα ψάρια επηρεάζονται από εσωτερικούς (νευρικούς, ενδοκρινολογικούς και νευροενδοκρινολογικούς) και εξωτερικούς (οικολογικούς) παράγοντες. Η αλατότητα αποτελεί ένα σημαντικό οικολογικό παράγοντα που επηρεάζει την αύξηση και την ανάπτυξη των ψαριών. Συχνά παρατηρείται ταχύτερος ρυθμός αύξησης στα ψάρια όταν αυτά μεγαλώνουν σε ενδιάμεσες αλατότητες δηλαδή σε υφάλμυρο νερό (8-20‰). Όμως δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν αυτό οφείλεται σε χαμηλότερο μεταβολικό κόστος, σε αυξημένη πρόσληψη τροφής, σε αποτελεσματικότερη μετατρεψιμότητα της τροφής και/ ή σε ορμονική ρύθμιση. Υπάρχει ακόμη η πιθανότητα της άμεσης επίδρασης της αλατότητας του νερού στη δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων, τα οποία σχετίζονται με την πέψη και την αποτελεσματικότητα της απορρόφησης των θρεπτικών (Boeuf & Payan, 2001).

Η αλματώδης αύξηση μεγέθους που παρατηρείται στα ψάρια μεταξύ της εκκόλαψης και του σταδίου της αναπαραγωγικής ωριμότητας συντελείται κυρίως μέσω της υπερπλασίας, δηλαδή του σχηματισμού νέων μυϊκών ινών και της σύνθεσης νέων πρωτεϊνών. Το είδος και η σχετική περιεκτικότητα των μυϊκών πρωτεϊνών, ο ρυθμός με τον οποίο παράγονται, αποθηκεύονται και ανακυκλώνονται, είναι τα κυριότερα στοιχεία της φυσιολογίας του μυός, με άμεσες επιπτώσεις στο ύψος και στην ποιότητα της ιχθυοπαραγωγής (Jobling, 1995).

Οι πρωτεΐνες αποτελούν το κύριο οργανικό συστατικό των ιστών των ψαριών, συνιστώντας το 65-75% του ξηρού τους βάρους (Jobling, 1995). Οι απαιτήσεις της τσιπούρας σε πρωτεΐνη είναι υψηλές ενώ σε υδατάνθρακες και λίπη χαμηλότερες καθώς πρόκειται για ένα σαρκοφάγο είδος. Η τσιπούρα απαιτεί το 45-46% της τροφής της να είναι πρωτεΐνη για να πετύχει μέγιστη αύξηση (Teles, 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, 1995).

Ο πεπτικός σωλήνας των ψαριών αρχίζει από το στόμα και την στοματική κοιλότητα, συνεχίζει στο φάρυγγα και τον οισοφάγο, το στομάχι, το έντερο με τα πυλωρικά τυφλά και το απευθυσμένο, για να καταλήξει στην έδρα (Εικ. 2). Η διαδικασία της πέψης αρχίζει από το στόμα και το φάρυγγα με την μηχανική διάσπαση των τροφών.

Τόσο στο στόμα όσο και στον φάρυγγα δεν παρατηρείται έκκριση πεπτικών ενζύμων και η διάσπαση της τροφής παραμένει καθαρά μηχανική. Ο οισοφάγος έχει επιθηλιακά κύτταρα που εκκρίνουν βλέννα, η οποία έχει το ρόλο λιπαντικού για να διευκολύνεται η κατάποση τροφών, αλλά έχει και προστατευτικό ρόλο προκειμένου να αποφεύγεται η καταστροφή των τοιχωμάτων του οισοφάγου. Μέχρι σήμερα δεν έχει διαπιστωθεί η έκκριση πεπτικών ενζύμων από τα κύτταρα του οισοφάγου (Jobling, 1995).



Εικόνα 2: Σχηματικό διάγραμμα τμήματος του πεπτικού σωλήνα της τσιπούρας στο οποίο φαίνονται το στομάχι (S), τα πυλωρικά τυφλά (PC), το πρόσθιο (AI) και το οπίσθιο (PI) έντερο.

Το στομάχι των ψαριών θεωρείται ως το όργανο για την προσωρινή αποθήκευση, ανάμειξη και πρωτογενή πέψη της τροφής και στην τσιπούρα έχει σχήμα Y (Cataldi *et al*, 1987). Το στομάχι των περισσότερων ψαριών 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 σφικτήρα που είναι η είσοδος στο άνω τμήμα του εντέρου. Στο στομάχι η τροφή διασπάται τόσο μηχανικά με τις κινήσεις του στομάχου, όσο και χημικά με τη δράση πεπτικών ενζύμων (Jobling, 1995).

Η ενζυμική πέψη της τροφής αρχίζει στο στομάχι κυρίως με τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων, των πεψινών σε όξινο περιβάλλον που επιτυγχάνεται με την έκκριση υδροχλωρικού οξέος. Μέχρι τώρα μόνο ένας κυτταρικός τύπος έχει εντοπισθεί στους γαστρικούς αδένες των ψαριών που παράγει υδροχλωρικό οξύ και πεψίνες. Οι πεψίνες εκκρίνονται με τη μορφή ανενεργών ζυμογόνων, των πεψιγόνων, τα οποία ενεργοποιούνται σε όξινες συνθήκες, δηλαδή σε pH χαμηλότερο του έξι. Πρόκειται για ενδοπεπτιδάσες οι οποίες υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ αρωματικών (π.χ. τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη) και δικαρβοξυλικών (π.χ. γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ) αμινοξέων. Έτσι οι πεψίνες διασπούν πολύ λίγους

από τους δεσμούς μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας παράγοντας μια σειρά μικρότερων πολυπεπτιδίων (Jobling, 1995).

Το έντερο είναι ένας μακρύς περιελιγμένος σωλήνας στον οποίο ολοκληρώνεται η πέψη των τροφών και γίνεται η απορρόφηση των θρεπτικών. Τα εντεροκύτταρα είναι τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου που είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση των θρεπτικών. Η απορρόφηση των πρωτεϊνών από τα εντεροκύτταρα γίνεται με τη μορφή αμινοξέων, ενάντια στη διαφορά συγκέντρωσης κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης με τη βοήθεια ενός μηχανισμού ενεργητικής μεταφοράς. Η απορρόφηση όμως των αμινοξέων με τη μορφή δι- και τριπεπτιδίων είναι πολύ πιο γρήγορη από ότι η απορρόφηση των ελεύθερων αμινοξέων. Το έντερο κατέχει επίσης σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση νερού και ηλεκτρολυτών (Jobling, 1995).

Το έντερο της τσιπούρας είναι κοντό (το σχετικό μήκος του είναι 0,5-0,6) και αποτελείται από κύτταρα κυλινδρικού μονόστιβου επιθηλίου καθώς επίσης από επιθηλιακά κύτταρα που εκκρίνουν βλέννα. Στο οπίσθιο έντερο είναι αυξημένος ο αριθμός των κυττάρων που εκκρίνουν βλέννα και υπάρχει μία αφθονία κενοτοπίων που περιέχουν ηωσινόφιλα, τα οποία έχουν την ικανότητα προσρόφησης και πέψης πρωτεϊνών με πινοκυττάρωση (Cataldi *et al*, 1987).

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

Καθώς οι πρωτεΐνες μετακινούνται κατά μήκος του εντέρου η διάσπασή τους συνεχίζεται σε αλκαλικό περιβάλλον. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην εντερική πέψη προέρχονται από δύο κυρίως πηγές, το πάγκρεας και τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Το πάγκρεας παράγει μεγαλύτερη ποικιλία και ποσότητα πεπτικών ενζύμων σε σχέση με τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Τα σημαντικότερα πρωτεολυτικά ένζυμα που παράγονται και εκκρίνονται από τα κυψελιδικά κύτταρα του παγκρέατος είναι η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η καρβοξυπεπτιδάση, ενώ από τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου η αμινοπεπτιδάση, οι διπεπτιδάσες και οι τριπεπτιδάσες (Jobling, 1995). Στην τσιπούρα το πάγκρεας δεν είναι ένα συμπαγές όργανο και διαιρείται σε δύο μέρη, ένα προσκολλημένο στο συκώτι και το άλλο κοντά στο πρόσθιο τμήμα του πεπτικού

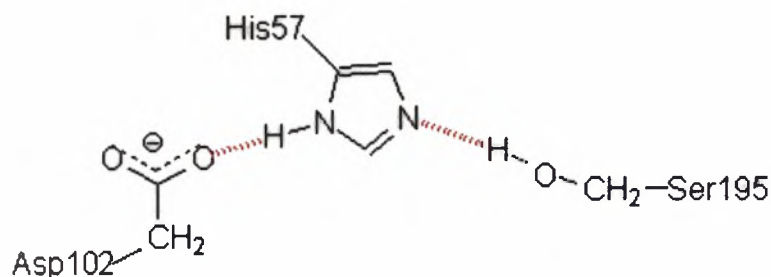
σωλήνα (Sarsquete *et al.*, 1993). Οι παγκρεατικές εκκρίσεις περιέχουν εκτός από πεπτικά ένζυμα και δικαρβονικά ιόντα για την εξουδετέρωση των οξέων του στομαχικού μίγματος και την αύξηση του pH. Τον ίδιο ρόλο με τα δικαρβονικά ιόντα έχουν και τα χολικά οξέα που παράγονται από το ήπαρ. Αυτή η αύξηση του pH του εντερικού περιεχομένου είναι απαραίτητη καθώς τα πρωτεολυτικά ένζυμα που παράγονται από το πάγκρεας και το εντερικό επιθήλιο εμφανίζουν μέγιστη δραστικότητα σε ελαφρά αλκαλικές συνθήκες δηλαδή σε pH=7-9 (Jobling, 1995).

Το πάγκρεας συνθέτει δυο οικογένειες πρωτεασών υπεύθυνες για την πρωτεϊνική πέψη, τις πρωτεάσες της σερίνης και τις καρβοξυπεπτιδάσες (Srivasta *et al.*, 2003). Η οικογένεια των πρωτεασών της σερίνης περιλαμβάνει πεπτιδάσες των οποίων ο καταλυτικός μηχανισμός τους εξαρτάται από την υδροξυλομάδα ενός καταλοίπου σερίνης, που προσβάλλει πυρηνόφιλα τον πεπτιδικό δεσμό. Οι ελαστάσες, οι θρυψίνες και οι χυμοθρυψίνες είναι ορισμένα παραδείγματα πρωτεασών της σερίνης. Υπάρχουν συνολικά περίπου πενήντα οικογένειες πρωτεασών της σερίνης που διαχωρίζονται με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων. Η οικογένεια S1 είναι η μεγαλύτερη οικογένεια πρωτεασών της σερίνης (Barrett, 2004). Παρά την μεγάλη ποικιλία στην πρωτοταγή δομή τους, η τρισδιάστατη δομή τους είναι πολύ συντηρημένη, γι' αυτό πιστεύεται ότι έχουν εξελιχθεί από ένα κοινό προγονικό γονίδιο (Suzuki *et al.*, 2002).

Η ελαστάση είναι μία ενδοπεπτιδάση που ανήκει στην S1 οικογένεια και καταλύει την υδρόλυση πρωτεϊνών σε πεπτιδικούς δεσμούς γειτονικούς σε αμινοξέα με μικρές, υδρόφοβες, αφόρτιστες πλευρικές αλυσίδες, όπως γλυκίνη, βαλίνη, και κυρίως αλανίνη. Η ελαστάση έχει τη μοναδική ικανότητα να υδρολύει την ελαστίνη, μία ινώδη δομική πρωτεΐνη των πνευμόνων, των αρτηριών, του δέρματος και του συνδετικού ιστού που είναι πλούσια σε γλυκίνη (32%), αλανίνη (26%) και βαλίνη (13%) για τα οποία η ελαστάση έχει εξειδίκευση. Η εξειδίκευση υποστρώματος της ελαστάσης οφείλεται στην περιοχή S1. Η ελαστάση μπορεί επίσης να υδρολύει και άλλες πρωτεΐνες όπως οι ανοσοσφαιρίνες και η καζεΐνη. Το Ca^{2+} προσδένεται ισχυρά στην ελαστάση αλλά αυτή η αλληλεπίδραση δεν επηρεάζει τις καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου (Barrett, 2004).

Η πλέον μελετημένη ελαστάση στα ψάρια είναι αυτή του βακαλάου του Ατλαντικού (*Gadus morhua*) όπου έχουν προσδιοριστεί τέσσερις διαφορετικές ισομορφές. Η ελαστάση είναι μία συμπαγής σφαιρική πρωτεΐνη που αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 240 αμινοξέων που είναι διασυνδεδεμένη με τέσσερις

δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι δεσμοί αυτοί σχηματίζονται από οκτώ συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης που βρίσκονται στις θέσεις 42, 58, 136, 168, 182, 191, 201 και 220 (Gudmundsdóttir *et al.*, 1996). Βασικό δομικό χαρακτηριστικό της ελαστάσης και όλων των πρωτεασών της σερίνης είναι ότι στο ενεργό τους κέντρο υπάρχει η καταλυτική τριάδα ιστιδίνη 57, ασπαραγινικό 102 και σερίνη 195 (αρίθμηση χυμοθρυψινογόνου, Εικ. 3). Η πολυπεπτιδική αλυσίδα της ελαστάσης αποτελείται από δύο αντιπαράλληλες β-βαρέλι κυλινδρικές περιοχές που αλληλεπιδρούν και έχουν μικρή αναλογία ελίκων. Μεταξύ των δύο περιοχών εντοπίζεται η σχισμή που περιέχει την καταλυτική τριάδα. Η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος βρίσκεται κατά μήκος της σχισμής και αποτελεί μέρος των δυο περιοχών (Barrett, 2004). Το ένζυμο αυτό συντίθεται στο πάγκρεας ως ανενεργό ζυμογόνο που έχει ένα υδροφοβικό σηματοδοτικό πεπτίδιο και ένα πεπτίδιο ενεργοποίησης (Gudmundsdóttir *et al.*, 1996). Στο πάγκρεας αποσπάται το σηματοδοτικό πεπτίδιο και στη συνέχεια στο δωδεκαδάκτυλο με τη δράση της τρυψίνης αποσπάται το πεπτίδιο ενεργοποίησης και ενεργοποιείται η ελαστάση.

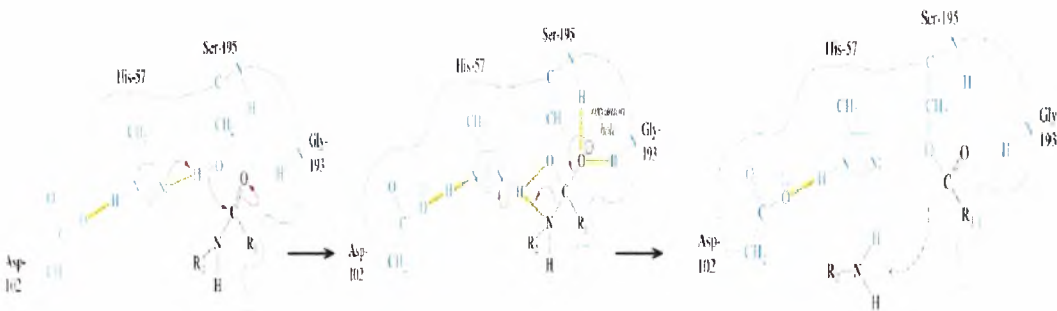


Εικόνα 3: Η καταλυτική τριάδα της ελαστάσης

(<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY252/Peptidase/3.html>).

Η ελαστάση καταλύει την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών σε δύο βήματα. Το πρώτο στάδιο είναι η ακυλίωση (Εικ. 4). Αρχικά συνδυάζεται το υπόστρωμα με την ελαστάση για να σχηματιστεί το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES). Η ιστιδίνη 57 δέχεται ένα πρωτόνιο από την ομάδα $-OH$ της σερίνης 195 όταν αυτό το άτομο του οξυγόνου προσβάλλει πυρηνόφιλα το καρβονυλικό άτομο άνθρακα του επιδεκτικού πεπτιδικού δεσμού. Ο δεσμός άνθρακα-οξυγόνου αυτής της καρβονυλομάδας γίνεται απλός και το οξυγόνο αποκτά ένα καθαρό αρνητικό φορτίο (ονομάζεται οξυανιόν). Τα τέσσερα άτομα που είναι τώρα ενωμένα με τον καρβονυλικό άνθρακα είναι διατεταγμένα όπως σε ένα τετράεδρο και βρίσκονται

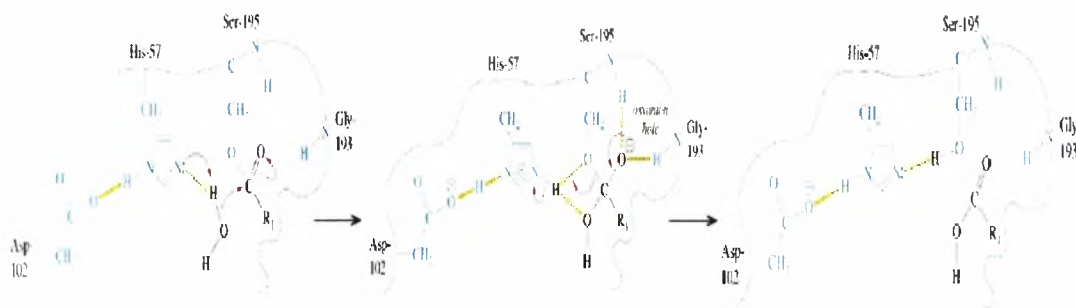
μέσα στην κοιλότητα του οξυανιόντος. Ο σχηματισμός αυτού του μεταβατικού τετραεδρικού ενδιάμεσου γίνεται δυνατός από τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου καρβονυλικού οξυγόνου και των ομάδων NH της σερίνης 195 και της γλυκίνης 193 της κύριας αλυσίδας. Ο ρόλος της ομάδας $-COO^-$ του ασπαργινικού 102 είναι να σταθεροποιεί στη μεταβατική κατάσταση τη θετικά φορτισμένη ιστοιδίνη 57. Επιπλέον, το ασπαργινικό 102 προσανατολίζει την ιστοιδίνη 57 και διασφαλίζει ότι βρίσκεται στην κατάλληλη ταυτομερή μορφή για να δεχθεί ένα πρωτόνιο από την σερίνη 195. Το πρωτόνιο της πρωτονιωμένης μορφής της ιστοιδίνης 57 μεταφέρεται κατόπιν στο άζωτο του προσβαλλόμενου πεπτιδικού δεσμού, ο οποίος έτσι διασπάται. Σε αυτό το στάδιο, το αμιδικό τμήμα του πεπτιδικού δεσμού του υποστρώματος είναι ενωμένο στην ιστοιδίνη 57 με δεσμό υδρογόνου, ενώ το καρβοξυλικό τμήμα του πεπτιδικού δεσμού του υποστρώματος είναι εστεροποιημένο στη σερίνη 195 σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο ακυλοένζυμο. Το στάδιο της ακυλίωσης της αντίδρασης υδρόλυσης συμπληρώνεται με την απομάκρυνση της αμινικής συνιστώσας (Stryer, 1997).



Εικόνα 4: Ακυλίωση, το πρώτο στάδιο της υδρόλυσης ενός πεπτιδικού δεσμού από την ελαστάση (<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY252/Peptidase/3.html>).

Το επόμενο στάδιο, που είναι η αποακυλίωση (Εικ. 5), αρχίζει όταν ένα μόριο ύδατος καταλαμβάνει τη θέση που ήταν ωριότερα κατειλημμένη από το αμινικό συστατικό του υποστρώματος. Το στάδιο αυτό προσδιορίζει τη συνολική ταχύτητα υδρόλυσης των πρωτεϊνών από την ελαστάση, γιατί είναι πολύ βραδύτερο από το πρώτο βήμα. Στην ουσία, η αποακυλίωση είναι η αντίστροφη πορεία της ακυλίωσης, με το H_2O να αντικαθιστά την αμινική συνιστώσα του υποστρώματος. Πρώτα, το δίκτυο μεταβίβασης φορτίου διώχνει ένα πρωτόνιο από το νερό. Το ιόν OH^- που παράγεται, προσβάλλει αμέσως το καρβονυλικό άτομο άνθρακα της ακυλομάδας που είναι

προσδεδεμένη στη σερίνη 195. Όπως και στην ακυλίωση, σχηματίζεται ένα μεταβατικό τετραεδρικό ενδιάμεσο. Τότε, η ιστοδίνη 57 προσφέρει ένα πρωτόνιο στο άτομο του οξυγόνου της σερίνης 195, η οποία απελευθερώνει το όξινο συστατικό του υποστρώματος. Αυτό το όξινο συστατικό απομακρύνεται και το ένζυμο είναι έτοιμο για τον επόμενο γύρο κατάλυσης (Stryer, 1997).

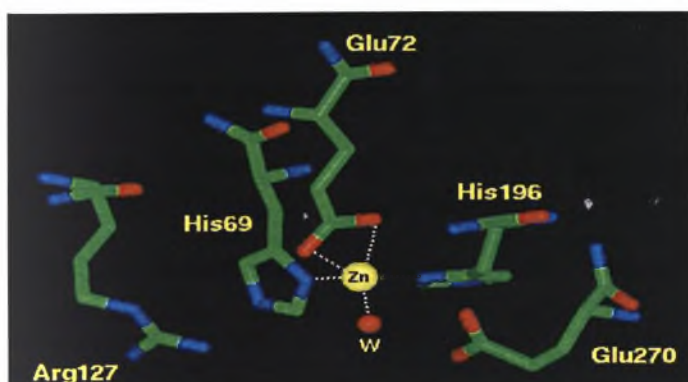


Εικόνα 5: Αποακυλίωση, το δεύτερο στάδιο της υδρόλυσης ενός πεπτιδικού δεσμού από την ελαστάση (<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY252/Peptidase/3.html>).

Οι καρβοξυπεπτιδάσες ανήκουν στην οικογένεια M14A των μεταλλοπρωτεασών που απαιτούν ένα ιόν ψευδαργύρου για την καταλυτική τους δράση και διακρίνονται σε καρβοξυπεπτιδάση Α (CPA) και σε καρβοξυπεπτιδάση Β (CPB). Είναι ένζυμο πέψης που δρουν καλύτερα σε πεπτίδια που έχουν προκύψει από τη δράση της πεψίνης και της χυμοθρυψίνης και φαίνεται να αναστέλλονται από την παρουσία αμινομάδων στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων. Η καρβοξυπεπτιδάση Α είναι μία 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 λυσίνη και αργινίνη (Barrett, 2004).

Η καρβοξυπεπτιδάση Α είναι μία πολυπεπτιδική αλυσίδα που αποτελείται από 307 αμινοξέα. Το ένζυμο αυτό έχει ελλειψοειδές σχήμα και περιέχει περιοχές α-έλικας (38%) και περιοχές β-πτυχωτής επιφάνειας (17%). Για την ενζυμική δραστηριότητα απαιτείται η παρουσία ενός ισχυρά προσδεδεμένου ιόντος ψευδαργύρου. Αυτό το ιόν ψευδαργύρου είναι τοποθετημένο σε μία κοιλότητα κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου, όπου σχηματίζει σύμπλοκο μέσα σε ένα τετράεδρο του οποίου οι κορυφές σχηματίζονται από τις πλευρικές αλυσίδες της ιστοδίνης 69, του γλουταμινικού 72, της ιστοδίνης 196 και ενός μορίου νερού (Stryer, 1997). Το γλουταμινικό 270 και η

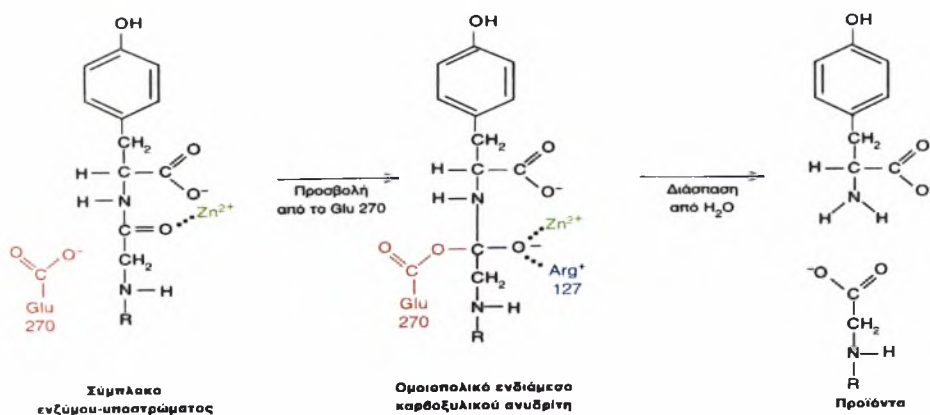
αργινίνη 127 είναι δυο κατάλοιπα πολύ σημαντικά για την κατάλυση (Εικ. 6). Η ιστιδίνη 69 και το γλουταμινικό 72 βρίσκονται σε μια α -έλικα ενώ η ιστιδίνη 196 σε μία β -πτυχωτή επιφάνεια. Ένα μεγάλο άνοιγμα κοντά στο ιόν του ψευδαργύρου δέχεται την πλευρική αλυσίδα του τελικού καταλοίπου του υποστρώματος, η οποία προσδένεται σε κατάλοιπα του ενεργού κέντρου όπως η αργινίνη 145 και η τυροσίνη 248 (Barrett, 2004). Στο πλατύψαρο *Paralichthys olivaceus* έγινε ο χαρακτηρισμός δύο διαφορετικών ισομορφών της καρβοξυπεπτιδάσης A (Srivastava *et al.*, 2003).



Εικόνα 6: Δομή του ενεργού κέντρου της καρβοξυπεπτιδάσης A (<http://pps98.man.poznan.pl/assignment/projects.grembecka/chapter31/html>).

Στο μηχανισμό κατάλυσης της καρβοξυπεπτιδάσης A τρεις ομάδες είναι κρίσιμες, το ιόν ψευδαργύρου, η γουανιδική ομάδα της αργινίνης 127 και η καρβοξυλική ομάδα του γλουταμινικού 270. Το καρβονυλικό άτομο άνθρακα του υπό διάσπαση δεσμού του υποστρώματος προσβάλλεται απ' ευθείας από την καρβοξυλομάδα του γλουταμινικού 270. Σχηματίζεται τότε ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο καρβοξυλικού ανυδρίτη, που προετοιμάζει τον δεσμό που διασπάται για να προσβληθεί από το μόριο νερού που είναι προσδεδεμένο στο ιόν Zn^{2+} . Αυτό το υψηλά πολωμένο μόριο νερού μεταφέρει ένα πρωτόνιο στη NH ομάδα διασπώντας τον δεσμό. Ο ρόλος της αργινίνης 127 είναι η σταθεροποίηση του αρνητικού φορτίου στο τετραεδρικό ενδιάμεσο (Εικ. 7). Εναλλακτικά, ένα ενεργοποιημένο μόριο νερού μπορεί να προσβάλλει απ' ευθείας το καρβονυλικό άτομο άνθρακα του υπό διάσπαση δεσμού του υποστρώματος. Χαρακτηριστικό είναι ότι η καρβοξυπεπτιδάση A επιταχύνει την κατάλυση με το να επάγει τη στρέβλωση των δεσμών του υποστρώματος της. Έτσι η πόλωση της καρβονυλικής ομάδας του υποστρώματος από το ιόν του ψευδαργύρου διευκολύνει την προσβολή του καρβονυλικού άνθρακα είτε από το γλουταμινικό 270

είτε από ένα ενεργοποιημένο μόριο νερού. Η πρόσδεση του υποστρώματος συνοδεύεται από δομικές αλλαγές στο ενεργό κέντρο της καρβοξυπεπτιδάσης A. Το προσδεμένο υπόστρωμα περιτριγυρίζεται από όλες τις πλευρές από τις καταλυτικές ομάδες του ενζύμου. Εάν το ένζυμο δεν ήταν εύκαμπτο τότε το υπόστρωμα δεν θα μπορούσε να εισχωρήσει σε ένα τέτοιο τόξο από καταλυτικές ομάδες, ούτε θα μπορούσε ένα προϊόν να απομακρυνθεί (Stryer, 1997).



Εικόνα 7: Ο μηχανισμός δράσης της καρβοξυπεπτιδάσης A (Stryer, 1997).

Η καρβοξυπεπτιδάση B, η οποία παλαιότερα ονομαζόταν προταμινάση λόγω της ικανότητάς της να απελευθερώνει αργινίνη από προταμίνες, έχει μήκος 306 αμινοξέα (Barrett, 2004). Υπάρχει μεγάλη δομική ομοιότητα μεταξύ καρβοξυπεπτιδάσης A και B καθώς στο πλατύψαρο *Paralichthys olivaceus* σημαντικός αριθμός αμινοξέων είναι συντηρημένα μεταξύ αυτών των δύο καρβοξυπεπτιδάσων. Τα κατάλοιπα που είναι συνδεδεμένα με το ιόν ψευδαργύρου (ιστιδίνη 69, γλουταμινικό 72, ιστιδίνη 196 και ένα μόριο νερού) είναι συντηρημένα. Το ίδιο συμβαίνει και με άλλα σημαντικά κατάλοιπα για την κατάλυση όπως το γλουταμινικό 270 και η αργινίνη 127, γι' αυτό ο μηχανισμός κατάλυσης είναι ίδιος. Οι διαφορές στην εξειδίκευση εξηγούνται από την παρουσία ασπαραγινικού 255 στη θέση που στην καρβοξυπεπτιδάση A καταλαμβάνεται από ισολευκίνη. Το αμινοξύ αυτής της θέσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις ενζύμου-υποστρώματος (Srivasta *et al.*, 2003). Όπως οι περισσότερες πεπτικές πρωτεάσες, οι καρβοξυπεπτιδάσες συντίθενται στο πάγκρεας σε πρώτη φάση ως μεγαλύτερα και ανενεργά πρόδρομα μόρια (ζυμογόνα) που έχουν ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο και ένα πεπτίδιο ενεργοποίησης. Η ωρίμανση των μορίων αυτών αρχικά γίνεται στο πάγκρεας, όπου αποσπάται το σηματοδοτικό

πεπτίδιο και στη συνέχεια η ενεργοποίηση των καρβοξυπεπτιδασών γίνεται στο έντερο με τη δράση της τρυψίνης, η οποία αποσπά το πεπτίδιο ενεργοποίησης (Srivasta *et al.*, 2003).

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της αλατότητας στην ενζυμική δραστηριότητα της ελαστάσης και των καρβοξυπεπτιδασών Α και Β στον τελεόστεο *Sparus aurata*. Τα ψάρια υποβλήθηκαν σε δυο διαφορετικές αλατότητες και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η δραστηριότητα των τριών πεπτικών πρωτεασών σε τρία διαφορετικά σημεία του πεπτικού σωλήνα, πυλωρικά τυφλά, πρόσθιο και οπίσθιο έντερο, σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Η εργασία αυτή εντάσσεται στα πλαίσια της κατανόησης της φυσιολογίας θρέψης των εμπορικών ειδών, η οποία θεωρείται σημαντική για τη βελτίωση των πρακτικών εκτροφής και την παραγωγή προϊόντων υψηλής διατροφικής ποιότητας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα διεξήχθη σε εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και διήρκησε δεκαπέντε ημέρες μετά το πέρας της απαιτούμενης για τον εγκλιματισμό των πειραματόζων χρονικής περιόδου.

Πειραματόζωα και ενυδρεία

Άτομα τσιπούρας (*Sparus aurata*) μέσου βάρους 7,5g μεταφέρθηκαν από μονάδα εντατικής εκτροφής του Ν. Φθιώτιδας στις εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου και εγκλιματίστηκαν σε εργαστηριακές συνθήκες για χρονική περίοδο ενός περίπου μήνα. Στο διάστημα αυτό προσφερόταν στα ψάρια τροφή δύο φορές ημερησίως υπό μορφή σύμπηκτων (pellets) Ecostart 15 No 0,4 (Biomar). Τα επίπεδα της διατροφής τους διατηρήθηκαν στο 2,5% του σωματικού τους βάρους ημερησίως.

Με την έναρξη του πειράματος τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν, μετρήθηκε το σωματικό τους βάρος, διαιρέθηκαν σε έξι ομάδες και μεταφέρθηκαν σε έξι διαφορετικά ενυδρεία. Οι τρεις ομάδες παρέμειναν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ (αλατότητα High, H), ενώ οι υπόλοιπες τρεις τοποθετήθηκαν σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰ (αλατότητα Low, L). Κατά τη διάρκεια του πειράματος προσφερόταν στα ψάρια τροφή μία φορά ημερησίως υπό μορφή σύμπηκτων (pellets) Ecostart 15 No 0,4 (Biomar). Τα επίπεδα της διατροφής τους διατηρήθηκαν στο 2,5% του σωματικού τους βάρους ημερησίως. Δεν υπήρχαν σημαντικές στατιστικές διαφορές ως προς το αρχικό σωματικό βάρος των ψαριών ανά ενυδρείο (Πίνακας 1). Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος τα ψάρια ήταν εκτεθειμένα σε φυσική φωτοπερίοδο (11L:13D), ενώ η μέση θερμοκρασία του νερού ήταν 22°C.

Χρησιμοποιήθηκαν έξι γυάλινα ενυδρεία ορθογώνιου σχήματος και χωρητικότητας 140L το καθένα. Το σύστημα κυκλοφορίας του νερού ήταν κλειστό, ενώ το κάθε ενυδρείο διέθετε παροχή συμπιεσμένου αέρα καθώς και αυτόνομο μηχανικό και βιολογικό φίλτράρισμα. Καθημερινά πραγματοποιούνταν καθαρισμός των ενυδρείων, απομάκρυνση των περιττωμάτων και των υπολειμμάτων τροφής, ενώ μια φορά την εβδομάδα γινόταν συντήρηση των φίλτρων και ανανέωση του νερού. Επίσης πραγματοποιούνταν καθημερινές μετρήσεις θερμοκρασίας, οξυγόνου, αλατότητας και αμμωνίας. Η θερμοκρασία μετρούνταν με απλό θερμόμετρο, τοποθετημένο εντός της δεξαμενής. Το οξυγόνο μετρούνταν με οξυγονόμετρο τύπου WTW oxi320, η

αμμωνία με το Kit Tetra Analyset Pro και η αλατότητα με οσμόμετρο τύπου TDS Meter4076.

Πίνακας 1. Αρχικό σωματικό βάρος (g) των ψαριών ανά ενυδρείο

	1H	2H	3H	4H	5H	6H
Μέσος	13,374	13,428	13,572	13,543	13,671	13,584
T. σφάλμα	0,38	0,356	0,34	0,425	0,356	0,375
Πλήθος	37	37	36	37	37	36

Δειγματοληψίες

Στη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν τέσσερις δειγματοληψίες. Πριν από κάθε δειγματοληψία τα ψάρια παρέμεναν νηστικά για 24h. Την πρώτη ημέρα μετά το σχηματισμό των έξι πειραματικών ομάδων (ημέρα 1), λήφθηκαν δείγματα από δύο τυχαία επιλεγμένα άτομα από κάθε ενυδρείο. Τα ψάρια αναισθητοποιούνταν και αφού μετρούνταν το σωματικό τους βάρος, θανατώνονταν, αφαιρούνταν ο πεπτικός σωλήνας, ο οποίος αφού καθάριζε από το περιεχόμενό του, διαιρούνταν σε τέσσερα τμήματα, στομάχι (stomach, S), πυλωρικά τυφλά (pyloric caeca, PC), πρόσθιο (anterior intestine, AI) και οπίσθιο έντερο (posterior intestine, PI) και αποθηκεύονταν στους -20°C . Οι δειγματοληψίες συνεχίστηκαν με τον ίδιο τρόπο και στις ημέρες 4, 10 και 15.

Προετοιμασία δείγματος (εκγύλιση ενζύμων)

Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν μηχανικά (ομογενοποιητής ULTRA TURAX, IKA-WERKER) για 40 sec περίπου σε ψυχρό 50mM Tris-HCl buffer, pH=7,5 σε αναλογία 100 mg ιστού ανά ml διαλύματος και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 16000 x g για 30min στους 4°C (Alarcon *et al.*, 1998). Το υπερκείμενο διαιρέθηκε σε σωλήνες eppendorf και αποθηκεύτηκε στους -80°C .

Μέτρηση πρωτεϊνικού περιεχομένου

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

Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της ελαστάσης

Για κάθε μια από τις ενζυμικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν προκαταρτικές δοκιμές, κατά τη διάρκεια των οποίων ελέγχθηκαν διάφορες αραιώσεις των ενζυμικών εκχυλισμάτων, έχοντας ως στόχο τον καθορισμό εκείνης της συγκέντρωσης που θα έδινε τη μεγαλύτερη γραμμική μεταβολή στην απορρόφηση του φωτός σε ελάχιστο χρονικό διάστημα 5 min.

Συγκεκριμένα ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της ελαστάσης πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο του Bieth *et al.* (1974) χρησιμοποιώντας υποστρώμα N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (Sigma S4760) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M Tris pH=8,3 0,01% NaN₃. Η αντίδραση άρχισε προσθέτοντας 5 μl ενζυμικού εκχυλίσματος για τα δείγματα πυλωρικών τυφλών και οπίσθιου εντέρου και 15μl για τα δείγματα πρόσθιου εντέρου σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 0,001M και συνολικό όγκο αντίδρασης 3ml. Αφού πέρασαν 10min, μετρήθηκε με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου CARY 50Bio η απορρόφηση στα 410 nm σε χρονικό διάστημα 5min και σε θερμοκρασία 25°C. Έτσι, βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηριότητα της ελαστάσης εκφράστηκε σε pmol p-nitroanilide που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ (ειδικός συντελεστής απορρόφησης $\epsilon=8,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της καρβοξυπεπτιδάσης A

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της καρβοξυπεπτιδάσης A πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο των Folk & Schirmer (1963) χρησιμοποιώντας υποστρώμα Hippuryl-L-phenylalanine (Sigma H6875) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,025 M Tris-HCl pH=7,5 0,5M NaCl. Η αντίδραση άρχισε προσθέτοντας 10 μl ενζυμικού εκχυλίσματος για τα δείγματα πυλωρικών τυφλών σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 0,0005M και συνολικό όγκο αντίδρασης 3ml. Για τα δείγματα πρόσθιου και οπίσθιου εντέρου προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού εκχυλίσματος (5, 10 ή 15 μl) η οποία έδινε τη μεγαλύτερη γραμμική μεταβολή. Μετρήθηκε με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου CARY 50Bio η απορρόφηση στα 254 nm σε χρονικό διάστημα 15min και σε θερμοκρασία 25°C. Έτσι, βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A εκφράστηκε σε pmol hippuric acid που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ (ειδικός συντελεστής απορρόφησης $\epsilon= 0,36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηρότητας της καρβοξυπεπτιδάσης B

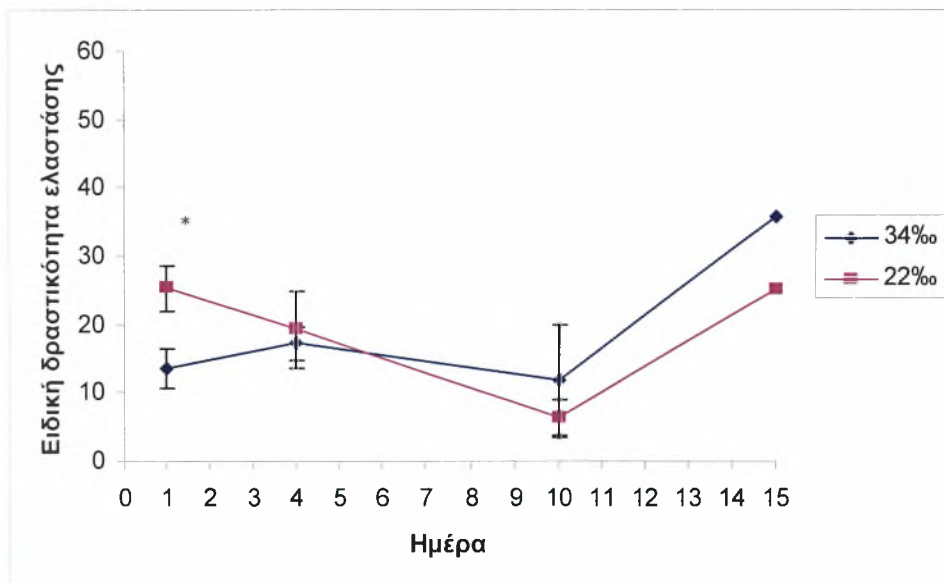
Ο προσδιορισμός της δραστηρότητας της καρβοξυπεπτιδάσης B πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο του Folk *et al.* (1960) χρησιμοποιώντας υποστρώμα Hippuryl-L-arginine (Sigma H2508) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,025 M Tris-HCl pH= 7,65 0,1M NaCl. Η αντίδραση άρχισε προσθέτοντας 5 μl ενζυμικού εκχυλίσματος σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 0,0005M και συνολικό όγκο αντίδρασης 3ml. Αφού πέρασαν 5min, μετρήθηκε με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου CARY 50Bio η απορρόφηση στα 254 nm σε χρονικό διάστημα 10min και σε θερμοκρασία 25°C. Έτσι, βάση του ρυθμού υδρόλυσης του υποστρώματος, η ειδική δραστηρότητα της καρβοξυπεπτιδάσης B εκφράστηκε σε pmol hippuric acid που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ (ειδικός συντελεστής απορρόφησης $\epsilon = 0,349 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MS EXCEL (Office 2000) με το οποίο δημιουργήθηκαν διαγράμματα διασποράς, έγινε ανάλυση διασποράς δύο παραγόντων με αλληλεπίδραση (two-way ANOVA) και όπου χρειάστηκε ακολούθησε έλεγχος συγκρίσεων t (t-test). Επίσης χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman. Ως διάστημα εμπιστοσύνης ορίστηκε το 95% ($P < 0,05$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑΕλασάση

Η δραστηριότητα της ελασάσης προσδιορίστηκε σε τρεις περιοχές του πεπτικού σωλήνα, τα πυλωρικά τυφλά (pyloric caeca, PC), το πρόσθιο (anterior intestine, AI) και το οπίσθιο έντερο (posterior intestine, PI) τις ημέρες 1,4,10 και 15 μετά τη μετάβαση από το θαλασσινό στο υφάλμυρο νερό. Την ημέρα 1 η ενζυμική δραστηριότητα της ελασάσης στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο υφάλμυρο νερό ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη ($t=-6,29$, $P=0,012$) από εκείνη στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο θαλασσινό νερό (Εικ. 1). Διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ημερών στη διάρκεια του πειράματος και στις δύο αλατότητες ($F=8,99$, $P=0,004$). Η διαφορά αυτή ήταν σημαντική για τις ημέρες 4 και 10 ($t=2,78$, $P=0,019$).

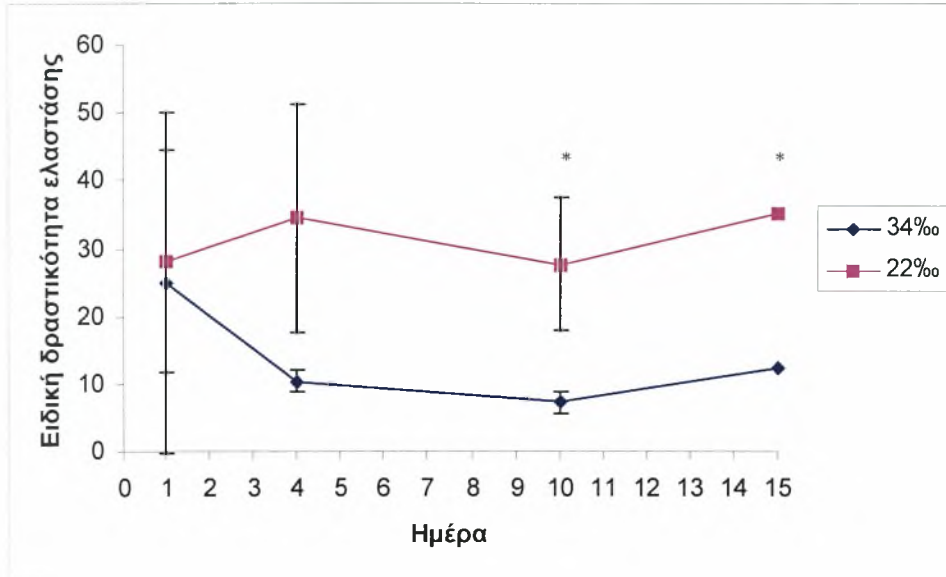


Εικόνα 1: Ειδική δραστηριότητα της ελασάσης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε $\mu\text{mol p-nitroanilide}$ που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0,05$) της μέσης τιμής της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου μεταξύ των δύο αλατοτήτων την ίδια χρονική στιγμή.

Η δραστηριότητα της ελασάσης παρουσίασε τελείως διαφορετική εικόνα στο πρόσθιο έντερο (Εικ. 2). Με εξαίρεση τις ημέρες 1 και 4, που δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο αλατοτήτων, η ενζυμική δραστηριότητα της ελασάσης στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο υφάλμυρο νερό ήταν στατιστικώς

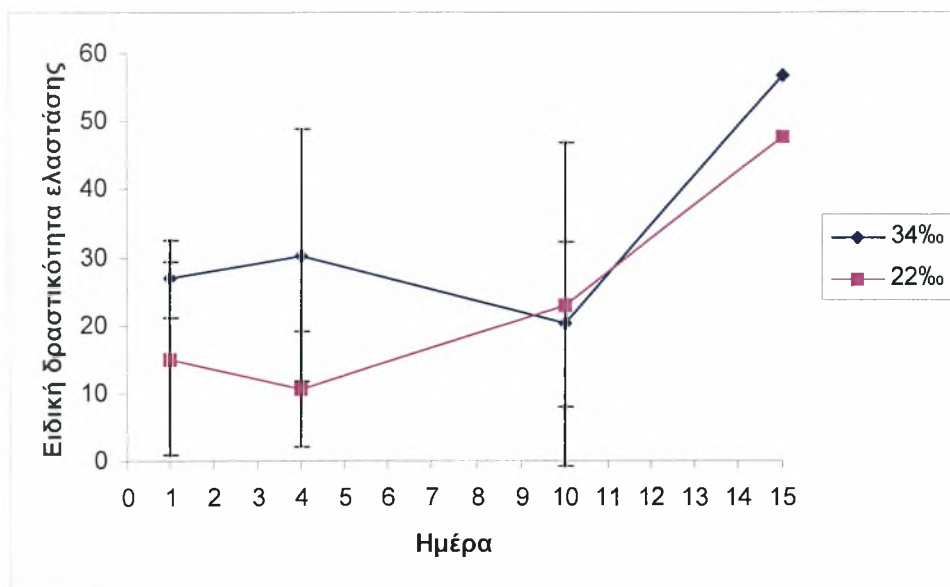
σημαντικά μεγαλύτερη ($F=5,25$, $P=0,041$) από εκείνη στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο θαλασσινό νερό.

Στο οπίσθιο έντερο αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στη δραστικότητα της ελαστάσης (Εικ. 3), ενώ αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη διακύμανση που παρατηρήθηκε μεταξύ των ατόμων.

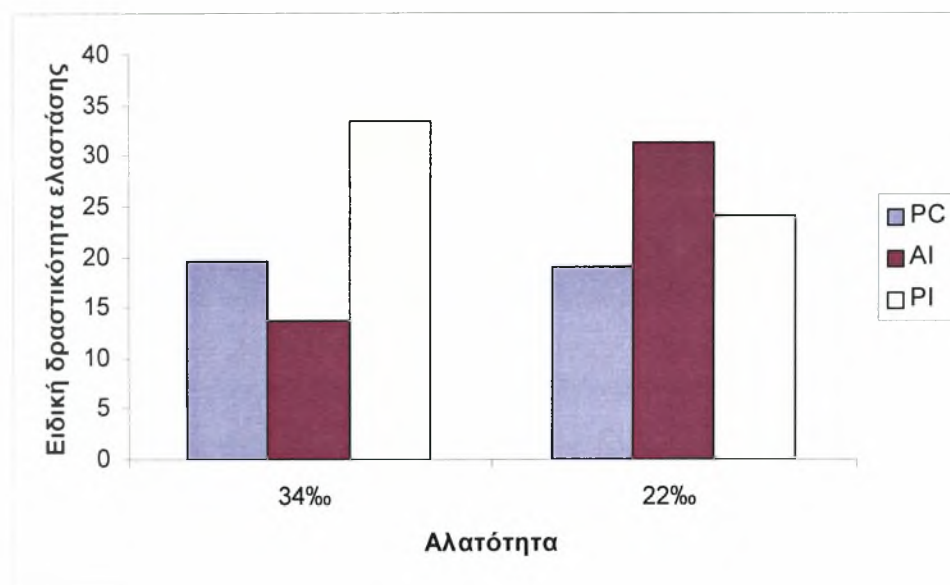


Εικόνα 2: Ειδική δραστικότητα της ελαστάσης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε pmol p-nitroanilide που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ στο πρόσθιο έντερο σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P<0,05$) της μέσης τιμής της ειδικής δραστικότητας του ενζύμου μεταξύ των δύο αλατοτήτων την ίδια χρονική στιγμή.

Συγκρίνοντας τις μέσες τιμές της δραστικότητας της ελαστάσης στα τρία τμήματα του πεπτικού σωλήνα όλο το διάστημα που ακολούθησε τον εγκλιματισμό στις δύο αλατότητες (Εικ. 4), είναι φανερό ότι η δραστικότητα της ελαστάσης δεν παρουσίασε ομοιόμορφη κατανομή κατά μήκος του εντέρου. Στην υψηλή αλατότητα, μεγαλύτερη δραστικότητα παρατηρήθηκε στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου και χαμηλότερη στο πρόσθιο. Στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών παρατηρήθηκε μια ενδιάμεση δραστικότητα που δεν επηρεάστηκε από την αλατότητα. Η μεγαλύτερη αλλαγή με την αλατότητα παρατηρήθηκε στο πρόσθιο έντερο, όπου η μέση δραστικότητα της ελαστάσης ήταν υπερδιπλάσια στα ψάρια του υφάλμυρου νερού σε σχέση με τα ψάρια του θαλασσινού.



Εικόνα 3: Ειδική δραστηριότητα της ελαστάσης (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε pmol p-nitroanilide που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ στο οπίσθιο έντερο σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰.

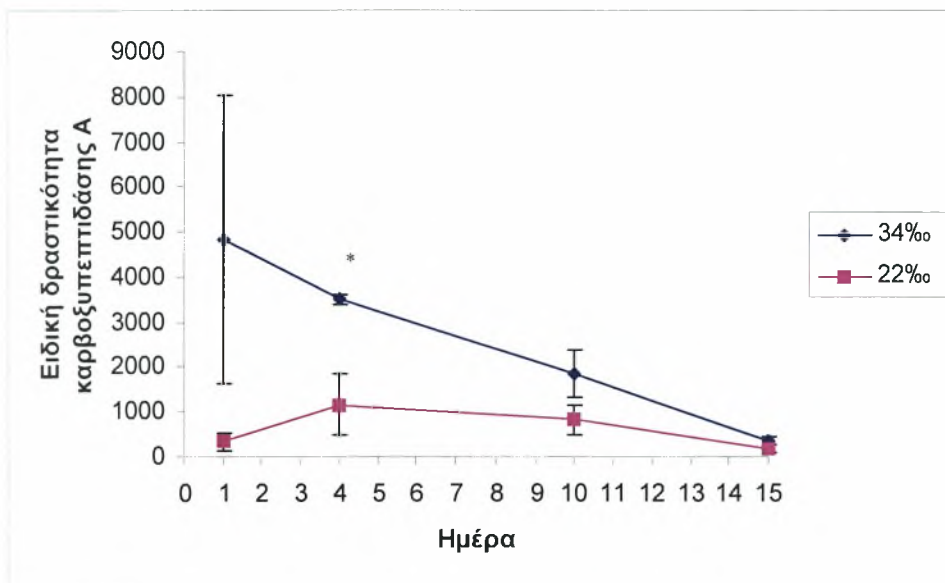


Εικόνα 4: Μέση τιμή της ειδικής δραστηριότητας της ελαστάσης εκφρασμένης σε pmol p-nitroanilide που παρήχθηκε $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ στις τρεις περιοχές του πεπτικού σωλήνα που μελετήθηκαν, πυλωρικά τυφλά (PC), πρόσθιο (AI) και οπίσθιο έντερο (PI) σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰.

Καρβοξυπεπτιδάση A

Η αλατότητα επηρέασε σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών ($F=13,01$, $P=0,007$) (Εικ. 5), με τα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στην υψηλή αλατότητα να παρουσιάζουν

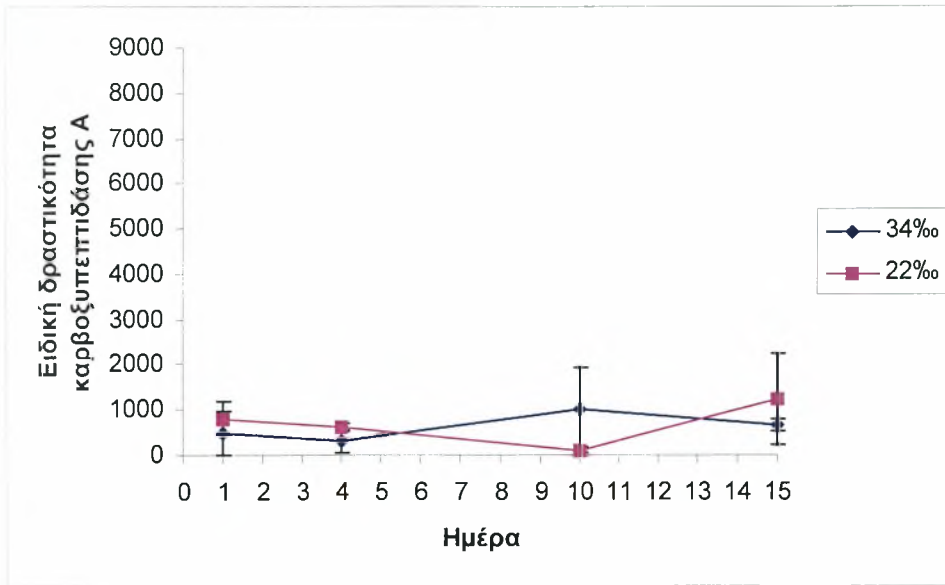
σταθερά υψηλότερη δραστικότητα καρβοξυπεπτιδάσης A από αυτά της χαμηλής αλατότητας. Την ημέρα 4 η ενζυμική δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο θαλασσινό νερό ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη ($t=5,47$, $P=0,016$) από εκείνη στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο υφάλμυρο νερό. Στις ημέρες που ακολούθησαν η διαφορά αυτή μειώθηκε βαθμιαία και την ημέρα 15 η ενζυμική δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο υφάλμυρο νερό, ήταν πολύ κοντά σε εκείνη στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο θαλασσινό νερό.



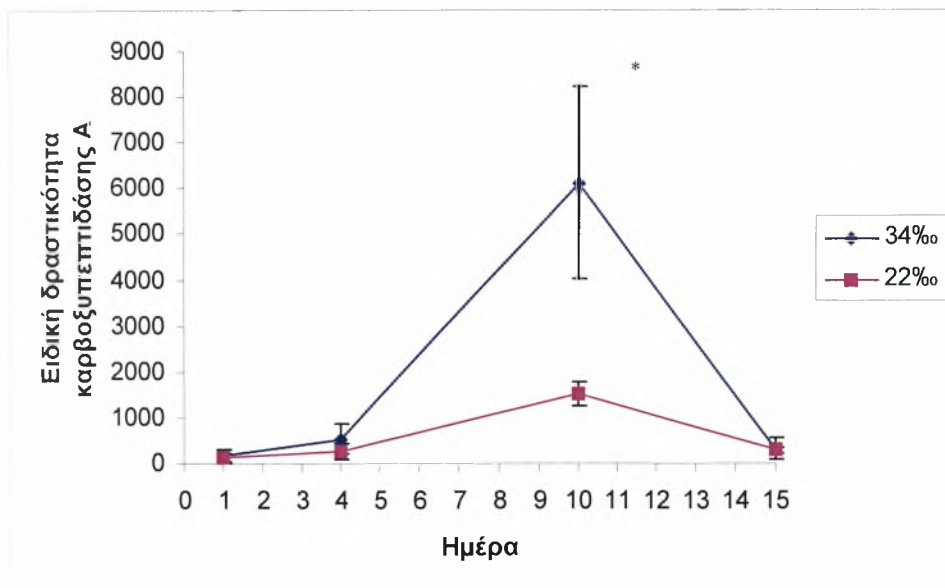
Εικόνα 5: Ειδική δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε $\mu\text{mol hippuric acid που παρήχθηκε } \text{mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0,05$) της μέσης τιμής της ειδικής δραστικότητας του ενζύμου μεταξύ των δύο αλατοτήτων την ίδια χρονική στιγμή.

Στην περιοχή του πρόσθιου εντέρου η δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A ήταν πολύ χαμηλή σε σχέση με την περιοχή των πυλωρικών τυφλών και δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την αλατότητα (Εικ. 6).

Στο οπίσθιο έντερο, η ενζυμική δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A επηρεάστηκε από την αλατότητα και την ημέρα 10 η ενζυμική δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο θαλασσινό νερό, ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη ($t=3,38$, $P=0,039$) από εκείνη στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο υφάλμυρο νερό (Εικ. 7).



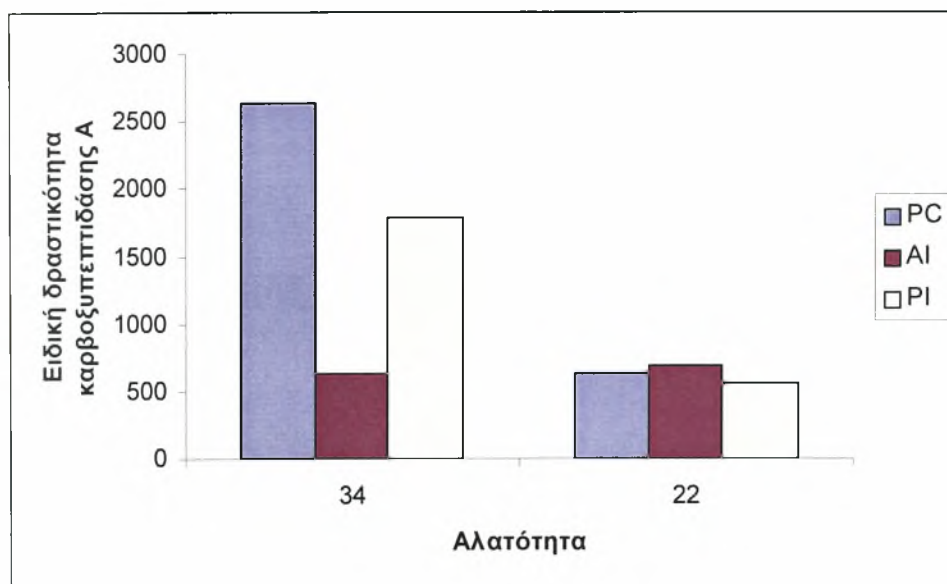
Εικόνα 6: Ειδική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε pmol hippuric acid που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ στο πρόσθιο έντερο σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰.



Εικόνα 7: Ειδική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε pmol hippuric acid που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ στο οπίσθιο έντερο σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά (P<0,05) της μέσης τιμής της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου μεταξύ των δύο αλατοτήτων την ίδια χρονική στιγμή.

Επίσης στο οπίσθιο έντερο διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ημερών στη διάρκεια του πειράματος και στις δύο αλατότητες ($F=33,70$, $P<0,001$). Η διαφορά αυτή ήταν σημαντική για τις ημέρες 1 και 4 ($t=-2,24$, $P=0,044$), τις ημέρες 4 και 10 ($t=-2,44$, $P=0,035$) καθώς επίσης τις ημέρες 10 και 15 ($t=3,00$, $P=0,015$).

Η δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Α εμφάνισε τις μεγαλύτερες τιμές στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών στα ψάρια της υψηλής αλατότητας, ενώ έντονη ήταν η παρουσία της και στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου στην ίδια αλατότητα (Εικ. 8). Η χαμηλή αλατότητα μείωσε σημαντικά τη δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Α και στις δύο αυτές περιοχές ($P<0,05$), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στο πρόσθιο έντερο.

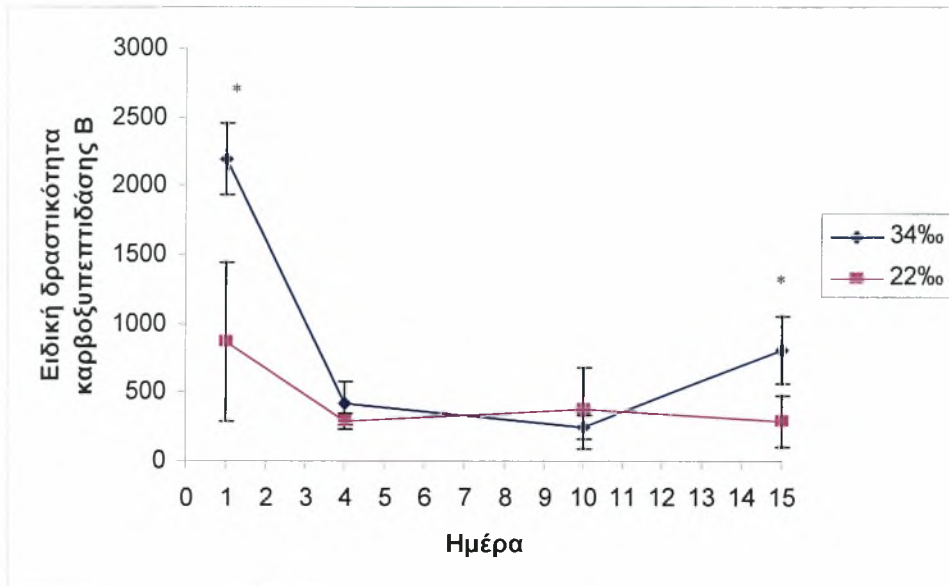


Εικόνα 8: Μέση τιμή της ειδικής δραστηριότητας της καρβοξυπεπτιδάσης Α εκφρασμένης σε $\mu\text{mol hippuric acid που παρήχθηκε } \text{mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ στις τρεις περιοχές του πεπτικού σωλήνα που μελετήθηκαν, πυλωρικά τυφλά (PC), πρόσθιο (AI) και οπίσθιο έντερο (PI) σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰.

Καρβοξυπεπτιδάση Β

Η αλατότητα επηρέασε σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών ($F=16,40$, $P=0,001$), η οποία τις ημέρες 1 και 15 ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0,05$) στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο θαλασσινό νερό από ότι στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο υφάλμυρο νερό (Εικ. 9). Ακόμη διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ημερών στη διάρκεια του πειράματος και στις δύο

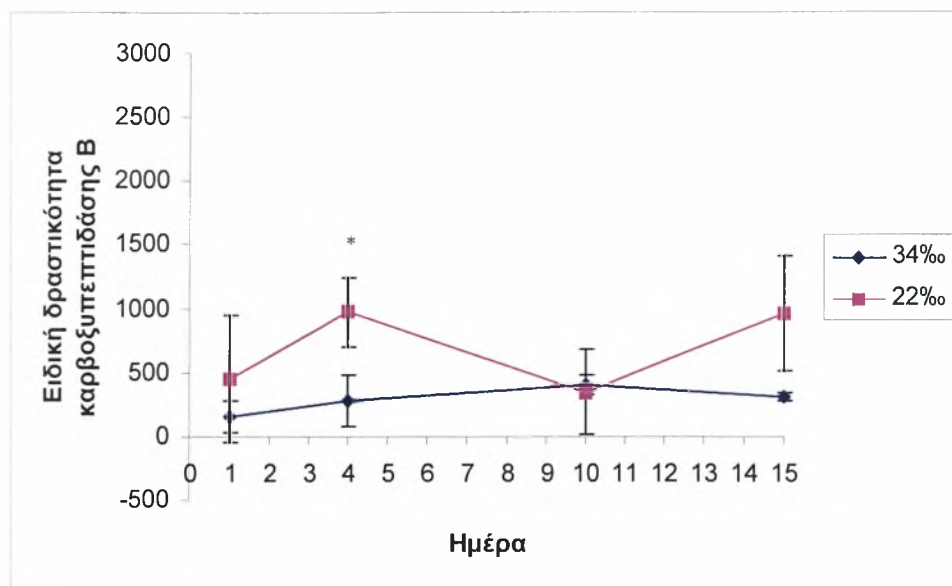
αλατότητες ($F=25,34$, $P<0,001$). Η διαφορά αυτή ήταν σημαντική για τις ημέρες 1 και 4 ($t=3,65$, $P=0,007$).



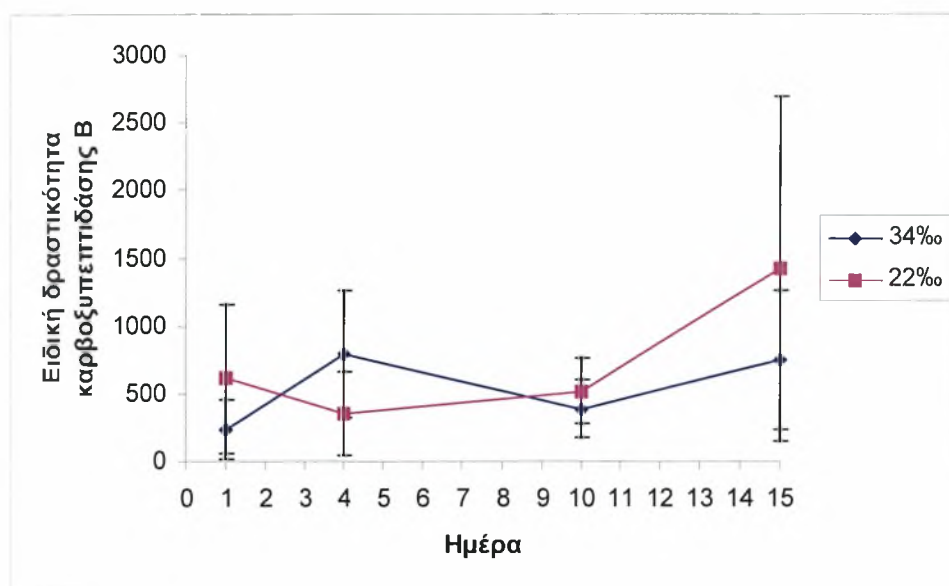
Εικόνα 9: Ειδική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε pmol hippuric acid που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P<0,05$) της μέσης τιμής της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου μεταξύ των δύο αλατοτήτων την ίδια χρονική στιγμή.

Στο πρόσθιο έντερο, η δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β ήταν σταθερή για όλο το χρονικό διάστημα του πειράματος στα ψάρια της υψηλής αλατότητας (Εικ. 10). Στη χαμηλή αλατότητα ωστόσο παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις και οι υψηλότερες τιμές παρουσιάστηκαν τις ημέρες 4 και 15 (Εικ. 10). Η αλατότητα επηρέασε σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β στο πρόσθιο έντερο ($F=10,87$, $P=0,005$). Την ημέρα 4 η ενζυμική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο υφάλμυρο νερό ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη ($t=-5,38$, $P=0,016$) από εκείνη στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στο θαλασσινό νερό.

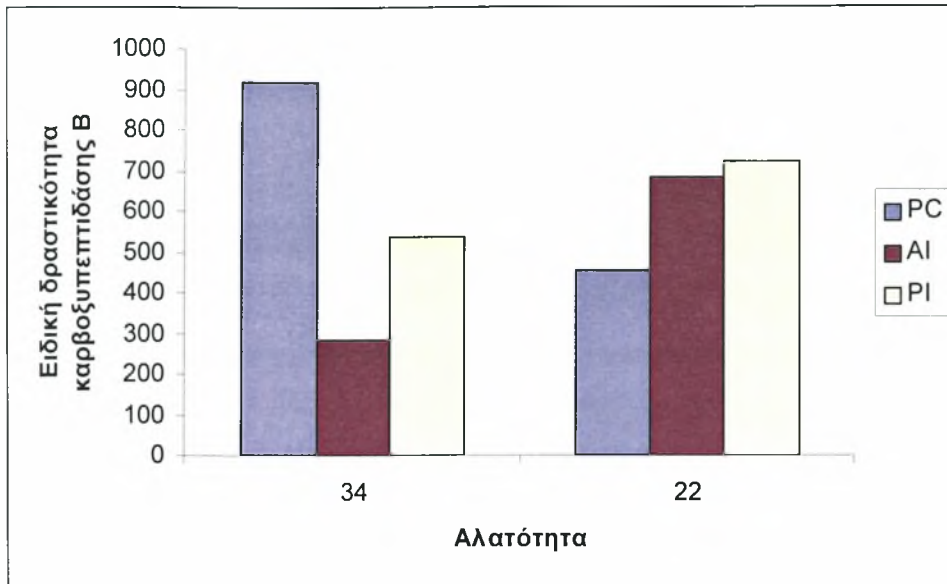
Αντίθετα, η δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β στο οπίσθιο έντερο δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την αλατότητα (Εικ. 11), ενώ παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ατόμων.



Εικόνα 10: Ειδική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε pmol hippuric acid που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ στο πρόσθιο έντερο σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά (P<0,05) της μέσης τιμής της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου μεταξύ των δύο αλατοτήτων την ίδια χρονική στιγμή.



Εικόνα 11: Ειδική δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) εκφρασμένη σε pmol hippuric acid που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ στο οπίσθιο έντερο σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰.



Εικόνα 12: Μέση τιμή της ειδικής δραστηριότητας της καρβοξυπεπτιδάσης Β εκφρασμένης σε pmol hippuric acid που παρήχθηκε mg protein⁻¹ min⁻¹ στις τρεις περιοχές του πεπτικού σωλήνα που μελετήθηκαν, πυλωρικά τυφλά (PC) , πρόσθιο (AI) και οπίσθιο έντερο (PI) σε τσιπούρες που εγκλιματίστηκαν σε θαλασσινό νερό αλατότητας 34‰ και σε υφάλμυρο νερό αλατότητας 22‰.

Στην υψηλή αλατότητα, η μεγαλύτερη δραστηριότητα καρβοξυπεπτιδάσης Β εντοπίστηκε στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών ενώ η χαμηλότερη στο πρόσθιο έντερο (Εικ. 12). Η μείωση της αλατότητας οδήγησε σε αντίστοιχη μείωση της δραστηριότητας στα πυλωρικά τυφλά και αύξηση στο πρόσθιο και στο οπίσθιο έντερο. Αξιοσημείωτη είναι η αλλαγή που επέφερε η μείωση της αλατότητας στη σχετική παρουσία των καρβοξυπεπτιδασών και στις τρεις περιοχές του εντέρου. Στην υψηλή αλατότητα η δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Α κυριαρχούσε έναντι αυτής της Β σε αναλογία 2,9 2,2 και 3,3 στα πυλωρικά τυφλά, το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο αντίστοιχα. Στη χαμηλή αλατότητα, οι δραστηριότητες των δύο καρβοξυπεπτιδασών κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα και οι αναλογίες διαμορφώθηκαν σε 1,4 1,01 και 0,8 στα πυλωρικά τυφλά το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο. Στα πυλωρικά τυφλά, η μείωση αυτή οφείλεται κυρίως στη μεγάλη μείωση της δραστηριότητας της καρβοξυπεπτιδάσης Α , στο πρόσθιο έντερο στην αύξηση της καρβοξυπεπτιδάσης Β ενώ στο οπίσθιο έντερο σε συνδυασμένη μείωση της καρβοξυπεπτιδάσης Α και αύξηση της καρβοξυπεπτιδάσης Β.

Στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν σε αλατότητα 34‰ υπήρξε αρνητική συσχέτιση της δραστηριότητας της καρβοξυπεπτιδάσης Α στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών με εκείνη στο πρόσθιο έντερο (Πίνακας 1). Στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν σε

αλατότητα 22% υπήρξε αρνητική συσχέτιση της δραστικότητας της καρβοξυπεπτιδάσης Β στο πρόσθιο με εκείνη στο οπίσθιο έντερο. Επίσης στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν σε αλατότητα 34% υπήρξε αρνητική συσχέτιση της δραστικότητας της ελαστάσης με εκείνη της καρβοξυπεπτιδάσης Β στο πρόσθιο έντερο. Σε όλα τα τμήματα του εντέρου και στις δύο αλατότητες παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στη δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Α και Β, ενδεικτικό της τάσης σε άτομα με υψηλή δραστικότητα καρβοξυπεπτιδάσης Α να παρατηρείται και υψηλή δραστικότητα καρβοξυπεπτιδάσης Β. Σε καμία περίπτωση ωστόσο, αυτή η συσχέτιση δεν ήταν στατιστικώς σημαντική.

Πίνακας 1. Συντελεστής συσχέτισης Spearman μεταξύ των ενζυμικών δραστικότητων των τμημάτων του πεπτικού σωλήνα για κάθε ένζυμο και μεταξύ των ενζυμικών δραστικότητων για κάθε τμήμα του πεπτικού σωλήνα

	34%	22%
<u>Ελαστάση</u>		
Πυλωρικά τυφλά: πρόσθιο έντερο	0,018	0,212
Πυλωρικά τυφλά: οπίσθιο έντερο	0,333	0,006
Πρόσθιο έντερο: οπίσθιο έντερο	0,333	-0,115
<u>Καρβοξυπεπτιδάση Α</u>		
Πυλωρικά τυφλά: πρόσθιο έντερο	-0,697*	-0,548
Πυλωρικά τυφλά: οπίσθιο έντερο	-0,317	0,119
Πρόσθιο έντερο: οπίσθιο έντερο	0,436	-0,612
<u>Καρβοξυπεπτιδάση Β</u>		
Πυλωρικά τυφλά: πρόσθιο έντερο	-0,527	0,091
Πυλωρικά τυφλά: οπίσθιο έντερο	-0,182	-0,200
Πρόσθιο έντερο: οπίσθιο έντερο	0,189	-0,718*
<u>Πυλωρικά τυφλά</u>		
Ελαστάση: καρβοξυπεπτιδάση Α	0,357	-0,643
Ελαστάση: καρβοξυπεπτιδάση Β	-0,115	-0,119
Καρβοξυπεπτιδάση Α: καρβοξυπεπτιδάση Β	0,350	0,119
<u>Πρόσθιο έντερο</u>		
Ελαστάση: καρβοξυπεπτιδάση Α	-0,624	0,100
Ελαστάση: καρβοξυπεπτιδάση Β	-0,648*	0,127
Καρβοξυπεπτιδάση Α: καρβοξυπεπτιδάση Β	0,238	0,473
<u>Οπίσθιο έντερο</u>		
Ελαστάση: καρβοξυπεπτιδάση Α	-0,267	-0,167
Ελαστάση: καρβοξυπεπτιδάση Β	0,164	0,248
Καρβοξυπεπτιδάση Α: καρβοξυπεπτιδάση Β	0,136	0,173

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ελαστάση και οι καρβοξυπεπτιδάσες Α και Β παράγονται και εκκρίνονται από το πάγκρεας στον εντερικό αυλό και η δραστηκότητά τους συνδέεται με την πέψη και την απορρόφηση των πρωτεϊνών. Αυτά τα πεπτικά ένζυμα δρουν εξωκυτταρικά (Suzuki *et al.*, 2002) και η δραστηκότητά τους αναμένεται να επηρεάζεται από τις συνθήκες που επικρατούν στον εντερικό αυλό. Η αλατότητα αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που πιθανόν να επηρεάζει τη δραστηκότητα τους, καθώς η τσιπούρα είναι θαλάσσιος οργανισμός και μαζί με την τροφή προσλαμβάνει και νερό με διαλυμένα άλατα.

Στη συγκεκριμένη εργασία προσδιορίστηκε η δραστηκότητα της ελαστάσης και των καρβοξυπεπτιδασών Α και Β στα πυλωρικά τυφλά, στο πρόσθιο και στο οπίσθιο έντερο τσιπούρας που εκτέθηκε σε δύο διαφορετικές αλατότητες. Ανιχνεύτηκε δραστηκότητα των ενζύμων αυτών και στα τρία σημεία του πεπτικού σωλήνα που μελετήθηκαν, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του Deguara *et al.* (2003) όπου βρέθηκε δραστηκότητα των καρβοξυπεπτιδασών Α και Β σε κάθε περιοχή του πεπτικού σωλήνα της τσιπούρας. Για την ελαστάση δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές, καθώς είναι η πρώτη φορά που μετρήθηκε η δραστηκότητα αυτού του ενζύμου στην τσιπούρα.

Η αλατότητα επηρέασε στατιστικώς σημαντικά ($P < 0,05$) την ενζυμική δραστηκότητα και των τριών πεπτικών πρωτεασών και η επίδραση αυτή ήταν εμφανής κυρίως τις ημέρες 1 ή 4, δηλαδή τις πρώτες ημέρες του πειράματος. Τη δεύτερη εβδομάδα του πειράματος διαπιστώθηκε μία επαναφορά των δραστηκότητων σε ανάλογα επίπεδα και στις δύο αλατότητες. Αντιθέτως, η συγκέντρωση NaCl δεν επηρέασε τη δραστηκότητα των αλκαλικών πεπτικών πρωτεασών της τσιπούρας (Munilla-Morán *et al.*, 1996). Εκεί όμως μελετήθηκε η επίδραση του NaCl *in vitro* και δεν μετρήθηκε η δραστηκότητα για κάθε ένζυμο ξεχωριστά. Η μικρή διάρκεια της επίδρασης της αλατότητας που διαπιστώθηκε στην παρούσα εργασία είναι πιθανόν να αποτελεί τη μεταβατική φάση μετά την αλλαγή της αλατότητας, κατά την οποία επιχειρείται προσαρμογή στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι τσιπούρες είναι ευρύαλα ψάρια, συνεπώς είναι ικανά να μετακινούνται σε νερά διαφορετικής αλατότητας και να προσαρμόζονται ώστε να επιβιώνουν στις νέες συνθήκες του περιβάλλοντος τους. Διαφάνηκε ότι η προσαρμοστικότητα τους περιλαμβάνει και τις πεπτικές πρωτεάσες και μάλιστα το διάστημα προσαρμογής υπήρξε αρκετά σύντομο.

Τα τρία πεπτικά ένζυμα δεν παρουσίασαν ομοιόμορφη κατανομή κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα. Η ελαστάση εμφάνισε τη μεγαλύτερη δραστικότητα στο οπίσθιο έντερο και τη χαμηλότερη στο πρόσθιο στα ψάρια που εγκλιματίστηκαν στην υψηλή αλατότητα. Η μετάβαση όμως των ψαριών από το θαλασσινό στο υφάλμυρο νερό, προκάλεσε μεγάλη αύξηση της δραστικότητας στο πρόσθιο έντερο. Χαρακτηριστικό είναι ότι στο υφάλμυρο νερό η δραστικότητα της ελαστάσης στο πρόσθιο έντερο παρέμεινε σημαντικά αυξημένη σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Πιθανώς το πρόσθιο είναι ο κύριος χώρος δράσης αυτού του ενζύμου. Η ελαστάση είναι ενδοπεπτιδάση και από την υδρολυτική της δράση παράγονται δι- και τριπεπτίδια τα οποία απορροφούνται πολύ πιο γρήγορα από ότι τα ελεύθερα αμινοξέα (Jobling, 1995). Από μελέτες στον *Ctenopharyngodon idella* προέκυψε ότι το 40-50% της πέψης και απορρόφησης των πρωτεϊνών συμβαίνει στο πρόσθιο έντερο (Scherp *et al.*, 1999).

Η καρβοξυπεπτιδάση A παρουσίασε στην υψηλή αλατότητα την μεγαλύτερη δραστικότητα στα πυλωρικά τυφλά και στο οπίσθιο έντερο. Η δραστικότητα στο πρόσθιο έντερο ήταν ιδιαίτερα χαμηλή και παρέμεινε ανεπηρέαστη από την αλλαγή της αλατότητας. Τα πυλωρικά τυφλά εμφανίζονται ως ο κύριος χώρος δράσης της καρβοξυπεπτιδάσης A, καθώς ήταν και η περιοχή του πεπτικού σωλήνα που η επίδραση της αλατότητας υπήρξε η μεγαλύτερη. Στα άτομα της υψηλής αλατότητας διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση της δραστικότητας της καρβοξυπεπτιδάσης A στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών με εκείνη στο πρόσθιο έντερο, υποδεικνύοντας ότι όταν η δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών ήταν υψηλή η αντίστοιχη στο πρόσθιο έντερο ήταν χαμηλή.

Στο υφάλμυρο νερό οι δραστικότητες των δύο καρβοξυπεπτιδασών κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα. Η μεγαλύτερη αλλαγή εντοπίστηκε στο οπίσθιο έντερο καθώς η αναλογία της δραστικότητας της καρβοξυπεπτιδάσης A προς της B από 3,3 στο θαλασσινό νερό μειώθηκε στο 0,8 δηλαδή, ενώ στην υψηλή αλατότητα κυριαρχούσε η καρβοξυπεπτιδάση A, στη χαμηλή αλατότητα η καρβοξυπεπτιδάση B είχε μεγαλύτερη δραστικότητα σ' αυτό το τμήμα του πεπτικού σωλήνα. Η απορρόφηση των πρωτεϊνών στο οπίσθιο έντερο είναι έντονη καθώς περιέχει ηωσινόφιλα, τα οποία έχουν την ικανότητα προσρόφησης και πέψης πρωτεϊνών με πινοκυττάρωση (Cataldi *et al.*, 1987). Τα δικαρβονικά ιόντα που εκκρίνονται από το πάγκρεας στον εντερικό αυλό αυξάνουν το pH σταδιακά κατά μήκος του εντέρου. Έτσι η τιμή του pH αυξάνεται από 6,8 στο πρόσθιο σε 7,9 στο οπίσθιο έντερο (Deguara *et al.*, 2003). Οι

αυξημένες τιμές του pH στο οπίσθιο έντερο ευνοούν τη δράση της καρβοξυπεπτιδάσης B η οποία απαιτεί ελαφρώς αυξημένες τιμές (pH 7,5-7,8) σε σχέση με την καρβοξυπεπτιδάση A (pH 7,5) (Barrett, 2004).

Σύμφωνα με τον Sarasquete *et al.* (1993) υπάρχει μία προοδευτική μείωση της δραστηριότητας των πεπτικών πρωτεασών από το πρόσθιο προς το οπίσθιο τμήμα του πεπτικού σωλήνα. Η παρούσα εργασία επιβεβαιώνει κάτι τέτοιο στην περίπτωση των καρβοξυπεπτιδάσεων A και B οι οποίες παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές δραστηριότητας στην υψηλή αλατότητα στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών, την κυριότερη περιοχή έκκρισης πεπτικών ενζύμων. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει την τάση οι δραστηριότητες των δύο καρβοξυπεπτιδάσεων να αυξάνονται ταυτόχρονα. Η ελαστάση όμως παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές της δραστηριότητας της στην υψηλή αλατότητα στο οπίσθιο έντερο. Αυτό μάλλον οφείλεται στο γεγονός ότι το οπίσθιο έντερο ήταν αναδιπλωμένο επάνω στο πάγκρεας (προσωπική παρατήρηση) και άρα δεν αποκλείεται η έκκριση πεπτικών ενζύμων και σε αυτό το τμήμα του πεπτικού σωλήνα. Επίσης οι υψηλές τιμές της δραστηριότητας της ελαστάσης στο οπίσθιο έντερο ίσως να οφείλονται στην εντερική χλωρίδα, που είναι μία εξωγενής πηγή ενζύμων.

Χαρακτηριστικό είναι ότι και στα τρία πεπτικά ένζυμα διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ημερών στη διάρκεια του πειράματος και στις δύο αλατότητες. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τα ένζυμα που μελετήθηκαν ήταν ευαίσθητα σε περιβαλλοντικές αλλαγές. Η θερμοκρασία, που κατά τη διάρκεια του πειράματος κυμάνθηκε από 19,9 έως 24,4 °C (δεδομένου ότι η διακύμανσή της ήταν ίδια και στα έξι ενυδρεία), είναι ίσως ένας παράγοντας που επηρέασε τη δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων.

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προέκυψε ότι η κατανομή των τριών πεπτικών ενζύμων κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα δεν ήταν ομοιόμορφη. Οι καρβοξυπεπτιδάσες εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές δραστηριότητας στην υψηλή αλατότητα στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών, την κυριότερη περιοχή έκκρισης πεπτικών ενζύμων. Αντιθέτως η ελαστάση παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές της δραστηριότητας της στην ίδια αλατότητα στο οπίσθιο έντερο. Η αλατότητα επηρέασε τη δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων μόνο τις πρώτες ημέρες μετά τη μετάβαση των ψαριών σε νερό χαμηλότερης αλατότητας από το θαλασσινό. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ενώ στο θαλασσινό νερό η δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A κυριαρχούσε έναντι αυτής της B, στο υφάλμυρο νερό οι

δραστηκότητες των δύο καρβοξυπεπτιδασών κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα. Υπάρχει λοιπόν ανάγκη περαιτέρω μελέτης για να διευκρινιστεί με ποιο τρόπο η αλατότητα επηρεάζει την αύξηση και την ανάπτυξη των ψαριών, με στόχο την κατανόηση της φυσιολογίας θρέψης των εμπορικών ειδών, τη βελτίωση των πρακτικών εκτροφής τους και την επίτευξη υψηλής ποιότητας παραγωγής σε συνδυασμό με χαμηλό κόστος.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Alarcón F.J., Diaz M., Moyano F.J. & Abellán E. (1998) Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 257-267.
- Barrett A.J., Rawlings N.D. & Woessner J.F. (2004) *Handbook of proteolytic enzymes*, 2th edn. Elsevier academic press, London.
- Bieth J., Spiess B. & Wermuth C. (1974) The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem Med* 11, 350-357.
- Boeuf G. & Payan P. (2001) How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology* 130C, 411-423.
- 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*. *J. Fish Biol.* 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.
- Folk J.E., Piez K.A., Carroll W.R. & Gladner J. (1960) Carboxypeptidase B. IV. Purification and characterisation of the porcine enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 235, 2272-2277.
- Folk J.E. & Schirmer E.W. (1963) The porcine pancreatic carboxypeptidase A system. *Journal of Biological Chemistry* 238, 3884-3894.
- Gudmundsdóttir E., Spilliaert R., Yang Q., Craik C.S., Bjarnason J.B. & Gudmundsdóttir A. (1996) Isolation and Characterization of Two cDNAs from Atlantic Cod Encoding Two Distinct Psychrophilic Elastases. *Comparative Biochemistry and Physiology* 113B No 4, 795-801.

- Jobling M. (1995) *Environmental Physiology of Fishes*, 1st ed., Chapman & Hall, London.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193,265-275.
- Munilla-Morán R. & Saborido-Rey F. (1996) Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from Redfish (*Sebastes mentella*), Seabream (*Sparus aurata*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 113B No 2, 395-402.
- Sarsquete M.C., Polo A. & Gonzalez 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.
- Schep L.J., Tucker I.G., Young G., Ledger R. & Butt A.G. (1999) Controlled release opportunities for oral peptide delivery in aquaculture. *Journal of controlled release* 59, 1-14.
- Srivastava A.S, Kurokawa T., & Suzuki T. (2003) Molecular cloning and cDNA sequence analysis of carboxypeptidases A1, A2 and B from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 135B, 593-599.
- Stryer L. (1997) *Βιοχημεία* I, 3^η έκδοση, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Suzuki T., Srivastava A.S. & Kurokawa T. (2002) cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine proteases from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131B, 63-70.
- Teles A.O. (2000) Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquaculture International* 8: 477-492.
- <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY252/Peptidase/3.html>

<http://pps98.man.poznan.pl/assignment/projects.grembecka/chapter31/html>

<http://www.euro2day.gr/articles/80024/>

<http://www.fishbase.org/Photos/ThumbnailsSummary.cfm?ID=1164>

<http://www.istitutoveneto.it/venezia/divulgazione/valli/index.php?id=25>

http://www.malawicichlidhomepage.com/other/sparus_aurata.html