

Αρ. 83 686

Τ.Ε.Ι. ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ ΣΤΕΓ

ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ – ΑΛΙΕΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΕ/Μ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΟΛΙΚΗΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ PUNTAZZO PUNTAZZO



ΤΟΥ ΣΠΟΥΔΑΣΤΗ : ΜΩΥΣΗ ΜΕΛΕΤΙΑΔΗ

ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ: ΑΛΚΗΣΤΗ ΠΑΡΠΟΥΡΑ

Εγκρίθηκε
Αλκήστη Παρπούρα

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ 1997

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Dr Άλκηστη Παρπούρα η οποία μου πρότεινε το συγκεκριμένο θέμα και μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω σε δύο εργαστηριακές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο διατροφής του ΕΚΘΕ.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αγγελική Αδαμίδου ι-χθυολόγο ΤΕ και υπάλληλο του ΕΑΤΕΕ για την καθοδήγηση που μου παρείχε σε ότι αφορά την χρήση των ηλεκτρονικών υπολογιστών καθώς και την συνάδελφο Μαριάνθη Λαυρεντάκη που επέβαλε την άποψη της σε θέματα σχετικά με τον καλωπισμό και την ευπρεπή παρουσία της συγκεκριμένης εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του ΕΑΤΕΕ που μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό του εργαστηρίου καθώς και τον φίλο μου Παναγιώτη Μπίστη για την επική του βοήθεια

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Οι ιχθυοκαλλιέργειες αποσκοπούν στην παραγωγή ψαριών εμπορικού μεγέθους τα οποία θα μπορούν να διατεθούν στην αγορά και να αποφέρουν κέρδη στον παραγωγό. Αυτό όμως προϋποθέτει ότι τα εκτρεφόμενα ψάρια θα εμφανίσουν καλό ρυθμό ανάπτυξης ο οποίος εξαρτάται και αυτός με την σειρά του από διάφορους παράγοντες που ένας τους είναι η παρεχόμενη τροφή.

Στην Δύση το κόστος των τροφών αντιπροσωπεύει το 50 - 60% των ετήσιων εξόδων μιας ιχθυοκαλλιέργειας (Λεονάρδος, 1996). Το πλέον ακριβό συστατικό των τροφών είναι οι πρωτεΐνες που αυτές περιέχουν.

Ανάλογα με το είδος του εκτρεφόμενου ψαριού η παρεχόμενη τροφή πρέπει να περιέχει περισσότερες ή λιγότερες πρωτεΐνες οπότε αναζητούνται συνεχώς νέα είδη για εκτροφή που να έχουν καλή ανάπτυξη, να διατίθενται εύκολα στην αγορά και να έχουν κατά το δυνατό, χαμηλό κόστος εκτροφής (Παπουτσόγλου, 1995). Στον Ελληνικό χώρο μερικά από τα είδη που εκτρέφονται πειραματικά είναι τα: *Mugil cephalus*, *Diplodus sargus*, *Pagrus pagrus* και το είδος πάνω στο οποίο έγιναν τα πειράματα από τα οποία προέκυψαν οι αναλύσεις που αποτελούν την βάση αυτής της εργασίας, το *Puntazzo puntazzo* (ΑΤΕ, 1995).

Η πρώτη από τις προαναφερθείσες αναλύσεις είχε σχέση με την συμπεριφορά του ενζύμου Phosphofructokinase (PFK) και συγκεκριμένα με τις μεταβολές που παρουσιάζονται στην δραστηριότητα του όταν τα ψάρια ταΐζονται με δίαιτες διαφορετικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες.

1.2 Ένζυμα

Τα ένζυμα είναι πολυπεπτίδια δηλαδή αποτελούνται από αμινοξέα ενωμένα με συγκεκριμένη σειρά. Δρουν στις διάφορες χημικές αντιδράσεις ως καταλύτες δηλαδή αυξάνουν την ταχύτητα με την οποία πραγματοποιείται μια αντίδραση μέσω της μείωσης της ενέργειας ενεργοποίησης της αντίδρασης.

Το παραπάνω επιτυγχάνεται με βάση την αρχή της “ενδιάμεσης καταλύσεως”. Δηλαδή πρώτα σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα ενζύμου -υποστρώματος το οποίο ύστερα μετατρέπεται σε ένα σύμπλεγμα ενζύμου -προϊόντος το οποίο στο τέλος δίσταται σε ένζυμο και προϊόν. Το ένζυμο κατόπιν είναι ικανό να δεσμευθεί με ένα άλλο μόριο υποστρώματος.

Η ενέργεια ενεργοποίησης που απαιτείται για το κάθε ένα από αυτά τα στάδια είναι πολύ μικρή σε σχέση με εκείνη που απαιτείται για ολόκληρη την μη καταλυόμενη αντίδραση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το να γίνονται οι αντιδράσεις που αποτελούν τον μεταβολισμό των ζώντων οργανισμών σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες κάνοντας δυνατή την ύπαρξη ζωής.

Η γενική αρχή με την οποία τα ένζυμα επηρεάζουν το υπόστρωμα είναι η εξής: Ένα συγκεκριμένο τμήμα του ενζύμου αποτελεί το ενεργό κέντρο το οποίο έχει τη μορφή σχισμής ή αύλακας, σε αυτό δεσμεύεται το υπόστρωμα ή τα δύο υποστρώματα (όταν έχουμε αντίδραση μεταξύ δύο υποστρωμάτων). Λόγω της διαμόρφωσης αυτού του τμήματος είναι δυνατή η αλληλεπίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα από τρεις πλευρές πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή της χωροδιατάξεως του ενζύμου άρα και την πρόκληση τάσεως στο μόριο του υποστρώματος. Επί πλέον

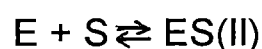
πλησιάζουν το υπόστρωμα δραστικές ομάδες, όπως είναι οι δότες και οι αποδέκτες πρωτονίων, οι οποίες διευκολύνουν τον σχηματισμό ενδιάμεσων καταστάσεων και τη γρήγορη αντίδραση.

Στην περίπτωση που αντιδρούν δύο υποστρώματα είναι πολύ σημαντικός ο τρόπος με τον οποίο τοποθετούνται το ένα ως προς το άλλο καθώς και το ότι πλησιάζουν το ένα το άλλο. Σε πολλά ένζυμα η σειρά δεσμεύσεως των υποστρωμάτων είναι αυστηρά καθορισμένη.

Η δραστικότητα των ενζύμων μετράται σε “διεθνείς μονάδες”. Μια τέτοια μονάδα αντιστοιχεί σε μετατροπή 1μΜοι υποστρώματος ανά λεπτό υπό καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας, συγκέντρωσης υποστρώματος, συμπαραγόντων, ρυθμιστικών.

Αφού θεωρούμε ότι το ένζυμο και το υπόστρωμα σχηματίζουν σύμπλεγμα μπορούμε να θεωρήσουμε την αντίδραση:

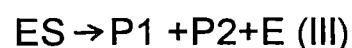
Ένζυμο+Υπόστρωμα Σύμπλεγμα ενζύμου-Υποστρώματος
ή αλλιώς



Με βάση το νόμο της δράσεως των μαζών, έχουμε

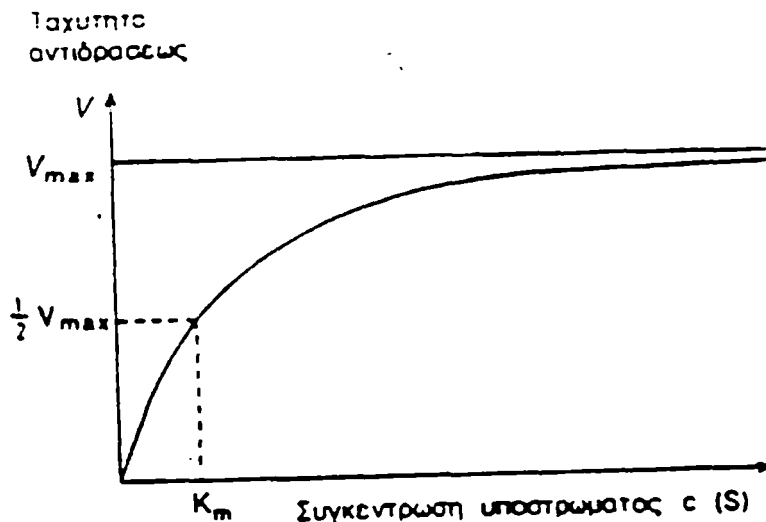
$$\frac{[E] \cdot [S]}{[E \cdot S]} = K_s$$

Αφού η ενζυμική κατάλυση μας αποδίδει προϊόντα μπορούμε να θεωρήσουμε ότι αυτά σχηματίζονται με βάση την παρακάτω αντίδραση



όπου P1 ,P2 είναι τα προϊόντα και E το αναγεννόμενο ένζυμο. Θεωρείται όμως από τους Michaelis και Menten ,οι οποίοι μελέτη-

σαν την κινητική των ενζύμων ότι η αντίδραση (III) προχωρεί πολύ αργά. Οπότε κάνοντας την γραφική παράσταση της ταχύτητας της αντίδρασης σε σχέση με την συγκέντρωση του υποστρώματος θα πάρουμε την παρακάτω εικόνα



Η παραπάνω εικόνα μας δείχνει ότι αν η συγκέντρωση του υποστρώματος αυξάνει, το ένζυμο θα μετατρέπεται στο σύμπλεγμα ES και η ταχύτητα της αντιδράσεως θα αυξάνει μέχρις ότου όλο το ένζυμο να χρησιμοποιηθεί στο σχηματισμό του συμπλέγματος ES. Τότε το ένζυμο θα έχει κορεστεί και η ταχύτητα της αντιδράσεως θα είναι μέγιστη.

Πρακτικά κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει γιατί μέρος του συμπλέγματος ES θα έχει διασπασθεί για να δώσει το αναγεννημένο ένζυμο και τα προϊόντα της αντιδράσεως.

Για αυτό το λόγο δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη μέγιστη ταχύτητα με την οποία ένα ένζυμο δεσμεύεται σε διαφορετικά υποστρώματα ή διαφορετικά ένζυμα δεσμεύονται στο ίδιο υπό-

στρωμα για να κάνουμε συγκρίσεις. Οπότε για να συγκρίνουμε τα διάφορα ένζυμα μεταξύ τους ή τα διάφορα υποστρώματα ως προς ένα ένζυμο χρησιμοποιούμε τη σταθερά Michaelis η οποία είναι η σταθερά διαστάσεως του συμπλέγματος ενζύμου - υποστρώματος στην αντίδραση (I) όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι τέτοια που να μας δίνει ταχύτητα ίση με το μισό της μέγιστης ταχύτητας της αντιδράσεως. Μεγάλη τιμή της σταθεράς Michaelis σημαίνει ότι για να δεσμευθεί η μισή ποσότητα ενζύμου στο υπόστρωμα χρειαζόμαστε υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος άρα το ένζυμο και το υπόστρωμα έχουν μικρή συγγένεια.

Την δραστηριότητα των ενζύμων επηρεάζουν οι εξής παράγοντες

1] **Θερμοκρασία.** Επηρεάζει η αύξηση της τα ένζυμα με δύο τρόπους αφ' ενός αυξάνει η δραστηριότητα τους αφ' ετέρου προκαλεί αλλαγές στην δομή της ενζυμικής πρωτεΐνης καθιστώντας την ανενεργό. Αυτό σημαίνει ότι το μόριο λειτουργεί μόνο μεταξύ ενός κατώτερου και ενός ανώτερου ορίου θερμοκρασίας σημειώνοντας ένα μέγιστο δραστηριότητας σε ένα συγκεκριμένο σημείο της περιοχής λειτουργίας.

2] **pH.** Σε ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών του pH κάθε ένζυμο λειτουργεί όπως πρέπει ,αυτό έχει να κάνει με την ανταλλαγή μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος φορτισμένων σωματιδίων (όπως είναι τα υδρογονοκατιόντα) οπότε η αφθονία ή η έλλειψη αυτών καθορίζει την ικανότητα αποβολής ή αναπρόσληψης τους από το ένζυμο δηλαδή την ικανότητα του να αναγεννηθεί μετά την κατεργασία του υποστρώματος.

την από το βέλτιστο. Διάφορες θεωρίες έχουν αναπτυχθεί σχετικά με το πως το ψάρι αντιδρά σε αυτό το πρόβλημα.

Πιθανό είναι το να μην καταπίνει καθόλου νερό κατά τη διάρκεια της πέψεως ή ίσως να παράγει επιπλέον οξύ για να καταστήσει όξινο το νερό. Ορισμένα ψάρια όπως οι πέστροφες περνούν το νερό μέσα από ένα περιορισμένο τμήμα του στομάχου επειδή έχουν τον οισοφάγο και τον πυλωρό πολύ κοντά τοποθετημένους.

Τέλος κάποια ψάρια πέπτουν το φαγητό περιβαλλόμενο από ένα στρώμα βλέννας ,πεψίνης και οξέος το οποίο δημιουργεί μια ζώνη με σταθερό pH.

1.3.3 Το έντερο

Σε γενικές γραμμές είναι ένας σωλήνας που αρχίζει από μια βαλβίδα στο τέλος του στομάχου και τελειώνει σε μια βαλβίδα στον πρωκτό. Όμως μεταξύ των διαφόρων ειδών ψαριών υπάρχουν κάποιες διαφοροποιήσεις.

Επί παραδείγματος χάρη στα σολομονοειδή υπάρχουν κοντά στην αρχή του εντέρου τα πυλωρικά τυφλά τα όποια είναι προεξοχές του εντέρου που μοιάζουν με δάχτυλα και στο τέλος τους είναι κλειστές. από απόψεως δομής και ενζύμων είναι παρόμοια με το έντερο πράγμα που σημαίνει ότι χρησιμοποιούνται για να αυξάνουν την επιφάνεια του εντέρου. Μερικές φορές οι προεκβολές περιλαμβάνουν πρωκτικά τυφλά που έχουν απορροφητικό ρόλο καθώς και μια κατά μήκος ραχιαία αναδίπλωση που αυξάνει την απορροφητική επιφάνεια και μια ποικιλία πτυχώσεων και αναδιπλώσεων του βλεννώδους επιθηλίου οι οποίες αυξάνουν και την εκκριτική και την απορροφητική επιφάνεια. Σε περιόδους νηστείας οι πτυχώσεις κα-

θώς και η διάμετρος και το μήκος του εντέρου μειώνονται. Λάχνες δεν υπάρχουν στο έντερο των ψαριών αλλά σε ορισμένα τμήματα του μπορεί να υπάρχουν βλεφαρίδες.

Οι εκκρίσεις στο έντερο των ψαριών περιλαμβάνουν τις τρεις κύριες κατηγορίες ενζύμων, πρωτεάσες, λιπάσες, καρβονυδρατάσες οι οποίες υδρολύουν τις τρεις κύριες κατηγορίες θρεπτικών συστατικών. Επίσης εκκρίνεται βλέννα και πιθανόν και υδροξείδιο του ασβεστίου από το πάγκρεας για να ουδετεροποιήσει το γαστρικό HCL.

Τα εκκριτικά κύτταρα του ψαριού σχηματίζονται στα βάθη των πτυχώσεων του εντέρου και μετά μεταναστεύουν στις κορυφές τους όπου και εκκρίνουν τα προϊόντα τους (Smith, 1982). Η τρυψίνη είναι το κυριότερο πρωτεολυτικό ένζυμο του εντέρου και είναι ενεργή σε τιμές pH 7 με 11. Πιθανόν το μεγαλύτερο ποσό της τρυψίνης να παράγεται στο πάγκρεας και ένα ποσοστό αυτής να παράγεται από τα εκκριτικά κύτταρα του εντέρου.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση της τρυψίνης μπορεί να γίνεται από ένα άλλο ένζυμο την εντεροκινάση.

Η πρωτεολυτική δραστηριότητα είναι ισχυρότερη στα σαρκοφάγα ψάρια σε σχέση με τα φυτοφάγα.

Η λιπολυτική δραστηριότητα είναι εμφανής σε εκκρίσεις του παγκρέατος, του εντέρου και των πυλωρικών τυφλών του ψαριού.

Τα ένζυμα που υδρολύουν τους υδατάνθρακες είναι ιδιαίτερα άφθονα στα φυτοφάγα ψάρια και βρίσκονται πάντα σε επίπεδα ανώτερα από αυτά των σαρκοφάγων ψαριών (Smith, 1982).

Στην αρχή περίπου του εντέρου εισέρχεται η χολή η οποία βοηθά την πέψη και την απορρόφηση των λιπιδίων και των θρεπτικών

συστατικών που σχετίζονται με τα λίπη όπως είναι οι λιποδιαλυτές βιταμίνες (A,D, E και K). Η σύσταση της είναι ένα μίγμα οργανικών και ανόργανων αλάτων που παράγονται στο συκώτι ως προϊόντα του καταβολισμού της αιμογλοβίνης και της χοληστερόλης.

Τα νεύρα που απολήγουν στον πεπτικό αγωγό είναι κλάδοι των εβδόμου, ενάτου και δεκάτου κρανιακών νεύρων. Τα πρώτα δύο απολήγουν στο στόμα και τον οισοφάγο ενώ το τρίτο σε όλες τις ενδότερες περιοχές. Αυτά τα νεύρα θεωρούνται μέρος του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος το οποίο συνήθως ερεθίζει τα εσωτερικά όργανα.

Ένα μόνο σπλαχνικό νεύρο βρέθηκε στο πρόσθιο μέρος να πηγαίνει προς το στομάχι και το έντερο ενώ δύο οπίσθια σπλαχνικά νεύρα καταλήγουν στο ορθό. Αυτά τα τρία φαίνεται ότι είναι μέρος του συμπαθητικού συστήματος και είναι σε γενικές γραμμές αντιερεθιστικά.

Υπάρχουν επίσης και αρκετά νεύρα τα οποία βρίσκονται εξ' ολοκλήρου στο έντερο και σχηματίζουν δίκτυα τα οποία φαίνεται ότι αποτελούν την ανατομική βάση για την ανακλαστική περίσταληση. Από διάφορες μελέτες που έγιναν στο έντερο φάνηκε ότι η περίσταληση του εντέρου έπαυε με την επίδραση της αδρεναλίνης και ενεργοποιούταν με την επίδραση της ακετυλοχολίνης. Επίσης το τέντωμα του εντέρου από την πλήρωση του με νερό ενεργοποιούσε την περίσταληση μάλιστα με τρόπο τέτοιο που η περισταλτική συστολή να είναι ανάλογη του τεντώματος. Από αυτές τις μελέτες φάνηκε ότι η περίσταληση των τελεοστεων είναι ένα ανακλαστικό που οφείλεται στην δραστηριότητα ενός εσωτερικού νευρικού πλέγματος του εντερικού τοιχώματος καθώς και ότι η κίνηση των τοιχωμάτων ήταν αποτέλεσμα της διαστολής και της συστολής των

επίμηκων και των στρογγυλών στρωμάτων των λείων μυϊκών ινών του εντέρου.

Μια άλλη μορφή μεταφοράς κατά μήκος του εντέρου φαίνεται να είναι αυτή που υποβοηθάται από τριχίδια η οποία είναι πιο συχνή σε μικρά ψάρια ή σε ψάρια στα νυμφικά στάδια. Όταν τα ψάρια ενηλικιώνονται τα τριχίδια εξαφανίζονται.

Η παύση της περίστασης καλείται στάσις του εντέρου, στα θηλαστικά συμβαίνει κατά την διάρκεια περιόδων έντονου στρες. Στα Salmonidae θεωρείται ότι κατά την διάρκεια ξεσπασμάτων ασθενειών η στάση του εντέρου βοηθά τα παθογόνα μικρόβια του εντέρου να εισέλθουν στο εσωτερικό του ψαριού μέσω των τοιχωμάτων του εντέρου που εξασθενούν από την δράση των πεπτικών ενζύμων του ψαριού.

Σε περιπτώσεις ψαριών που έχαναν πολλά λέπια συνέβαινε στάση του εντέρου οπότε το πλούσιο σε ιόντα μαγνησίου υγρό που αποβαλλόταν μέσω του πρωκτού παρέμενε στο έντερο. Κατόπιν απορροφούταν όλο ανεβάζοντας το επίπεδο των ιόντων μαγνησίου στο πλάσμα σε σημείο τέτοιο που να μπλοκάρονται οι μυονευρικές συνάψεις των ψαριών και τα ψάρια να πεθαίνουν από ασφυξία οφειλόμενη στην παράλυση των μυών της αναπνευστικής αντλίας (Smith, 1982).

Στο εντερικό τοίχωμα ξέρουμε ότι υπάρχουν λευκοκύτταρα καθώς και λεμφοειδή κύτταρα τα οποία αποτελούν τον τρόπο αντίδρασης του οργανισμού σε κάποιες πρωτεΐνες τις οποίες χαρακτηρίζει ως αντισώματα. Όπως ξέρουμε το εντερικό επιθήλιο απορροφά ολόκληρες πρωτεΐνες από τις οποίες όσες αναγνωρίζονται ως θρεπτικά συστατικά απορροφούνται από μεγάλα supernuclear κε-

νοτόπια των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων στα οποία και πέπτονται. Αυτές που αναγνωρίζονται ως αντιγόνα απελευθερώνονται στο ενδοκυτταρικό διάστημα μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων όπου υπάρχουν τα λεμφοειδή κύτταρα.

1.3.4 Το πάγκρεας

Το πάγκρεας των περισσότερων τελεόστεων είναι διάχυτο, σε αντίθεση με τους χονδριχθείς και αποτελείται από τμήματα παγκρεατικού ιστού διασκορπισμένα στο μεσεντέριο μέρος του ψαριού. Κάθε τμήμα είναι εφοδιασμένο με μια αρτηρία ,φλέβα ,ένα νεύρο και ένα παγκρεατικό αγωγό, συνήθως αυτοί οι αγωγοί συνενώνονται με τον αγωγό της χοληδόχου κύστεως. Το πάγκρεας παράγει ινσουλίνη που ενεργοποιεί την λήψη των αμινοξέων από το έντερο καθώς και εκκρίσεις που βοηθούν την πέψη κυρίως πρωτεΐνες και δικαρβονικά οξέα.

1.3.5 Η απορρόφηση

Η απορρόφηση στο έντερο μπορεί να γίνει είτε με απλή διάχυση είτε με ενεργό μεταφορά συγκεκριμένων μορίων.

Οι πρωτεΐνες μπορούν να απορροφηθούν είτε ως πεπτίδια είτε ως ελεύθερα αμινοξέα. Από έρευνες βρέθηκε ότι το μεσαίο τμήμα του εντέρου της νύμφης του ψαριού *Clarias lazera* απορροφούσε πρωτεϊνικά μόρια με την διαδικασία της πινοκύτωσης (Smith, 1982). Είναι επίσης γνωστό ότι η πέστροφα έχει κοκκιόμορφα κύτταρα ακριβώς κάτω από το βλεννώδες επιθήλιο τα οποία μπορεί να παίζουν ρόλο στην λήψη των πρωτεϊνών.

Οι μελέτες πάνω στην πρόσληψη των αμινοξέων έδειξαν ότι κάθε αμινοξύ έχει τα δικά του χαρακτηριστικά, για παράδειγμα η πρόσληψη της λυσίνης μειωνόταν όταν υπήρχε γλυκόζη και αυξανόταν όταν υπήρχε ATP (Smith, 1982). Το μεγαλύτερο μέρος των αμινοξέων απορροφάται στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου ενώ μέρος από αυτά απορροφάται στο στομάχι και σε ορισμένες δίαιτες και στο οπισθέντερο.

Σχετικά με τα λιπίδια ο Brockerhoff (1967) και ο Scerbina (1973) όπως αναφέρει στο βιβλίο του ο Halver έδειξαν ότι αυτά προσλαμβάνονται από το επιθήλιο του εντέρου και των πυλωρικών τυφλών εν μέρει ως λιπαρά οξέα κυρίως όμως ως μονό- και διγλυκερίδια και ένα τμήμα τους ως σταγονίδια ύστερα όλα μεταφέρονται στο αίμα και την λέμφο. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μεταφέρονται ως χηλομικρά και όχι ως μόρια και εμφανίζονται κυρίως ως τριγλυκερίδια. Στα επιθηλιακά κύτταρα του προσεντέρου και των πυλωρικών τυφλών παρατηρήθηκε ο σχηματισμός λιπιδίων πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) τα οποία τελικά περνούσαν στα λεμφικά αγγεία. Ο

μηχανισμός της εστεροποίησης των μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων για την παραγωγή σωματιδίων VLDL καθώς και η μεταφορά τους από τα επιθηλιακά κύτταρα στα λεμφικά αγγεία γινόταν όπως και στα θηλαστικά απλά με πιο αργό ρυθμό.

Η μεταφορά των υδατανθράκων μετρήθηκε μέσω της λήψης της γλυκόζης και βρέθηκε να είναι υψηλή στα φυτοφάγα ψάρια, μέση στα παμφάγα και χαμηλή στα σαρκοφάγα.

Το οπίσθιο τμήμα του εντέρου απορροφά περίπου το 1/20 του συνόλου των απορροφούμενων αμινοξέων και κατά πάσα πιθανότητα επαναπορροφά τα πρωτεολυτικά ένζυμα μια και αυτά ενώ δεν αυτολύονται εύκολα δεν βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα κόπρανα (Smith, 1982).

1.4 Ενδιάμεσος μεταβολισμός

1.4.1 Μεταβολισμός των υδατανθράκων

Οι υδατάνθρακες συνιστούν το μεγαλύτερο μέρος των οργανικών ουσιών στη γη, το μόριό τους αποτελείται από άτομα άνθρακα (C), υδρογόνου (H) και οξυγόνου (O) και η χημική τους σύσταση δείχνει να είναι μόρια διοξειδίου του άνθρακα επί ένα ή περισσότερα μόρια νερού. Στους ζωικούς οργανισμούς οι υδατάνθρακες ως πηγές ενέργειας βρίσκονται είτε με την μορφή της γλυκόζης ή με την μορφή του γλυκογόνου το οποίο είναι πολυμερές της γλυκόζης.

Το γλυκογόνο συντίθεται στο ήπαρ από την ουρινοδιφωσφορική - γλυκόζη (UDP - Glc). Απαιτείται αρχικά η ύπαρξη ενός ενεργητικού μορίου το οποίο είναι μια πολυπεπτιδική αλυσίδα στην οποία προστίθενται αλυσίδες ολιγοσακχαριτών με την βοήθεια του κατάλληλου ενζύμου. Στις αλυσίδες αυτές ένα άλλο ένζυμο η κυρίως συνθετάση του γλυκογόνου μεταφέρει τις γλυκοζυλομάδες από την UDP - Glc στις αλυσίδες σε $1 \rightarrow 4$ δεσμό και έτσι επιμηκύνεται διαδοχικά η αλυσίδα κατά μια μονάδα γλυκόζης. Οι διακλαδώσεις σχηματίζονται με την δράση της γλύκανο - 1,6 - τρανσφεράσης (ένζυμο Q) το οποίο αποσπά μια αλυσίδα μήκους 6 -7 μονάδων από τον $1 \rightarrow 4$ δεσμό και την συνδέει στο 6 - υδροξύλιο μιας γλυκοζυλικής ομάδας. Η UDP - Glc βρέθηκε όμως να υπάρχει στο ήπαρ του κυπρίνου και της πέστροφας σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Στο ήπαρ των ψαριών μόνο η μισή περίπου συνθετική δραστηριότητα σχετιζόταν με το γλυκογόνο ενώ στο ήπαρ των ποντικών σχεδόν όλη η συνθετική δραστηριότητα σχετιζόταν με το μόριο του γλυκογόνου. Επίσης σε ομογενοποιήσεις ήπατος ποντικών δεν ήταν δυνατό να βρεθεί μόριο του ενζύμου που να μην σχετίζεται με το γλυκογόνο ενώ κάτι τέτοιο δεν συνέβαινε στις πέστροφες (Halver,

1989). Τα παραπάνω δείχνουν ότι η συγγένεια μεταξύ της συνθέ-
τάσης του γλυκογόνου και του γλυκογόνου ήταν μεγαλύτερη στα
ποντίκια από ότι στις πέστροφες. Το ένζυμο που υπήρχε στις πέ-
στροφες εμφάνιζε μεγαλύτερη δραστικότητα όταν υπήρχαν ιόντα
μαγνησίου και ασβεστίου μα παρεμποδιζόταν από τα φωσφορικά
και τα θειικά ιόντα. Επίσης ενεργοποιούταν από την 6 - φωσφορική
γλυκόζη αλλά έδειχνε μεγαλύτερη δραστικότητα όταν οι συγκε-
ντρώσεις του υποστρώματος ήταν άνω του 1mM. Μελέτες σε πο-
ντίκια έδειξαν ότι υπό κανονικές συνθήκες επαναδιατροφής ο κα-
νονικός όγκος του ηπατικού γλυκογόνου σχηματίζεται από ένα έμ-
μεσο δρόμο ακολουθώντας την πορεία γλυκόζη → γαλακτικό οξύ
→ 6 - φωσφορική γλυκόζη → γλυκογόνο.

Η αποδόμηση του γλυκογόνου γίνεται με την βοήθεια της φω-
σφορυλάσης του γλυκογόνου η οποία βρίσκεται σε δύο μορφές την
α που είναι η ενεργός και η β που είναι η ανενεργός. Το ένζυμο
μπορεί να μετατραπεί στη μια ή στην άλλη μορφή. Στην α μετατρέ-
πεται με φωσφορυλίωση μέσω της κινάσης της μορφής β ενώ στην
β μετατρέπεται με αποφωσφορυλίωση μέσω της φωσφατάσης της
μορφής α. Κατά την αποδόμηση παράγεται η 1 - φωσφορική γλυ-
κόζη όμως επειδή κατά την διαδικασία της αποδομήσεως με την
φωσφορυλάση παραμένουν στο μόριο τέσσερις ομάδες γλυκόζης
πρίν από την θέση διακλαδώσεως οι τρεις από αυτές μεταφέρονται
με την βοήθεια της τρανς - γλυκοζυλάσης σε μια άλλη αλυσίδα σε
θέση 1 → 4. Στο σημείο διακλαδώσεως παραμένει μόνο μια μονά-
δα γλυκόζης δεμένης με δεσμό 1 → 6 που αποσπάται υδρολυτικά
με την βοήθεια του ενζύμου άμυλο - 1 ,6 γλυκόζιτάση.

Στις πέστροφες το ηπατικό γλυκογόνο εξυπηρετεί ως πηγή
γλυκόζης για το αίμα μόνο όταν οι θερμοκρασίες του περιβάλλο-

ντος είναι υψηλές ,σε χαμηλές θερμοκρασίες η γλυκόζη του αίματος παρέχεται από την γλυκονεογέννεση (Halver, 1989).

1.4.1^ο Η γλυκόζη

Η γλυκόζη εισέρχεται στον οργανισμό μέσω των τροφών και αξιοποιείται από αυτόν για την παραγωγή των περισσότερων από τους υδατάνθρακες που βρίσκονται στους ζωικούς ιστούς. όμως και ο οργανισμός μπορεί να παράγει γλυκόζη μέσω της ανασύνθεσης της από το γαλακτικό οξύ το οποίο με την σειρά του παράγεται από την αναερόβια διάσπαση της. Ο χώρος στον οποίο πραγματοποιείται η όλη διαδικασία είναι το ήπαρ και ίσως και το νεφρό των ψαριών. Η ποσότητα που ανασυντίθεται είναι ίση με τα 3/4 του γαλακτικού οξέως.

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής: Από το γαλακτικό οξύ με οξείδωση σχηματίζεται πυροσταφυλικό το οποίο με την βοήθεια του ενζύμου πυροσταφυλική καρβοξυλάση μετατρέπεται σε οξαλοξικό. όμως επειδή το οξαλοξικό παράγεται στα μιτοχόνδρια από όπου πρέπει να εξέλθει γίνεται είτε η τρανσαμίνωση του σε ασπαργανικό ή σε μικρότερο βαθμό η αναγωγή του σε μηλικό. Η αντίστροφη διαδικασία συμβαίνει έξω από τα μιτοχόνδρια και ύστερα το παραγόμενο οξαλοξικό φωσφορυλιώνεται με δότη φωσφόρου το ATP και με ένζυμο την φωσφοενολο - πυροσταφυλική καρβοξυκινάση σχηματίζοντας το φωσφοενολο - πυροσταφυλικό οξύ. Ύστερα η ενολάση καταλύει την προσθήκη του νερού στο 2 - φωσφογλυκερινικό και μετά μετακινείται η φωσφορική ομάδα και παίρνουμε το 3 - φωσφογλυκερινικό. Το φωσφογλυκερινικό φωσφορυλιώνεται με ATP προς 1 ,3 -διφωσφογλυκερινικό το οποίο ανάγεται σε φωσφορική τριόζη με την δράση της αφυδρογονάσης της φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης. Μετά η ισομεράση της τριόζης και η αλδο-

λάση προκαλούν την μετατροπή της φωσφορικής τριόζης σε 1,6 - διφωσφορική φρουκτόζη. Τέλος με την δράση μιας φωσφατάσης η 1,6 - διφωσφορική φρουκτόζη μετατρέπεται σε 1 - φωσφορική φρουκτόζη.

Η 6 - φωσφορική φρουκτόζη βρίσκεται σε ισορροπία με την 6 - φωσφορική γλυκόζη η οποία μπορεί μέσω της 1 - φωσφορικής γλυκόζης να μετατραπεί σε γλυκογόνο ή με την δράση της φωσφατάσης της 6 - φωσφορικής γλυκόζης σε γλυκόζη. Το γαλακτικό οξύ που δεν μετατρέπεται σε γλυκόζη καίγεται για να δώσει την απαιτούμενη ενέργεια.

Υπάρχει επίσης η δυνατότητα για την σύνθεση γλυκόζης από αμινοξέα. Πρώτα τα αμινοξέα μετατρέπονται σε C4 δικαρβοξυλικά οξέα και ύστερα αυτά τα αμινοξέα συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος παράγοντας οξαλοξικό. Από αυτό το σημείο και μετά ακολουθείται το μονοπάτι της γλυκονεογενέσεως.

Στα ψάρια η γλυκονεογέννεση έχει τριπλό ρόλο

- 1] Ανακυκλώνει το γαλακτικό οξύ των μυών.
- 2] Συνθέτει γλυκόζη από τα διαιτητικά αμινοξέα ως συμπλήρωμα της δίαιτας.
- 3] Παράγει γλυκερόλη για την λιπογέννεση.

Για να χρησιμοποιηθεί η γλυκόζη που βρίσκεται εντός του οργανισμού χρησιμοποιείται η διαδικασία της γλυκολύσεως. Η γλυκόλυση μπορεί να γίνει είτε υπό αερόβιες συνθήκες όπως είναι αυτές που επικρατούν στα κύτταρα του ερυθρού γραμμωτού μυ είτε υπό αναερόβιες συνθήκες όπως είναι αυτές που επικρατούν στα κύτταρα του λευκού γραμμωτού μυ. Η διαδικασία έχει ως εξής η γλυκόζη από το αίμα μεταφέρεται στα κύτταρα και φωσφορυλιώνε-

ται στην θέση 6. Ο φώσφορος προσφέρεται από το ATP με την δράση δύο ενζύμων της εξοκινάσης και της γλυκοκινάσης. Η 6 - φωσφορική γλυκόζη που είναι και το προϊόν της πιο πάνω αντίδρασης με την δράση της φωσφοεξοζο - ισομεράσης μετατρέπεται σε 6 -φωσφορική φρουκτόζη κατά το 1/3. Με την δράση μιας άλλης κινάσης της φωσφοφρουκτοκινάσης φωσφορυλιώνεται η 6 - φωσφορική φρουκτόζη και μετατρέπεται σε 1,6 - διφωσφορική φρουκτόζη η οποία κόβεται από μια αλδολάση σε δύο τριόζες τη φωσφορική διυδροξυακετόνη (C1 - C3) και τη φωσφορική γλυκεριναλδεΰδη (C4 -C6). Το 1/10 της 1,6 - διφωσφορικής φρουκτόζης κόβεται σε τριόζες από τις οποίες το 96% είναι φωσφορική διυδροξυακετόνη η οποία μετατρέπεται σε φωσφορική γλυκεριναλδεΰδη από το ένζυμο ισομεράση της φωσφορικής τριόζης όταν η συγκέντρωση της δεύτερης μειωθεί ως προς την συγκέντρωση της πρώτης. Το επόμενο βήμα είναι η αφυδρογόνωση της φωσφορικής γλυκεριναλδεΰδης η οποία μας δίνει ως παράγωγο το 3 - φωσφογλυκερυλο -1 - φωσφορικό. ύστερα με την δράση του ενζύμου φωσφογλυκερινική κινάση η φωσφορική ομάδα από τον C1 άνθρακα μεταφέρεται στο ADP με αποτέλεσμα την παραγωγή 3 - φωσφογλυκερινικού και ATP. Το 3 - φωσφογλυκερινικό οξύ με την δράση του ενζύμου μούτάση του φωσφογλυκερινικού και με συνυπόστρωμα το 2,3 - διφωσφογλυκερινικό μετατρέπεται σε 2 - φωσφογλυκερινικό. Κατόπιν απομακρύνεται από αυτό νερό με την δράση μιας ενολάσης και λαμβάνουμε το φωσφοενολοπυροσταφυλικό. Απο αυτό με την δράση μιας πυροσταφυλικής κινάσης μεταφέρεται φώσφορος στο ADP σχηματίζοντας ένα ATP και από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό προκύπτει το πυροσταφυλικό οξύ.

Εδώ τελειώνει η αερόβια διάσπαση της γλυκόζης, η αναερόβια συνεχίζει ως εξής με την δράση του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση αναγεται το πυροσταφυλικό οξύ σε γαλακτικό οξύ με δότη υδρογόνου το κατιόν NADPH.

Στα ψάρια η γλυκολυτική δραστηριότητα εμφανίζεται πιο έντονη στους καρδιακούς και γραμμωτούς μυς ενώ λιγότερο έντονη στο ήπαρ και στο νεφρό. Από τις μέχρι τώρα παρατηρήσεις γνωρίζουμε ότι η αποδόμηση του γλυκογόνου στο ήπαρ των ψαριών προχωρά πολύ αργά ακόμη και υπό συνθήκες νηστείας ενώ η δραστηριότητα της εξοκινάσης που παράγει την 6 - φωσφορική γλυκόζη είναι η χαμηλότερη από όλων των ενζύμων του γλυκολυτικού κύκλου (Halver, 1989).

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η αδυναμία των ψαριών να ασκήσουν έλεγχο στην γλυκόζη του αίματος οφείλεται στην αδυναμία του ήπατος να φωσφορυλιώσει την γλυκόζη.

Εκτός από την γλυκόλυση υπάρχουν και άλλα μονοπάτια για τον καταβολισμό της γλυκόζης, όπως είναι ο κύκλος των φωσφορικών πεντοζών.

Με αυτόν γίνεται στους ζωικούς οργανισμούς η μετατροπή των εξοζών σε ριβόζη που είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό των νουκλεϊνικών οξέων και των συνενζύμων που περιέχουν νουκλεοτίδια. Ένας τρόπος για να προχωρήσει αυτός ο κύκλος είναι η μη οξειδωτική μετατροπή των εξοζών σε πεντόζες. Αυτή αρχίζει με την μεταφορά διανθρακικής ομάδας από την 6 - φωσφορική φρουκτόζη στην 3 - φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη οπότε παράγεται η 5 - φωσφορική ξυλουλόζη και η 4 - φωσφορική ερυθρόζη. Ύστερα από ένα άλλο μόριο 6 - φωσφορικής φρουκτόζης λαμβάνεται μια τριαν-

θρακική ομάδα η οποία προσφέρεται στην 4 - φωσφορική ερυθρόζη. Ως προϊόντα λαμβάνονται η 7 - φωσφοσεδοππουλόζη και η 3 - φωσφορική γλυκεριναλδεΰδη μετά με την μεταφορά μιας διανθρακικής ομάδας τα αμέσως προηγούμενα μετατρέπονται σε 5 - φωσφορική ριβόζη και 5 - φωσφορική ξυλουλόζη η οποία μετατρέπεται σε 5 - φωσφορική ριβουλόζη και ύστερα σε 5 - φωσφορική ριβόζη.

Ένας άλλος τρόπος για να προχωρήσει ο κύκλος είναι η άμεση οξειδωση της γλυκόζης.

Αυτή αρχίζει με την αφυδρογόνωση της 6 - φωσφορικής γλυκόζης το υδρογόνο μεταφέρεται στο κατιόν του NADP παράγοντας 6 - φωσφογλυκονολακτόνη. Η γλυκονολακτόνη υδρολύεται προς γλυκονικό οξύ το οποίο αφυδρογονώνεται με την βοήθεια ενός ενζύμου με ταυτόχρονη απόσπαση διοξειδίου του άνθρακα και καταλήγει τελικά σε 5 - φωσφορική ριβουλόζη η οποία υπό την επίδραση της ισομεράσης της 5 - φωσφορικής ριβόζης βρίσκεται σε ισορροπία την 5 - φωσφορική ριβόζη. Ο συγκεκριμένος κύκλος οδηγεί στον σχηματισμό NADPH το οποίο παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τον σχηματισμό των διπλών δεσμών στα ενδιάμεσα της συνθέσεως των λιπαρών οξέων και της 5 - φωσφορικής ριβόζης.

Άλλα μόρια υψηλής σπουδαιότητας που μπορούν να σχηματισθούν από την γλυκόζη είναι το γλυκουρονικό και το ασκορβικό οξύ.

Το γλυκουρονικό σχηματίζεται από UDP - Glc η οποία αφυδρογονώνεται ενώ συγχρόνως ανάγεται το κατιόν του NAD το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή UDP - γλυκουρονικού οξέος. Το συγκεκριμένο οξύ χρησιμοποιείται στην αποτοξικοποίηση ορισμένων ξένων

οργανικών συμπλόκων μέσω της συζεύξεως με αυτά, έχει παρατηρηθεί σύνθεση του στην πέστροφα και σε άλλα είδη. Από το γλυκουρονικό οξύ με την αναγωγή της ημιακεταλικής ομάδας ενζυμικά με το NADPH σαν δότη υδρογόνου παράγεται L - γουλονικό το οποίο αφυδρογονώνεται με την οξειδάση της L - γουνολολακτόνης για να δώσει ασκορβικό. Από τα περισσότερα όμως ψάρια φαίνεται να λείπει το ένζυμο οξειδάση της L - γουνολολακτόνης. Στα κυπρινοειδή έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει το συγκεκριμένο ένζυμο στο ήπατοπάγκρεας και σε μικρότερα ποσά στα νεφρά και τον ερυθρό μυ σε ικανοποιητικά ποσά σε αντίθεση με τον κέφαλο και άλλους τελεόστεους όπου υπάρχει δραστηριότητα του αλλά σε επίπεδα τέτοια που να είναι υπεύθυνο για την σύνθεση μικρού μέρους του απαιτούμενου ημερησίως ασκορβικού οξέος (Halver, 1989).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η γλυκόλυση υπό αναερόβιες συνθήκες οδηγεί στην δημιουργία πυροσταφυλικού οξέος το οποίο οξειδώνεται προς διοξειδίο του άνθρακα και νερό στον κύκλο του κιτρικού οξέος.

Η διαδικασία έχει ως εξής το ακετυλο - CoA το οποίο παράγεται από το πυροσταφυλικό με την δράση του ενζύμου πυροσταφυλική αφυδρογενάση αντιδρά με το οξαλοξικό για τον σχηματισμό του κιτρικού οξέος. Μετά με την επίδραση της υδρατάσης του ακονιτικού καταλύεται η επίτευξη της τελικής ισορροπίας μεταξύ του κιτρικού που αποτελεί το 89% ,ακονιτικού που αποτελεί το 3% και του ισοκιτρικού που αποτελεί το 8%. Με την επίδραση του ενζύμου αφυδρογονάση του κιτρικού παράγεται το 2 - οξογλουταρικό οξύ από το ισοκιτρικό οξύ ,πιθανώς με τον ενδιάμεσο σχηματισμό οξαλο - ηλεκτρικού οξέος το οποίο όμως παραμένει στενά συνδεδεμένο με το ένζυμο οπότε δεν αποτελεί αυτοτελή ενδιάμεση βαθμίδα του κύ-

κλου. Το επόμενο βήμα είναι ο σχηματισμός του ηλεκτρυλο - CoA με την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του 2 - οξογλουταρικού οξέος. Ακολουθεί με την βοήθεια του ενζύμου θειοκινάση του ηλεκτρικού οξέος ο σχηματισμός του ηλεκτρικού οξέος. Κατόπιν ακολουθεί η αφυδρογόνωση του ηλεκτρικού οξέος ,με την βοήθεια του ενζύμου αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος, από την οποία παράγεται φουμαρικό οξύ. Μετά έχουμε την προσθήκη νερού στο φουμαρικό οξύ για την μετατροπή του σε μηλικό με καταλύτη την υδρατάση του φουμαρικού. Τέλος ακολουθεί η αφυδρογόνωση της δευτεροταγούς αλκοολικής ομάδας του μηλικού οξέος με την βοήθεια του ενζύμου αφυδρογονάση του μηλικού οξέος που μεταφέρει το υδρογόνο στο κατιόν NAD με προϊόν το οξαλοξικό οξύ.

1.4.2 Μεταβολισμός αμινοξέων - πρωτεϊνών

Μια άλλη ομάδα θρεπτικών συστατικών τα οποία είναι απαραίτητα για τους ζωικούς οργανισμούς είναι τα αμινοξέα και οι ενώσεις αυτών οι πρωτεΐνες.

Στον οργανισμό παρέχονται μέσω της δίαιτας και του καταβολισμού των πρωτεϊνών του σώματος ο οποίος προμηθεύει λιγότερο από το μισό των αμινοξέων που βρίσκονται διαθέσιμα στο σώμα των ψαριών (Halver, 1989).

Τα μη απαραίτητα αμινοξέα μπορούν να συντεθούν με την μεταφορά αμινοομάδων σε ανθρακικούς σκελετούς που προέρχονται από τον ενδιάμεσο μεταβολισμό. Στα ψάρια τα αμινοξέα χρησιμοποιούνται πρωτίστως για την παραγωγή πρωτεϊνών και αμέσως μετά για την παραγωγή ενέργειας όπου φαίνεται να παίζουν πιο σημαντικό ρόλο από τους υδατάνθρακες. Ο καταβολισμός των πλεοναζόντων αμινοξέων γίνεται στο συκώτι και περιλαμβάνει την απομάκρυνση της αμινοομάδας και τον σχηματισμό ενός α - κετονοξέος. Η μοίρα των κετονοξέων είναι η οξειδωση προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος ο οποίος παράγει ενέργεια.

Το τελικό προϊόν του καταβολισμού των αμινοξέων στους τελεόστεους είναι η αμμωνία της οποίας η μη ιονισμένη μορφή είναι εξαιρετικά τοξική ευτυχώς όμως υπό φυσιολογικό pH το 99% θα υφίσταται στην λιγότερο τοξική ιονισμένη μορφή.

Τα ένζυμα του κύκλου της ουρίας έχουν βρεθεί στους ιστούς των τελεόστεων αλλά μόνο η αργινάση βρέθηκε σε επαρκείς ποσότητες, από αυτό συμπεραίνουμε ότι ο κύκλος της ουρίας δεν έχει μεγάλη αξία στους τελεόστεους (Halver, 1989). Όμως στους χον-

δριχθείς παράγεται κανονικά ουρία για οσμωρυθμιστικούς λόγους της οποίας η τοξικότητα μειώνεται όταν συνυπάρχει με το οξειδίο της τριμεθυλαμίνης κατά αναλογία 2 - 1.

Το μεγαλύτερο μέρος του εκκρινόμενου αζώτου αποβάλλεται μέσω των βραγχίων ενώ το υπόλοιπο μέσω των ούρων, του δέρματος και των κοπράνων. Το 60 με 70% της ολικής παραγωγής αμμωνίας συμβαίνει στο ήπαρ ενώ το υπόλοιπο στο νεφρό και τον μύ (Halver, 1989).

Η εκκρινόμενη αμμωνία προέρχεται κυρίως από τις αμινοομάδες των αμινοξέων μέσω του καταβολισμού τους. Οι ενζυματικοί μηχανισμοί που καταβολίζουν τα αμινοξέα μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριους τύπους.

1] Αυτούς με τους οποίους έχουμε άμεση απαμίνωση και

2] Αυτούς με τους οποίους έχουμε μεταφορά της αμινοομάδας σε ένα κοινό αποδέκτη ο οποίος μετά απαμινώνεται

Η δεύτερη περίπτωση περιλαμβάνει δύο δρόμους. Ο πρώτος είναι η τρανσαμίνωση κατά την οποία έχουμε την μεταφορά μιας αμινοομάδας από ένα αμινοξύ σε ένα κετονοξύ πράγμα που δημιουργεί ένα νέο αμινοξύ με τον ανθρακικό σκελετό του αρχικού κετονοξέος και ένα νέο κετονοξύ με τον αρχικό σκελετό του αρχικού αμινοξέος - δότη. Ύστερα συμβαίνει μια απαμίνωση κατά την οποία στο προκύπτον αμινοξύ δρά η γλουταμινική αφυδρογονάση.

Ο δεύτερος δρόμος είναι πάλι μια τρανσαμίνωση κατά την οποία από ένα αμινοξύ μεταφέρεται μια αμινοομάδα σε ένα κετονοξύ και προκύπτουν ένα νέο αμινοξύ και ένα νέο κετονοξύ. Όμως το προκύπτον αμινοξύ αντιδρά με την μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP) για τον σχηματισμό μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) και φου-

μαρικού. Στο AMP δρά το ένζυμο απαμινάση του αδενυλικού οξέος σχηματίζοντας ξανά IMP και αμμωνία. Αυτός ο δρόμος αποκαλείται κύκλος του νουκλεοτιδίου της πουρίνης.

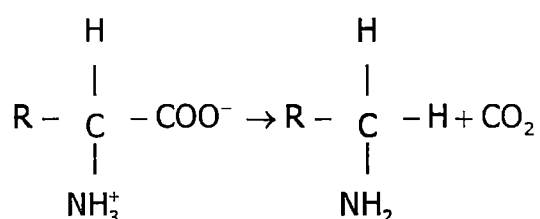
Η πρώτη περίπτωση καταβολισμού των αμινοξέων περιλαμβάνει και αυτή δύο δρόμους.

Ο πρώτος είναι η απαμίνωση η οποία χωρίζεται σε οξειδωτική και μη οξειδωτική.

Στην οξειδωτική ένα ένζυμο δρά πάνω σε ένα αμινοξύ παράγοντας το αντίστοιχο α - κετογλουταρικό οξύ, καυστικό νάτριο και αμμωνία.

Στην μη οξειδωτική ένα ένζυμο αφαιρεί την αμινοομάδα από ένα αμινοξύ ως αμμωνία σχηματίζοντας ένα διπλό δεσμό στον εναπομείναντα ανθρακικό σκελετό.

Ο δεύτερος είναι η αποκαρβοξυλίωση κατά την οποία ορισμένα ένζυμα επιδρούν σε συγκεκριμένα αμινοξέα αναγκάζοντας τα να αποβάλλουν διοξείδιο του άνθρακα και να μετατραπούν σε αμίνες. Ο γενικός τύπος είναι



Τα ένζυμα της απαμινώσεως έχουν μικρές δραστηριότητες στα ψάρια πράγμα που σημαίνει ότι παίζουν μικρό ρόλο στην παραγωγή αμμωνίας. Από αυτό εξαιρείται η γλουταμινική αφυδρογονάση (Halver, 1989).

Ο κύκλος του νουκλεοτιδίου της πουρίνης είναι συνηθισμένος στους μύς ιδιαίτερα στον λευκό γραμμωτό μυ ενώ η τρανσαμίνωση

είναι ο κύριος δρόμος για την παραγωγή αμμωνίας στο ήπαρ των ψαριών. Ο κύκλος της ουρίας δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικός στους τελεόστεους οπότε υποθέτουμε ότι η ουρία που παράγεται σε αυτά τα ψάρια προέρχεται είτε από το αμινοξύ αργινίνη είτε από τις πουρίνες. Το ένζυμο που καταβολίζει την αργινίνη βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο ήπαρ και τους νεφρούς των ψαριών αλλά το ίδιο το αμινοξύ βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις που αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για το ένζυμο οπότε η ουρία παράγεται από τον καταβολισμό των πουρινών (Halver, 1989).

Είναι γνωστό ότι πρώτα πρέπει να εξυπηρετηθούν οι ανάγκες των ζώων για την σύνθεση πρωτεϊνών και ύστερα να καταβολισθούν τα περισσευούμενα αμινοξέα. Δηλαδή υπάρχει ανάγκη για κάποιο έλεγχο της διάθεσης των αμινοξέων που θα εισέλθουν στο σώμα ιδιαίτερα όταν η ποσότητα της τροφής είναι περιορισμένη. Ο τρόπος με τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι ο εξής τα ένζυμα της σύνθεσης των πρωτεϊνών είναι διάσπαρτα σε όλο το σώμα και έχουν χαμηλότερες τιμές Km από τα ένζυμα του καταβολισμού των αμινοξέων που βρίσκονται συγκεντρωμένα στο συκώτι (Halver, 1989). Άρα σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η έμφαση θα δίνεται στην σύνθεση πρωτεϊνών ενώ ο καταβολισμός θα είναι σε χαμηλά επίπεδα όσο όμως αυξάνεται η συγκέντρωση τόσο θα αυξάνονται τα επίπεδα του καταβολισμού.

Οι κυριότερες επιδράσεις μιας δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες σε σχέση με μια δίαιτα χαμηλότερης περιεκτικότητας είναι η αύξηση των αμινοξέων στο σώμα ,η αύξηση στις δραστηριότητες των γλυκονεογεννετικών ενζύμων και η μείωση στις δραστηριότητες των γλυκολυτικών ενζύμων. Οι επιπτώσεις στις δρα-

στικότητα των ενζύμων του καταβολισμού των αμινοξέων είναι μικρές.

Ο λόγος των ΕΑΑ/ΝΕΑΑ (Απαραίτητα Αμινοξέα / Μη Απαραίτητα Αμινοξέα) στο πλάσμα ήταν 1,71 όταν τα ψάρια ταΐζονταν με δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και 0,79 όταν τα ψάρια ταΐζονταν με δίαιτες χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (Halver, 1989).

Η εκκρινόμενη αμμωνία βρισκόταν σε άμεση αναλογία με το ποσό του αζώτου που λαμβανόταν από την δίαιτα ενώ η εκκρινόμενη ουρία ήταν ανεξάρτητη από αυτό

Οι Lied και Braated (1984) όπως αναφέρει στο βιβλίο του Halver που τάισαν το μπακαλιάρο με δίαιτες που είχαν περιεκτικότητα πρωτεΐνης από 10 - 70% της εκτιμώμενης μεταβολικής ενέργειας παρατήρησαν ότι οι ρυθμοί της μεταβολικής συνθέσεως αυξανόταν στο λευκό γραμμωτό μυ για ποσοστά πρωτεΐνης από 10 - 48% της εκτιμώμενης μεταβολικής ενέργειας. Πέρα από αυτό το επίπεδο δεν παρατηρήθηκαν αυξήσεις στην σύνθεση των πρωτεϊνών.

Σε περιόδους νηστείας οι εφεδρείες των λιπών αρχικά στο ήπαρ και μετά στους μυς χρησιμοποιούνται αμέσως. Όταν παρατείνεται η νηστεία παρατηρείται μια αύξηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας στους μυς και η κινητοποίηση των αμινοξέων για χρήση σε πιο ζωτικούς ιστούς.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κινητική ενζύμων

Το μετρούμενο ένζυμο ήταν η phosphofructokinase η οποία είναι απαραίτητη στην διαδικασία της γλυκολύσεως.

Η μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου στηρίζεται στη αντίδραση του ενζύμου του εκχυλίσματος με το υπόστρωμα και μετράμε την αναγωγή του NAD όπου κάθε μόριο που ανάγεται αντιστοιχεί σε ένα μόριο υποστρώματος που οξειδώνεται.

Κατά το πείραμα της κινητικής ενζύμων ελήφθησαν δείγματα από το νεφρό και το ήπαρ ψαριών που είχαν εκτραφεί για 60 ημέρες σε θερμοκρασία 18 - 20°C. Τα ψάρια αυτά ταιΐζονταν με διαφορετικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες δίαιτες οι οποίες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Συστατικά	Δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες	Δίαιτα φτωχή σε πρωτεΐνες	Μέση δίαιτα
Πρωτεΐνες	61%	35%	47%
Υδατάνθρακες	15,7%	41,7%	27%
Λιπίδια	9%	9%	12%
Βιταμίνες	4,1%	4,3%	2%
Τέφρα	10%	10%	12%

Πίνακας 1: Η επί τοις εκατό ποσοστιαία σύσταση των τριών διαιτών που δόθηκαν στα ψάρια από τα οποία πάρθηκαν τα δείγματα που αναλύθηκαν στο πείραμα της κινητικής ενζύμων.

Τα δείγματα που ελήφθησαν τοποθετήθηκαν σε υγρό ομογενοποίησης κατά αναλογία 1 gr ήπατος για 10ml ρυθμιστικού διαλύματος και 1gr νεφρού για 10ml ρυθμιστικού.

Αφού γινόταν ομογενοποίηση του δείγματος με ομογενοποιητή Ultra - Turrax T - 25 της IKA αυτό τοποθετούταν σε ψυχόμενη υπερφυγόκεντρο Sorvall και φυγοκεντρούταν στις 17.000 rpm για 1 ώρα.

Ύστερα λαμβανόταν ποσότητα εναιωρήματος ίση με 0,04 ml η οποία τοποθετούταν σε κυβελίδα που περιείχε 1,5 ml υποστρώματος fructose - 6 - phosphate και φωτομετρούταν στα 340nm υπό θερμοκρασία 25C. Στην συνέχεια με βάση την κατανάλωση του υποστρώματος σε σχέση με τον χρόνο εκτιμούσαμε την δραστηκότητα των ενζύμων για να δούμε αν αυτή μεταβαλλόταν ανάλογα με την περιεκτικότητα της δίαιτας σε πρωτεΐνες.

Ο τύπος που μας έδινε την δραστηκότητα των ενζύμων είναι ο

$$\Delta_c = \frac{\Delta A}{6,3} \times \frac{V_t}{V_s}$$

όπου ΔA = μεταβολή στην απορρόφηση

V_t = ολικός όγκος υποστρώματος

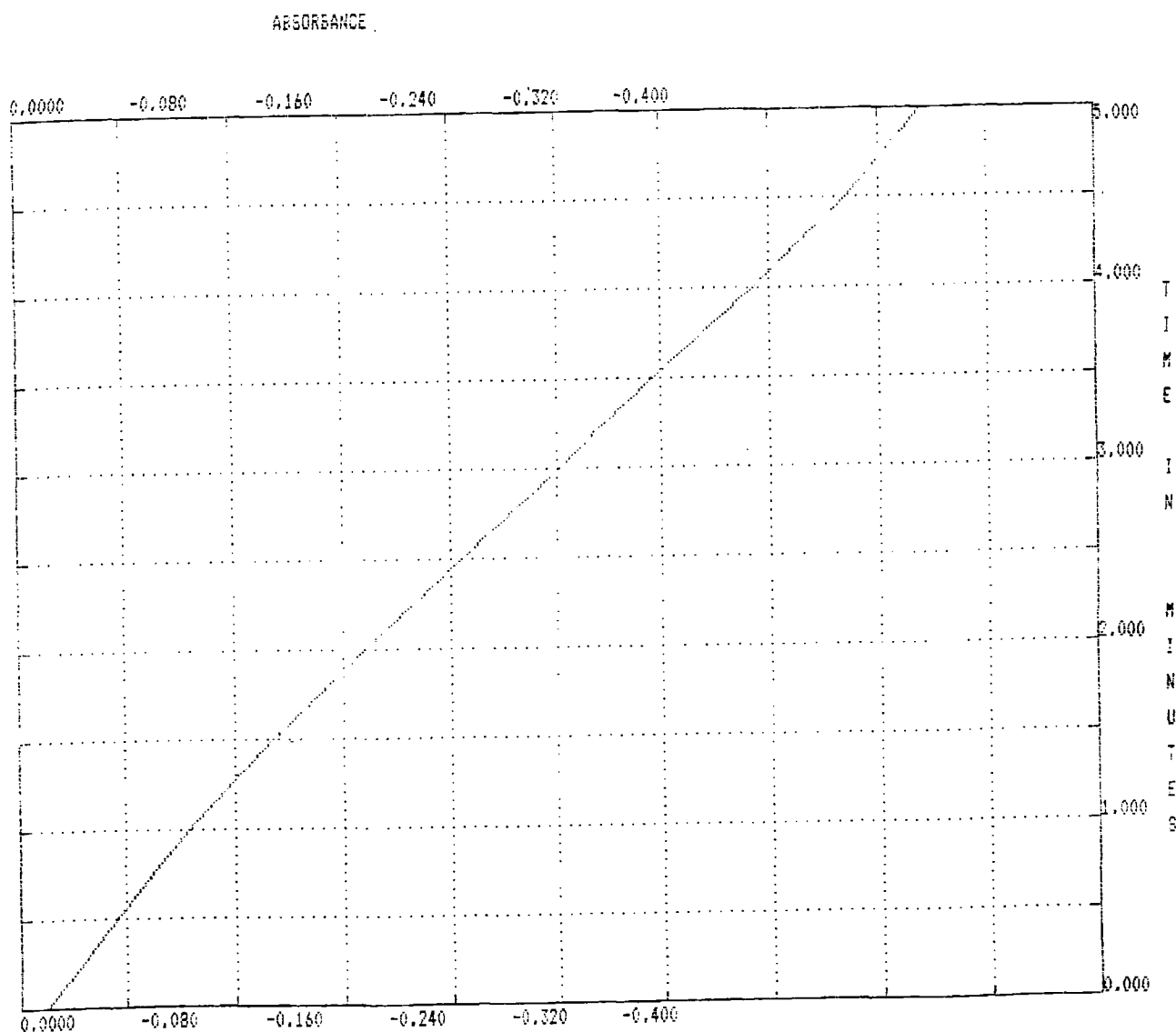
V_s = ολικός όγκος δείγματος που ελήφθει από το ήπαρ ή το νεφρό

Επειδή η κινητική ενζύμων έχει μονάδες ταχύτητα ενζύμου ανά mg πρωτεϊνών του ιστού έπρεπε να βρούμε την ποσότητα των πρωτεϊνών που περιέχονταν σε κάθε εναιώρημα.

Για να γίνει αυτό χρησιμοποιούσαμε την μέθοδο Lowry δηλαδή κατασκευάζαμε διαλύματα με γνωστή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες με την χρήση αναλυτικού ζυγού Santorius τα οποία φωτομετρούσαμε για να λάβουμε τις διαφορετικές απορροφήσεις τους και να κατασκευάσουμε την καμπύλη προτύπων. Ύστερα φωτομετρούσαμε εναιώρημα φυγοκεντρημένου, ομογενοποιημένου διαλύματος

από το ήπαρ ή το νεφρό και προσδιορίζαμε τις πρωτεΐνες που περιέχονταν στο εναιώρημα μέσω της καμπύλης προτύπων.

Αμέσως μετά φαίνεται ένα διάγραμμα της μεταβολής της απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο το οποίο δημιουργούταν κατά την φασματοφωτομέτρηση του εναιωρήματος.



Διάγραμμα 1: Δείγμα της μεταβολής της απορρόφησης σε συνάρτηση με τον χρόνο

Το διάλυμα ομογενοποίησεως αποτελούταν από 100 mM Tris - HCL και 250 mM Sucrose το pH του ήταν 7,6 και διατηρούταν υπό ψύξη.

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών κατασκευάζαμε τα παρακάτω διαλύματα:

A] 2% Na_2CO_3 σε 0,1N NaOH

B] 0,5% CuSO_4 σε 1/ Potassium sodium tartiate

C] Alkalium copper διάλυμα το οποίο παρασκευάζεται με την ανάμιξη 50ml A και 1ml B και διατηρείται μόνο για μια ημέρα.

E] Diluted Folin Reagent το οποίο αραιώνεται με νερό μέχρι να γίνει 1N

Τα πρότυπα ήταν πέντε τα S10 ,S20 ,S30 ,S40 ,S50 τα οποία περιείχαν αντίστοιχα 10mg πρωτεΐνης /100ml ,20mg πρωτεΐνης /100ml ,30mg πρωτεΐνης /100ml ,40mg πρωτεΐνης /100ml ,50mg πρωτεΐνης /100ml

Για κάθε δίαιτα κατασκευαζόταν εκ νέου πρότυπα.

2.2 Ολική πεπτικότητα

Η μέθοδος στηρίζεται στην οξειδωση του χρωμίου με υπερχλωρικό οξύ και θειικό οξύ και τη δημιουργία έγχρωμου παραγώγου το οποίο απορροφά στα 410nm.

Το οξειδωτικό διάλυμα περιέχει 10gr. μολυβδαινικό νάτιο, 150ml αποσταγμένο νερό, 150ml πυκνό θειικό οξύ και 200ml υπερχλωρικό οξύ.

Εδώ χρησιμοποιήθηκαν ψάρια τα οποία ταΐζονταν με έξι διαφορετικές δίαιτες που περιείχαν 1% οξειδίο του χρωμίου. Η εκτροφή των ψαριών υπό αυτές τις συνθήκες γινόταν για 25 ημέρες και μετά συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν τα κόπρανα τους ως εξής 95 - 105mg αφυδατωμένων περιττωμάτων τοποθετούταν σε σωλήνες Kjeldahl όγκου 100ml. Σε αυτά προσθέτονταν 3ml οξειδωτικού διαλύματος και ύστερα το δείγμα θερμαίνονταν στους 220°C. Όταν παρατηρούταν αλλαγή του χρώματος από πράσινο σε κίτρινο μετρούσαμε χρόνο 5 λεπτών και σταματούσαμε την θέρμανση. Αφού το δείγμα κρύωνε προσθέταμε 1ml υπερχλωρικού οξέος και μετά θερμαίναμε για άλλα 5 λεπτά. Αφού κρύωνε ξανά το δείγμα αραιωνόταν με 15ml απεσταγμένο νερό και φυγοκεντρούταν στις 1000 rpm για 10 λεπτά αν τα δείγματα ήταν θολά. Μετά φωτομετρούσαμε στα 410 nm και λαμβάναμε απορροφήσεις ανάλογες με την περιεκτικότητα του χρωμίου στα περιττώματα.

Το ρυθμιστικό διάλυμα του κιτρικού οξέως αποτελούταν από: 21,01gr. κιτρικού οξέως συν 2,5gr. φθοριούχου νατρίου σε 900ml αποσταγμένο νερό με pH 4,2 πράγμα που επιτυγχάνεται με τη χρήση πυκνού καυστικού νατρίου.

Για τον υπολογισμό του χρωμίου στα περιττώματα χρησιμοποιούσαμε την καμπύλη προτύπων η οποία προέκυπτε από στάβιταρ διαλύματα που περιείχαν 0,4gr οξειδίου του χρωμίου σε 10gr αμύλου. Η ίδια διαδικασία ακολουθούταν και στις τροφές.

Επειδή όμως χρειαζόμασταν και τις περιεκτικότητες των τροφών και των περιττωμάτων σε θρεπτικά ακολουθούσαμε την εξής διαδικασία.

Σε προζυγισμένες κάψες μεταφέραμε επακριβώς ζυγισθείσα ποσότητα περιττωμάτων ή τροφής και τις τοποθετούσαμε στο φούρνο σε θερμοκρασία 105°C για 24 ώρες. Ύστερα τις βγάzaμε και τις τοποθετούσαμε στον ξηραντήρα μέχρι να κρυώσουν και μετά ζυγίζαμε κάψα και περιεχόμενο για να βρούμε την υγρασία στις τροφές ή στα περιττώματα.

Ο λόγος του ξηρού βάρους της τροφής ή των περιττωμάτων προς το υγρό τους βάρος μας έδινε την εκατοστιαία αναλογία των θρεπτικών συστατικών στις τροφές ή τα περιττώματα.

Ο τύπος που μας έδινε την πεπτικότητα για κάθε τροφή για κάθε μια από τις 12 δεξαμενές εκτροφής είναι ο

$$\text{Πεπτικότητα} = 100 - \left(100 \frac{\% \text{ δεικτη στην τροφή}}{\% \text{ δεικτη στα κόπρανα}} \times \frac{\% \text{ θρεπτικά στα κόπρανα}}{\% \text{ θρεπτικά στην τροφή}} \right)$$

Το οξειδωτικό διάλυμα που προστίθετο στον προσδιορισμό του χρωμίου αποτελούταν από 10gr Sodium molybdate σε 150ml απεσταγμένο νερό και 150ml πυκνόθειικό οξύ στο οποίο αφού ψυχόταν προστίθεντο 200ml υπερχλωρικό οξύ και το διάλυμα φυλασσόταν σε σκοτεινό μέρος

Η εκατοστιαία σύνθεση των έξι διαιτών φαίνεται στον πίνακα 2

A.Δ	1	2	3	4	5	6
Ιχθ/ρο	45,6	46,7	79,9	80	53,4*	53,4*
Ιχθ/λαιο	4,3	11,8	0,9	8,4	9,3	4,3
Άμυλο	40,7	32,7	14,2	6,5	25**	36**
DCP	4,3	9,8	0,9	0,9	2,2	2,2
Βιταμί - νες, κλπ	4,3	4,2	4,1	4,1	4	4

Πίνακας 2

* Οι δίαιτες αυτές περιέχουν ιχθυάλευρα LT (Low Temperature)

** Το άμυλο εδώ είναι ειδικά κατεργασμένο (gelatinized) για καλύτερη πεπτικότητα και περιέχεται στις δίαιτες και ποσοστό κυτταρίνης

DCP = Φωσφορικό διασβέστιο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κινητική ενζύμων

Για την 1/7/95 τα πρότυπα διαλύματα οι απορροφήσεις τους και η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες έχουν ως εξής

S10 = 0,111 και περιέχει 5mg/100ml

S20 = 0,205 και περιέχει 10mg/100ml

S30 = 0,294 και περιέχει 15mg/100ml

S40 = 0,350 και περιέχει 20mg/100ml

S50 = 0,400 και περιέχει 25mg/100ml

Άρα η ευθεία των ελαχίστων τετραγώνων έχει την μορφή

$$\Psi = 0,01446X + 0,0551$$

Για την 30/6/95 ομοίως

S10 = 0,109 και περιέχει 5mg/100ml

S20 = 0,228 και περιέχει 10mg/100ml

S30 = 0,345 και περιέχει 15mg/100ml

S40 = 0,406 και περιέχει 20mg/100ml

S50 = 0,488 και περιέχει 25mg/100ml

Οπότε η ευθεία των ελαχίστων τετραγώνων έχει την μορφή

$$\Psi = 0,0344 + 0,01872X$$

Για την 18/4/95 ομοίως

S10 = 0,048 και περιέχει 5mg/100ml

S20 = 0,154 και περιέχει 10mg/100ml

S30 = 0,260 και περιέχει 15mg/100ml

S40 = 0,320 και περιέχει 20mg/100ml

S50 = 0,367 και περιέχει 25mg/100ml

Οπότε η ευθεία των ελαχίστων τετραγώνων έχει την μορφή

$$\Psi = 0,01616X - 0,013$$

Για την 19/4/95 ομοίως

S30 = 0,233 και περιέχει 15mg/100ml

S40 = 0,304 και περιέχει 20mg/100ml

S50 = 0,349 και περιέχει 25mg/100ml

Οπότε η ευθεία των ελαχίστων τετραγώνων έχει την μορφή

$$\Psi = 0,0116X + 0,0633$$

Οι τιμές της απορρόφησης για κάθε δείγμα της 1/7/95 και η περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα

Δείγμα	Απορρόφηση	Περιεκτικότητα (mg)
Συκώτι 1	0,351	20,463347
Νεφρό 1	0,312	17,766251
Συκώτι 2	0,497	30,560165
Νεφρό 2	0,347	0,186721

Πίνακας 3

Οι τιμές της απορρόφησης και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες κάθε δείγματος της 30/6/95 φαίνονται στον πίνακα 4.

Δείγμα	Απορρόφηση	Περιεκτικότητα (mg)
Συκώτι 1	0,388	18,8888
Νεφρό 1	0,395	17,660256
Νεφρό	0,294	13,867521

Πίνακας 4

Οι τιμές της απορρόφησης και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες για κάθε δείγμα της 18/4/95 φαίνονται στον πίνακα 5.

Δείγμα	Απορρόφηση	Περιεκτικότητα (mg)
Συκώτι	0,350	22,648514
Νεφρό	0,316	20,35891

Πίνακας 5

Οι τιμές της απορρόφησης και της περιεκτικότητας για κάθε δείγμα της 19/4/95 φαίνονται στον πίνακα 6

Δείγμα	Απορρόφηση	Περιεκτικότητα (mg)
Συκώτι	0,335	23,422413
Νεφρό	0,280	18,681034

Πίνακας 6

Για τα δείγματα που ελήφθησαν από τα νεφρά των ψαριών που ταΐζονταν με την δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ο επόμενος πίνακας μας δίνει τις μονάδες της ενζυμικής δραστηριότητας, την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και το πηλίκο της πρώτης δια την δεύτερη.

Δραστηριότητα (mU)	Περιεκτικότητα (mg)	mU/mg
436,5	13,867521	31,476
1190,475	19,26282	61,801
4166,662	19,26282	216,305
654,75	13,867521	47,214
833,325	19,26282	43,26

Πίνακας 7

Στον πίνακα που ακολουθεί εμφανίζεται ότι και στον προηγούμενο αλλά για δείγματα που ελήφθησαν από τον νεφρό ψαριών

που τρέφονταν με την δίαιτα που είχε υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες

Δραστικότητα (mU)	Περιεκτικότητα (mg)	mU/mg
43125	20,186721	2136,305
396,787	17,766251	22,333

Πίνακας 8

Στον επόμενο πίνακα εμφανίζονται οι μονάδες της ενζυμικής δραστικότητας, της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και το πηλίκο της πρώτης προς την δεύτερη για δείγματα που ελήφθησαν από το ήπαρ των ψαριών που ταΐζονταν με μια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες

Δραστικότητα (mU)	Περιεκτικότητα (mg)	mU/mg
396,787	20,463347	19,39
178,537	20,463347	8,724

Πίνακας 9

Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει ότι και ο πίνακας 9 αλλά για δείγματα που πάρθηκαν από ψάρια που ταΐζονταν με μια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες

Δραστικότητα (mU)	Περιεκτικότητα (mg)	mU/mg
892,8	18,8888	47,266
1142,85	18,8888	60,504
7618,8	18,8888	403,35
3809,4	18,8888	201,675
1269,75	18,8888	67,222
198,375	18,8888	10,502
654,75	18,8888	34,663

Πίνακας 10

Από τα δείγματα που ελήφθησαν από το ήπαρ των ψαριών που τρέφονταν με την formal diet σχηματίζεται ο παρακάτω πίνακας που είναι παρόμοιος με τον πίνακα 10

Δραστικότητα (mU)	Περιεκτικότητα (mg)	mU/mg
4166,662	23,422413	177,892
4642,837	22,648514	204,995
3952,35	23,422413	168,742
4421,7	23,422413	188,78
5416,65	22,648514	239,161
1368,975	22,648514	60,444
15475,5	22,648514	683,289

Πίνακας 11

Αθροίζοντας τα πηλίκα mU/mg σύμφωνα με το από ποιο μέρος του σώματος του ψαριού ελήφθησαν και την δίαιτα με την οποία ταιΐζονταν προσθετοαφαιρώντας το standard error in the median (SEM) και λαμβάνοντας κατά νου την συγκέντρωση του υποστρώματος υπό την οποία έγινε η φωτομέτρηση παίρνουμε για το νεφρό τον πίνακα 12 και για το ήπαρ τον πίνακα 13

Fructose - 6 - phosphate	HP	LP
0,1Mm	1079 ± 1057	80 ± 34

Πίνακας 12: Οι τιμές mU/mg για δείγματα που ελήφθησαν από τον νεφρό ψαριών που ταιΐζόταν με μια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (HP) και με μια δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (LP).

Fructose - 6 - phosphate	HP	LP	FD
0,1Mm	14 ± 4	94 ± 49	212 ± 77

Πίνακας 13: Οι τιμές mU/mg για δείγματα που ελήφθησαν από το ήπαρ ψαριών που ταΐζόταν με μια διαίτα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (HP), μια διαίτα χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (LP) και μια διαίτα μέσης περιεκτικότητας (FD).

Βλέπουμε ότι στο συκώτι η LP διαίτα προκάλεσε μεγαλύτερη δραστικότητα από την HP διαίτα. Ενώ η formal diet οδήγησε σε μεγαλύτερη δραστικότητα και από τις δύο παραπάνω δίαιτες.

Επίσης στο νεφρό βλέπουμε ότι η HP διαίτα έδωσε ανώτερες τιμές από την LP διαίτα.

3.2 Ολική πεπτικότητα

3.2.1 Προσδιορισμός χρωμίου

Ξέρω ότι στα πρότυπα διαλύματα σε κάθε 10gr αμύλου αντιστοιχούν 0,4gr οξείδιο του χρωμίου άρα αφού τα 50,23mgr του προτύπου S2 εμφανίζουν απορρόφηση 0,160 ενώ τα 102,7mgr του S3 εμφανίζουν απορρόφηση 0,404 οι αντιστοιχίες της περιεκτικότητας σε χρώμιο και της απορροφήσεως δίνονται στον πίνακα 14

Χρώμιο (mgr)	Απορρόφηση
2,0092	0,160
4,108	0,404

Πίνακας 14

Οπότε η ευθεία των ελαχίστων τετραγώνων έχει την μορφή

$$\Psi = 0,1162569X - 0,0735833$$

Στον πίνακα 15 φαίνεται για κάθε δείγμα κοπράνων η απορρόφηση και η περιεκτικότητα του σε χρώμιο

Δείγμα	Απορρόφηση	Περιεκτικότητα (mg)
1/2	0,193	2,2930535
2/1	0,188	2,2500453
2/2	0,270	2,9553798
3/1	0,180	2,1812322
3/2	0,178	2,1640289
4/1	0,231	2,6199158
4/2	0,236	2,662924
5/1	0,195	2,3102568
5/2	0,240	2,6973306
6/1	0,136	1,80276
6/2	0,141	1,8457682
7/1	0,277	3,0155913
7/2	0,290	3,1274126
8/1	0,167	2,0694109
8/2	0,164	2,043606
9/1	0,160	2,0091994
9/2	0,168	2,0780125
10/1	0,137	1,8113617
10/2	0,163	2,0350043
11/1	0,190	2,2672486
11/2	0,185	2,2242404
12/1	0,216	2,4908912
12/2	0,214	2,473688

Πίνακας 15

Στον πίνακα 16 φαίνονται το υγρό βάρος (Υ.Β) κάθε δείγματος κοπράνων το ξηρό βάρος (Ξ.Β) κάθε δείγματος κοπράνων και το αποτέλεσμα της διαίρεσης του δεύτερου με το πρώτο που ακολουθείται από τον πολλαπλασιασμό με το 100 δίνοντας μας το ποσοστό των θρεπτικών συστατικών σε κάθε δείγμα κοπράνων (Θ.Σ%).

Δείγμα	Υ.Β	Ξ.Β	Θ.Σ%
1/1	0,2977	0,2728	91,63587%
1/2	0,3742	0,3426	91,55531%
2/1	0,4068	0,3703	91,02753%
2/2	0,488	0,443	90,77868%
3/1	0,5238	0,4717	90,05345%
3/2	-	-	-
4/1	0,3445	0,314	91,14658%
4/2	0,3641	0,3325	91,3106%
5/1	0,5193	0,4776	91,96995%
5/2	0,4872	0,4496	92,28243%
6/1	0,368	0,3369	91,54891%
6/2	0,3396	0,3118	91,81389%
7/1	0,5379	0,492	91,46681%
7/2	0,5081	0,4648	91,47805%
8/1	0,3473	0,327	94,1549%
8/2	0,4178	0,3871	92,65198%
9/1	0,4873	0,4474	91,81202%
9/2	0,4461	0,4106	92,04214%
10/1	0,4942	0,4435	89,74099%
10/2	0,5209	0,4676	89,7677%
11/1	0,3152	0,2907	92,22715%
11/2	0,3475	0,3203	92,17266%
12/1	0,45	0,4103	91,17777%
12/2	0,4846	0,4414	91,08543%

Πίνακας 16

Ο πίνακας 17 μας δίνει την μέση τιμή για τα ποσοστά των θρεπτικών συστατικών σε κάθε μια από τις 12 δεξαμενές

Δεξαμενή	Θ.Σ%
1	91,60%
2	90,90%
3	90,05%
4	91,3%
5	92,13%
6	91,68%
7	91,47%
8	93,40%
9	91,93%
10	89,75%
11	92,0%
12	91,13%

Πίνακας 17

Ο επόμενος πίνακας είναι παρόμοιος με τον πίνακα 16 μόνο που αφορά τις τροφές

Δείγμα	Υ.Β	Ξ.Β	Θ.Σ%
1/1	0,4399	0,3912	88,9293%
1/2	0,5683	0,5057	88,98469%
2/1	0,5436	0,5289	97,2958%
2/2	0,4515	0,4381	97,03211%
3/1	0,4427	0,3835	86,62751%
3/2	0,4421	0,3835	86,74508%
4/1	0,441	0,4263	96,66666%
4/2	0,4694	0,4541	96,74051%
5/1	0,5477	0,5085	92,84279%
5/2	-	-	-
6/1	0,5247	0,4868	92,77682%
6/2	0,4851	0,4512	93,01175%

Πίνακας 18

Αυτός ο πίνακας είναι παρόμοιος με τον πίνακα 17 μόνο που και εδώ αντί για κόπρανά έχουμε τροφές και αντί για αριθμό δεξαμενών αριθμό τροφών

Τροφή	Θ.Σ%
1	88,96%
2	97,16%
3	86,69%
4	96,70%
5	92,84%
6	92,89%

Πίνακας 19

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται για κάθε τροφή η απορρόφηση και το ποσοστό επί τοις εκατό του δείκτη που περιέχεται.

Τροφή	Απορρόφηση	Περιεκτικότητα %
1	0,082	1,34
2	0,043	1
3	0,036	0,94
4	0,016	0,77
5	0,023	0,83
6	0,024	0,84

Πίνακας 20

Επίσης γνωρίζω ότι η τροφή 1 δόθηκε στις δεξαμενές 1 και 6, η τροφή 2 δόθηκε στις δεξαμενές 3 και 10, η τροφή 3 στις δεξαμενές 5 και 12, η τροφή 4 δόθηκε στις δεξαμενές 4 και 7, η τροφή 5 στις δεξαμενές 2 και 11 και η τροφή 6 στις δεξαμενές 8 και 9.

Άρα για την τροφή 1 εμφανίζονται πεπτικότητες

Δεξαμενή	Πεπτικότητα
1	40,26%
6	23,78%

Πίνακας 21

Για την τροφή 2 εμφανίζονται πεπτικότητες

Δεξαμενή	Πεπτικότητα
3	57,22%
10	52,16%

Πίνακας 22

Για την τροφή 3 έχουμε πεπτικότητες

Δεξαμενή	Πεπτικότητα
5	59,72%
12	60,1%

Πίνακας 23

Για την τροφή 4 έχουμε πεπτικότητες

Δεξαμενή	Πεπτικότητα
4	72,74%
7	76,25%

Πίνακας 24

Για την τροφή 5 έχουμε πεπτικότητες

Δεξαμενή	Πεπτικότητα
2	68,64%
11	63,37%

Πίνακας 25

Για την τροφή 6 έχουμε πεπτικότητα

Δεξαμενή	Πεπτικότητα
8	58,59%
9	59,41%

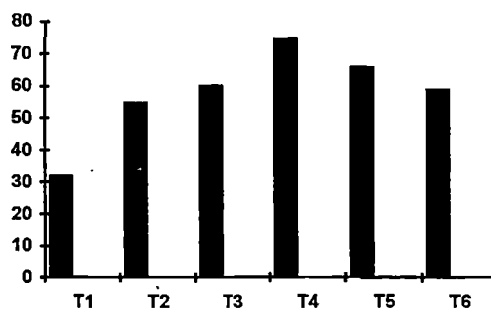
Πίνακας 26

Στον πίνακα 27 βλέπουμε την μέση πεπτικότητα για κάθε τροφή

Τροφή	Πεπτικότητα
1	32,02%
2	54,69%
3	59,91%
4	74,49%
5	66%
6	59%

Πίνακας 27

Τα στοιχεία του πίνακα 27 μπορούν να παρασταθούν με το παρακάτω σχεδιάγραμμα



Σχ.2 Η πεπτικότητα κάθε μιας από τις χορηγούμενες τροφές

Φαίνεται το ότι όσο μικρότερη είναι η περιεκτικότητα κάθε δίαιτας σε υδατάνθρακες τόσο καλύτερη είναι η πεπτικότητά της. Η ευθεία των ελαχίστων τετραγώνων για την σχέση περιεκτικότητας αμύλου και πεπτικότητας της κάθε δίαιτας έχει την μορφή $\psi=1,691 \cdot x+13,983$.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Κινητική ενζύμων

Για το ήπαρ βλέπουμε ότι η LP δίαιτα προκάλεσε μεγαλύτερη δραστικότητα για την PFK σε σχέση με την HP δίαιτα ενώ η formal diet οδήγησε σε μεγαλύτερη δραστικότητα και από τις δύο παραπάνω δίαιτες.

Ενώ στο νεφρό βλέπουμε ότι η HP δίαιτα έδωσε ανώτερες τιμές από την LP δίαιτα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η δίαιτα μέσης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες έγινε σε άλλη χρονική περίοδο με διαφορετικά χημικά αντιδραστήρια οπότε δεν είναι άμεσα συγκρίσιμη με τις άλλες δίαιτες.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, καθώς και η απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο, δείχνουν ότι υπήρξε κάποιο πρόβλημα στην εκτέλεση των αναλύσεων. Αυτό μπορεί να οφείλεται, είτε στην παρασκευή των αντιδραστηρίων για την οποία απαιτούταν μεγάλη ακρίβεια, είτε σε αλλοιώσεις που υφίστανται τα αντιδραστήρια κατά τη φύλαξή τους, είτε ,τέλος , σε ελαττωματικό καθαρισμό του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού.

Από τη διεθνή βιβλιογραφία καθίσταται εμφανές, ότι οι δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες προκαλούν αύξηση στις δραστικότητες των PFK-1 και PFK-2 (όπου PFK - 1 = 6 - phosphofructo - 1 - kinase και PFK -2 = 6 - phosphofructo - 2 - kinase) ενώ δίαιτες με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες προκαλούν μείωση της δραστικότητας της PFK - 1(Bonamusa, 1992).

Όμως σε ψάρια του είδους *Salmo gairdneri* που ταΐζονταν με δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες είχαμε αύξηση της δραστικότητας της PFK για συγκεντρώσεις υποστρώματος κατώτερες του κορεσμού (Luriane, 1989).

Οι παρατεταμένες περίοδοι νηστείας προκαλούσαν μείωση της δραστικότητας της PFK -1 και της PFK - 2 (Bonamusa, 1992).

Σε σχέση με την θερμοκρασία του περιβάλλοντος φαίνεται η δραστικότητα της PFK να αυξάνει στα εν ψυχρώ εγκλιματισμένα ψάρια (Guderley et al, 1990) και παρουσιάζει μια αύξηση στον λευκό και τον ερυθρό μυ μεταξύ Ιουλίου και Σεπτεμβρίου δείχνοντας μια προετοιμασία για την χειμερινή ανοξία μέσω της αυξημένης γλυκολυτικής ικανότητας (Lind, 1992).

Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι η διατροφή με δίαιτες πλούσιες σε πρωτεΐνες μειώνει την δραστικότητα της PFK η οποία όμως φαίνεται να υπόκειται και σε ορμονικό και σε θερμικό έλεγχο. Και στα δικά μας πειράματα εμφανίζεται αυξημένη δραστικότητα της PFK στο ήπαρ (όργανο ενδιάμεσου μεταβολισμού) στα ψάρια που τρέφονταν με δίαιτα LP.

Οπότε η αυξημένη δραστικότητα της PFK στο ψάρι *Salmo gairdneri* που τρεφόταν με μια δίαιτα που δεν περιείχε πρωτεΐνες μπορεί να οφείλεται στην χαμηλή θερμοκρασία εκτροφής ή στην προσπάθεια του ψαριού να εξισορροπήσει την δίαιτα του μέσω της αποδόμησης του αποθηκευμένου γλυκογόνου και της γλυκόλυσης της παραγόμενης γλυκόζης.

4.2 Ολική πεπτικότητα

Με βάση τα δεδομένα της συγκεκριμένης αναλύσεως η καλύτερη ολική πεπτικότητα εμφανίστηκε για την δίαιτα με το χαμηλότερο ποσοστό υδατανθράκων η οποία μάλιστα περιείχε μη ειδικά κατεργασμένο άμυλο. Η χαμηλότερη πεπτικότητα εμφανίζεται στις δίαιτες με υψηλή περιεκτικότητα σε ακατέργαστους υδατάνθρακες.

Η ευθεία των ελαχίστων τετραγώνων για την σχέση περιεκτικότητας αμύλου και πεπτικότητας της κάθε δίαιτας έχει την μορφή $\psi = 1,691 \cdot x + 13.983$.

Τα ποσοστά της συνολικής πεπτικότητας για όλες τις δίαιτες είναι χαμηλά γιατί η πεπτικότητα καθενός εκ των συστατικών ξεχωριστά είναι σημαντικά ανώτερη από τις πεπτικότητες που εμφανίστηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα (Παρπούρα, 1997). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι τα θαλασσινά ψάρια κατά την ωσμωρύθμιση αποβάλλουν από το έντερο μεγάλα ποσά δισθενών ιόντων τα οποία προστίθενται στην μάζα των κοπράνων αυξάνοντάς την. Φαίνεται όμως ότι η χρήση υψηλών επιπέδων υδατανθράκων στην δίαιτα περιορίζει όμως την ολική πεπτικότητα της τροφής.

Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι η ανυπαρξία υδατανθράκων στην δίαιτα οδηγεί σε καθυστέρηση στην ανάπτυξη των ψαριών προφανώς γιατί μέρος των πρωτεϊνών που τους παρέχονται χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας και όχι για την δημιουργία ιστών καθώς και ότι η ανάπτυξη ενός ψαριού μπορεί να επιταχυνθεί αν η χορηγούμενη δίαιτα του προσφέρεται στις ίδιες ποσότητες αλλά πολλές φορές την ημέρα για να μπορεί το ψάρι να αξιοποιήσει καλύτερα την παρεχόμενη τροφή (Tung, 1991).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bonamusa L. ,Garcia de Frutos P. ,Fernandez F. ,Baanante I. V. 1992, Nutritional effects on key glycolytic - gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata* MOL. - MAR. - BIOL. - BIOTECHNOL. vol. 1, no. 2, pp. 113 - 124

Bonamusa L., Garcia - de - Frutos P. ,Fernandez F. ,Baanante I. V. 1989, Enzymes as indicators of nutritional conditions in the gilthead sea bream, *Sparus aurata* ,AQUACULTURE - EUROPE - '89 - SHORT - COMMUNICATIONS - AND - ABSTRACTS - OF - REVIEW - PAPERS - FILMS - SLIDESHOWS - AND - POSTER - PAPERS - PRESENTED - AT - THE - INTERNATIONAL - AQUACULTURE - CONFERENCE - HELD - IN - BORDEAUX - FRANCE - 2 - 4 - OCTOBER - 1989 no. 10, pp. 37 - 38

Brockerhoff H., 1967, Journal of Fish Resources Canada, 23, pp. 1835 – 1839.

Chew S. F. ,Ip Y. K. 1987, Ammoniogenesis in mudskippers *Boleophthalmus boddaerti* and *periophthalmodon schlosseri* COMP. - BIOCHEM. - PHYSIOL. - B. vol. 87B, no. 4, pp. 941 - 948

Guderley H. ,Foley L. 1990, Anatomic and metabolic responses to thermal acclimation in the ninespine stickleback, *Pungitius pungitius* FISH - PHYSIOL. - BIOCHEM. vol. 8, no. 6, pp 465 - 473

Guderley H. ,Gawlicka A. 1992, Qualitative modification of muscle metabolic organization with thermal acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* FISH - PHYSIOL. - BIOCHEM. vol. 10, no. 2, pp.

123 - 132

Halver John E. 1989, Fish nutrition Academic Press INC

Karlson Peter 1984, Βιοχημεία Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας

Lied E. and Braaten B., 1984. Comparative Biochemistry Physiology, 78A, pp.49.

Lind Y. 1992, Summertime and early autumn activity of some enzymes in the carbohydrate and fatty acid metabolism of the crucian carp FISH - PHYSIOL. - BIOCHEM. vol. 9, no. 5 - 6, pp. 409 - 415

Lupianez J. A. ,Sanchez - Locano M. J. ,Garcia - Regon L. ,de la Higuera M. 1989, Long - term effect of a high - protein / non - carbohydrate diet on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) AQUACULTURE vol. 79, no. 1 - 4, pp. 91 - 101

Mattenhelmer Hermann The theory of enzyme tests
Boehringer Mannheim GmbH

Scerbina M. A., 1973, Journal of Ichthyology, 13, pp. 104-111.

Smith Lynwood S. 1982, Introduction to fish physiology TFH Publications INC

Tung Pen Hsing ,Shiau Shi Yen 1991, Effects of meal frequency on growth performance of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* *O. aureus*, fed different carbohydrate diets
AQUACULTURE vol. 92, no. 4 pp. 343 – 350

ΑΤΕ, 1994, Απολογιστική έκθεση 1994 για αλιεία, υδατοκαλλιέργειες, σπογγαλιεία και μεταποίηση αλιευμάτων. Αλιευτικά Νέα, Σεπτέμβριος 1995, σελ. 49.

Ηλιόπουλου Γεωργίου 1995, Βιοχημεία ΟΕΔΒ
Λεονάρδος Ι. Σημειώσεις για το μάθημα "Διατροφή Ιχθύων", Μεσολόγγι 1996.

Παπουτσόγλου Ε. Σωφρόνιος, 1995, Αναμενόμενες Ερευνητικές – Βιοτεχνολογικές και Περιβαλλοντολογικές επεμβάσεις στις υδατοκαλλιέργειες, Αλιευτικά Νέα, Μάρτιος 1995, σελ. 52.

Παρπούρα Α., Αλέξη Μ., Αποστολοπούλου Μ., Κονίδης Λ., 1997, Επίδραση της σύστασης του σιτηρεσίου στην πεπτικότητα της τροφής στο ψάρι *Puntazzo puntazzo*. Αναφορά στο 21^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο της εταιρίας Βιολογικών Επιστημών, Θεσσαλονίκη 1997.

Κάθε γνήσιο αντίτυπο φέρει την υπογραφή του συγγραφέα

Μωυσής Μελετιάδης