

Διερεύνηση της δραστηριότητας του ενζύμου της χιτινάσης σε ιχθείς μετά από χορήγηση τροφής με μερική υποκατάσταση ιχθυάλευρου από εντομοάλευρο

Αμαλία Μηνά, Ευθυμία Αντωνοπούλου, Αθανάσιος Ι. Παπαδόπουλος

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη –
thanpap@bio.auth.gr

ABSTRACT

Amalia Mina, Efthimia Antonopoulou, Athanasios I. Papadopoulos: A study on the enzyme activity of chitinase in farmed fish supplied with food where fishmeal was partially substituted with insect meal

The use of insect meal, rich in protein, is considered as a new alternative source of protein to the diet of farmed fish. However serious problems have been reported in fish growth rate when fish meal was substituted by insect meal at a percentage higher than 25%. The presence of insect's body chitin was suggested as a reason for the observed lower growth rate. In our present work we investigated the effect of partially substituted fish meal by insect meal on the enzyme of chitinase in cultured gilthead seabream and rainbow trout. We also investigated the possibility of chitin from various sources being a limiting factor for food availability in alternatively fed cultured fish. For this reason we studied the effect of various chitins deriving from different organisms upon the activity of chitinase. Significant differences were noticed in both, the effect of the diet and the chitin source upon the kinetics of the enzyme activity.

Keywords: chitinase enzyme activity, chitin, fishmeal, insect meal, digestive tube, gilthead seabream, rainbow trout

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ιχθυοκαλλιέργειες αντιμετωπίζουν προβλήματα εξαιτίας της δυσμενούς κατάστασης στην οποία βρίσκονται τα αποθέματα του θαλασσιού περιβάλλοντος και της αύξησης του κόστους των ιχθυαλεύρων (Sanchez-Muros *et al.* 2014). Η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης, γίνεται ολοένα και πιο επιτακτική (Manzano-Agugliaro *et al.* 2012).

Η χρήση των εντομοάλευρων αποτελεί μια νέα εναλλακτική λύση που παρέχει υψηλής ποιότητας πρωτεΐνη. Σχετικές μελέτες δείχνουν ότι τα περισσότερα είδη εντόμων έχουν υψηλή ποιότητα και ποσότητα πρωτεΐνης, ανταγωνιζόμενα αυτά των ιχθυάλευρων και των σογιάλευρων (Sanchez-Muros *et al.* 2014). Σε πειράματα που έγιναν κατά την εκτροφή της τσιπούρας, *Sparus aurata* (Linnaeus 1758), με μερική υποκατάσταση ιχθυάλευρων από εντομοάλευρα, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένος ρυθμός αύξησης και υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας, ιδιαίτερα όταν η υποκατάσταση ήταν στα επίπεδα του 50% (Gasco *et al.* 2016).

Ως πιθανή αιτία μεταξύ άλλων θεωρήθηκε η παρουσία στα εντομοάλευρα, υψηλών ποσοστών χιτίνης που προέρχεται από τα έντομα. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζουμε τα αποτελέσματα από την προσπάθεια που καταβάλαμε να ελέγξουμε την πιθανότητα αυτή. Για τον σκοπό αυτό μελετήσαμε το ένζυμο της χιτινάσης στον πεπτικό σωλήνα δύο εκτρεφόμενων ειδών ιχθύων, τσιπούρας και ιριδιζουσας πέστροφας, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792), στα οποία χορηγήθηκε τροφή με μερική υποκατάσταση του ιχθυάλευρου από εντομοάλευρο (σε ποσοστό 25% και 50% για τη τσιπούρα και 60% για την ιριδιζουσα πέστροφα). Για την υποκατάσταση χρησιμοποιήθηκε άλευρο από προνύμφη του εντόμου *Tenebrio molitor* (Linnaeus 1758) (Gasco *et al.* 2016).

Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός πως υπάρχουν δομικές διαφορές μεταξύ της χιτίνης που προέρχεται από διαφορετικούς οργανισμούς (Beier *et al.* 2013), απομονώσαμε χιτίνη σουπιάς, *Sepia officinalis* (Linnaeus 1758), γαρίδας, *Parapenaeus longirostris* (Lucas 1846), και από αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *T. molitor*, και ελέγξαμε την επίδραση που είχε η παρουσία των διαφορετικών αυτών χιτινών στην έκφραση της δραστηριότητας του ενζύμου της χιτινάσης. Μελετήσαμε την επίδραση αυτή σε ένζυμο από τον πεπτικό σωλήνα των ιχθύων ώστε να ανιχνεύσουμε πιθανά σημαντικές δομικές διαφορές οι οποίες μπορεί να ανιχνεύονται από το ίδιο το ένζυμο.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της χιτινάσης έγινε με χιτίνη azure (Sigma) (Shen *et al.* 2010), ως υπόστρωμα και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 0,2M, pH 5,4.

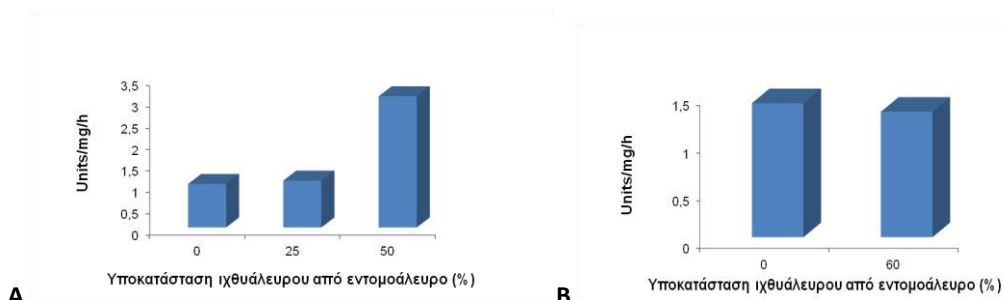
Για την ομογενοποίηση των πεπτικών σωλήνων από τσιπούρες (στις οποίες χορηγήθηκε για τριάντα εβδομάδες τροφή με μερική υποκατάσταση ιχθυάλευρων από εντομοάλευρα σε ποσοστό 0, 25 και 50% σύμφωνα με Gasco *et al.* 2016), και ιριδίτσουσες πέστροφες (στις οποίες χορηγήθηκε για 75 ημέρες τροφή με μερική υποκατάσταση ιχθυάλευρων από εντομοάλευρα σε ποσοστό 0 και 60% σύμφωνα με Gasco *et al.* 2016), χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 0,01M, pH 5,4. Για την ομογενοποίηση η αναλογία ιστού με ρυθμιστικό διάλυμα ήταν 1/3 (w/v).

Προκειμένου να διαπιστώσουμε την προέλευση της ενζυμικής δραστηριότητας (εάν προέρχεται από τον ίδιο τον ιστό ή από μικροοργανισμούς που αποτελούν τη φυσιολογική χλωρίδα του σωλήνα), απομακρύνουμε, πριν την ομογενοποίηση, την μικροβιακή χλωρίδα του πεπτικού σωλήνα με απόξεση του ιστού και πλύση με 9‰ φυσιολογικό ορό.

Χιτίνη απομονώθηκε από κέλυφος σουπιάς, εξωσκελετό γαρίδας, εξωσκελετό ενήλικων και εξώδεσμα προνυμφών του εντόμου *T. molitor* σύμφωνα με τον Jeuniaux (1966) ώστε να ελεγχθεί η δυνατότητα αναστολής, λόγω εξειδίκευσης, του ενζύμου της χιτινάσης που μετρήσαμε.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την μελέτη προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας της χιτινάσης στον πεπτικό σωλήνα των εκτρεφόμενων ψαριών διαπιστώνεται στατιστικά σημαντική αύξηση ($P < 0,001$) στην ειδική δραστηριότητα του ενζύμου στην τσιπούρα μετά τη χορήγηση τροφής με 50% υποκατάσταση ιχθυάλευρου από εντομοάλευρο, ενώ στη περίπτωση της ιριδίτσουσας πέστροφας δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικ. 1). Σημαντική ήταν και η μεταβολή στις κινητικές παραμέτρους K_m και V_{max} του ενζύμου από τον πεπτικό σωλήνα της τσιπούρας (Πίν. 1).



Εικόνα 1. Επίδραση της μερικής υποκατάστασης του ιχθυάλευρου από εντομοάλευρο της τροφής, στην ειδική δραστηριότητα του ενζύμου της χιτινάσης από πεπτικό σωλήνα τσιπούρας (A) και ιριδίτσουσας πέστροφας (B).

Figure 1. Effect of partial substitution of dietary fish meal with various percentages of the insect meal on the specific activity of chitinase enzyme from digestive track of gilthead seabream (A) and rainbow trout (B).

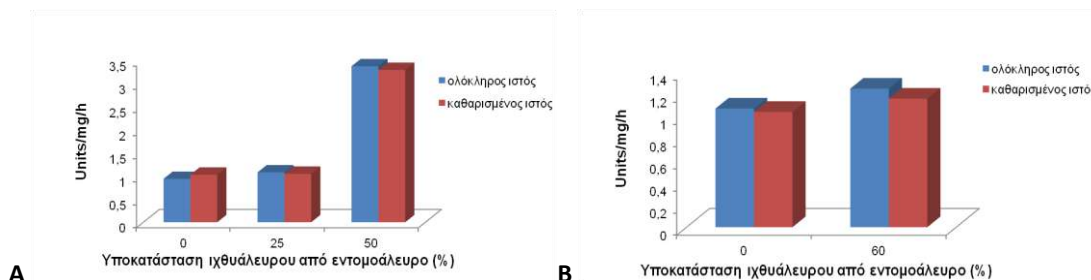
Πίνακας 1. Κινητικές παράμετροι του ενζύμου της χιτινάσης από πεπτικό σωλήνα τσιπούρας μετά την χορήγηση τροφής με μερική υποκατάσταση ιχθυάλευρων από εντομοάλευρα.

Table 1. Kinetic parameters of the enzyme chitinase from digestive tube from gilthead seabream supplied by food with partial substitution of fish meal with insect meal.

<i>Sparus aurata</i>	Υποκατάσταση 0%	Υποκατάσταση 25%	Υποκατάσταση 50%
V_{max} U/mg/h	1,1 ± 0,08	1,4 ± 0,09	3,1 ± 0,3
K_m mg/ml	0,34 ± 0,09	0,45 ± 0,08	0,27 ± 0,02

Η παρουσία και η ανάπτυξη χιτινολυτικών βακτηριδίων στην χλωρίδα του πεπτικού σωλήνα ιχθύων που διατράφηκαν με τροφή πλούσια σε χιτίνη θεωρήθηκε ως πιθανή αιτία για την αυξημένη

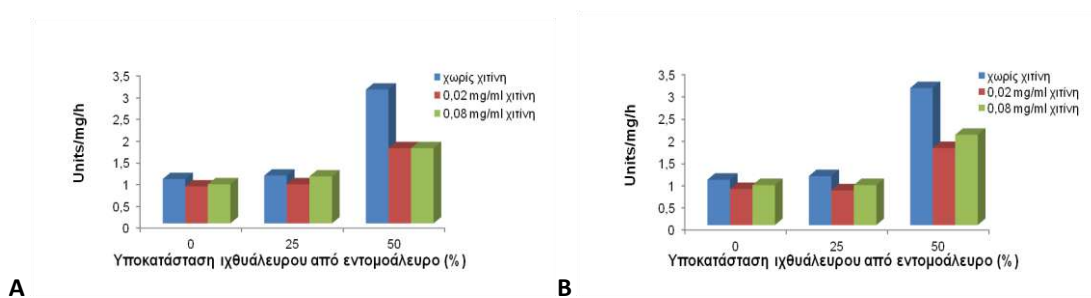
ενzymική δραστικότητα της χιτινάσης στους ιχθείς αυτούς (Goodrich & Morita 1977). Προκειμένου να ελέγξουμε την πιθανότητα η δραστικότητα του ενζύμου που ανιχνεύσαμε στον πεπτικό σωλήνα των ιχθύων να οφείλεται όχι στον ίδιο τον οργανισμό αλλά σε μικροοργανισμούς του σωλήνα που αποτελούν τη φυσιολογική χλωρίδα και αναπτύσσονται κατά την εκτροφή, προσδιορίσαμε την ειδική ενzymική δραστικότητα σε τμήματα του ίδιου πεπτικού σωλήνα πριν και μετά από απόξεση (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά πριν και μετά την απόξεση των ιστών (Εικ. 2). Τα αποτελέσματά είναι σύμφωνα με τις ανακοινώσεις των Danulat & Kaush (1984) και Fines & Holt (2010).



Εικόνα 2. Ειδική ενzymική δραστικότητα σε πεπτικό σωλήνα τσιπούρας (Α), και ιριδιζουσας πέστροφας (Β) πριν και μετά την απόξεση.

Figure 2. Enzyme activity of digestive tube from gilthead seabream (A), and rainbow trout (B), before and after removal of microflora bacteria by scraping.

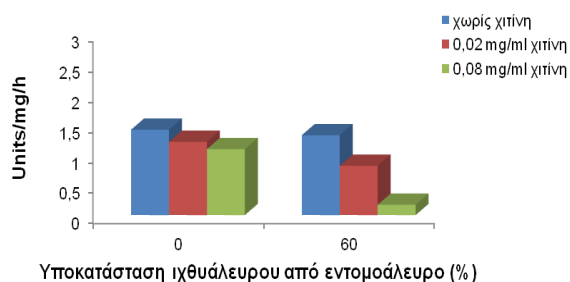
Κατά τον έλεγχο της επίδρασης της χιτίνης διαφορετικής προέλευσης στην ειδική δραστικότητα της χιτινάσης του πεπτικού σωλήνα της τσιπούρας διαπιστώθηκε σημαντική επίδραση της διατροφής στην έκφραση και την εξειδίκευση του ενζύμου. Πέρα από την σημαντική μεταβολή στις κινητικές παραμέτρους του ενζύμου, παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική αναστολή στην μετρούμενη ειδική ενzymική δραστικότητα που προήλθε από ιχθείς στους οποίους χορηγήθηκε τροφή με υποκατάσταση του ιχθυάλευρου από εντομοάλευρο σε ποσοστό 50% μετά την προσθήκη χιτίνης σουπιάς και προνυμφών του εντόμου (Εικ. 3). Η προσθήκη προκάλεσε αναστολή της ειδικής δραστικότητας του ενζύμου που έφτασε στο επίπεδο του 44%. Η παρατηρούμενη αναστολή υποδεικνύει ότι το ένζυμο της χιτινάσης που μελετάμε αναγνωρίζει ως υπόστρωμα επίσης την χιτίνη μόνο συγκεκριμένης προέλευσης που προστίθεται, με συνέπεια να μειώνεται η ποσότητα του κανονικού υποστρώματος που αποικοδομείται στην μονάδα του χρόνου.



Εικόνα 3. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων χιτίνης από σουπιά (Α) και από προνύμφες εντόμου (Β), στην ειδική δραστικότητα της χιτινάσης πεπτικού σωλήνα τσιπούρας.

Figure 3. Effect of various concentrations of cuttlefish (A) and *T. molitor* larvae (B) chitin, upon the specific activity of chitinase in the digestive tube of gilthead seabream fed diets with partial substitution of fish meal by insect meal.

Παρόμοια πειράματα επαναλάβουμε με την χιτινάση πεπτικού σωλήνα ιριδιζουσας πέστροφας μετά την χορήγηση τροφής με υποκατάσταση ιχθυάλευρου από εντομοάλευρο (σε ποσοστό 0% και 60%), έδωσαν αποτελέσματα σύμφωνα με τα οποία σημαντική αναστολή στην μετρούμενη ειδική ενzymική δραστικότητα εξαιτίας της προσθήκης χιτίνης σουπιάς, παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση της υποκατάστασης του ιχθυάλευρου κατά 60% με εντομοάλευρο (Εικ. 4). Η αναστολή που σημειώθηκε έφτασε στα επίπεδα του 87%.



Εικόνα 4. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων χιτίνης σουπιάς στην ειδική δραστηριότητα της χιτινάσης πεπτικού σωλήνα ιριδιζουσας πέστροφας.

Figure 4. Effect of various concentrations of cuttlefish chitin upon the specific activity of digestive tube chitinase from rainbow trout fed diets with partial substitution of fish meal by insect meal.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δεν φαίνεται να ευθύνεται η παρουσία της χιτίνης στο εντομοάλευρο για την παρατηρούμενη καθυστέρηση στην αύξηση των ιχθύων μετά την χορήγηση τροφής με υποκατάσταση ιχθυάλευρου από εντομοάλευρο. Επιπλέον, ο οργανισμός φαίνεται να συνθέτει περισσότερο ένζυμο με εξειδίκευση έναντι της χιτίνης που προέρχεται από το έντομο, κάτι που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε τους Prof Laura Casco (University of Turin) και Dr Giovanni Piccolo (University of Naples Federico II) για τη διεξαγωγή των πειραμάτων υποκατάστασης ιχθυαλεύρων με εντομοάλευρα στην τσιπούρα και στην πέστροφα και την αποστολή των δειγμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Beier S, Bertilsson S (2013) Bacterial chitin degradation — mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology* 4: 149
- Danulat E, Kausch H (1984) Chitinase activity in the digestive tract of the cod, *Gadus morhua* (L.). *Journal of Fish Biology* 24: 125–133
- Fines BC, Holt GJ (2010) Chitinase and apparent digestibility of chitin in the digestive tract of juvenile coho, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 303(1-4): 34–39
- Gasco L., Henry M., Piccolo G, Marono S, Gai Fr, Renna M, Lussiana C, Antonopoulou Ea, Mola P, Chatzifoti S (2016) Tenebrio molitor meal in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles: Growth performance, whole body composition and in vivo apparent digestibility. *Animal Feed Science and Technology*
- Goodrich TD, Morita RY (1977) Bacterial chitinase in the stomachs of marine fishes from Yaquina Bay, Oregon, U.S.A. *Marine Biology* 41: 355-360
- Jeuniaux C (1966) Chitinases. *Methods in Enzymology* 8: 644-650
- Manzano - Agugliaro F, Sanchez-Muros MJ, Barroso FG, Martínez-Sánchez A, Rojo S, Pérez-Bañón C (2012) Insects for biodiesel production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 16: 3744-3753
- Sancez – Muros MJ, Barroso FG, Manzano – Agugliaro F (2014) Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *Journal of Cleaner Production* 65: 16 - 27
- Shen CR, Chen YS, Yang CJ, Chen, JK, Liu CL (2010) Colloid chitin azure is a dispersible, low - cost substrate for chitinase measurements in a sensitive, fast, reproducible assay. *Journal of Biomolecular Screening* 15(2): 213-217