



**Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente**

**Masters in Marine Biology, specialization in
Fisheries and Aquaculture**

**Evaluation of Enzymatic and Metabolic Parameters of
Quality in Eggs of the Senegalese Sole (*Solea senegalensis*,
Kaup, 1858)**

**Avaliação de Parâmetros Enzimáticos e Metabólicos de
Qualidade em ovos de Linguado (*Solea senegalensis*, Kaup,
1858)**

Emílio António Estorninho dos Santos Silva Mota

Faro, January 2008



**Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente**

**Masters in Marine Biology, specialization in
Fisheries and Aquaculture**

**Evaluation of Enzymatic and Metabolic Parameters of
Quality in Sole Eggs (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858)**

**Avaliação de Parâmetros Enzimáticos e Metabólicos de
Qualidade em ovos de Linguado (*Solea senegalensis*, Kaup,
1858)**

Emílio António Estorninho dos Santos Silva Mota

**Dissertation presented at the University of Algarve, to obtain the degree of
Master in Marine Biology, with a specialization in Fisheries & Aquaculture,
tutored by Professor Doctor Maria Teresa Dinis, Doctor Elsa Cabrita and
Doctor Florbela Soares**

Faro, January 2008

ACKNOWLEDGMENTS

To Professor Doctor Maria Teresa Dinis; I would like to thank for the inspiration given through her classes, which motivated me to work in aquaculture. Accepting me as a student was an honor, and the guidance, the ongoing encouragement and the critical perspective I received during the elaboration of this work were much appreciated.

To Doctor Elsa Cabrita; I would like to thank for accepting to guide my work. Her friendship, her insightful suggestions, her critical analysis I could always count on were indispensable.

To Doctor Florbela Soares, for accepting to guide my work, for the support and friendship given; to her, my sincere thank you.

To Professor Doctor Robert A. Patzner I like to express my gratitude for receiving me in the University of Salzburg, for his help along my stay in Salzburg and for his opportune comments.

To Doctor Franz Lahnsteiner, I am grateful for receiving me in the University of Salzburg, for his guidance and for his precious help to adjust to both Salzburg and to its weather.

A very special thank you to my friend Nuno Magalhães, for his friendship and support that were unmatched; without them the academic odyssey that led to the realization of this work might not have come to fruition.

To my dear friend Doctor Laura Ribeiro, for I would like to thank the encouraging voice, for the advices, critical judgment and scientific expertise. For all that and for her excellent cooking, I warmly thank you.

To Rita Rainha, the friend who went through very long nights of brainstorming and hard work, I like to express my thanks for the help, for the critical voice, for the friendship, kind words and the ever lasting smile;

To my friend Clementina, I thank for being there, for the new perspectives showed and for that “little” motivating hand that made the difference in the more stressful hours.

To my friends: Raquel, Rute, Vera, Patrícia; for being there, for their laughter, for their friendship and support, for sometimes shedding the light into the darkness, making the connections that were right in front of me and yet obscured.

To my family; I would like to thank their support and encouragement in all my academic tuition.

To Doctor Felipe Martínez Pastor I thank for his valuable help in the statistic analysis.

To my friends, to everyone not mentioned in the above listing and that in some way contributed to the accomplishment of this work; my sincere thank you.

ABSTRACT

The egg's potential to produce viable fry has been the definition of egg quality. The Senegalese sole (*Solea senegalensis*) is a species with potential to European aquaculture, with high market value and a growth rate only second to *Sparus aurata*. No available literature was found concerning *S. senegalensis* egg quality neither related to enzymatic activity nor to key metabolites concentrations so, the present study aimed to find biomarkers of egg quality in this species, using morphophysiological data and analytical information, regarding the egg energetic status and some selected enzymatic and metabolic parameters. Eggs were obtained by natural spawning in 2006 breeding period, from late March to the end of June. The eggs were measured, checked for fecundation status, sampled for biochemical analysis and put to incubate in the same conditions of the broodstock. The egg energy status was determined through the energetic compound ATP. Carbohydrates metabolites (total levels of carbohydrates, monosaccharides (hexoses, 6-deoxyhexoses and heptoses), ribose, ketoses, sialic acids) were analyzed as well as the enzymes related to their metabolism (malate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucose-6-phosphatase). Enzymes related to autolytic processes (acid and alkaline phosphatases) and enzymes involved in catabolism of amino acids (aspartate aminotransferase: transamination) were also studied. Both the floating and the nonfloating eggs were subjected to the same biochemical assays, which already had proven to be biomarkers for egg quality in others species. When compared with the nonfloating eggs, the viable eggs had more enzymatic activity of the following enzymes: acid phosphatase, alkaline phosphatase, glucose-6-phosphatase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, aspartate aminotransferase and higher levels of ATP and ribose. Nonviable eggs showed higher activity malate dehydrogenase and higher levels of monosaccharides, sialic acids and ketoses. When correlated with the eggs morphophysiological parameters, only glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, heptoses and 6-deoxyhexoses concentrations were related to the percentage of viability, and thus they are proposed as bio-markers for egg quality determination in *Solea senegalensis*.

Keywords: Egg Quality, *Solea senegalensis*, Enzyme activity, Metabolites, Carbohydrate metabolism

RESUMO

O linguado senegalês (*Solea senegalensis*) é uma espécie com grande potencial para a aquacultura europeia dado ter um elevado valor de mercado, bem como um potencial de crescimento elevado e apenas superado pelo da dourada (*Sparus aurata*). No passado, a produção de *S. senegalensis* foi limitada por problemas ligados ao controlo de temperatura, doenças e problemas ligados à reprodução em cativeiro. Mais recentemente, a disponibilização de tecnologia de recirculação de água, bem como a utilização de rações mais adequadas aos requisitos nutricionais da espécie, minimizaram alguns destes problemas. Ainda assim, a reprodução em cativeiro de *S. senegalensis* continua a ter alguns problemas, principalmente devidos à fraca mobilidade dos espermatozóides após activação e à falta de conhecimento acerca do que poderá ser considerado padrão de qualidade de ovos, aplicável a esta espécie. A definição mais comum de qualidade de ovos é o potencial de ovos viáveis originarem juvenis viáveis. Este potencial pode ser afectado, quer no estado selvagem, quer em aquacultura, por vários factores, como desvios no normal curso da oogénese, fraca qualidade do sémen dos reprodutores, tamanho e idade dos reprodutores, temperatura e salinidade da água. A manutenção dos peixes em condições de cativeiro, manuseamento dos peixes, densidades de cultivo elevadas, a falha em suprir os requisitos nutricionais adequados a cada espécie podem induzir estados de stress mais ou menos intensos, podendo o stress também ser um factor condicionante da qualidade de ovos.

Na bibliografia disponível não foi possível encontrar informação relativa à qualidade de ovos de linguado senegalês que utilizasse parâmetros relativos à actividade enzimática e a concentrações de metabolitos de vias metabólicas chave para o desenvolvimento, como por exemplo o metabolismo dos hidratos de carbono ou das proteínas. Em outras espécies os resultados de testes enzimáticos e concentrações de metabolitos ligados aos metabolismos supracitados puderam ser relacionados com a qualidade de ovos, através das relações estabelecidas com as percentagens de viabilidade, fecundação, eclosão, sobrevivência larvar até à abertura da boca ou até ao ponto de não retorno. Deste modo, o presente trabalho procurou encontrar bio-marcadores de qualidade de ovos para esta

espécie usando dados morfofisiológicos registados e informação analítica obtida referente à actividade de algumas enzimas e à concentração de alguns metabolitos.

Os ovos utilizados no presente trabalho foram obtidos a partir do grupo de reprodutores mantidos na Estação Experimental do Ramalhete, da Universidade do Algarve, na época de reprodução de 2006, que se estendeu desde o fim de Março até ao fim de Junho. Estes ovos foram obtidos deixando que os reprodutores desovassem naturalmente durante a noite e foram colhidos na manhã após a postura. Após recolha, os ovos foram separados nas fracções flutuante e não flutuante, em água salgada. A fracção flutuante foi considerada como viável e a fracção não flutuante considerada como não viável. Mediu-se o diâmetro aos ovos provenientes da cada fracção, verificou-se o estado de fertilização e colocaram-se a incubar até à eclosão, nas mesmas condições físico-químicas em que estavam mantidos os reprodutores. Investigou-se o estado energético dos ovos pela presença e quantificação de ATP. Quantificou-se ainda a presença de metabolitos do metabolismo dos hidratos de carbono (níveis hidratos de carbono totais, monossacáridos (hexoses, 6-desoxihexoses e heptoses), ribose, cetoses, ácidos siálicos, glucose-6-fosfato e fructose-6-fosfato), bem como a actividade de enzimas intervenientes neste metabolismo (glucose-6-fosfatase, glucose-6-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase). Analisou-se também a actividade de enzimas ligadas a processos autolíticos (fosfatases ácida e alcalina) e ligadas ao catabolismo de aminoácidos (aspartato transaminase: transaminação). Ovos, quer da fracção flutuante, quer da não flutuante, foram sujeitos aos mesmos ensaios bioquímicos.

Os ovos analisados demonstraram uma tendência para um aumento de viabilidade nas posturas até um máximo, sendo que para o final da época se constatou uma maior variabilidade na viabilidade das posturas. Nas últimas posturas analisadas, a viabilidade reduz-se de modo acentuado. Em termos de diâmetro dos ovos, os resultados obtidos vão de encontro aos resultados obtidos anteriormente por outros autores. Verificou-se, após análise gráfica, que existem diferenças entre ovos viáveis e não viáveis, não sendo no entanto confirmadas pelo teste estatístico Mann-Whitney ($Z=1.241451$; $\alpha=0.05$). Relativamente à percentagem de fecundação, constatou-se que mais perto do final da época de postura havia uma maior percentagem de ovos inviáveis fecundados, sugerindo que ovos inicialmente viáveis e fecundados poderiam ter abortado o seu

desenvolvimento. Quanto às eclosões, salienta-se a maior estabilidade na eclosão, com uma taxa $\geq 80\%$ nas amostras 8-14 e 17-29, sendo que as restantes amostras apresentaram maior variação. Relativamente aos resultados dos ensaios, verificou-se que os ovos viáveis possuíam maior actividade enzimática nas seguintes enzimas: fosfatase ácida, fosfatase alcalina, glucose-6-fosfatase, glucose-6-fosfato desidrogenase e aspartato transaminase. Estes ovos possuíam também níveis mais elevados de ATP e ribose (tanto na forma ligada como na forma livre). Os ovos não viáveis demonstraram ter maior actividade da enzima malato desidrogenase e níveis mais elevados de monossacáridos (hexoses, 6-desoxihexoses e heptoses), ácidos siálicos e cetoses.

Quando correlacionados os resultados dos ensaios bioquímicos com os parâmetros morfofisiológicos medidos nos ovos, apenas se obteve correlação entre a quantidade de ácidos siálicos presentes e a percentagem de fecundação. No entanto, esta correlação não apresentou poder explicativo algum ($P < 0.0001$). Assim, procedeu-se à separação das amostras através da utilização das curvas ROC (Receiving-Operating-Characteristics); procedimento que estabeleceu um valor de corte para os resultados de cada ensaio efectuado. Conforme a estatística do teste, valores acima/abaixo desse valor de corte estariam associados a ovos de alta qualidade. Deste modo, procedeu-se à selecção das melhores amostras, tendo por base o lote inicial de amostras. As amostras cujos valores estavam além/aquém do valor de corte em 7 dos 10 ensaios efectuados foram consideradas as melhores. Novamente, verificou-se a existência, ou não, de relações entre os parâmetros morfofisiológicos e os resultados obtidos dos ensaios de actividade enzimática e de concentração de metabolitos. Nesta nova análise, a correlação anteriormente referida entre as concentrações de ácidos siálicos e percentagem de fecundação não se confirmou. Porém, três novas relações foram definidas entre a actividade da glucose-6-fosfato-desidrogenase e os níveis de heptoses e 6-desoxihexoses com a percentagem de viabilidade ($\alpha = 0.05$). Tendo em conta estas relações propõe-se o uso da actividade da glucose-6-fosfato-desidrogenase e os níveis de heptoses e 6-desoxihexoses como bio-marcadores de qualidade de ovos em *Solea senegalensis*.

Palavras-chave: Qualidade de Ovos, *Solea senegalensis*, Actividade Enzimática, Metabolitos, Metabolismo dos Hidratos de Carbono

