

ONCORHYNCHUSMYKISS (OSTEICHTHYES: SALMONIDAE) İN
SOLUNGAÇ ES TERAZİNİN
HAM DOKU HOMOJENATLARINDA
KİSMİ KARARTI RİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep EKER

(201392011015)

Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Salih GÖRGÜN

HAZİRAN 2015

ZEYNEP EKER'in hazırladığı ve "*Oncorhynchus mykiss* (Osteichthyes: Salmonidae)'in solungaç esterazının ham doku homojenatlarında kısmi karakterizasyonu" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOKİMYA ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Salih GÖRGÜN.

Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ferda CANDAN.

Cumhuriyet Üniversitesi

Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ.

Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Zeynep EKER, 2015

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Salih GÖRGÜN'e,

Yağ asitlerinin analizlerinde katkı sunan Dr. Gökhan ZENGİN'e (Selçuk Üniversitesi),

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımcı olan arkadaşım Serhat DURMAN'a ;

Laboratuvar imkanlarını sunan Fen Fakültesi Biyokimya ve Biyoloji Bölümleri'ne,

Bugünlere gelmemi sağlayan tüm Biyokimya Anabilim Dalı hocalarıma,

ve eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu
(Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- S Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- S Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- S Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

....// 2015

Zeynep EKER

ÖZET

***ONCORHYNCHUS MYKISS* (OSTEICHTHYES: SALMONIDAE) 'IN SOLUNGAÇ ESTERAZININ HAM DOKU HOMOJENATLARINDA KISMİ KARAKTERİZASYONU**

ZEYNEP EKER

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Salih GÖRGÜN

2015, xiii + 53 sayfa

Bu çalışmada *Oncorhynchus mykiss*'in solungaç dokusu esteraz aktivitesinin genel özellikleri ve bazı kimyasalların aktiviteye etkileri araştırılmıştır. Solungaç esterazının optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 30 °C ve 8,8 olduğu belirlenmiştir. Araştırılan kimyasallar arasında, EDTA, Na-taurokolat ve benzamidinin aktiviteyi düşürdüğü belirlenmiştir. Araştırılan organik çözücüler genel olarak solungaç esteraz aktiviteleri üzerine artırıcı bir etkiye sahip olmuştur. Deterjanların solungaç esteraz aktivitesine etkisi değerlendirildiğinde, triton X 100'ün tüm uygulamaları enzim aktivitesinde düşüşe yol açmıştır. Tween uygulamalarının triton X 100 den daha ılımlı olduğu görülmüştür. *O. mykiss*'in solungaç esterazının K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla $2,25 \pm 0,29$ mmol.mL⁻¹ ve $2,80 \pm 0,17$ umol.mL⁻¹ olduğu bulunmuştur. Native-PAGE çalışması sonucunda solungaç esteraz izozim band bölgesinin molekül ağırlığının yaklaşık 72 kDa olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmanın bir diğer kısmı *O. mykiss*'in solungaç dokusundaki toplam lipid yağ asidi bileşiminden oluşmuştur. En fazla bulunan yağ asitlerinin C16:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C20:4 n-6 ve C22:6 n-3 olduğu bulunmuştur. Bulgularımız, ne insan beslenmesinde ne de endüstriyel süreçlerde kullanılmayan solungaç dokusunun bu amaçla daha fazla araştırmayı hak ettiğini önermektedir.

Anahtar sözcükler: *Oncorhynchus mykiss*, solungaç esterazı, karakterizasyon, yağ asitleri.

ABSTRACT

PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE GILL ESTERASE OF *ONCORHYNCHUS MYKISS* (OSTEICHTHYES: SALMONIDAE) IN CRUDE TISSUE HOMOGENATES

Zeynep EKER

Master of Science Thesis, Department of Biochemistry

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Salih GÖRGÜN

2015, xiii + 53 pages

In this study, esterase activity in the gill tissue of *Oncorhynchus mykiss* was investigated in terms of its general properties and the effects of some chemicals. The temperature and pH optima for the gill esterase were determined to be 30 °C and 8.8, respectively. Among chemicals, EDTA, Na-taurocholate and Benzamidine decreased the esterase activities. Organic solvents investigated generally had an enhancing effect on the gill esterase activities. When assessed the effects of detergents on the gill esterase activities, all applications of Triton X 100 resulted in decreases in the enzyme activity. It seems that Tween applications are much more moderate than that of Triton X 100 applications. K_m and V_{max} values for the gill tissue of *O. mykiss* were found to be 2.25 ± 0.29 mM and 2.80 ± 0.17 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively. In the result of Native-PAGE study, molecular weight of the gill esterase isozyme band region was found to be approximately 72 kDa.

Another part of this study consisted of the fatty acid composition of the total lipid in the gills of *O. mykiss*. It was found that the most abundant fatty acids were C16:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C20:4 n-6 and C22:6 n-3. Our results have suggested that the gill tissue that is not used neither for human nutrition nor for industrial processes is deserving much more investigation for these purposes.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*, gill esterase, characterization, fatty acids.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1 Esterazlar.....	1
1.2 Esterazlar a/p Hidrolaz Katlı Enzimlerdendir.....	2
1.3 a/p Hidrolaz Katının Muhafaza Edilmiş Özellikleri.....	2
1.4 Esterazlar (EC 3.1.1.1) ve Lipazlar (EC 3.1.1.3).....	4
1.5 Esterazların (ve lipazların) Çalışma Mekanizması.....	5
1.6 Esterazların Fonksiyonları.....	7
1.7 Esterazların Günümüzde Uygulama Alanları.....	7
1.8 Yağ Asitleri.....	8
1.9 Esansiyel Yağ Asitleri.....	11
1.10 Araşidonik asit ve Eikosapentaenoik asitin Rolü.....	11
1.11 Esterazlar ile İlgili Literatür Çalışmalarına Örnekler.....	13
2..MATERYAL VE METOT	16
2.1 Kullanılan Kimyasallar.....	16
2.2 Kullanılan Reaktifler.....	16
2.3 Kullanılan Cihazlar.....	16
2.4 Balık Örneklerinin Sağlanması.....	17
2.5 Solungaç Doku Homojenatının Hazırlanması.....	17
2.6 Protein Miktar Tayinleri.....	17
2.7 Esteraz Aktivitesi Tayinleri.....	18
2.8 Solungaç Esterazına Sıcaklığın Etkisi.....	18
2.9 Solungaç Esterazına pH'ın Etkisi.....	18
2.10 Solungaç Esterazına Substrat (p-NPA) Etkisi.....	19
2.11 Solungaç Esterazına Deterjanların Etkisi.....	19
2.12 Solungaç Esterazına Organik Çözücülerin Etkisi.....	19
2.13 Solungaç Esterazına Seçilmiş Kimyasalların Etkisi.....	20
2.14 Solungaç Dokusu Toplam Lipit ve Yağ Asidi Çalışmaları.....	20
2.15 Elektroforetik Çalışmalar.....	20
2.16 İstatistiksel Analiz.....	21
3. BULGULAR	22
3.1 Solungaç Esterazına Sıcaklığın Etkisi.....	22
3.2 Solungaç Esterazına pH'ın Etkisi.....	24
3.3 Solungaç Esterazına Substrat (p-NPA) Etkisi.....	26
3.4 Solungaç Esterazına Deterjanların Etkisi.....	30
3.5 Solungaç Esterazına Organik Çözücülerin Etkisi.....	32
3.6 Solungaç Esterazına Seçilmiş Kimyasalların Etkisi.....	35
3.7 <i>O. mykiss</i> Solungaç Esterazı Native-PAGE Bulguları.....	38
3.8 <i>O. mykiss'in</i> Solungaç Dokusu Toplam Lipit Yağ Asidi Bileşimi.....	39

4. TARTIŞMA ve SONUÇ	41
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1	a/p hidrolaz katının şematik sunumu	3
Şekil.2	Elektrostatik sapan modeli.....	6
Şekil.3	Yağ asidi sentezi.....	10
Şekil.4	Araşidonik asit üzerinden eikozanoidlerin sentezi.....	12
Şekil.5	Solungaç esterazına sıcaklığın etkisi.....	23
Şekil.6	Solungaç esterazı spesifik aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	24
Şekil.7	Solungaç esterazına pH'ın etkisi.....	25
Şekil.8	Solungaç esterazı spesifik aktivitesine pH'ın etkisi.....	26
Şekil.9	Michaelis-Menten Grafiği.....	28
Şekil.10	Lineweaver-Burk Grafiği.....	29
Şekil.11	Solungaç esterazına deterjanların etkisi.....	31
Şekil.12	Solungaç esterazı spesifik aktivitesine deterjanların etkisi.....	31
Şekil.13	Solungaç esterazına organik çözücülerin etkisi.....	34
Şekil.14	Solungaç esterazı spesifik aktivitesine organik çözücülerin etkisi.....	34
Şekil.15	Solungaç esterazına seçilmiş kimyasalların etkisi.....	37
Şekil.16	Solungaç esterazı spesifik aktivitesine seçilmiş kimyasalların etkisi.....	37
Şekil.17	Solungaç esteraz izozim band bölgesi ve marker.....	38
Şekil.18	Örnek ve marker'a ait Rf değerleri.....	38

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1	Standart enzim aktivite yöntemi tüp içerikleri.....	18
Tablo 2	Deterjanlar için enzim aktivite yöntemi tüp içerikleri.....	19
Tablo 3	Organik çözücüler için enzim aktivite yöntemi tüp içerikleri.....	19
Tablo 4	Seçilmiş kimyasallar için enzim aktivite yöntemi tüp içerikleri.....	20
Tablo 5	Solungaç esterazına sıcaklığın etkisi.....	23
Tablo 6	Solungaç esterazına pH'ın etkisi.....	25
Tablo 7	<i>O. mykiss</i> , solungaç esteraz aktivitesi üzerine substrat (p-NPA) etkisi.....	27
Tablo 8	Deterjanların <i>Oncorhynchus mykiss'in</i> solungaç doku esterazlarına etkileri	30
Tablo 9	Organik çözücülerin <i>O. mykiss'in</i> solungaç doku esterazlarına etkisi.....	33
Tablo 10	Bazı kimyasalların <i>Oncorhynchus mykiss'in</i> solungaç doku esterazlarına etkileri.....	36
Tablo 11	<i>O.mykiss'in</i> solungaç dokusu yağ asidi bileşimi (%).....	40

KISALTMALAR DİZİNİ

EC	: Enzim Sınıflandırma
CoA	: Koenzim A
BSA	: Bovine Serum Albümin
p- NPA	: para-Nitrofenil Asetat
p- NPB	: para-Nitrofenil Butirat
Na- taurokolat	: Sodyum taurokolat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetikasit
DYA	: Doymuş Yağ Asidi
TÇDmYA	: Tek Çift Bağ İçeren Doymamış Yağ Asidi
ADmYA	: Aşırı Doymamış Yağ Asidi
Km	: Michaelis-Menten sabiti
V_{max}	: Maksimum hız
TDmYA	: Toplam Doymamış Yağ Asidi
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
DHA	: Dokosahekzaenoik Asit
ARA	: Araşidonik Asit
LA	: Linoleik Asit
ALA	: a- linolenik Asit
GLA	: Y- linolenik Asit
HETE	: Hidroksieikozatetraenoik Asit
COX	: Siklooksijenaz
DGLA	: dihomu- Y-linolenik Asit

1. GİRİŞ

1.1 Esterazlar

Esterazlar, enzim sınıflandırma komisyonunununa göre "EC 3.1.1.1" olarak temsil edilmektedirler. Genel olarak esterazların geniş bir substrat grubundaki ester bağlarının hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfına ait enzimler oldukları bildirilmektedir. Bununla birlikte, günümüzde esteraz sınıfından enzimlerin ester bağlarının oluşumunu da katalizledikleri bilinmektedir. Esterazlar mikroorganizma, bitki ve hayvansal organizmaları içine alan tüm canlı hatlarında var olan enzimlerdir. Bu enzimlerin çoğunluğunun geniş bir substrat toleransına sahip olmaları nedeniyle karbon kaynaklarına ulaşmaya olanak sağlayan veya katabolik yollarda gereksinilen enzimler oldukları düşünülmektedir. Ayrıca, esterazlar yüksek stereospesifite ve regiospesifiteye sahip olan enzimler olup, bu özellikleri onları çeşitli kimyasalların sentez olaylarında optik olarak aktif saf bileşenlerin üretimi için cazip biyokatalizörler yapmaktadır. Esterazları bu anlamda önemli kılan faktörlerden bir diğeri ise, kofaktörlere gereksinim duymamaları ve genellikle organik çözücülerin varlığında dahi oldukça kararlı olabilmeleridir (Bornscheuer ve Kazlauskas, 1999; Patel, 2000; Bornscheuer, 2002 a).

Yukarıda bahsettiğimiz özellikler nedeniyle birçok farklı kaynaktan esterazlar üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bununla birlikte, balık dokularından özellikle solungaç esterazlarına odaklanan çalışmaların yok denecek kadar az olduğu görülmektedir. Bu nedenle, bu Yüksek Lisans çalışmasında, ülkemizde önemli bir kültür balığı türü olan gökkuşuğu alabalığı *Oncorhynchus mykiss* (Osteichthyes: Salmonidae)'in solungaç esterazlarının ham doku homejenatlarında karakterizasyonu amaçlanmıştır.

1.2 Esterazlar a/p Hidrolaz Katlı Enzimlerdendir

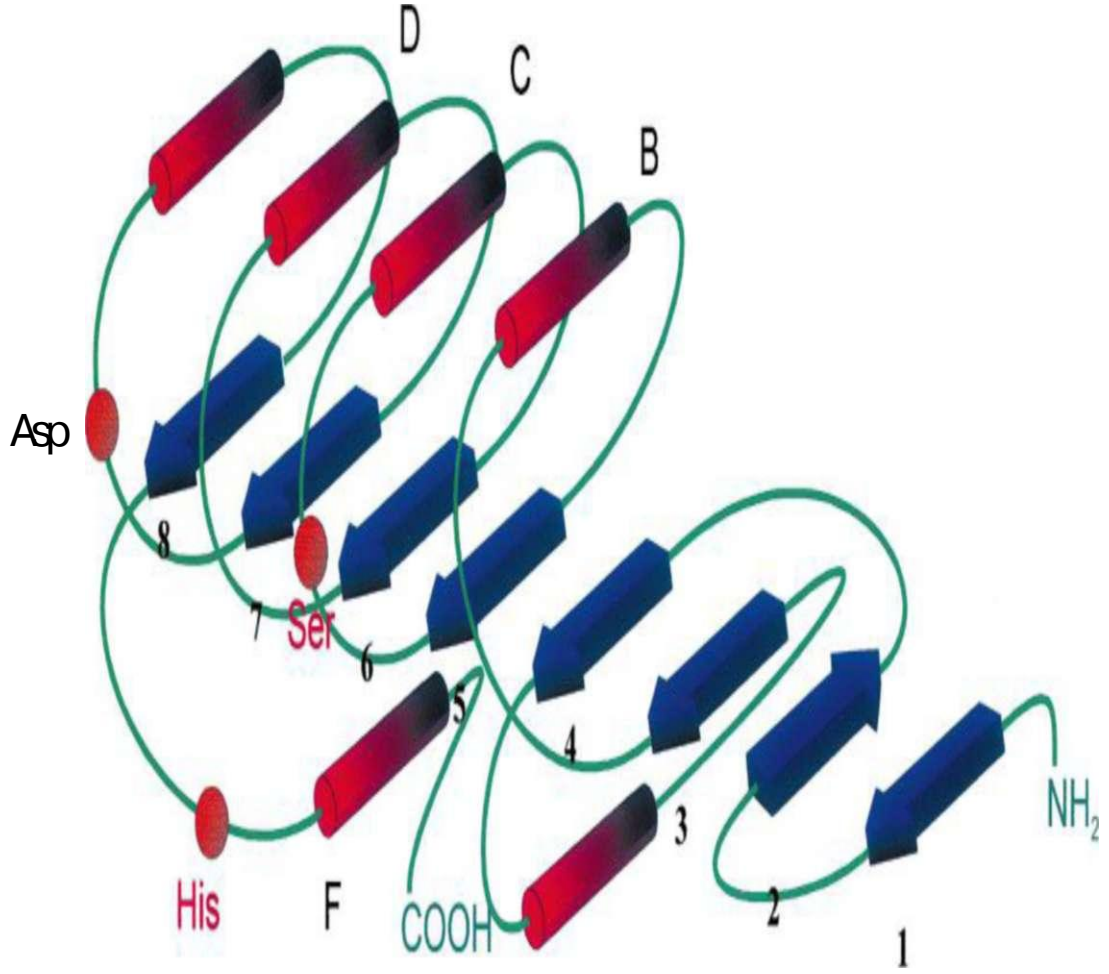
Doğada çok sıklıkla bulunan domain katları a heliksler tarafından çevrelenen merkezi, paralel veya karışık P plakasından oluşan a/p domainlerdir. *Geotrichum candidum*'da önemli amino asit dizi benzerliğini içermeyen ve farklı substratları kullanan lipaz, asetilkolinesteraz, buğday serin karboksipeptidaz II, diene lakton hidrolaz ve haloalkan dehalojenaz enzimleri üzerinde yapılan çalışmalardan a/p domaininin bir alt sınıfı "a/p hidrolaz" katlanması olarak adlandırılmıştır. Bu enzimlerin amino asit dizilimi ve kullandıkları substratlardaki farklılığa rağmen, katalitik merkezlerindeki amino asit düzenlenmelerinin korunduğu düşünülmektedir (Ollis ve ark., 1992; Nardini ve Dijkstra, 1999). Bu özellik a/p hidrolaz ailesini, bilinen en yaygın ve çok yönlü protein katlanmalarından biri kılmaktadır. Buna bağlı olarak epoksid hidrolazlar, dehalojenazlar, proteazlar, peroksidazlar, lipazlar ve esterazlar a/p hidrolaz katlanmasına sahip enzim ailesi içerisinde yer almaktadırlar (Nardini ve Dijkstra, 1999).

1.3 a/p Hidrolaz Katının Muhafaza Edilmiş Özellikleri

Kristalografik ve biyoinformatik çalışmalardan elde edildiği üzere (Ollis ve ark., 1992; Hubbard ve ark., 1998; Orengo ve ark., 1998; Cousin ve ark., 1998), standart bir a/p hidrolaz katının a heliksler tarafından her iki taraftan sarılan çoğunlukla paralel (sadece ikinci P ipliği antiparaleldir) sekiz iplikli p plakadan oluşan bir yapı olduğu bildirilmektedir (Nardini ve Dijkstra, 1999).

"Merkezi p plakasının topolojisi +1, +2, -1x, +2x, (+1x), tür ve yaklaşık olarak 90 °C' lik bir açı ile birbirini geçen ilk ve son iplikler ile, sol-el süperheliksel bir büküm sergiler. Bükülmenin derecesi önemli farklılıklar gösterebilir ki, en fazla sapmanın meydana geldiği ipliklerin genellikle p5 ve p6 iplikleri arasında lokalize olduğu görülmektedir. Aynı zamanda, merkezi p plakasının p ipliklerini birleştiren a helikslerin uzaysal pozisyonunda da farklılıklar olabilmektedir. Bazı durumlarda bu helikslerin bir ya da daha fazlası tamamen ortadan kalkmış olabilir. Bunlardan sadece aC olarak isimlendirilen heliksin son derece korunmuş olduğu bulunmuştur. Bu heliks p plakasının merkezinde stratejik bir pozisyondadır ve aktif merkezdeki nükleofilik rezidenin doğru pozisyonda olmasında anahtar bir rol oynamaktadır" (Nardini ve Dijkstra, 1999).

a/p hidrolaz katlanmasına sahip çok geniş çeşitlilikteki enzimlerin aktif merkezleri yaygın bir yapıyı paylaşmaktadır. Bu enzimlerde aktif merkezi meydana getiren amino asitler "katalitik triad" olarak adlandırılmakta olup; p5 ipliğinden sonra gelen bir nükleofil (serin, sistein veya aspartik asit), p7 ipliğinden sonra gelen bir asit rezide ve son p ipliğinden sonra gelen bir histidin rezidesinden meydana gelmektedir. Bu anlamda katalitik triad "serin-aspartat-histidin" amino asitlerinden meydana gelmektedir (Şekil 1). Bazı lipazlarda aspartat yerine glutamatın bulunabildiği bildirilmiştir (Ollis ve ark., 1992; Nardini ve Dijkstra, 1999; Bornscheuer, 2002 a).



Şekil.1 a/p hidrolaz katının şematik sunumu (Bornscheuer, 2002 a).

1.4 Esterazlar (EC 3.1.1.1) ve Lipazlar (EC 3.1.1.3)

Esterazlar ve lipazlar hidrolaz katlanması sınıfındaki en önemli enzim gruplarından ikisini teşkil etmektedirler (Bornscheuer, 2002 a). Her iki enzim grubu da ester bağlarının yıkımı ve oluşumunun katalizini gerçekleştirebilmelerine ve amino asit dizi benzerliklerine rağmen, aralarında substrat özgünlüğü ve fizyolojik rolleri itibariyle önemli farklılıklar da bulunmaktadır (Gilham ve Lehner, 2005). Bu anlamda, esterazlar arasında, gerçek esterazlar (karboksilesterazlar) "karboksil ester hidrolazlar" olarak adlandırılıp, "EC 3.1.1.1" enzim sınıfında bulunmaktadırlar. Lipazlar ise "triaçil gliserol hidrolazlar" olarak adlandırılırlar ve "EC 3.1.1.3" enzim sınıfında yer alırlar (Eggert ve ark., 2002; Faiz ve ark., 2007).

Esteraz ve lipazların en ilginç özelliklerinden birisi her iki enzimin de su ile etkileşebilir yüzey kısımlarına sahip olmalarına rağmen, bu ortamda substratlarının görel olarak çözünmez formda olmalarıdır. Bu nedenle bu enzimler substratlarını "su-yağ" ara yüzeyinde dönüşüme uğratmakta olup, bu olgu ara-yüzey aktivasyonu (interfacial activation) olarak adlandırılmaktadır. Özellikle deterjan ve bazı lipid, protein türünden unsurların suda çözünmez olan substratların emülsifikasyon süreci için gerekli oldukları bildirilmektedir (Beisson ve ark., 2000). Ara yüzey aktivasyonu ile ilgili olarak, lipazların genellikle kapak bölgesi (lid region) adı verilen bir bölgeye sahip oldukları belirtilmekle birlikte, yapılan çalışmalardan birkaç lipazda bu bölgenin bulunmadığı belirlenmiştir (Lotti ve Alberghina, 2007).

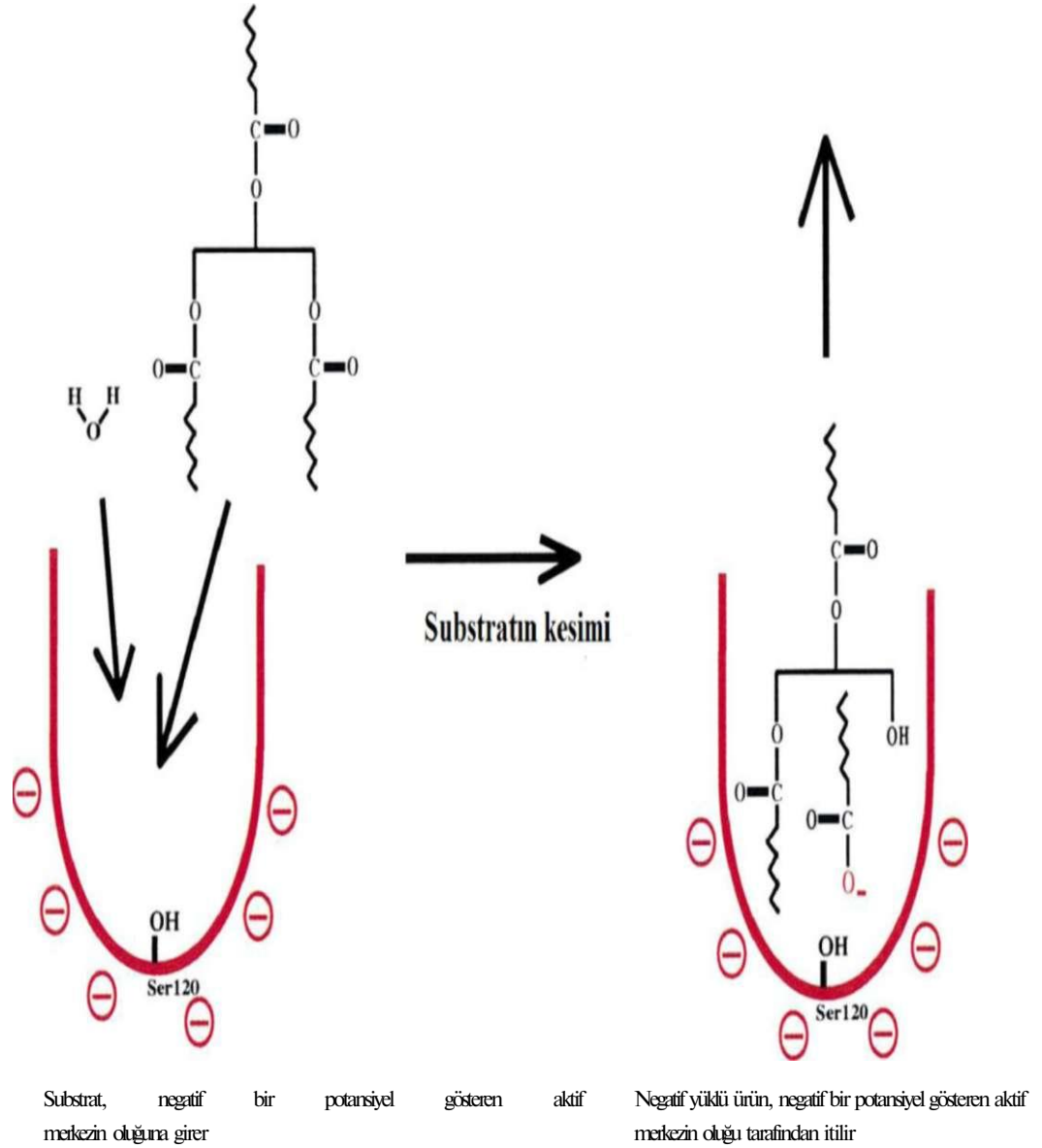
Esterazları lipazlardan ayıran özellikler dizi analizi ve protein elektrik yüklerini esas alan önemli bir çalışmanın sonuçlarında tartışılmıştır. Buna göre, esterazlar lipazlardan farklı olarak kapak bölgesi içermemektedirler. Ayrıca esterazlar tercihen kısa zincirli yağ asitlerinin ester bağlarını kırarken, lipazların esterazlardan daha geniş bir substrat spektrumunu kullandıkları görülmektedir. Buradan substratın fiziksel durumunun çoğunlukla substrat özgünlüğüne destekleyici bir unsur olduğu anlaşılmaktadır. Uzun zincirli yağ asitleri suda çözünmez veya çok az çözünerek emülsiyon formlarda bulunabilirler. Bu nedenle, lipazlar suda çözünmeyen ya da yoğun bir şekilde kümeleşmiş bir substrat ile tanımlanabilirler. Ayrıca lipaz aktivitesi substrat derişimi ile ilgili olmayıp, doğrudan toplam substrat alanı ile ilişkilidir. Esteraz aktivitesi suda çözünme yeteneği daha fazla olan substratların kullanılmasıyla arttığı bilinmektedir (Fojan ve ark., 2000). Çalışmamızda da esterazların bu özelliğinden faydalanılarak balık solungaç dokusunun genel esteraz

aktiviteleri araştırılmıştır. Burada lipazların da benzer özellikleri paylaşımlarından dolayı lipazlar hakkında da bilgi verilmiştir. Günümüzde esteraz ve lipazların farklılıklarının ayırt edilmesi hala problemlidir.

1.5 Esterazların (ve lipazların) Çalışma Mekanizması

Esterazların çalışma mekanizması pH'ın bir fonksiyonu olarak enzim molekülünün yüzeyinin elektrostatik potansiyelin yine protein yüzeyindeki anahtar rezidelerin bilgisiyle birleştirilmesiyle belirlenmiştir. Bu model Petersen ve ark. (2001) tarafından ortaya konulmuş ve elektrostatik sapan (the electrostatic catapult) modeli olarak adlandırılmıştır. Bu modele göre, substrat enzimin nötral ile bazik pH değerleri arasında negatif potansiyel yük gösteren aktif merkezine girer ve ester bağının kırılması sonrasında negatif yüklü ürün, yine negatif yüklü aktif merkez tarafından itilir (Petersen ve ark., 2001). Bu olaylar ve enzimin aktif merkezine ait veriler Şekil 2'de görülmektedir.

ELEKTROSTATİK SAPAN MODELİ



Şekil.2 Elektrostatik sapan modeli esterazların (lipazlar da dahil) nasıl çalıştıklarını açıklamaktadır (Petersen ve ark., 2001)

1.6 Esterazların Fonksiyonları

Esterazlar (karboksilesterazlar) birçok dokunun sitozolü ve hücrel organellerden ise endoplazmik retikulumlarında bulunan enzim sınıfıdır. Yukarıda bahsedildiği üzere hidrolaz sınıfından bir enzim olup, tiyoester, esterler, amidler gibi farklı bağların hidrolizlerini gerçekleştirebilmektedirler. Bu rollerine ek olarak, özellikle organofosfatlı bileşenler başta olmak üzere toksik bileşenlerin detoksifikasyonu ve ilaç metabolizmasında da gereksinim duyulduklarına dair önemli bilgiler mevcuttur (Satoh ve Hosokawa, 1998; Satoh ve Hosokawa, 2000; Gilham ve Lehner, 2005).

Günümüzde karboksilesterazlar üzerine yapılan çalışmalar, en belirgin rollerinin uzun zincirli açıl-karnitin ve açıl-KoA esterleri dahil olmak üzere kısa ve uzun zincirli lipit bileşenlerin hidrolizini katalizlediklerini bildirmektedir (Satoh ve Hosokawa, 1998; Gilham ve Lehner, 2005). Mevcut çalışmamız *O. mykiss'in* solungaç dokusundaki esterazları, lipit sindirimi fonksiyonu açısından değerlendirmektedir.

1.7 Esterazların Günümüzde Uygulama Alanları

Farmasötikler, pestisitler ve saf kimyasallar için inşa bloklarını sentezleme süreçleri esnasındaki biyokataliz uygulamalarında enzimler büyük yer tutmaktadır. Enzim uygulamalarının büyük çoğunluğu hidrolazları içermekte olup, bu sınıf içerisinde ise esterazlar baskın biyokatalistlerdir (Bornscheuer, 2005; Bornscheuer ve Schmidt, 2005). İki farklı makale özellikle mikrobiyal kaynaklardan enzimlerin organik sentez (Asano, 2002) ve endüstriyel süreçlerde (Ogawa ve Shimizu, 2002) kullanılabilirliklerini detaylı bir şekilde tartışmıştır. Ancak günümüzde memeli dokularından bu tarz enzimlerin araştırılması oldukça sınırlı görünmektedir.

Esterazların (ve lipazların) günümüzde oldukça farklı amaçlar doğrultusunda dizayn edilmeleri yönünde çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların immobilizasyon, çözünürlük ve kimyasal türetme gibi fizikokimyasal metotlar, esterifikasyona karşı hidroliz, su aktivitesinin kontrolü gibi reaksiyon mühendisliği metotları, daha geniş bir uygulama alanı olarak ise oransal protein dizaynı ve yönlendirilmiş evrimi içeren moleküler biyoloji metotları oldukları görülmektedir (Bornscheuer ve ark., 2002).

Günümüzde esterazların izoenzim sınıflarının bulunması enantioselektif süreçlerde faydalı sonuçlar doğurabilmektedir. Bu amaçla kullanılan en önemli iki enzim örneği domuz karaciğer esterazı ve *Candida rugosa* lipazını içermektedir. Bu enzimlerden ilkinin baskın olarak üç izoenzim formunun bulunduğu bilinmekle birlikte, bu izoenzim formlarının farklı enantioselektif süreçlerde kullanılabilirliği üzerine çalışmalar devam etmektedir (Bornscheuer, 2002 b). Bu veriler ışığında esterazların doğal rollerine ek olarak, günümüzde daha çok biyoteknolojik ve endüstriyel süreçlerde kullanılmaları yönünde fonksiyonlarının değiştirilebilmeleri için önemli çabalar olduğu anlaşılmaktadır.

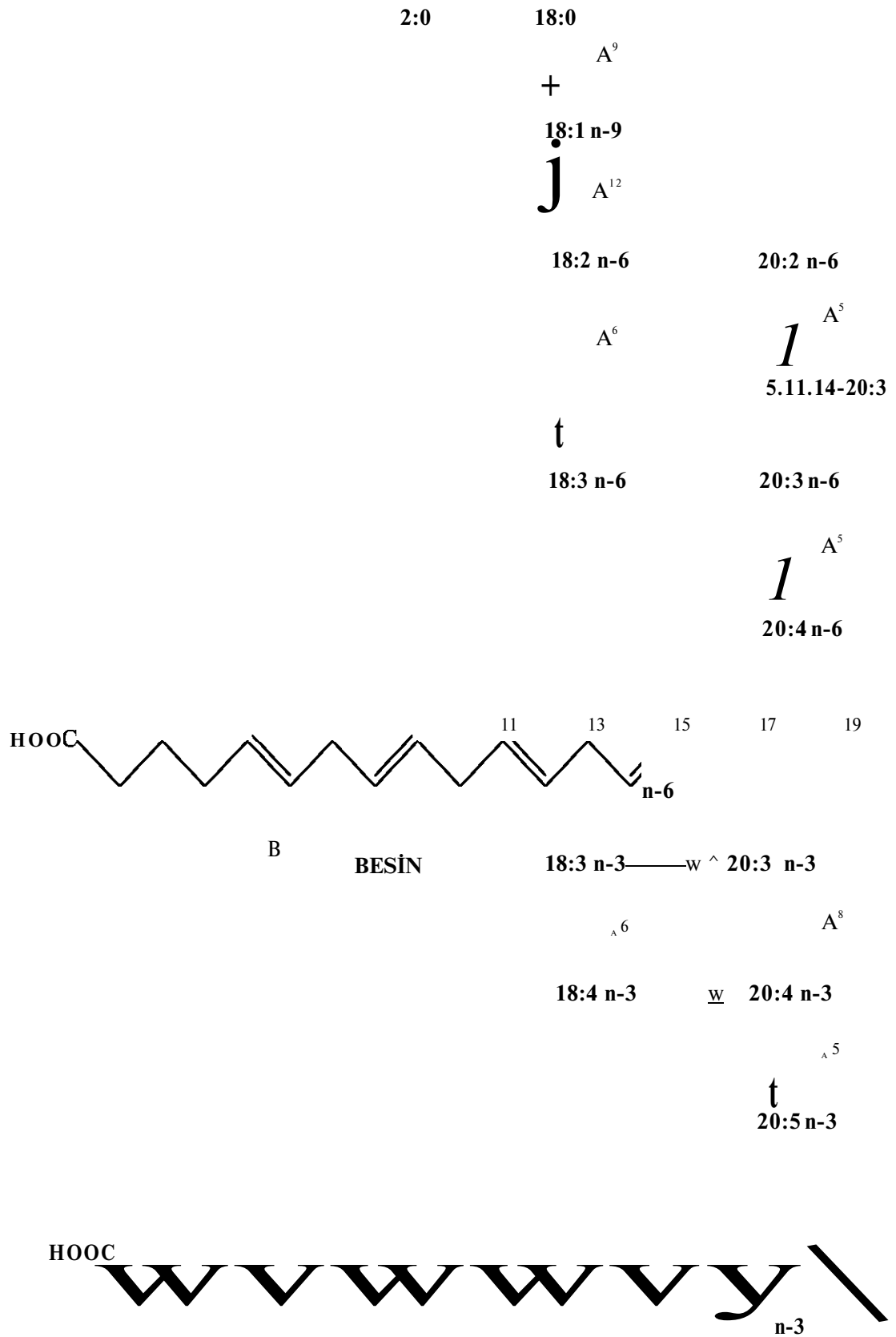
1.8 Yağ Asitleri

Lipidler enerji kaynağı ve yağda çözülebilir vitaminlerin taşıyıcıları olmaları gibi nedenlerden dolayı balık besininin önemli bileşenlerinden birisidir (Lee, 2001; Rueda ve ark., 2001; Lee ve ark., 2003). Bununla birlikte, lipidler hayvansal organizmalarda sadece enerji kaynağı olmayıp, yapı taşları olan yağ asitleri biyolojik membranların çatısını oluştururlar. Bu yağ asitlerinden özellikle uzun zincirli ve aşırı doymamış karbon atomlarına sahip olanlar organizmada önemli biyolojik mediyatörler olan eikozanoid ve prostaglandinlerin sentezinde öncü olarak görev yapmaktadırlar (Sargent ve ark., 1999; Aras ve ark., 2003).

Balıklarda yağ asidi kompozisyonunu belirlemeye yönelik çalışmaların 1952 yılında başladığına dair veriler olmakla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmaların balık yağlarının insan beslenmesindeki doğasını daha iyi aydınlattığı bildirilmektedir (Kaya ve ark., 2004). Balık yağlarının özellikle omega-3 (co-3 veya n-3) olarak bilinen yağ asitleri olan eikosapentaenoik asit (C20:5 n-3, EPA) ve dokosaheksaenoik asit (C22:6 n-3, DHA) asitlerini fazla miktarlarda içermesinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Holub ve Holub, 2004).

Yağ asitleri doymuş ve doymamış olmak üzere iki farklı tipte olabilirler. Doymuş yağ asitlerinin karbon atomları arasında çift bağ bulunmazken doymamış yağ asitlerinde bir ya da daha fazla sayıda çift bağın varlığı söz konusudur. Yağ asidinin doymamış olduğu durumda bir tane çift bağ varsa buna tek çift bağ içeren doymamış yağ asidi (TÇDmYA), daha fazla çift bağ varsa çok çift bağ içeren ya da aşırı doymamış yağ asidi (ADmYA) denilmektedir (Kaya ve ark., 2004). Yağ asitlerinin iki karbon atomunda başlamak suretiyle daha uzun zincirli ve doymamış

formlarına dönüştüğü metabolik yolun sunumu aşağıda şekilde verilmiştir (Ogg ve ark., 1993). Sağlıklı bir balıkta yılın belirli bir döneminde protein miktarının hemen hemen sabit olmasına karşın, yağ asitlerinin sabit bir kompozisyonda olmadığı bilinmektedir. (Dörücü, 1997). Bu olgu birçok farklı balık türlerinin yağ asidi bileşiminin araştırılmasına neden olmuştur. Ayrıca balıkların farklı organlarında farklı yağ asidi bileşimine sahip oldukları yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir (Görgün ve Akpınar, 2007; Akpınar ve ark., 2009; Aras ve ark., 2003). Yiyecek ulaşılabilirliği, balığın yaşı, yakalandığı bölge, balığın olgunluk durumu, mevsim, balığın üreme periyodu ve dokunun örnekleme noktasına bağlı olarak balıklarda yağ asidi bileşiminin farklılıkları araştırılmıştır (Rueda ve ark., 2001; Aras ve ark., 2003; Görgün ve Akpınar, 2007).



Şekil.3 A) Asetattan ADmYA'ların sentezi. B) Besine bağlı olarak C18:3 n-3'ten daha uzun zincirli yağ asidi (C20:5 n-3)'ün sentezi (Ogg ve ark., 1993)

1.9 Esansiyel Yağ Asitleri

Esansiyel yağ asitleri balıklarda (ve memelilerde) basit öncül karbon atomlarından sentezlenemeyen ve besinle alınmaları zorunlu olan yağ asitleridir. Gelişim, büyüme ve uygun biyokimyasal fonksiyonların yerine getirilmeleri için esansiyel (vazgeçilmez) olmaları nedeniyle bu ada layık görülmüşlerdir (Le ve ark., 2009). Geleneksel olarak, 18 karbonlu öncüller olarak kabul edilen bir n-3 formu olan a linolenik asit (ALA, C18:3 n-3) ve bir n-6 formu yağ asidi olan linoleik asit (LA, C18:2 n-6) olmaksızın diğer daha uzun zincirli ADmYA'ler sentezlenemediği için özellikle bu iki yağ asidinin esansiyel olduğu bildirilmektedir. Bu iki yağ asidinin daha uzun zincirli ürünleri arasında araşidonik asit (ARA, C20:4 n-6), EPA ve DHA bulunmaktadır (Simopoulos, 1999; Le ve ark., 2009).

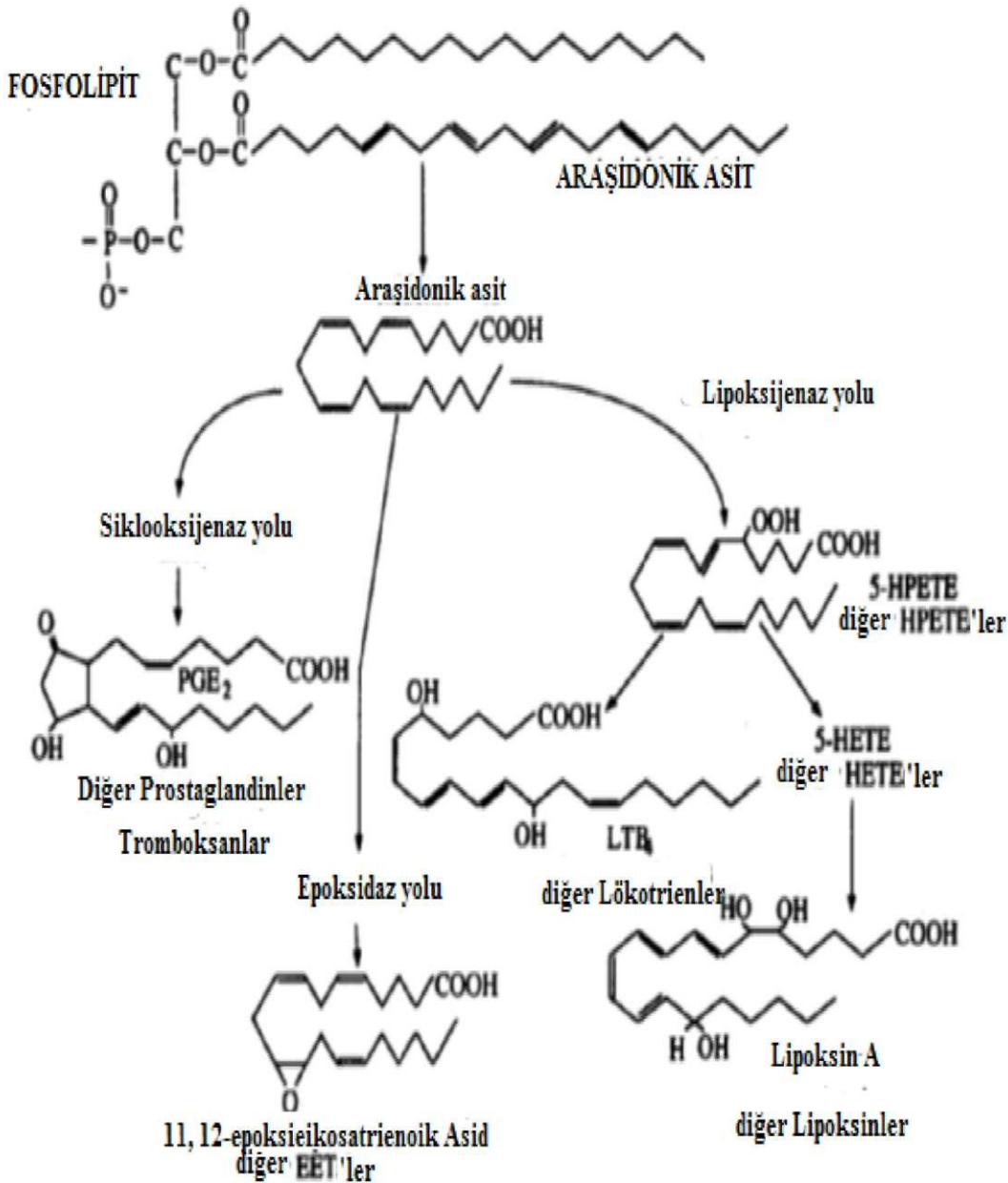
Esansiyel yağ asitleri açısından eksik beslenen ratlar üzerindeki deneylerde deri lezyonları, sekteye uğramış gelişim, renal toksisite, pulmoner anomaliler, artırılmış metabolik hız gibi anormal durumların ortaya çıktığı tablolar gözlenmiştir. Besine esansiyel yağ asitlerinin eklenmesiyle bu durumların ortadan kalktığı gözlenmiştir (Le ve ark., 2009).

1.10 Araşidonik asit ve Eikosapentaenoik asitin Rolü

20 karbonlu çok çift bağlı yağ asitlerinden biyolojik olarak aktif moleküller olan eikozanoidler sentezlenmektedir. Eikozanoidlerin sentezinde üç yol bulunmaktadır. Bunlardan birincisi prostaglandin ve tromboksanları oluşturan siklooksijenaz yolu, ikincisi lipoksinler, lökotrienler ve hidroksieikozatetraenoik asitleri (HETE) oluşturan lipoksijenaz yolu, üçüncüsü ise epoksit ve diollerin oluşturulduğu sitokrom P₄₅₀ epoksijenaz yoludur (Montgomery ve ark., 1996).

Eikozanoidlerin sentezi kısaca şu şekilde gerçekleşmektedir: Linoleik asit, A6 desaturazın aktivitesiyle y linolenik aside (GLA, n-6) dönüştürülür. GLA daha sonra elongaz denilen bir enzim yoluyla dihomö- y-linolenik aside (DGLA) dönüştürülür. DGLA ise A5 desaturaz aktivitesiyle araşidonik aside (ARA) dönüştürülür. ARA eikozanoidlerin sentezinde çok önemlidir çünkü seri 4 lökotrienler, seri 2 prostaglandinler ve tromboksan A2 bu asit üzerinden sentezlenmektedir. Bu eikozanoidlere siklooksijenaz (COX) ve 5-lipoksijenaz yoluyla ara bulunur ve hücre sinyalleşmesi, yangı ve vazomodülasyonda gereksinirler (Le ve ark., 2009). Bir diğer eikozanoid öncüsü ise balık yağlarında bol miktarlarda bulunan ve ARA ile yarışmalı bir metabolik yola sahip olan eikosapentaenoik asittir (EPA). Bununla birlikte,

EPA'dan açığa çıkan eikozanoidlerin ARA üzerinden sentezlenenlerle kıyaslandığında çok daha ılımlı biyolojik aktiviteye sahip oldukları bildirilmektedir. Ayrıca vücuttaki düşürülmüş eikozanoid faaliyetinin yüksek EPA/ARA oranıyla sağlandığı göz önüne alındığında EPA'nın eikozanoid faaliyetlerini düzenlemede önemli bir rolü olduğu anlaşılmaktadır (Sargent ve ark., 1999). Tüm bu anlatılanlar Şekil 4'te sunulmaktadır.



Şekil.4 Araşidonik asit üzerinden eikozanoidlerin sentezi (Ogg ve ark., 1993)

1.11 Esterazlar ile ilgili Literatür Çalışmalarına Örnekler

Günümüze kadar esterazlarla ilgili birçok çalışma yapılmakla birlikte, son zamanlarda literatürde yer almış olan esteraz çalışmalarına örnekler şu şekilde verilebilir:

Genel olarak esteraz ve lipazların mikrokok, laktokok, laktobasil gibi mikroorganizmalardan elde edilen esteraz ve lipazların lipolizise bağlı olarak peynir aromasının gelişimine katkı yapabilecekleri bildirilmektedir (Liu ve ark., 2001). Bu nedenle Liu ve ark. (2001) *Streptococcus thermophilus* türünden hücre içi esterazları anyon değişim, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografilerini kullanarak saflaştırmışlar ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuç ise esteraz I olarak adlandırdıkları bir enzimin lipolizis açısından peynir aromasının (lezzetinin) gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini önermektedir. Esterazlar ve lipazlar ayrıca peynir yüzeyi bakterisi *Brevibacterium linens*'den (Rattray ve Fox, 1997) ve *Arthrobacter nicotianae* (Smacchi ve ark., 2000) den izole edilerek karakterizasyonları yapılmıştır.

Liu ve ark. (2004) laktik asit bakterileri olan *Streptococcus thermophilus* ST1 ve *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* B1079 türleri ile çalışmışlar ve her iki türden elde edilen esterazların sulu bir çevrede alkololizis yoluyla ester sentezini yapabildiklerini göstermişlerdir. Ayrıca, her iki türden elde edilen esterazların hidroliz işlemini de yapabildikleri ve bu nedenle de türlerden elde edilen esterazların alkol açıltransferazlar olduklarını önermişlerdir. Bu esterazların hem sentez hem de hidroliz reaksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri nedeniyle biyoteknolojik öneme sahip enzimler oldukları bildirilmiştir.

Faiz ve ark (2007) *Anoxybacillus gonensis* A4 suşundan 62 kDa'luk bir moleküler kütleyle sahip olan, 5.5 pH ve 60-80 °C'ta maksimum aktivite gösteren oldukça önemli bir esteraz saflaştırmışlardır. Yukarıdaki mikrobiyal esterazlardan örneklerden de anlaşılacağı gibi mikrobiyal esterazların endüstriyel ve biyoteknolojik öneme sahip oldukları görülmektedir.

Bitkisel organizmalarda son zamanlarda esterazlar üzerine yapılan çalışmaların sınırlı olduğu söylenebilir. Bu çalışmalardan önemli olanların bir tanesi Fahmy ve ark. (2008) tarafından *Cucurbita pepo* cv. "Eskandrani" bitkisinde çalışılmış ve bu bitkiden kromatografik metotlar kullanılarak 47 kDa ve 66 kDa

molekül kütlesine sahip iki tane bitkisel esterazın karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bir diğer çalışma ise soya fasulyesi esterazı (soybean esterase) üzerinde yapılan ve organofosfat ile karbamat pestisitlere duyarlılığa odaklanan geniş bir çalışmayı kapsamaktadır. Bu çalışmada saflaştırılan esterazın 24 ve 37.2 kDa ağırlığındaki molekül kütlelerine sahip dimer yapıda ve kolinesteraz benzeri bir esteraz olduğu saptanmıştır (Lı ve ark., 2009).

Chandrasekaran ve ark. (2011) yenilebilir ve tıbbi amaçla kullanılabilen bir mantar türü olan *Sparassis crispa*'dan bir esteraz saflaştırmışlar ve bu enzimin alkalifilik bir özellikte olduğunu bildirmişlerdir.

Omurgasız ve omurgalı hayvanlarda esterazlar üzerine yapılan çalışmaların da sınırla sayıda olduğu söylenebilir. Fahmy ve ark. (2004) bir akar türü olan *Hyalomma dromedarifnin* gelişim evrelerindeki esterazları tanımlamaya çalışmışlar ve esteraz ve lipaz aktivitesi gösteren lipolitik enzimlerin bu türün embriyogenezinde merkezi bir rol oynayabileceklerini önermişlerdir.

Sucul omurgasızlarda esterazların üzerine önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalardan bir tanesi *Mytilus edulis'in* farklı doku ve hücre altı yapılarında esterazların dağılımını araştıran çalışmadır (Brown ve ark., 2004). Bir diğer çalışma ise Crustaceae familyasından olan *Procambarus clarkii*'de esterazların dokulardaki dağılımlarını belirlemeye odaklanan bir çalışma olup Vioque-Fernandez ve ark. (2007) tarafından yerine getirilmiştir. Bu çalışmada kerevit türünün kas dokuları, sinir dokusu ve sindirim bezlerinde asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz ve karboksilesterazlara ait spesifik aktiviteler araştırmışlardır. Sindirim bezlerinde karboksilesteraz ve sinir dokusunda asetilkolinesteraz aktivitesinin hakim olduğu bu türün bir biyomarker olarak kullanılabilirliğini önermişlerdir.

Dauberschmidt ve ark. (1997) bir yumuşakça türü olan *Dreissena polymorpha*'da kolinesteraz aktivitesini araştırmışlardır. Bonacci ve ark. (2004) yine bir yumuşakça türü olan *Adamussium colbecki*'de esteraz aktivitelerini tanımlanmış ve sonuçlara göre *A. Colbecki*'de optimal koşullarda organofosfat duyarlı kolinesteraz ve karboksil esteraz aktivitesi görülmüştür. Yine bu çalışmada elde edilen önemli bir sonuç ise; bu türün Antarktik deniz çevresindeki kirliliği gözlemlemek için bir biyomarker olarak kullanılabilirliği olmuştur.

Cherif ve Gargouri (2010) hindi faringial esterazı üzerine yapmış oldukları çalışmalarda elde etmiş oldukları esterazın 50 °C'ta ve 8.5 pH değerinde aktif ve oldukça kararlı olduğunu bildirmişlerdir. Aslında bu çalışma bir bakıma omurgalı türlerinde de biyoteknolojik ve endüstriyel anlamda önem arz eden esterazların da var olabileceğini önermektedir.

(Lima ve ark., 2013) *Macrobrachium* cinsinden üç türün (*Macrobrachium jelskii*, *Macrobrachium amazonicum* ve *Macrobrachium brasiliense*) hepatopankreasındaki esterazları araştırmışlar ve türlerde toplamda on iki esteraz bandının var olduğunu bildirmişlerdir. Hepatopankreasın çeşitli maddelerin detoksifikasyonu ve sindiriminde önemli olduğu vurgulanmıştır.

Yukarıda verilen literatür bilgileri 2000 yılından sonrasını içermekte olup, daha önce yapılan çalışmalara yer verilmemiştir. Bununla birlikte, balık dokularında özellikle sindirim sistemindeki lipolitik enzimlerin yoğun bir şekilde araştırma altında olmasına rağmen, balık dokularının hücre içi lipaz ve esterazlarına ait çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Balık solungaçlarında esteraz aktiviteleri üzerine odaklanan çalışmalar ise yok denecek kadar az olduğu söylenebilir. Son zamanlarda Görgün ve Zengin (2015) Eğirdir Gölü'nde yaşayan *Vimba vimba*'nın solungaç ve gonadlarındaki esteraz aktiviteleri üzerine bir araştırma yapmışlar ve önemli sonuçlara ulaşmışlardır. Bu açıdan düşünüldüğünde, ülkemizde önemli bir kültür balığı olan gökkuşuğu alabalığı *Oncorhynchus mykiss*'in solungaç esterazları üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasının ana konusunu *O. mykiss*'in solungaç homojenatındaki esteraz aktivitelerinin incelenmesi oluşturmaktadır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Kullanılan Kimyasallar

EDTA, Tris, Benzamidin-HCl, Triton X-100, Tween 40, Tween 80, Na-Taurokolat, BSA, a-naftil asetat, p-NPA, fast blue RR salt kimyasalları sigma marka kullanıldı. Kloroform, hekzan, metanol, asetik asit ve diğer çözücüler Merck marka kullanıldı. Tüm kullanılan diğer kimyasallar ya Sigma ya da Merck marka olup moleküler biyoloji saflıktaydı.

2.2 Kullanılan Reaktifler

Deneyler esnasında kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Sigma firmasından satın alındı.

1. Homojenat Tamponu : 50 mM Tris-HCl pH : 7,4
2. Aktivite Tamponu : 50 mM Tris-HCl pH : 8,0 (% 4 etanol katkılı)
3. Substrat Çözeltisi : 50 mM p-NPA (p-nitrofenil asetat)
4. Deterjan çözeltileri : Tween 40 (Polyoxyethylenesorbitan monopalmitate), tween 80(POE (20) sorbitan monooleate) ve tritonX-100 (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol)'ün % 0,5 , % 1 ve % 5' lik derişimleri aktivite tamponu içerisinde hazırlanmıştır.
5. Organik çözücüler : Hekzan, metanol, aseton ve kloroformun % 0.5, % 1 ve % 5'lik derişimleri aktivite tamponu içerisinde hazırlanmıştır.
6. Seçilmiş kimyasalların çözeltileri: EDTA (etilendiamintetraasetik asit), benzamidin-HCl ve Na-taurokolat'ın 1, 5 ve 10 mM'lık derişimleri aktivite tamponu içerisinde hazırlanmıştır.

2.3 Kullanılan Cihazlar

Ultra-Turrax T 25 homojenizatör

Elektromag M 11 homojenizatör

Eppendorf marka santrifüj

Çift ışın yollu Cecil 5500 marka spektrofotometre ve sıcaklık inkübatörü

Adwa 8000 pH metre

Vorteks

HP marka gaz kromatografisi

Dikey protein elektroforezi

2.4 Balık Örneklerinin Sağlanması: Çalışmamızda kullanılan balık türü olan *Oncorhynchus mykiss*'in ergin bireyleri (n=5, 492±10,27 gr ve 34,30±1,88 cm) canlı olarak sağlanmış ve her bir bireye ait solungaçlar buzlu ortam altında disekte edilmiştir. Dokular kullanılana kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

2.5 Solungaç Doku Homojenatının Hazırlanması: Toplam kütlesi 9,75 gr olan solungaç dokusu 50 mM ve pH=7,4 olan Tris-HCl tamponunda öncelikle makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmış ve buzlu ortamda 2 dakika süreyle 24,000 devir .dk⁻¹ hızda Ultra-Turrax T 25 homojenizatörde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatta doku parçaları kalması nedeniyle homojenat buzlu ortamda Elektromag M 11 homojenizatörde 1500 devir.dk⁻¹ hızla 5 dakika tekrar homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemi sonucunda elde edilen homojenat Eppendorf marka santrifüjde 13,000 devir.dk⁻¹ 'de 2 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Bu işlem sonunda çökelti kısımları uzaklaştırılmıştır. Üst sıvılar toplanarak toplam 15 mL olan solungaç esterez enzimi kaynağı elde edilmiştir. Elde edilen homojenat çözeltisi vortekslenerek 2'şer mL'lik ependorf tüplere paylaştırılmış ve kullanılana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

2.6 Protein Miktar Tayinleri: Solungaç homojenatının protein miktarı Bollag ve ark. (1996)'na göre Bradford metodu kullanılarak belirlenmiştir. Standard olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Bu amaçla 1 mg.mL⁻¹ derişimde BSA hazırlanarak miktarları 0 ile 12,5 ug olacak şekilde ependorf tüplere ilave edilmiştir. Üzerlerine tüp hacimleri 100 uL'ye tamamlanacak şekilde homojenat tamponu lave edilmiştir. Bunu takiben ticari olarak satın alınan Bradford boya uygun oranlarda seyreltilmiş ve her bir tüpe 1 mL boya çözeltisi ilave edilerek tüpler vortekslenmiştir. Bu şekilde hazırlanan standart tüpleri 30 dakika karanlık ortamda beklettikten sonra Shidmadzu marka spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Solungaç dokusu örneklerinin protein miktarları BSA yerine homojenat örneklerinin farklı derişimleri konularak aynı şartlar altında yerine getirilmiştir.

2.7 Esteraz Aktivitesi Tayinleri: Solungaç homojenatının esteraz aktivite tayinleri ufak modifikasyonlarla Görgün ve Zengin (2015)'e göre yapılmıştır. Bu amaçla pH'ı 8,0 olan 50 mM Tris-HCl (% 4 etanol katkılı) çözeltisi aktivite tamponu olarak kullanılmıştır. Stok substrat çözeltisi olarak 50 mM p-Nitrofenil Asetat (p-NPA) kullanılmıştır. Toplam hacmi 1 mL olan aktivite tüpü 950 uL aktivite tamponu, 40 uL p-NPA ve 10 uL solungaç homojenatından oluşmuştur. Kör tüpe enzim çözeltisi yerine tampon çözeltisi kullanılmıştır. Aktivite tüpü kör tüpe karşı çift ışın yollu Cecil 5500 marka spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda 3 dakika süreyle 30 °C'de ölçülmüştür. Bir enzim ünitesi (IU) 30 C'da 1 dakika içerisinde 1umol p-NPA 'nın p-NP'e dönüşümünü sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Görgün ve Akpınar, 2012; Görgün ve Zengin, 2015).

Tablo 1 Standart enzim aktivite yöntemi tüp içerikleri

Tepkime Bileşenleri	Kör tüpü (uL)	Örnek tüpü (uL)
Aktivite tamponu	960	950
Substrat (p-NPA)	40	40
Enzim çözeltisi	-	10
Toplam tepkime hacmi	1000	1000

2.8 Solungaç Esterazına Sıcaklığın Etkisi: Sıcaklığın solungaç doku esterazına etkisi farklı sıcaklıklarda (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60) değerlendirilmiştir. Bu amaçla 10 uL solungaç homojenatı içeren ependorf tüpler ilgili sıcaklıklarda 20 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra bu enzim çözeltileri standart aktivite yöntemine göre ölçülerek farklı sıcaklıklardaki enzim aktivite değerleri elde edilmiştir. Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak yerine getirilmiştir.

2.9 Solungaç Esterazına pH'ın Etkisi: pH'ın solungaç doku esteraz aktivitesine etkileri farklı pH değerlerinde (5,7 , 6,0 , 6,5 , 6,9 , 8,0 , 8,5 , 8,8 , 9,38 , 10,2) değerlendirilmiştir. Bu amaç için fosfat (pH 5-7 arası) ve tris (pH 8-10 arası) tamponları kullanılmıştır. 10 uL solungaç homojenatı içeren ependorf tüpler ilgili pH'da 20 dakika süreyle inkübe edilmiş ve daha sonra standart aktivite yöntemine göre ilgili pH değerlerinde ölçümler yapılarak enzim aktiviteleri elde edilmiştir.

2.10 Solungaç Esterazına Substrat (p-NPA) Etkisi: Bu amaçla p-NPA'ın farklı konsantrasyonları standart enzim aktivite yöntemi altında belirlenmiştir. elde edilen enzim aktivite hızlarına göre K_m ve V_{max} değerleri elde edilmiştir. Tüm denemeler üç tekrarlı olarak yerine getirilmiştir.

2.11 Solungaç Esterazına Deterjanların Etkisi: Solungaç esterazına tween 40, tween 80 ve triton X 100'ün % 0,5 , % 1 ve % 5' lik derişimleri standart aktivite yöntemi altında belirlenmiştir. Kör tüp sadece enzim çözeltisini içermemiş ve ilgili deterjanların oranlarını içermiştir. Tüm denemeler üç tekrarlı olarak yerine getirilmiştir.

Tablo 2 Deterjanlar için enzim aktivite yöntemi tüp içerikleri

Tepkime Bileşenleri	Kör (uL)	Örnek (uL)
Tampon (ilgili derişimlerde deterjan katkılı)	960	950
Substrat (pNPA)	40	40
Enzim çözeltisi	-	10

Kontrol deneyi ve kontrol deneyine ait kör deneyi deterjan içermemiştir.

2.12 Solungaç Esterazına Organik Çözücülerin Etkisi: Solungaç esterazına hekzan, metanol, aseton, bütanol ve kloroformun % 0,5, % 1 ve % 5'lik derişimlerinin etkisi standart aktivite yöntemi altında belirlenmiştir. Kör tüp sadece enzim çözeltisini içermemiş ve ilgili çözücünün oranlarını içermiştir. Tüm denemeler üç tekrarlı olarak yerine getirilmiştir.

Tablo 3 Organik çözücüler için enzim aktivite yöntemi tüp içerikleri

Tepkime Bileşenleri	Kör (uL)	Örnek (uL)
Tampon (ilgili derişimlerde organik çözücü katkılı)	960	950
Substrat (pNPA)	40	40
Enzim çözeltisi	-	10

Kontrol deneyi ve kontrol deneyine ait kör deneyi organik çözücü içermemiştir.

2.13 Solungaç Esterazına Seçilmiş Kimyasalların Etkisi: Solungaç esterazına EDTA, benzamidin-HCl ve Na-taurokolat'ın 1, 5 ve 10 mM'lık derişimlerinin etkileri standart aktivite yöntemi altında belirlenmiştir. Kör tüp sadece enzim çözeltisini içermemiş ve ilgili çözücünün oranlarını içermiştir. Tüm denemeler üç tekrarlı olarak yerine getirilmiştir.

Tablo 4 Seçilmiş kimyasallar için enzim aktivite yöntemi tüp içerikleri

Tepkime Bileşenleri	Kör (uL)	Örnek (uL)
Tampon (ilgili derişimlerde kimyasal katkı)	960	950
Substrat(pNPA)	40	40
Enzim çözeltisi	-	10

Kontrol deneyi ve kontrol deneyine ait kör deneyi seçilmiş kimyasal içermemiştir.

2.14 Solungaç Dokusu Toplam Lipit ve Yağ Asidi Çalışmaları: Solungaç dokusu toplam lipit eldesi çalışmaları Folch ve ark. (1957)'ye göre yerine getirilmiştir. Elde edilen toplam lipitlerin sabunlaştırılması ve yağ asidi metil esterlerine dönüştürülmeleri Moss ve ark. (1974)' nın metoduyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yağ asitlerinin metil esterlerini gaz kromatografik analizleri Görgün ve Zengin (2015)' e göre yapılmıştır.

2.15 Elektroforetik Çalışmalar: a-esteraz band paterni çalışması Görgün ve Zengin (2015)'e göre bazı değişikliklerle yerine getirilmiştir. Bunun için % 8'lik ayırıcı jel kullanılmıştır. Elektroforez 1,2 saat boyunca 220 Volt ve 90 mA'de Tris-Glisin tamponunda (pH:8,3, 0,025 M Tris ve 0,192 M Glisin) örnek ve marker koşturulmuştur. Elektroforez bitiminde jeller 200 mL'lik 0,05 M sodyum fosfat tamponunda (pH:7,2 1 mL asetonda çözünmüş 40 mg a-naftil asetat ve 180 mg fast blue RR salt katkı) boyanmıştır. Jeller metanol/asetik asit (60/40, v/v) çözeltisinde 20 dakika fikse edilmiş ve daha sonra distile suya alınıp fotoğraflanmıştır.

2.16 İstatistiksel Analiz: Mevcut çalışmanın istatistiksel analizleri " SPSS 15.0 for Windows" istatistik paket programı kullanılmıştır. K_m ve V_{max} parametrelerinin çözümünde "GraphPad Prism version 5.3 for Windows, GraphPad Software" programları kullanılmıştır. Organik şekillerin çiziminde "ChemBioDraw Ultra 13.0" kullanılmıştır ve grafikler "Microsoft Excel 2010" kullanılarak çizilmiştir.

3. BULGULAR

Bu tez çalışmasında *O. mykiss'in* ergin bireyleri kullanılmıştır. Kullanılan balıkların ergin evreye ulaşip ulaşmadıkları diseksiyon esnasında kontrol edilmiştir. Kullanılan balıkların boy ve ağırlık açısından birbirlerine olabildiğince benzer olmasına özen gösterilmiştir. Bununla birlikte, çalışmada hem erkek hem de dişi bireyler kullanılmıştır. Solungaç doku homojenatının hazırlanması esnasında, bazı kimyasalların etkilerini daha doğru değerlendirebilmek için hiçbir ekstra bileşen eklenmemiş ve enzim çözeltisi yalnız bırakılmıştır. Örnek vortekslenmek suretiyle 2 mL hacmindeki ependorf tüplere alınmış, her bir çalışma için her bir tüpün kontrol aktivitesi ve protein miktarları ölçülmüştür. Bu işlem çalışmaya başlamadan önce her zaman yerine getirilmiştir. Tüplerin protein miktarları Bradford tekniğiyle ölçülmüştür.

3.1 Solungaç Esterazına Sıcaklığın Etkisi

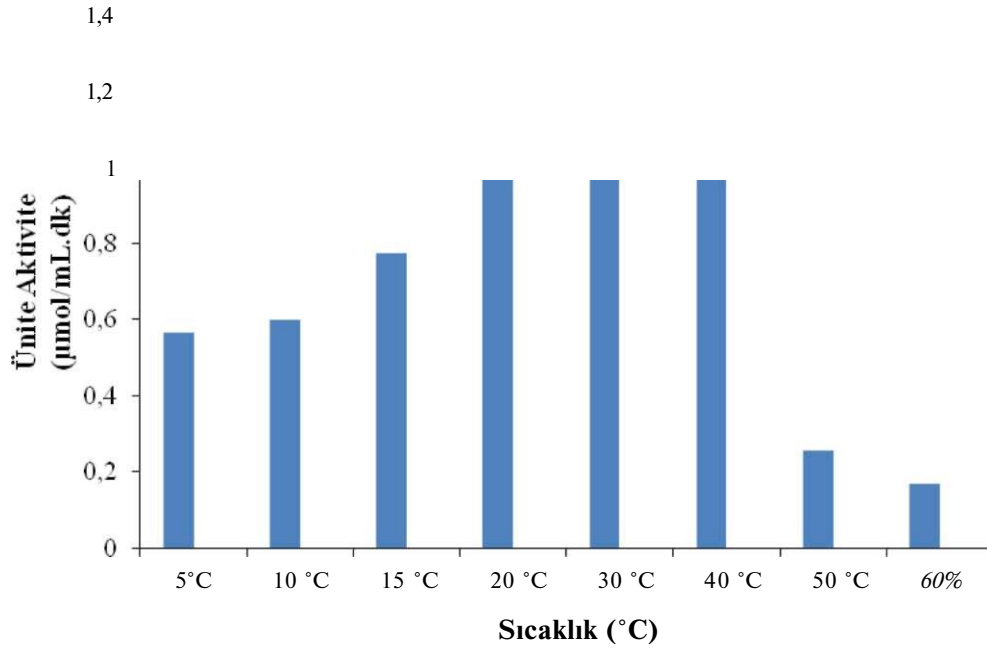
Solungaç dokusu esterazına sıcaklığın etkisi 5 °C ile 60 °C arasında değişen sıcaklıklarda değerlendirilmiştir. Buna göre, 5 ve 10 °C arasında elde edilen aktivite değerleri önemli bir istatistiksel fark göstermemiştir ($p>0,05$). Sıcaklığın 15 °C'ye çıkarılmasıyla aktivitede önemli bir artış kaydedilmiş ve bu artış 20 ve 30 °C'de ölçülen aktivite değerlerinde de görülmüştür. En yüksek aktivite değeri 30 °C'de elde edilmiştir. Tablo 5'deki tüm görel aktivite değerleri 30 °C 'deki görel aktivite değeri 100 alınarak hesaplanmıştır. 20 ve 40 °C'de elde edilen aktivite değerleri aynıdır.

Sıcaklığın 50 °C'ye yükseltilmesiyle birlikte enzim aktivitesinde ani bir düşüş saptanmış ve bu sıcaklık değerinde elde edilen aktivite değeri $0,255 \text{ umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın 60 °C'ye yükseltilmesiyle bu düşüş devam etmiş ve aktivite değeri $0,168 \text{ umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Tüm bu veriler Tablo 5, Şekil 5 ve Şekil 6'da görülmektedir.

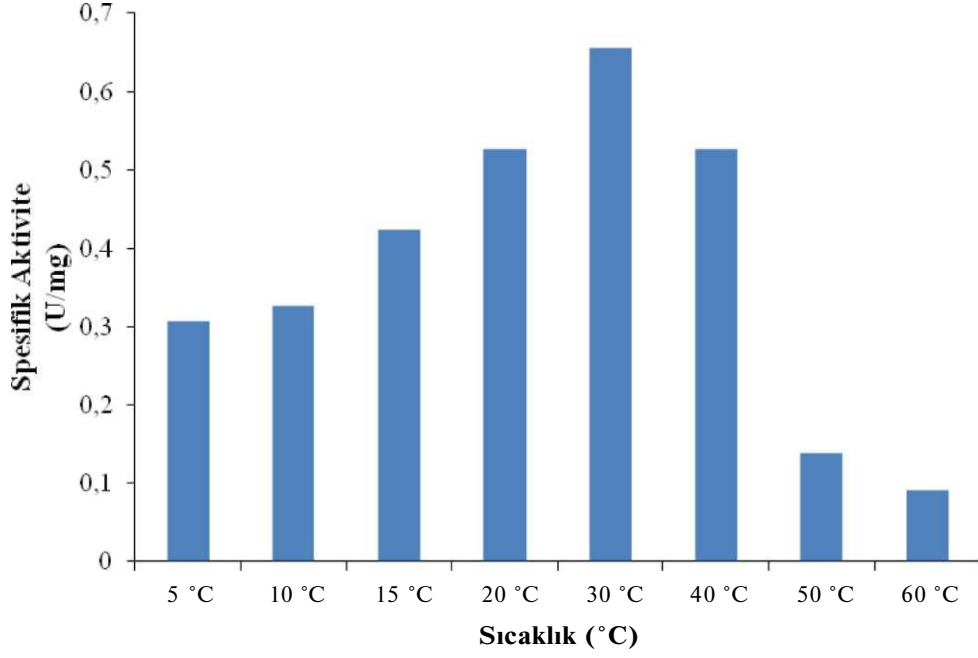
Tablo 5 Solungaç esterazına sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Ünite aktivite (umol.mL ⁻¹ .dk ⁻¹) Ort.± S.H.	Spesifik Aktivite(U.mg ⁻¹) Ort.± S.H	Görelî (%) spesifik aktivite Ort.± S.H
5	0,565 ±0,01a	0,308±0,006	47,0
10	0,599 ±0,06a	0,327±0,035	49,9
15	0,775 ±0,10b	0,423±0,058	64,6
20	0,965 ±0,06c	0,527±0,036	80,5
30	1,199 ±0,03d	0,655±0,019	100
40	0,964 ±0,12c	0,526±0,070	80,3
50	0,255 ±0,02e	0,139±0,012	21,2
60	0,168 ±0,04f	0,091±0,025	13,9

*Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda yer alan ve aynı harflerle belirtilen veriler 0,05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Deneylerin yapıldığı tüpe ait protein miktarı 1,83 mg.mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Ort. ± S.H. =Ortalama ± Standart Hata



Şekil.5 Solungaç esterazına sıcaklığın etkisi



Şekil.6 Solungaç esterazı spesifik aktivitesine sıcaklığın etkisi

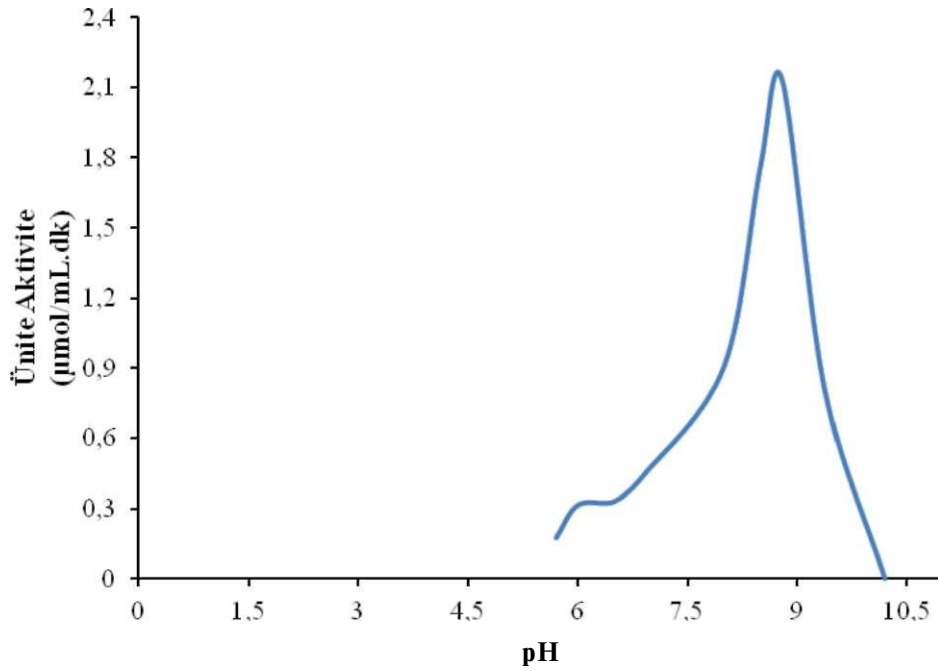
3.2 Solungaç Esterazına pH'ın Etkisi

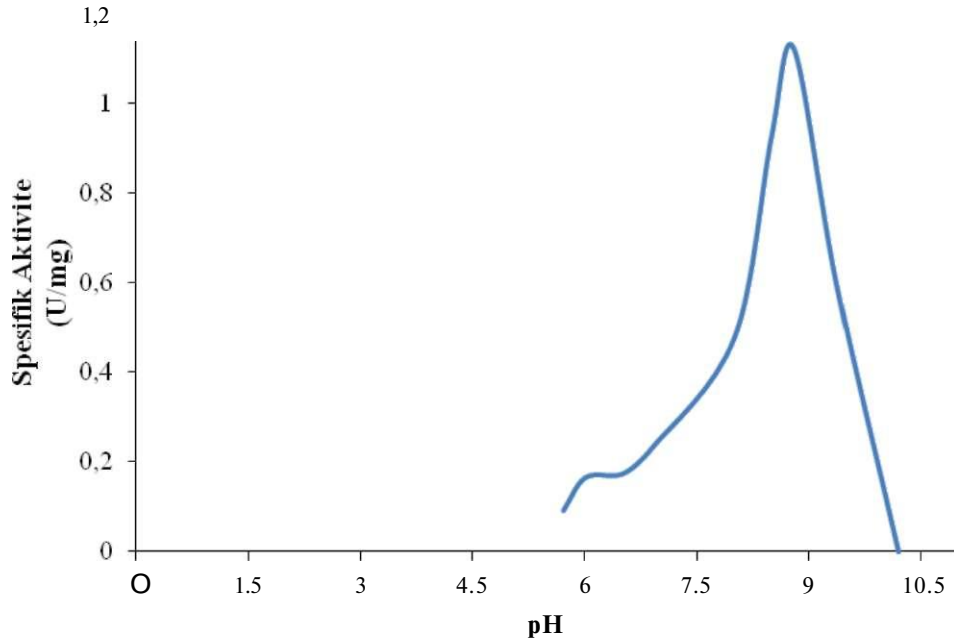
O.mykiss'in solungaç dokusu esteraz aktivitesine pH'ın etkisi, pH'ın 5,7 ile 6,9 arasında olduğu çözeltilerde $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ kullanılarak, pH'ın 8 ile 10 arasında olduğu pH değerlerinde ise Tris-HCl tamponu kullanılarak belirlenmiştir. Buradan elde edilen bulgulara göre pH'ın 5,7 olduğu değerlerde $0,175 \text{ umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ olan aktivite değeri pH'ın 6,0'ya yükseltilmesiyle $0,316 \text{ umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ aktivite değerine yükselmiştir. 6,5 olan pH değerindeki aktivite değeri bu değerden istatistiksel olarak farklı değildir ($p>0,05$). pH değerinin 8,0'a artırılmasıyla aktivite ($0,907 \text{ umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$), pH'ın 6,9 olduğu noktadaki elde edilen aktivite değerinden 2 kat daha fazla olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Yine pH'daki artışa bağlı olarak aktivite değerlerinde istatistiki açıdan önemli olan artışlar saptanmıştır. En yüksek aktivite değeri pH'ın 8,8 olduğu noktada ve $2,131 \text{ umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ değerindeki aktiviteyle saptanmıştır. Bu pH değerinden daha yüksek olan 9,38 pH'da aktivite $0,812 \text{ umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ 'ya gerilemiş ve pH'ın 10,2 olduğu noktada ise aktiviteye rastlanmamıştır. Tüm bu veriler Tablo 6 ve Şekil 7 ve Şekil 8'te verilmektedir.

Tablo 6 Solungaç esterazına pH'ın etkisi

Tampon	pH	Aktivite ($\mu\text{mol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$) Ort.± S.H.	Spesifik aktivite(U.mg^{-1}) Ort.± S.H.	Görelî (%) aktivite Ort.± S.H.
KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄	5,70	0,175 ±0,01a	0,092±0,008	8,21
	6,00	0,316 ±0,09b	0,166±0,050	14,8
	6,50	0,331 ±0,02b	0,174±0,010	15,5
	6,90	0,443 ±0,03c	0,233±0,018	20,8
Tris-HCl	8,00	0,907 ±0,05d	0,477±0,026	42,5
	8,50	1,762 ±0,22e	0,927±0,116	82,7
	8,80	2,131 ±0,06f	1,121±0,033	100
	9,38	0,812 ±0,00d	0,427±0,000	52,6
	10,2	0,000 ±0,00g	0,000±0,000	0,00

*Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda yer alan ve aynı harflerle belirtilen veriler 0,05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Deneylerin yapıldığı tüpe ait protein miktarı $1,902 \text{ mg.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Ort. ± S.H. =Ortalama ± Standart Hata

**Şekil.7** Solungaç esterazına pH'ın etkisi



Şekil.8 Solungaç esterazı spesifik aktivitesine pH'ın etkisi

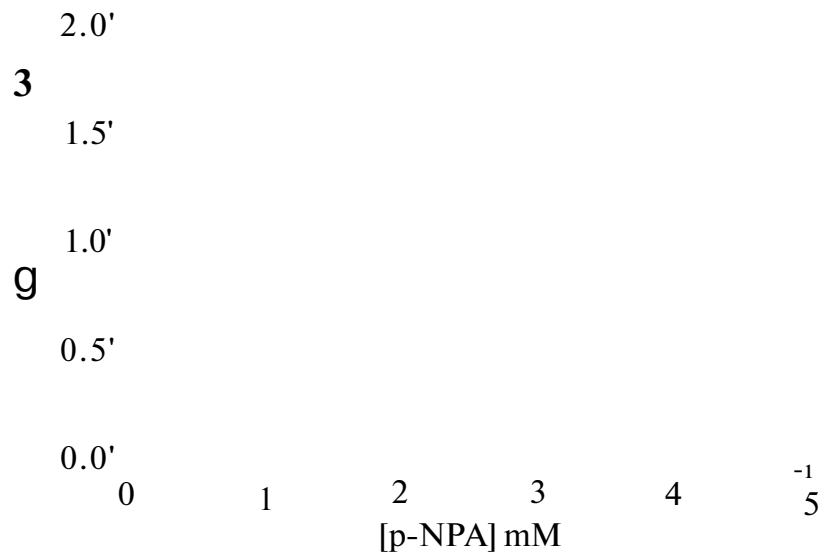
3.3 Solungaç Esterazına Substrat (p-NPA) Etkisi

Solungaç dokusu esteraz aktivitesine sabit enzim derişiminde substrat miktarının etkisi 0,25 mM ile 4 mM p-NPA varlığında ve standart aktivite ölçüm metodları altında değerlendirilmiştir. Buna göre, substrat miktarının 0,25 mM'dan 0,50 mM'a yükseltilmesiyle 0,333 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ olan aktivite değeri 0,528 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ 'ya çıkmıştır. Substrat miktarlarının 1,5 ,2 ve 2,5 mM olduğu değerlerde de enzim aktivitesinde artışlar görülmüştür. Ancak özellikle 3 ve 3,5 mM'lık substrat derişimlerindeki artışların istatistiki olarak önemsiz olduğu bulunmuştur ($p>0,05$). Tablo 3'teki veriler kullanılarak elde edilen Michaelis-Menten eğrisinden $V_{\text{max}}=2,80\pm 0,17$ $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$, $K_m=2,25\pm 0,29$ mM olduğu bulunmuştur. Ayrıca Michaelis-Menten eğrisi üzerinden Lineweaver-Burk eğrisi de çizilmiştir. Substrat miktarının etkisine dair tüm veriler Tablo 7 'de, Şekil 9 ve Şekil 10'de sunulmaktadır.

Tablo 7 *O. mykiss*, solungaç esteraz aktivitesi üzerine substrat (p-NPA) etkisi

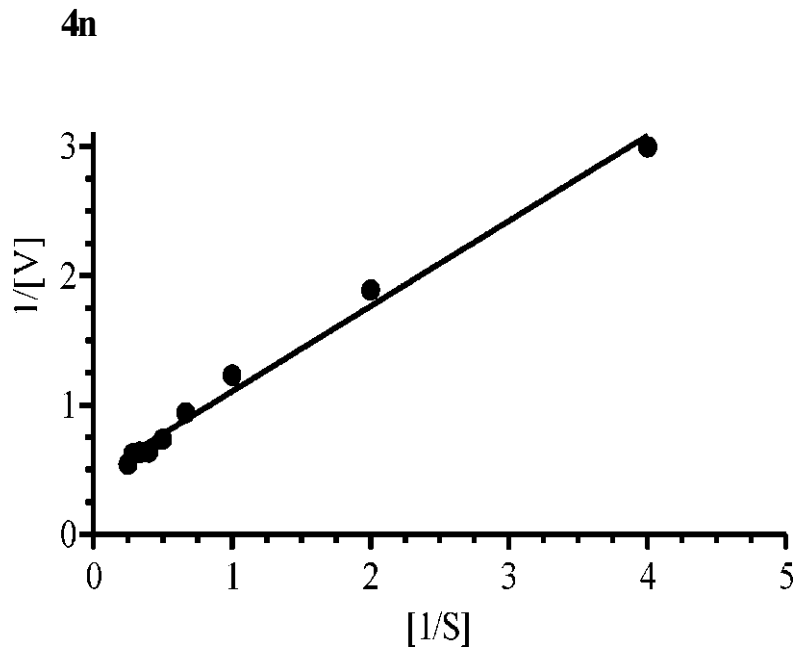
[S] (mM)	V ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{dk}^{-1}$) Ort. \pm S.H.	1/V	1/[S]	[S]/V	V/[S]
0,25	0,333 \pm 0,018a	3,000	4,000	0,750	1,332
0,50	0,528 \pm 0,006b	1,893	2,000	0,947	1,056
1,00	0,813 \pm 0,038c	1,230	1,000	1,230	0,813
1,50	1,062 \pm 0,008d	0,941	0,667	1,412	0,708
2,00	1,361 \pm 0,035e	0,735	0,500	1,469	0,680
2,50	1,564 \pm 0,102f	0,639	0,400	1,598	0,625
3,00	1,578 \pm 0,062f	0,634	0,333	1,901	0,526
3,50	1,604 \pm 0,029f	0,623	0,286	2,182	0,458
4,00	1,850 \pm 0,021g	0,540	0,250	2,162	0,462

*Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda yer alan ve aynı harflerle belirtilen veriler 0,05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Ort. \pm S.H. =Ortalama \pm Standart Hata



Şekil.9 Michaelis-Menten Grafiği

Michaelis-Menten	
Best-fit values	
Vmax	2,806
Km	2,257
Std. Error	
Vmax	0,1712
Km	0,2904
95% Confidence Intervals	
Vmax	2,453 to 3
Km	1,659 to 2
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	25
R square	0,9693
Absolute Sum of Squares	0,2110
Sy.x	0,09188
Constraints	
Km	Km > 0,0
Number of points	
Analyzed	27



Şekil. 10 Lineweaver-Burk Grafiği

Best-fit values	
Slope	0,6597 ± 0,02530
Y-intercept when X=0.0	0,4457 ± 0,03965
X-intercept when Y=0.0	-0,6756
1/slope	1,516
95% Confidence Intervals	
Slope	0,5998 to 0,7195
Y-intercept when X=0.0	0,3519 to 0,5395
X-intercept when Y=0.0	-0,8799 to -0,4999
Goodness of Fit	
R square	0,9898
Sy.x	0,08842
Is slope significantly non-zero?	
F	680,0
DFn, DFd	1,000, 7,000
P value	< 0,0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	9
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	9
Number of missing values	0

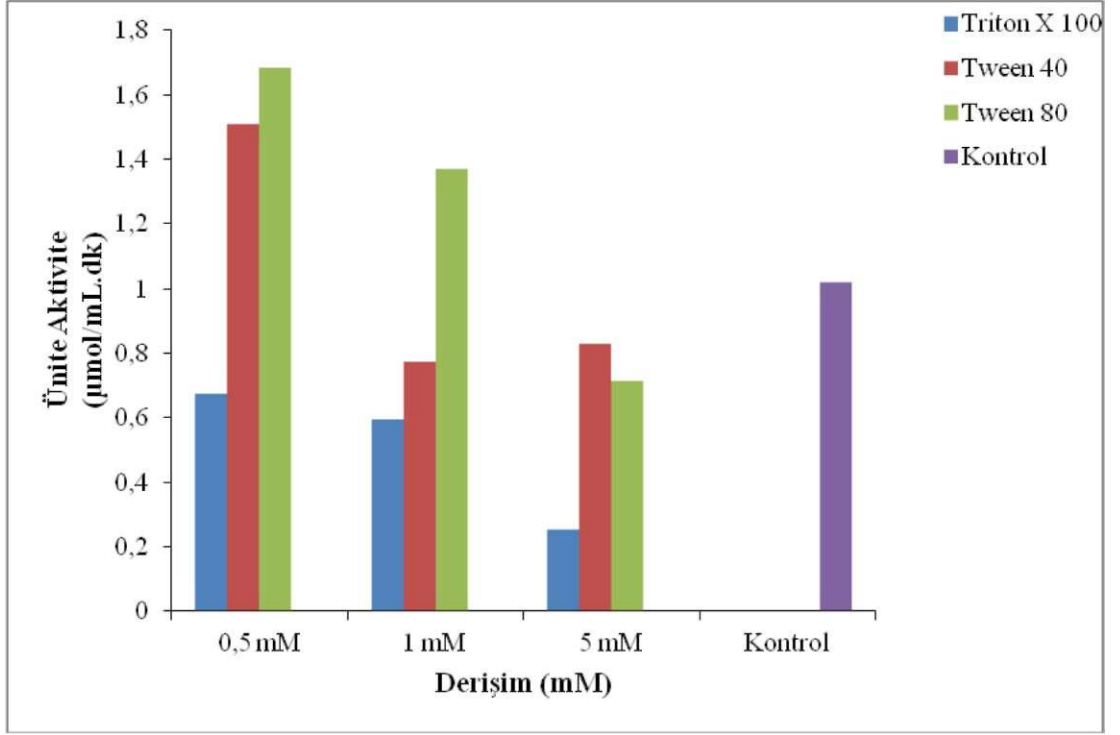
3.4 Solungaç Esterazına Deterjanların Etkisi

Solungaç doku esterazlarına triton X 100, tween 80 ve tween 40'ın 0,5 , 1 ve 5 mM'lık derişimlerinin etkileri ham doku homojenatlarında değerlendirilmiştir. Elde edilen aktivite değerleri kontrol aktivitesiyle karşılaştırılarak rezidüel spesifik aktiviteler yüzde değer olarak saptanmıştır. Bu çalışmayla ilgili veriler Tablo 8'te ve Şekil 11 ve Şekil 12'de görülmektedir.

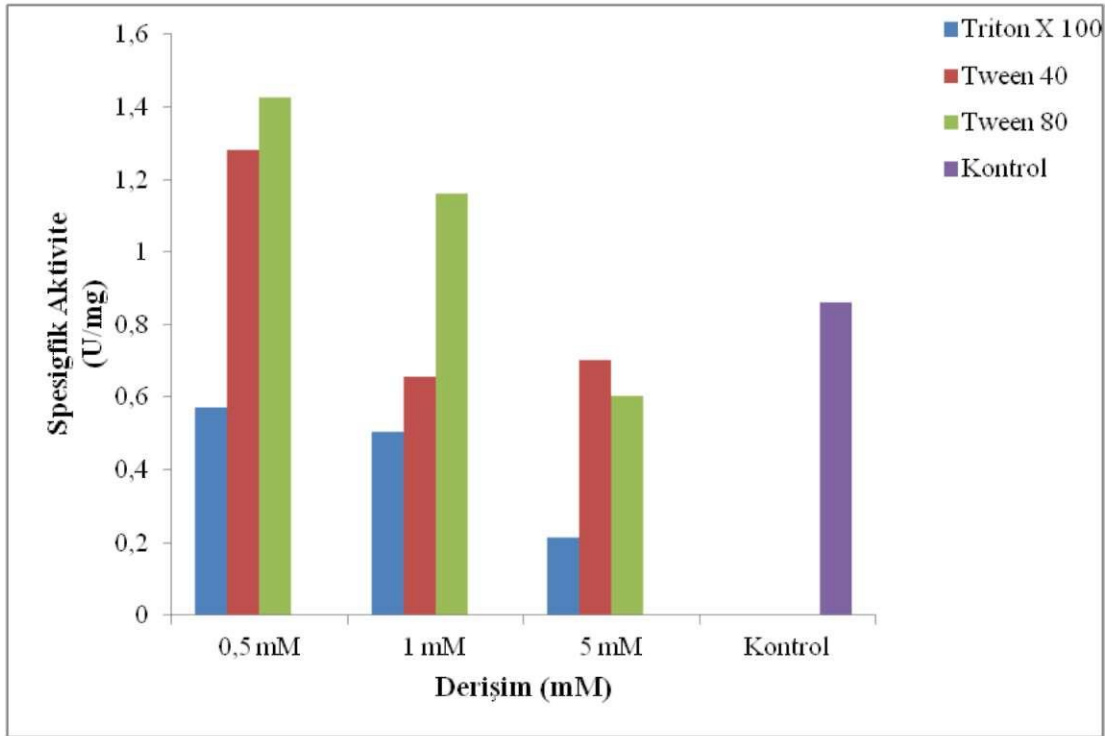
Tablo 8 Deterjanların *Oncorhynchus mykiss*'in solungaç doku esterazlarına etkileri

Kimyasal adı	Derişim(mM)	Aktivite (umol.mL ⁻¹ dk ⁻¹) Ort.±S.H	Spesifik aktivite(U.mg ⁻¹) Ort.±S.H.	Görelî spesifik(%) aktivite
TritonX100	0,5	0,675±0,44ad	0,572±0,012	66,3
	1	0,594±0,38ab	0,503±0,040	58,3
	5	0,254±0,18b	0,215±0,014	24,9
Tween40	0,5	1,511±0,45c	1,280±0,135	148
	1	0,775±0,22ad	0,657±0,043	76,0
	5	0,828±0,24ade	0,702±0,117	81,2
Tween80	0,5	1,684±0,61c	1,427±0,030	165
	1	1,372±0,52cd	1,163±0,043	135
	5	0,713±0,59ad	0,604±0,014	69,9
Kontrol		1,019±0,35e	0,863±0,000	100

*Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda yer alan ve aynı harflerle belirtilen veriler 0,05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Deneylerin yapıldığı tüpe ait protein miktarı 1,18 mg.mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Ort. ± S.H. =Ortalama ± Standart Hata



Şekil.11 Solungaç esterazına deterjanların etkisi



Şekil.12 Solungaç esterazı spesifik aktivitesine deterjanların etkisi

Triton X 100 uygulamalarının tüm derişimlerinde esteraz aktivitesini düşürdüğü saptanmıştır. 5 mM triton X 100 uygulamasıyla yaklaşık olarak % 75 değerinde aktivite kaybı olduğu gözlenmektedir. Bununla birlikte, gerek tween 80 gerekse tween 40'ın 0,5 mM'lık derişiminde elde edilen aktivite değerlerinin kontrol değerinden oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Tween 40'ın 1 ve 5 mM'lık uygulamaları kontrol aktivitesinden daha düşük aktivite değerleri verirken, tween 80'in sadece 5 mM'lık uygulaması yaklaşık % 30'luk bir aktivite kaybına neden olmuştur. Bu bulguların önemli olduğunu düşünmekteyiz.

3.5 Solungaç Esterazına Organik Çözücülerin Etkisi

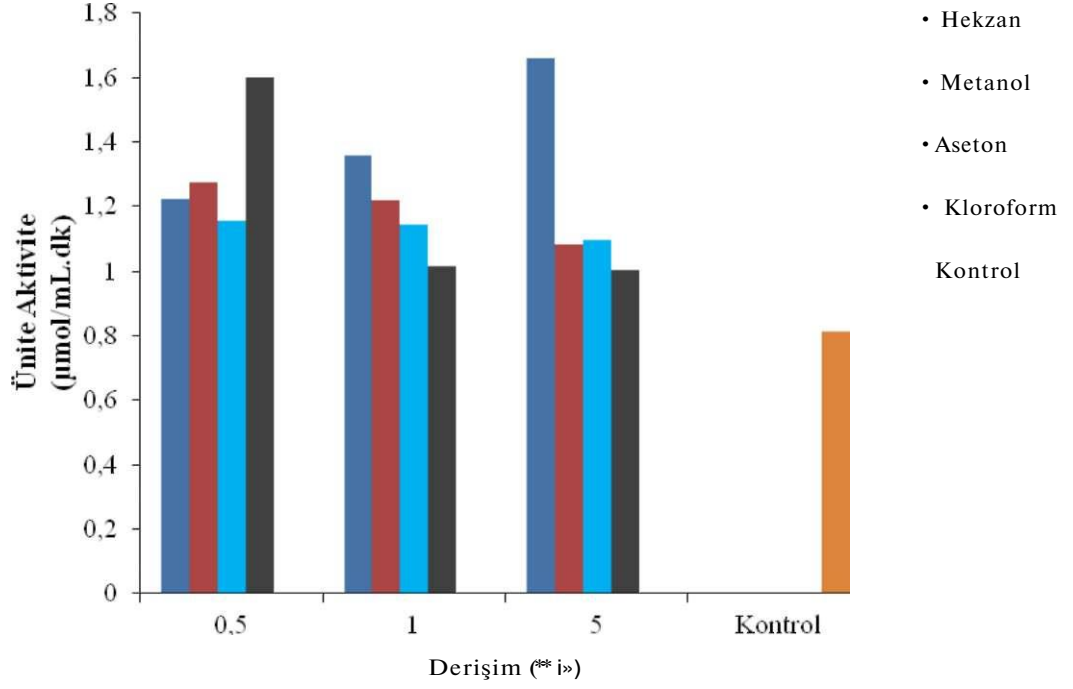
Hekzan, metanol, aseton ve kloroformun % 0,5 , % 1 ve % 5 derişimlerindeki çözeltilerinin *O. mykiss'in* solungaç homojenatı esteraz aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Hekzan uygulamasında, her üç uygulamada elde edilen aktivite değerlerinin kontrol aktivitesinden daha yüksek olduğu ve artan derişime bağı olarak aktivitenin de artış gösterdiği belirlenmiştir. Metanolün her üç derişiminin uygulamasında da kontrol değerlerinden yüksek aktivite değerleri elde edilmesine karşın, artan derişime bağı olarak aktivitede düşüş kaydedilmiştir. Aseton ve kloroform da esteraz aktivitesinde benzer bir davranışın ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu açıklamalara ait veriler Tablo 9 ve Şekil 13 ve şekil 14' de görülmektedir.

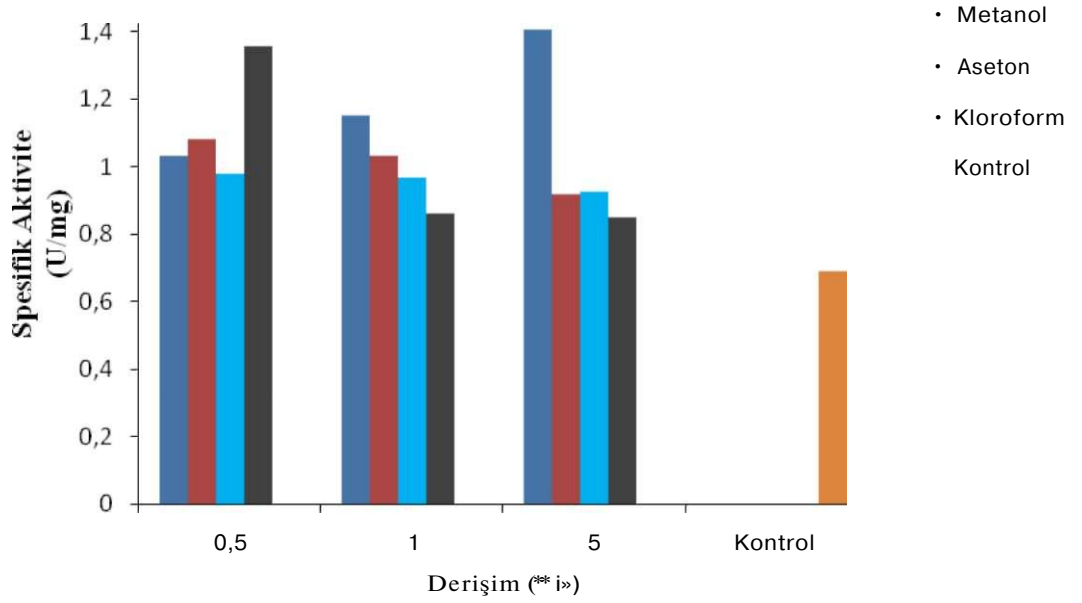
Tablo 9 Organik çözücülerin *O. mykiss'in* solungaç doku esterazlarına etkisi

Kimyasal adı	Derişim (%)	Aktivite umol/mL.dk Ort.±S.H	Spesifik aktivite (U/mg) Ort.±S.H.	Görelî (%) spesifik aktivite
Hekzan	0,5	1,222±0,39a	1,035±0,164	150
	1	1,358±0,13a	1,150±0,107	166
	5	1,661±0,27a	1,408±0,148	203
Metanol	0,5	1,277±0,44a	1,082±0,122	156
	1	1,218±0,28a	1,032±0,244	150
	5	1,085±0,20a	0,919±0,161	133
Aseton	0,5	1,156±0,70a	0,981±0,007	142
	1	1,142±0,36a	0,968±0,029	140
	5	1,095±0,41a	0,928±0,002	134
Kloroform	0,5	1,601±0,22a	1,357±0,035	196
	1	1,017±0,30a	0,862±0,258	125
	5	1,005±0,37a	0,852±0,134	123
Kontrol		0,816±0,27a	0,691±0,118	100

*Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda yer alan ve aynı harflerle belirtilen veriler 0,05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Deneylerin yapıldığı tüpe ait protein miktarı 1,18 mg.mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Ort. ± S.H. = Ortalama ± Standart Hata



Şekil.13 Solungaç esterazına organik çözücülerin etkisi



Şekil.14 Solungaç esterazı spesifik aktivitesine organik çözücülerin etkisi

3.6 Solungaç Esterazına Seçilmiş Kimyasalların Etkisi

Benzamidin-HCl, EDTA ve Na-taurokolat'ın 1, 5 ve 10 mM'lık derişimlerindeki uygulamalarının *O. mykiss*'in solungaç homojenatının esteraz aktivitesine etkileri değerlendirilmiştir. Buna göre; 1,985 $\text{umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ olarak belirlenen kontrol aktivitesinin benzamidin-HCl'nin 1, 5 ve 10 mM'lık uygulamalarında sırasıyla 0,762 $\text{umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$, 0,564 $\text{umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ ve 0,550 $\text{umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ aktivite değerlerine gerilediği belirlenmiştir. Buradan ilgili derişimlerdeki benzamidin-HCl uygulamasını solungaç esteraz aktivitesinde yaklaşık % 60 ile % 80 aktivite kaybıyla sonuçlandığı açığa çıkmıştır.

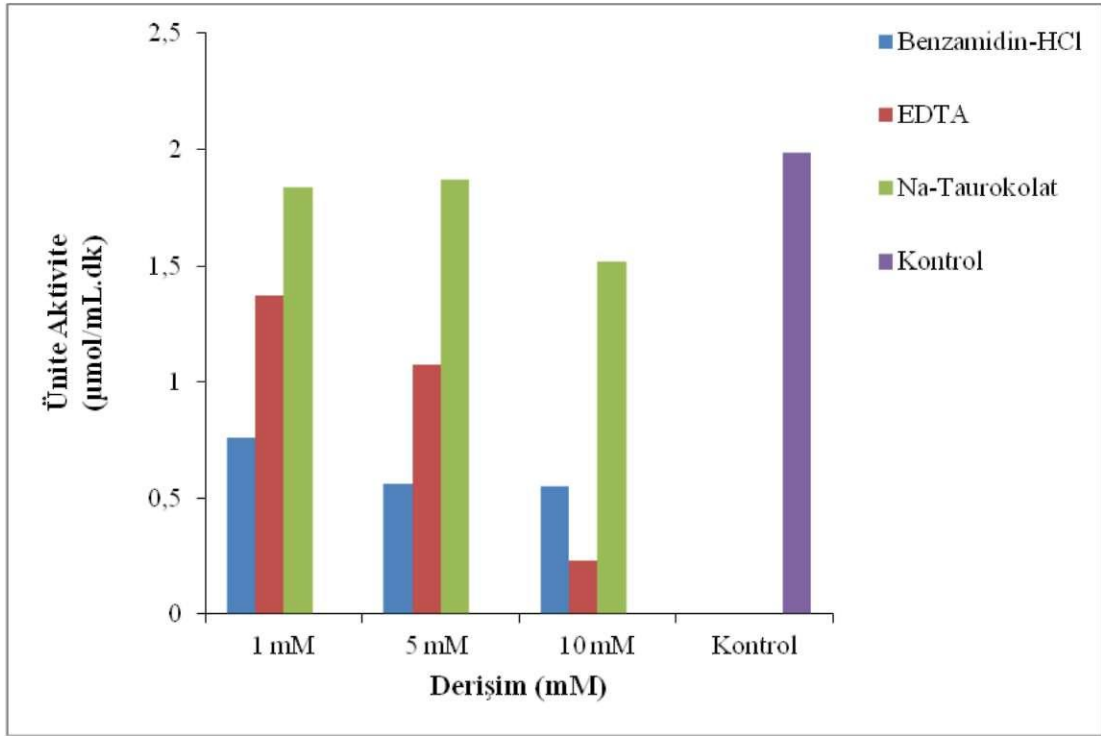
EDTA uygulamasında elde edilen aktivite değerleri kontrol aktivitesinden daha düşük bulunmuştur. Bununla birlikte, özellikle 10 mM EDTA uygulamasında elde edilen 0,233 $\text{umol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ 'lık aktivite değeri kontrol değeriyle karşılaştırıldığında yaklaşık % 89 aktivite kaybının olduğunu bildirmektedir.

Na-taurokolat uygulamasında da kontrol değerinden düşük aktivite değerleri elde edilmesine rağmen, benzamidin-HCl ve EDTA'ya nazaran daha ılımlı bir aktivite kaybına neden olduğu söylenebilir. 1 ve 5 mM Na-taurokolat uygulamaları % 10'luk dahi bir aktivite kaybına neden olmamışlardır. Bununla birlikte, 10 mM Na-taurokolat aktivitesi solungaç esterazında yaklaşık % 25 aktivite kaybıyla sonuçlanmıştır.

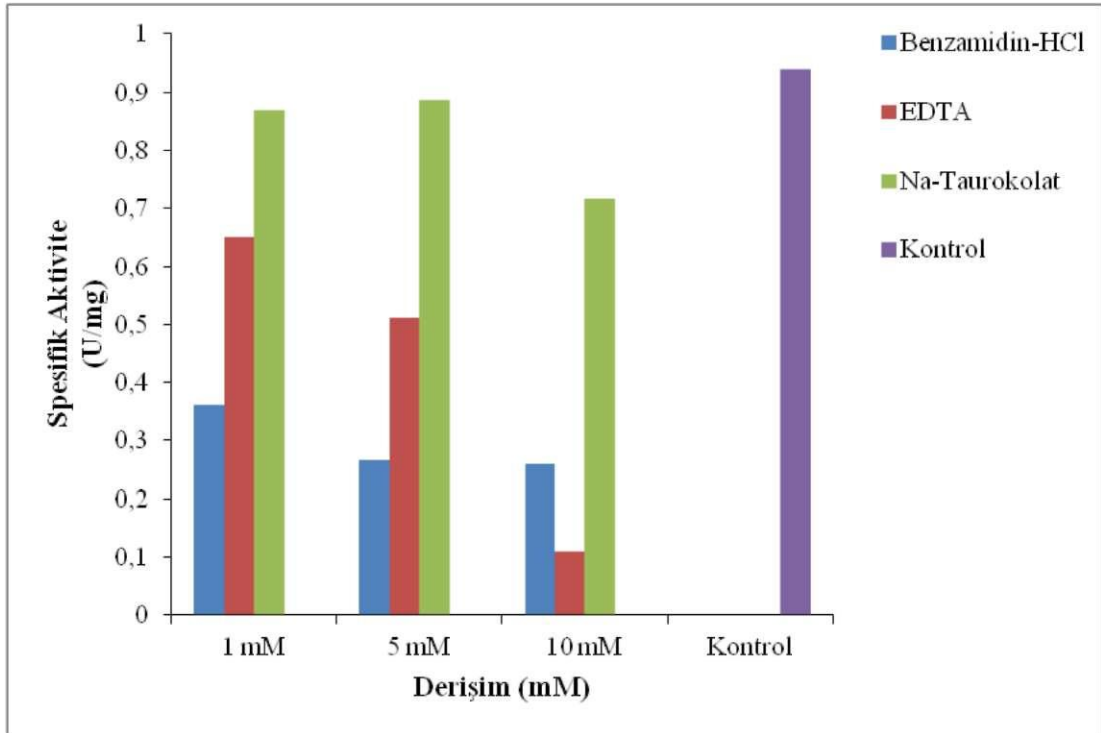
Tablo 10 Bazı kimyasalların *Oncorhynchus mykiss*'in solungaç doku esterazlarına etkileri

Kimyasal adı	Derişim (mM)	Aktivite (umol.mL ⁻¹ dk ⁻¹) Ort.±S.H	Spesifik aktivite(U.mg ⁻¹) Ort.±S.H.	Rezidüel (%) aktivite
	1	0,762±0,11ac	0,361±0,049	38,4
Benzamidin- HCl	5	0,564±0,27ad	0,267±0,035	28,4
	10	0,550±0,14ad	0,261±0,064	27,7
	1	1,376±0,22be	0,652±0,103	69,3
EDTA	5	1,078±0,81bcf	0,494±0,022	54,3
	10	0,233±0,12d	0,110±0,007	11,7
	1	1,836±0,68eg	0,870±0,020	92,5
Na-taurokolat	5	1,872±0,72eg	0,887±0,006	94,3
	10	1,516±0,31ef	0,718±0,048	76,3
Kontrol		1,985±0,93g	0,940±0,015	100

*Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda yer alan ve aynı harflerle belirtilen veriler 0,05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Deneylerin yapıldığı tüpe ait protein miktarı 2,11 mg.mL⁻¹olarak belirlenmiştir. Ort. ± S.H. = Ortalama ± Standart Hata



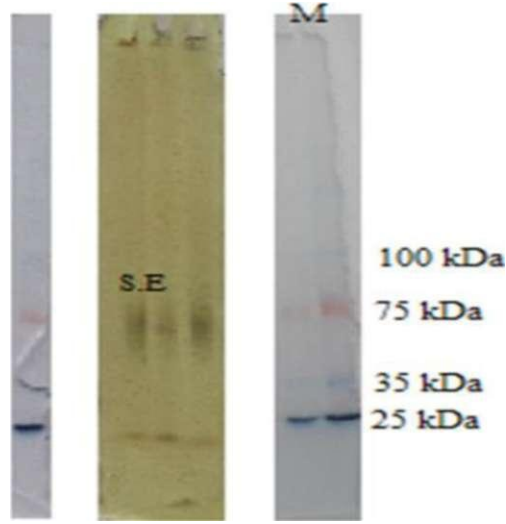
Şekil.15 Solungaç esterazına seçilmiş kimyasalların etkisi



Şekil.16 Solungaç esterazı spesifik aktivitesine seçilmiş kimyasalların etkisi

3.7 *O. mykiss* Solungaç Esterazı Native-PAGE Bulguları

Yapılan Native-PAGE çalışması sonucunda molekül ağırlığının yaklaşık olarak 70 kDa ile 75 kDa arasında olan solungaç esteraz izozim band bölgesinin varlığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, bu esteraz izozim band bölgesinin kaç bandtan oluştuğu çalışmamızda belirlenememesine karşın, birden fazla band olduğunu düşünmekteyiz. Tüm bu veriler aşağıdaki şekilde açıklanmaktadır.



Şekil.17 Solungaç esteraz izozim band bölgesi ve marker

R_f	marker	<u>örnek</u>	-5L
0.24	~		
0.34			
0.46			
0.56	,	,	
0.80			

Şekil .18 Örnek ve marker' a ait R_f değerleri

3.8 *O. mykiss*'in Solungaç Dokusu Toplam Lipit Yağ Asidi Bileşimi

Çalışmamızda *O. mykiss*'in solungaç dokusuna ait toplam lipit yağ asidi bileşimi belirlenmiştir. Dokuda en fazla bulunan yağ asitlerinin C16:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6 ve C22:6 n-3 olduğu belirlenmiştir. Buna ait veriler Tablo 11'de sunulmaktadır.

Solungaç dokusu doymuş yağ asidi (DYA) sınıfında C8:0, C10:0, C12:0, C15:0, C17:0, C20:0, C21:0 ve C22:0'ın iz miktarlarda oldukları belirlenmiştir. DYA'nın en fazla bulunan yağ asidi % 15,23 ile C16:0 olup bu yağ asidinden sonra en fazla bulunan yağ asidi % 4,71 ile C18:0'dır. DYA yüzdesi % 24,26 olarak belirlenmiştir.

O. mykiss'in solungaç dokusunda tek çift bağ içeren doymamış yağ asidi (TÇDmYA) sınıfının % 41,31 seviyesi ile en baskın yağ asidi sınıfı olduğu belirlenmiştir. Bu yağ asidi sınıfının bir üyesi olan C18:1 n-9'un tüm yağ asitleri içerisinde en fazla bulunan (% 31,85) yağ asidi olduğu görülmektedir. TÇDmYA sınıfının bir diğer yüksek yüzdeye sahip olan yağ asidi ise C16:1 n-7 (% 3,91)'dir. Bu yağ asidini, % 2,80 seviyesinde bulunan C18:1 n-7 izlemiştir. TÇDmYA sınıfının diğer yağ asidi üyelerinin iz bileşenler olduğu görülmektedir.

n-6 ve n-3 formu aşırı doymamış yağ asitleri (ADmYA) içerisinde en fazla bulunan yağ asidi C18:2 n-6 olmakla birlikte seviyesinin % 17,67 olduğu belirlenmiştir. C18:3 n-6 (% 0,17) yağ asidi iz miktarlarda bulunmuştur. n-6 ADmYA sınıfının fazla miktarda temsil edilen bir diğer üyesi ise C20:4 n-6 olup, % 2,34 ile temsil edilmektedir. n-3 ADmYA sınıfının en fazla miktara sahip üyesi C22:6 n-3'tür ve % 7,76'lık bir değerle temsil edilmektedir. Bir diğer n-3 formu ADmYA olan C20:5 n-3'ün ise % 1,13 miktarıyla temsil edildiği belirlenmiştir. *O. mykiss*'in solungaç dokusu toplam lipit sınıfının TÇDmYA ve ADmYA sınıfını içeren toplam doymamış yağ asidi (TDmYA) miktarının oldukça yüksek ve % 75,74 seviyesinde olduğu belirlenmiştir.

Tablo 11 *O.mykiss'in* solungaç dokusu yağ asidi bileşimi (%)

Yağ Asitleri	İsimleri	ORT ± S.H
C 8:0	Kaprilik asit	0,05±0,01
C 10:0	Dekanoik asit	0,05±0,01
C12:0	Dodekanoik asit	0,06±0,01
C14:0	Tetradekanoik asit	2,62±0,20
C15:0	Pentadekanoik asit	0,22±0,04
C16:0	Heksadekanoik asit	15,23±0,77
C17:0	Heptadekanoik asit	0,13±0,02
C18:0	Oktadekanoik asit	4,71±0,32
C20:0	Eikosanoik asit	0,09±0,02
C21:0	Heneikosanoik asit	0,47±0,08
C22:0	Dokosanoik asit	0,66±0,11
DYA		24,26±0,23
C14:1	Tetradekenoik asit	0,08±0,02
C15:1	Pentadekenoik asit	0,03±0,00
C16:1 n-7	Palmitoleik asit	3,91±0,16
C17:1	Heptadekenoik asit	0,07±0,01
C18:1 n-7	Vaksenik asit	2,80±0,15
C18:1 n-9	Oleik asit	31,85±0,94
C20:1	Erikosenoik asit	2,36±0,09
C22:1	Dokosenoik asit	0,23±0,03
TÇDmYA		41,31±0,75
C18:2 n-6	Linoleik asit	17,67±0,86
C18:3 n-6	Y - linolenik asit	0,17±0,02
C18:3 n-3	a - linolenik asit	3,11±0,14
C20:2 n-6	Eikosadienoik asit	1,29±0,18
C20:3 n-6	Eikosatrienoik asit	0,07±0,02
C20:4 n-6	Araşidonik asit	0,92±0,13
C20:5 n-3	Eikosapentaenoik asit	2,34±0,29
C22:5 n-3	Dokosapentaenoik asit	1,13±0,08
C22:6 n-3	Dokosahekzaenoik asit	7,76±0,44
ADmYA		34,43±0,63
TDmYA		75,74±0,37
n-3		14,33±0,54
n-6		20,11±0,30
n-6/n-3		0,71
n-3/n-6		1,40

*Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda yer alan ve aynı harflerle belirtilen veriler 0,05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Ort. ± S.H. = Ortalama ± Standart Hata

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada *O. mykiss'in* solungaç dokusu esteraz aktivitesinin temel özellikleri ve bazı bileşenlerin aktiviteye olan etkileri araştırılmıştır. Görebildiğimiz kadarıyla bu türün solungaç esterazı üzerine herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

Günümüzde protein saflaştırma çalışmaları esnasında proteaz inhibitörleri oldukça geniş bir uygulamaya sahiptir. Buradaki etken neden doku homojenizasyonunu takiben ortama salınması muhtemel olan proteazların denatüre edici etkilerini en aza indirmektir (Bollag ve ark., 1996; Görgün ve Zengin 2015). Bununla birlikte çalışmamızda homojenizasyon işlemi esnasında hiçbir proteaz inhibitörü kullanılmamıştır. Bu işlemle protein homojenizasyon ortamlarında sıklıkla kullanılan bileşenlerin solungaç dokusu esteraz aktivitesine çalışmamızda kullanılan derişimlerinin olası etkilerinin daha doğru bir şekilde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle enzim çözeltisi homojenat ortamında yalnız bırakılmış ve sadece hücredeki fizyolojik koşullara uygun, ılımlı bir pH'daki tampon içerisinde bu işlemler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca enzimin çalışma boyunca stok enzim çözeltisinin dondurulup çözünmesini engellemek için homojenat çözeltisi vortekslenerek 2 mL'lik ependorf tüplere paylaştırılmıştır. Bu şekilde çözünmeye bağlı olarak gelişebilecek denatürasyon olaylarının etkileri minimize edilmeye çalışılmıştır. Çalışmalar esnasında her bir parametrenin belirlenmesinde tüplere ait esteraz enzim aktivitesi ve protein miktarları belirlenmiştir. Elde edilen bu değerler kontrol değeri olarak belirlenmiş ve aynı tüpteki enzim çözeltisinde yapılan enzim aktivitesi çalışmalarında elde edilen sonuçlar elde edilen kontrol değerleriyle karşılaştırılmıştır.

Sıcaklığın *O. mykiss'in* solungaç dokusu esteraz aktivitesine etkisinin değerlendirildiği çalışmalarda en yüksek aktivitelere 20 °C ve 40 °C arasındaki aktivite değerlerinde rastlanmıştır. Bununla birlikte solungaç esterazının optimum sıcaklığının 30 °C olduğu ve bu sıcaklıkta 1,199 $\mu\text{mol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ aktivite değerinde olduğu görülmektedir.

Mikrobiyal kökenli esterazların çalışmamızda elde edilen optimum sıcaklık değerinden daha yüksek sıcaklıklarda çalışabildikleri ve daha uzun süre dayanıklılığa sahip oldukları bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalardan bir tanesi metagenom odaklı bir çalışma olup, *Escherichia coli* bakterisinde gerçekleştirilmiş

ve elde edilen esterazın 30 °C'ın üzerinde ve 95 °C'a kadar sıcaklık değerlerinde aktif olduğu vurgulanmıştır (Rhee ve ark., 2005). Başka bir çalışmada, *A. Gonensis'den* elde edilen esterazın çalıştığı optimum sıcaklığın 60 ile 80 °C arasında olduğu bildirilmiştir (Faiz ve ark., 2007; Esteban-Torres ve ark., 2014). *Lactobacillus plantarum'dan* elde edilen bir esterazın optimum sıcaklığının 20 °C olduğu ve 5 °C'ta ise sahip olduğu optimum aktivitenin % 90'dan fazlasını koruyabildiği bildirilmiştir (Esteban-Torres ve ark., 2014). Bu sonuçlardan, mikrobiyal esterazların oldukça değişken sıcaklıklarda optimum aktiviteye sahip olabildikleri gözlenmektedir. Son zamanlarda sucul organizmalardan saflaştırılan lipolitik enzimlerden birisi olarak yengeç sindirim lipazının 60 °C'de çalışabildiği gösterilmiştir (Cherif ve ark., 2007). Bununla birlikte, sucul organizmalar üzerinde yapılan araştırmalardan balıklardaki lipolitik enzimlerin çalışmamızda elde edilen sıcaklık değerlerine benzer olduğu görülmektedir. Örneğin, *Cirrhinus reba* türünden saflaştırılan lipaz enziminin 30-60 °C arasında aktivite göstermesine karşın, en yüksek aktiviteyi 35 °C'de göstermiştir (Islam ve ark., 2009). Bununla birlikte, "cod" lipazı üzerine yapılan araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilerek, sıcaklığın artırılmasıyla birlikte aktivitede düşüşler meydana gelmiş ve 60 °C'de herhangi bir aktiviteye rastlanmamıştır (Gjellesvik ve ark., 1992). Solungaç dokusu üzerine sıcaklığın etkisi bu çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

O. mykiss'in solungaç dokusu esteraz aktivitelerinin pH'a bağlı olarak elde edilen aktivite deneylerinde enzimin asit pH değerlerinde çok aktif olmadığı söylenebilir. pH 5,7 ve 6,9 noktalarında enzim aktivitesi 0,175 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ dan başlamak suretiyle pH'taki artışa bağlı olarak 0,443 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ seviyelerine artış göstermiştir. Bununla birlikte, enzim pH'ın 8,0 ve 8,8 olduğu aralıklarda en yüksek aktiviteyi sergilemiş ve 8,8'lik bir pH noktasında en yüksek aktivite değeri olan 2.131 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ değerinde bir aktivite göstermiştir. Buradan *O. mykiss* solungaç esterazının optimum pH seviyesinin 8,8 olduğu belirlenmiştir. Aktivite değeri pH 9,38 de 0,812 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ olarak saptanmış ve pH'ın 10,2 olduğu noktada ise herhangi bir enzimatik aktiviteye rastlanmamıştır. Bununla birlikte, çeşitli balık türlerinden elde edilen lipolitik aktivitelerin optimum pH değerleri farklı olabilmektedir. *C. reba* türünden saflaştırılan lipazın pH 5,5 noktasında en yüksek olduğu belirlenmiştir (Islam ve ark., 2009). Bu çalışmada elde edilen pH sonuçları çalışmamızdakinden farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, genel olarak sucul

türlerden elde edilen lipolitik enzimlerin optimum pH değerlerinin pH 7 ve üzerinde olduğu bildirilmektedir. Örneğin *Cyprinus carpio* türünün karaciğerinden saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH değeri 8,0 ve optimum sıcaklık değeri ise 37 °C olarak belirlenmiştir (Görgün ve Akpınar, 2012). Bu bulgular çalışmamızda elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda substrat olarak p-NPA kullanılmıştır. Bu substrat ile yapılan deneylerden K_m 2,257 mM, V_{max} ise 2,806 $\mu\text{mol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Diğer balık türleri ve dokularından saflaştırılan lipolitik enzimlerin farklı K_m ve V_{max} değerlerinin olduğu görülmektedir. Bunlardan Görgün ve Akpınar (2012) substrat olarak p-NPB (p-Nitrofenil Butirat) kullanmışlar ve *C. carpio'nun* karaciğer lipazı için K_m ve V_{max} 'ı sırasıyla 0,17 mM ve 2,6 $\mu\text{mol.mL}^{-1}\text{dk}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada *O. mykiss*'in karaciğer lipazı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,12 mM ve 0,40 U.mg^{-1} olarak belirlenmiştir (Metin ve Akpınar, 2000).

Genellikle enzim saflaştırma çalışmaları enzim aktivitesinin saflaştırma süreçlerinde korunması amacıyla bazı inhibitörler ve yüzey aktif kimyasalların belirli miktarlarını içermektedir. Bunlar arasında EDTA ve Benzamidin-HCl en fazla kullanılan inhibitörler arasında yer alırken, Na-taurokolat ise yüzey aktif bileşen olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Görgün ve Zengin, 2015). Çalışmamızda özellikle benzamidin-HCl'nin 1, 5 ve 10 mM miktarındaki derişimleri *O. mykiss* solungaç esteraz aktivitesinde çok önemli düşüşlere neden olmuşlardır. Bu kimyasallar arasında EDTA'nın çok daha güçlü bir esteraz inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Görgün ve Zengin (2015) *Vimba vimba*'nın solungaç ve gonad dokularının esteraz aktivitelerine Benzamidin-HCl'nin etkisini değerlendirmişler ve solungaç dokusunda kantitatif farklılıklar görülmekle birlikte, 10 mM'lık uygulama sonucunda yaklaşık % 60 aktivite kaybı olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda bu kimyasalın 10 mM uygulaması sonucunda yaklaşık % 70 aktivite kaybının olduğu görülmektedir. *C. reba* kasından saflatılan lipaz üzerine EDTA'nın etkisini değerlendiren çalışmalarda bu kimyasalın 1, 3 ve 5 mM derişimlerinin önemli düşüşlere neden olduğu ve 5 mM'lık derişim uygulaması sonucunda aktivitede % 75 kayıp olduğu bildirilmiştir(Islam ve ark., 2009). Çalışmamızda EDTA'nın 1 ve 5 mM derişim uygulamasında aktivite kaybı yaklaşık % 46 iken 10 mM'lık uygulamada yaklaşık % 89'luk bir aktivite kaybı belirlenmiştir. Buradan EDTA'nın

esteraz çalışmalarında oldukça dikkatli kullanılması gerektiği ve 1 mM'lık uygulamalarda dahi önemli aktivite kayıplarına neden olduğu açıkça görülmektedir.

Çalışmamızda Na-taurokolatın 1 ve 5 mM'lık uygulamalarının önemsiz aktivite düşüşlerine neden olduğu görülmekle birlikte, 10 mM uygulama sonucunda *O. mykiss* solungaç esterazının aktivitesinde yaklaşık % 25 kayıp olduğu görülmektedir. Görgün ve Zengin (2015) *V. Vimba*'nın solungaç esterazında bu kimyasalın 5 mM derişimlerinde daha önemli düşüşlere neden olduğunu göstermekle birlikte, bu türün gonad esteraz aktivitesi üzerine 1 mM Na-taurokolat uygulamasında aktivitede artış olduğu bildirilmiştir. Burada bu kimyasalın farklı dokularda farklı sonuçlar üretebileceği ve solungaç ve gonadal dokulardaki farklı esteraz izozimlerinin etkisinin olabileceğini düşünmeye sevk etmektedir.

Deterjanlar suda oldukça yüksek çözünürlüğe sahip olup protein saflaştırma çalışmaları esnasında geniş uygulamalara sahip olan amfilik moleküllerdir. Triton X 100, tween 40 ve tween 80 gibi deterjanlar noniyonik deterjanlar olup, iyonik deterjanlara nazaran daha az denatüre edici etkiye sahiptirler (Bollag ve ark., 1996). Çalışmamızda kullanılan triton X 100 literatür verileri incelendiğinde gerek genel protein saflaştırma çalışmaları gerekse esteraz/lipaz çalışmalarında en fazla kullanılan deterjanlardan birisidir. Çalışmamızda triton X-100'ün % 0.5 derişimindeki uygulamasının *O. mykiss* solungaç esteraz aktivitesinde önemli (yaklaşık % 44) aktivite kaybına neden olduğu belirlenmiştir. Bu deterjanın uygulama derişimi % 5'e çıkarıldığında aktivite kaybı yaklaşık % 75 kadardır. Bununla birlikte tween 40 ve tween 80 uygulamalarının % 0,5'lik derişimleri *O. mykiss* esteraz aktivitesinde artışa neden olmuştur. Yine tween 80 uygulamasında sadece % 5 uygulamasında elde edilen aktivite değeri kontrol aktivitesinden yaklaşık % 30 civarında düşük olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlardan tween 40 ve tween 80'in triton X 100'e nazaran *O. mykiss* solungaç esterazı ile ilgili çalışmalarda daha güvenli bir şekilde kullanılabileceği söylenebilir. Lopes ve ark. (2011) triton X 100'ün farklı derişimlerinin beş farklı lipaz üzerinde aktivitede kayba neden olduğunu göstermişlerdir. Buna karşın, Kim ve ark. (2002) *Pseudomonas* sp. S34 esterazının triton X 100 varlığında aktivitesinde artış bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu grup deterjanlar hakkında elde edilen verilerin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Hermoso ve ark. (1996) iyonik olmayan deterjanların lipaz aktivasyonu üzerine çalışmışlar ve çok düşük deterjan konsantrasyonlarında emülsüfiye olmuş substrat hidrolizinin arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca Balan ve ark. (2013) *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra'dan bir lipaz saflaştırmışlar ve Tween 20, Tween 40 ve Tween 80 deterjanlarıyla yapılan çalışmalarda kontrol aktivitesinden daha yüksek (% 150'ye varan) göreceli aktivite değerleri elde etmişlerdir.

Organik çözücülerin lipolitik enzimlerin aktivitesi üzerine etkilerinin değişken olduğu görülmektedir. Son zamanlarda Cherif ve Gargouri (2010) hindi farinjal dokusundan organik çözücülere dirençli bir esteraz saflaştırmışlardır. Bu çalışmada elde edilen enzimin yaklaşık 1 saat boyunca aktivitesini çeşitli organik çözümlere karşı koruyabildiği görülmüştür. Balan ve ark. (2013) *G. thermodenitrificans*'dan elde edilen lipaz üzerine çeşitli organik solventlerin (aseton, asetonitril, benzen, kloroform, etanol, metanol, heksan, heptan) etkilerinin araştırmışlar ve 1 saatlik uygulama sonucunda kontrol değerinden genelde yüksek aktivite değerleri elde etmişlerdir. Çalışmamızda da organik çözücülerin benzer sonuçları elde edilmesine rağmen, elde etmiş olduğumuz yüksek aktivitelerin kontrol deneyi esnasında deney ortamındaki hatalardan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda *O. mykiss*'in solungaç dokusu yağ asit bileşimi de belirlenmiştir. Günümüzde birçok çalışma farklı balık türlerinin özellikle kas dokusunun yağ asidi bileşimini belirlemeye odaklanmıştır. Ayrıca, bazı türlerin karaciğer, kas, gonad gibi farklı dokularının yağ asidi bileşimleri de yoğun şekilde araştırılmaktadır (Görgün ve ark., 2013; Görgün ve ark., 2014). Bununla birlikte, balıklarda solungaç gibi önemli bir dokuya ait yağ asidi çalışmalarının oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Son zamanlarda Görgün ve Zengin (2015) *V. vimba*'nın solungaç ve gonad dokularının yağ asidi bileşimlerini ayrıntılı bir şekilde çalışmışlardır.

O. mykiss'in solungaç dokusu yağ asidi bileşiminde doymuş yağ asidi (DYA) formunda en fazla bulunan yağ asidinin C16:0 (% 15,23) olduğu görülmektedir. Bunu takiben en fazla bulunan yağ asidinin C18:0 (% 4,71) olduğu belirlenmiştir. (Steffens, 1997)'ye göre C16:0 ve C18:0 balık dokularının DYA formu yağ asitleri içerisindeki kararlı bileşenleri olup, C16:0 miktar olarak daha fazla bulunmaktadır. Çalışmamızda elde edilen veriler bu bilgiyle uyumludur.

O. mykiss'in solungaç dokusunda en fazla bulunan yağ asidi tek çift bağlı doymamış yağ asidi (TÇDmYA) olan C18:1 n-9 olmuştur. Bu asidin seviyesi % 31,85 olarak belirlenmiştir. Birçok çalışma TÇDmYA sınıfının hakim yağ asidinin C18:1 n-9 olduğunu farklı balık türleri ve dokularında bildirmiştir (Görgün ve Akpınar, 2007; Akpınar ve ark., 2009; Görgün ve Zengin 2015).

Balıklarda en önemli yağ asitleri arasında n-6 ve n-3 formu aşırı doymamış yağ asitleri (ADmYA) olduğu söylenebilir. Bunlar esansiyel yağ asitleri olup, besin yoluyla alınmaları gerekmektedir (Lee ve ark., 2003). Bu yağ asitleri arasında C20:4 n-6 araşidonik asit olarak bilinir ve eikozanoid ve prostaglandin gibi farmakolojik etkilere sahip biyolojik unsurların sentezinde öncülük yapmaktadır (Sargent ve ark., 1999). Çalışmamızda elde edilen verilerden C20:4 n-6 seviyesinin % 2,34 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yine balık dokularında bulunan ve araşidonik asidin n-3 formu yağ asidi analogu olan bir başka yağ asidi de C20:5 n-3'ün seviyesinin % 1,13 olduğu görülmektedir. *O. mykiss* solungaç dokusundaki bir başka önemli ADmYA C22:6 n-3 olup % 7,76 seviyesinde bir değere sahiptir. Balıklarda özellikle bu yağ asidinin insan sağlığına olumlu etkilerinin olduğu ve biyolojik membranlar için oldukça elzem olduğu bildirilmektedir. Görgün ve Zengin (2015) *V.Vimba'nın* solungaç dokusunun toplam lipitlerinin C20:4 n-6, C20:5 n-3 ve C22:6 n-3 yağ asidi seviyelerini yaklaşık olarak % 5 olarak belirlemelerine karşın, gonad dokusunda C20:4 n-6 (% 3,71), C20:5 n-3 (% 2,19) ve C22:6 n-3 (% 2,75) daha düşük miktarlarda ifade edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen verilerin farklı olmasında başlıca etkenin tür farklılığı olabilme ihtimali yüksektir.

O. mykiss'in solungaç dokusunun esteraz aktivitesi ve yağ asidi bileşimine odaklanmış olan mevcut çalışma ile türün solungaç dokusunun önemli esteraz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca esteraz aktivitesi üzerine özellikle organik çözen ve deterjanların etkilerinde elde edilen verilerin önemli olduğunu düşünmekteyiz. Yağ asidi çalışmalarından elde edilen sonuçlar bu türün solungaç dokusunun toplam % 75,74'lük bir değer ile oldukça yüksek miktarda toplam doymamış yağ asidi (TÇDYA + ADmYA) içerdiğini bildirmiştir. Bu sonuçlardan balıklarda solungaç gibi besinsel ve endüstriyel olarak kullanılmayan dokuların daha fazla araştırmaya konu olmaları gerektiğini hak ettiklerini önermekteyiz.

KAYNAKLAR

- Akpınar, M.A., Görgün, S., Akpınar, A.E.** (2009) .A comparative analysis of the fatty acid profiles in the liver and muscles of male and female *Salmo trutta macrostigma*. Food Chemistry, 112, 6-8.
- Aras N.M., Haliloğlu, H.I., Ayik, O., Yetim, H.** (2003). Comparison of fatty acid profiles of different tissues of mature trout (*Salmo trutta labrax*, Pallas, 1811) caught from Kazandere creek in the Çoruh region, Erzurum, Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 27, 311-316.
- Asano, Y.** (2002). Overview of screening for new microbial catalysts and their uses in organic synthesis—selection and optimization of biocatalysts. Journal of Biotechnology, 94, 65-72.
- Balan, A., Ibrahim, D., Rahim, R.A.** (2013). Organic-solvent and surfactant tolerant thermostable lipase, isolated from a thermophilic bacterium, *Geobacillus thermodentificans* IBRL-nra. Advanced Studies in Biology, 5, 9, 389-401.
- Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C., Verger, R.,** (2000). Methods for lipase detection and assay: a critical review. European Journal of Lipid Science and Technology, 133-1530.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J.** (1996). Protein methods. A John Wiley and Sons, Inc., Publication, 57-82.
- Bonacci, S., Browne, M.A., Dissanayake, A., Hagger, J.A., Corsi, I., Focardia, S., Galloway, T.S.** (2004). Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbecki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. Marine Pollution Bulletin, 49, 445-455.
- Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J.** (1999). Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and Stereoselective Biotransformations. Weinheim: Wiley-VCH.
- Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., and Krishna, S.H.** (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends in Biotechnology, 20, 433-436.
- Bornscheuer, U.T.** (2002a). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews, 26, 73-81.
- Bornscheuer, U.T.** (2002b). Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. Current Opinion in Biotechnology, 13, 543-547.
- Bornscheuer, U.T.** (2005). Deep Sea Mining for Unique Biocatalysts. Chemistry and Biology, 12, 859-865.
- Bornscheuer, U.T., Schmidt, M.** (2005). High-throughput assays for lipases and esterases. Biomolecular Engineering, 22, 51-56.

- Brown, M., Davies, I.M., Moffat, C.F., Redshaw, J., Craft, J.A.** (2004). Characterisation of choline esterases and their tissue and subcellular distribution in mussel (*Mytilus edulis*). *Marine Environmental Research*, 57, 155-169.
- Chandrasekaran, G., Kim, G.J., Shin, H.J.** (2011). Purification and characterisation of an alkaliphilic esterase from a culinary medicinal mushroom *Sparassis crispa*. *Food Chemistry*, 124, 1376-1381.
- Cherif, S., Fendri, A., Miled, N., Trabelsi, H., Mehdoub, H., Gargouri, Y.** (2007). Crab digestive lipase acting at high temperature: Purification and biochemical characterization. *Biochimie*, 89, 1012-1018.
- Cherif, S., Gargouri, Y.** (2010). An organic-solvent-tolerant esterase from turkey pharyngeal tissue. *Bioresource Technology*, 101, 3732-3736.
- Cousin, X., Hotelier, T., Giles, K., Toutant, J.P., Chatonnet, A.** (1998). The database system for esther, the a/p fold family of proteins and the cholinesterase gene server. *Nucleic Acid Research*, 26, 226-228.
- Dauberschmidt, C.L., Dietrich, D.R., Schlatter, C.** (1997). Esterases in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: activities, inhibition, and binding to organophosphates. *Aquatic Toxicology*, 37, 295-305.
- Dörücü, M.** (1997). Seasonal Variation of Pseudophyllidean cestode, *Diphyllobothrium* spp. Infection in *Cyclops strenuus abyssorum* (Copepoda) in Loch Lomond. *Turkish Journal of Zoology*, 23, 85-91.
- Eggert, T., Pouderoyen, G.V., Pencreach, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B., and Jeager, K.** (2002). Biochemical properties and three dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloid Surface B*. 26, 37-46.
- Esteban-Torres, M., Santamaria, L., Rivas, B., Munoz, R.** (2014). Characterisation of a cold-active and salt-tolerant esterase from *Lactobacillus plantarum* with potential application during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 39, 312-315.
- Faiz, O., Colak, A., Saglam, N., Canakci, S., Belduz, A.O.** (2007). Determination and characterization of thermostable esterolytic activity from a novel thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 588-594.
- Fahmy, A.S., Abdel-Gany, S.S., Mohamed, T.M., Mohamed, S.A.** (2004). Esterase and lipase in camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) during embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 137, 159-168.
- Fahmy, A.S., Abo-Zeid, A.Z., Mohamed, T.M., Ghanem, H.M., Borai, I.H., Mohamed, S.A.** (2008). Characterization of esterases from *Cucurbita pepo* cv. "eskandrani". *Bioresource Technology*, 99, 437-443.

- Fojan, P., Johnson, P.H, Petersen, M.T.M, Petersen, S.B.** (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: a novel approach. *Biochimie*, 82, 1033–1041.
- Folch, J., Less, M. and Sloane Stanley, G.H.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Gilham, D., Lehner, R.** (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 36, 139-147.
- Gjellesvik, D.R., Lombardo, D., Walther, B.T.** (1992). Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*) : purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1124, 123-124.
- Görgün, S., Akpınar, M.A.** (2007). Liver and muscle fatty acid composition of mature and immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two different diets. *Biologia*, 62, 351-355.
- Görgün, S., Akpınar, M.A.** (2012). Purification and characterization of lipase from the liver of Carp, *Cyprinus carpio* L. (1758), Living in Lake Tödürge (Sivas, Türkiye). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 207-215.
- Görgün, S., Akpınar, N., Zengin, G., Akpınar, M.A., Gunlu, A., Guler, G.O., Aktumsek, A.** (2013) Determination of fatty acid profiles of total, neutral, and polar lipids in different tissues of *Vimba vimba* (L., 1758) from Eğirdir Lake (Isparta, Turkey). *Turkish Journal of Zoology*, 37, 627-634.
- Görgün, S., Akpınar, N., Dirican, S.**(2014) A comparative study on the fatty acid profiles of total lipid, neutral and polar lipids in the liver and muscle of *Capoeta sieboldii* (Steindachner, 1864) and *Capoeta baliki* (Turan, Kottelat, Ekmekçi, Imamoğlu, 2006) from Tödürge Lake (Sivas, Turkey). *Acta Alimentaria*, 43(1),170-181.
- Görgün, S., Zengin, G.** (2015). Determination of fatty acid profiles and esterase activities in the gills and gonads of *Vimba vimba* (L., 1758). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92, 353-360.
- Hermoso, J., Pignol, D., Kerfelec, B., Crenon, I., Chapus, C., Fontecilla-Camps, J. C.** (1996). Lipase activation by nonionic detergents: The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol mono-octyl ether complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 271, 30, 26, 18007-180016.
- Holub, D.J., Holub, B.J.** (2004). Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263, 217- 225.
- Hubbard, T.J.P., Ailey, B., Brenner, S.E., Murzin, A.G., Chothia, C.** (1998). SCOP, structural classification of proteins database: applications to evaluation of the effectiveness of sequence alignment methods and statistics of protein structural data. *Acta Crystallographica, Section D*, 54, 1147-1154.

- Islam, M.A., Parveen, F., Hossain, K., Khatun, S., Karim, M.R., Kim, G.S., Absar, N., Haque, S.** (2009). Purification and biochemical characterization of lipase from the Dorsal Part of *Cirrhinus reba*. Thai Journal of Agricultural Science, 42 (2), 71-80.
- Kaya, Y., Duyar, H.A., Erdem, M.E.** (2004). Balık yağ asitlerinin insan sağlığı için önemi, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 21 (3-4), 365-370.
- Kim, G.J., Choi, G-S., Kim, J-Y., Lee, J-B., Jo, D-H., Ryu, Y-W.** (2002). Screening, production and properties of a stereospecific esterase from *Pseudomonas sp.* S34 with high selectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 17, 1, 29-38.
- Le, H.D., Meisel, J.A., Meijer, V.E., Gura, K.M., Puder, M.** (2009). The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 81(2-3): 165-170.
- Lee, S.M.** (2001). Review of the lipid and essential fatty acid requirements of rockfish (*Sebastes schlegeli*). Aquaculture Research, 32 (Suppl. 1), 8-17.
- Lee S.-M., Lee J.H. & Kim K.D.** (2003). Effect of dietary essential fatty acids on growth, body composition and blood chemistry of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). Aquaculture 225: 269-281.
- Li, J-K., Zhou, Y-L., Wen, Y-H. ve Hu, Q-H.** (2009). Studies on the purification and characterization of soybean esterase, and its sensitivity to organophosphate and carbamate pesticides. Agricultural Sciences in China, 8(4), 455-463.
- Lima, A.V.B., Guerra, A.L., Almeida, E.A., Taddei, F.G., Castiglioni, L.** (2013). Characterization of esterase patterns in hepatopancreas of three species of *Macrobrachium* (Palaemonidae). Biochemical Systematics and Ecology, 47, 132-138.
- Liu, S.Q., Holland, R., Crow, V.L.** (2001). Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus*. International Dairy Journal, 11, 27-35.
- Liu, S.Q., Holland, R., Crow, V.L.** (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. International Dairy Journal, 14, 923-945.
- Lopes, D.B., Fraga, L.P., Fleuri, L.F., Macedo, G.A.** 2011. Lipase and esterase- to what extent can this classification be applied accurately? Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 31(3): 608-613.
- Lotti, M., Alberghina, L.** (2007). Lipases: Molecular Structure and Functions. In: Polaina J and MacCabe A P. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Springer, Dordrecht, 263-282.
- Metin, K. and Akpınar, M.A.** (2000). *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 karaciğer lipaz enziminin bazı kinetik özellikleri. Turkish Journal of Biology, 24, 489-502.
- Montgomery, R., Conway, T.W., Spector, A.A., Chappell, D.** (1996). Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım. Palme Yayıncılık.

- Moss, C.W., Lambert, M.A., Mervin, W.H.** (1974). Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. *Journal of Applied Microbiology*, 28(1), 80-85.
- Nardini, M., Dijkstra, B.W.** (1999). a/p Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 732-737.
- Ogawa, J., Shimizu, S.** (2002). Industrial microbial enzymes : Their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 367-375.
- Ogg, C.L., Meinke, L.J., Howard, R.W., Stanley-Samuelson, D.W.** (1993). Phospholipid and triacylglycerol fatty acid compositions of five species of *Diabrotica* (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105B, 1, 69-77.
- Orengo, C.A., Martin, A.M., Hutchinson, G., Jones, S., Jones, D.T., Michie, A.D., Swindells, M.B., Thornton, J.M.** (1998). Classifying a protein in the CATH database of domain structures. *Acta Crystallography D*, 54, 1155-1167.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J.** (1992). The a/p-hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5, 197-211.
- Patel, R.N.** (2000). Stereoselective biocatalysis for synthesis of some chiral pharmaceutical intermediates. In *Stereoselective Biocatalysis*. Marcel Dekker, 87-130.
- Petersen, M.T.N., Fojan, P., Petersen, S.B.** (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology*, 85, 115-147.
- Ratray, F.P., Fox, P.F.** (1997). Purification and characterization of an intracellular esterase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *International Dairy Journal*, 7 (4), 273-278.
- Rhee, J.K., Ahn, D.G., Kim, Y.G., and Oh, J.W.** (2005). New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2, 817-825.
- Rueda, F.M., Hernandez M.D., Egea, M.A., Aguado, F., Garcia, B., Martinez F.J.** (2001). Differences in tissue fatty acid composition between reared and wild sharpshout sea bream, *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). *British Journal of Nutrition*, 86, 617-622.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A.** (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177(1), 191-199.
- Satoh, T., Hosokawa, M.** (1998). The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38, 257-288.

- Satoh, T., Hosokawa, M.** (2000). Organophosphates and their impact on the global environment. *Neurotoxicology*, 21, 223-228.
- Simopoulos, A.P.** (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, Suppl: 560-569.
- Smacchi, E., Gobbetti, M., Rossi, J., Fox, P.F.** (2000). Purification and characterization of an extracellular esterase from *Arthrobacter nicotianae* 9458. *Lait*, 80, 255-265.
- Steffens, W.** (1997). Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture*, 151(1-4), 97-119.
- Vioque-Fernandez, A., Alves de Almeida, E., Lopez-Barea, J.** (2007). Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 145 , 404-412.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Zeynep EKER
Doğum yeri ve Tarihi	Sivas, 15.10.1991
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
E- posta Adresi	zeynepker91@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Halil Rıfat Paşa Lisesi , 2009
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi , Kimya Bölümü , 2013
Yüksek lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, 2015

Ödüller

2013 mezuniyet töreni, Kimya Bölüm ikinciliği