

**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÖDÜRGE GÖLÜ'NDE (SİVAS) YAŞAYAN BAZI CYPRINIDAE TÜRLERİNİN  
KARACİĞER VE KAS DOKUSU YAĞ ASİTİ BİLEŞİMİNİN MEVSİMSEL  
DEĞİŞİMİ VE KARACİĞER LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE  
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Salih GÖRGÜN**

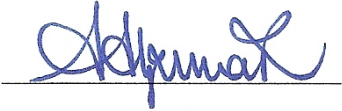
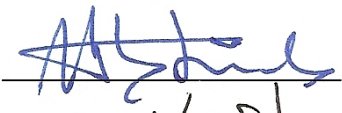

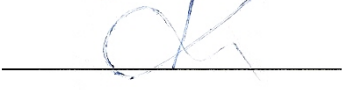

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. MEHMET ALİ AKPINAR**

**SİVAS, 2011**

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof. Dr. Mehmet Ali AKPINAR	
Üye	Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK	
Üye	Prof. Dr. Naci DEĞERLİ	
Üye	Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL	
Üye	Prof. Dr. Nursevin ÖZTOP	

ONAY

Bu tez çalışması, 26/05/2011 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 9 sayılı toplantısında kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
<b>ÖZET</b>	v
<b>SUMMARY</b>	viii
<b>TEŞEKKÜR</b>	xi
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	xii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xiii
<b>KISALTMALAR</b>	xvi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. MATERYAL VE METOD</b>	34
2.1. Materyal seçimi	34
2.2. Örneklerin Diseke Edilmesi	34
2.3. Lipit Çalışmaları İçin Örneklerin Özütleme	34
2.3.1. Toplam Lipit Eldesi	34
2.3.2. Toplam Yağ Asiti Eldesi	35
2.3.3. Yağ Asiti Metil Esterlerinin Eldesi	35
2.3.4. Yağ Asitlerinin Gaz Kromatografik Analizi	35
2.4. Lipaz Saflaştırılması İçin Karaciğer Dokusunun Homojenizasyonu	36
2.5. Santrifüjleme İşlemleri	36
2.6. Polietilen glikol 6000 (PEG 6000) ile Proteinlerin Çöktürülmesi	37
2.7. Protein Miktar Tayinleri	37
2.8. Enzim Aktivitesi Tayinleri	37
2.9. Kromatografik İşlemler	38
2.9.1. Q Sefaroz Fast Flow Anyon Değişim Kromatografisi	38
2.9.2. Sefakril S-200 HR Jel Filtrasyon Kromatografisi	38
2.9.3. Fenil Sefaroz CL-4B Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	39
2.10. Enzim Kinetiği Çalışmaları	39

2.10.1. Optimum pH çalışmaları	39
2.10.2. Optimum sıcaklık çalışmaları	39
2.10.3. Enzim aktivitesi üzerine substrat miktarının etkileri	40
2.10.4. Enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerin etkileri	40
2.11. Elektroforetik Teknikler	40
2.11.1. Gümüş Boyama	41
2.11.2. SDS-PAGE işlemi	41
2.12. Verilerin Değerlendirilmesi	42
<b>3. BULGULAR</b>	44
3.1. <i>C. chalcoides</i> 'in (Gümüş) karaciğer yağ asitlerinde mevsimsel değişim	46
3.2. <i>L. cephalus</i> 'un (Kefal) karaciğer yağ asitlerinde mevsimsel değişim	49
3.3. <i>C. carpio</i> 'nun (Sazan) karaciğer yağ asitlerinde mevsimsel değişim	52
3.4. <i>C. chalcoides</i> 'in (Gümüş) kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi	55
3.5. <i>L. cephalus</i> 'un (Kefal) kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi	58
3.6. <i>C. carpio</i> 'nun (Sazan) kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi	61
3.7. <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> karaciğer toplam yağ asiti miktarlarının mevsimsel olarak karşılaştırılması	64
3.8. <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> kas dokusu toplam yağ asiti miktarlarının mevsimsel olarak karşılaştırılması	64
3.9. Karaciğer lipazının saflaştırılması	66
3.9.1. <i>C. chalcoides</i> 'in karaciğer lipazının saflaştırılması	68
3.9.1.1. Q sefaroze anyon değişim kromatografisi ile saflaştırma	68
3.9.1.2. Sefakril S200-HR jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma	70
3.9.1.3 Fenil Sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırma	70
3.9.1.4. <i>C. chalcoides</i> karaciğer lipazının saflaştırma sonuçları	73

3.9.2. <i>L. cephalus</i> 'un karaciğer lipazının saflaştırılması	75
3.9.2.1. Q sefaroze anyon değişim kromatografisi ile saflaştırma	75
3.9.2.2. Sefakril S 200 HR jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma	77
3.9.2.3. Fenil sefaroze CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırma	77
3.9.2.4. <i>L. cephalus</i> karaciğer lipazının saflaştırma sonuçları	80
3.9.3. <i>C. carpio</i> 'nun karaciğer lipazının saflaştırılması	82
3.9.3.1. Q sefaroze anyon değişim kromatografisi ile saflaştırma	82
3.9.3.2. Sefakril S 200 HR jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma	84
3.9.3.3. Fenil sefaroze CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırma	84
3.9.3.4. <i>C. carpio</i> karaciğer lipazının saflaştırma sonuçları	87
3.9.4 <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> 'nun karaciğer lipazlarının spesifik aktivite ve saflıklarının karşılaştırılması	89
3.10. Karakterizasyon çalışmaları	91
3.10.1. Sıcaklığın karaciğer lipazı aktivitesi üzerine etkisi	91
3.10.2. pH'nın karaciğer lipazı aktivitesi üzerine etkisi	93
3.10.3. Substrat miktarının karaciğer lipazları üzerine etkileri	95
3.10.3.1. <i>C. chalcoides</i> karaciğer lipaz aktivitesi üzerine substrat miktarının (pNPB) etkisi	95
3.10.3.2. <i>L. cephalus</i> karaciğer lipaz aktivitesi üzerine substrat (pNPB) miktarının etkisi	98
3.10.3.3. <i>C. carpio</i> karaciğer lipaz aktivitesi üzerine substrat (pNPB) miktarının etkisi	101
3.11. Yüzey aktif maddelerin karaciğer lipazları üzerine etkisi	104
3.11.1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)'in etkisi	104
3.11.2. Sodyum taurokolik asit'in etkisi	105
3.11.3 Triton X-100'ün etkisi	107

3.12. Elektroforetik Analizler	109
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	113
<b>5. KAYNAKLAR</b>	153
<b>6. Yağ asiti bileşimi incelenen dokuların gaz kromatografisi metil esterlerine ait kromatogram örnekleri</b>	180
<b>7. EK (Lipaz saflaştırma profillerine ait kromatogram bilgileri)</b>	204
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	213

**ÖZET**  
**DOKTORA TEZİ**

**TÖDÜRGE GÖLÜ'NDE (SİVAS) YAŞAYAN BAZI CYPRINIDAE  
TÜRLERİNİN KARACİĞER VE KAS DOKUSU YAĞ ASİTİ BİLEŞİMİNİN  
MEVSİMSEL DEĞİŞİMİ VE KARACİĞER LİPAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Salih GÖRGÜN**  
**Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Mehmet Ali AKPINAR**

Bu çalışmada, *Chalcalburnus chalcoides*, *Leuciscus cephalus* ve *Cyprinus carpio*'nun karaciğer ve kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi ve karaciğer lipaz enzimlerinin (E.C. 3.1.1.3) saflaştırılması, bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

İncelenen türlerin karaciğer ve kas dokusu yağ asitleri kalitatif fark göstermezken, mevsime bağlı olarak kantitatif farkların olduğu belirlenmiştir. Yağ asitleri gaz kromatografisi ile analizlenmiştir.

Karaciğer ve kas dokusunda tüm mevsimlerde en fazla bulunan yağ asitlerinin palmitik asit (C16:0), stearik asit (C18:0), palmitoleik asit (C16:1 n-7), oleik asit (C18:1 n-9), C18:1 n-7, linoleik asit (C18:2 n-6), arakidonik asit (C20:4 n-6), eikosapentaenoik asit (C20:5 n-3), dokosapentaenoik asit (C22:5 n-3) ve dokosahekzaenoik asitin (C22:6 n-3) olduğu bulunmuştur.



Su sıcaklığı ve türlerin üreme periyotlarına bağlı olarak, karaciğer ve kas dokusu toplam doymuş yağ asiti (DYA) ve aşırı doymamış yağ asiti (ADmYA) miktarlarının önemli derecede etkilendiği belirlenmiştir. Yazın yüksek oranlarda temsil edilen DYA miktarlarının kış periyoduyla azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, incelenen türlerin üreme periyotları esnasında toplam ADmYA oranlarında önemli düşüş olmuştur. Bu periyotlarda en fazla düşüş gösteren yağ asitlerinin C20:4 n-6 ve C22:6 n-3 olduğu belirlenmiştir. Kış sezonuyla birlikte, ADmYA seviyelerinde önemli artışlar saptanmıştır. İnsan sağlığı açısından önemli fizyolojik etkilere sahip olan n-3 formu ADmYA'nin incelenen türlerin karaciğer ve kas dokularında oldukça yüksek miktarlarda bulunduğu görülmüştür.

Bu çalışmada *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğer lipaz enzimleri saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri karakterize edilmiştir. Saflaştırma işlemi homojenatın hazırlanması, PEG-6000 ile çöktürme ve Q sefaroz, Sefakril S 200 HR, fenil sefaroz CL-4B'yi kapsayan kromatografik işlemlerden oluşmuştur.

Anyon değişim kromatografisi olan Q sefaroz tüm türlerde önemli saflaştırma parametreleri sağlamıştır (*C. chalcoides*'te 32.96 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite ve 30.49 kat saflık, *L. cephalus*'ta 30.99 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite ve 33.05 kat saflık, *C. carpio*'da 29.72 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite ve 24.83 kat saflık). Sefakril S 200 HR kromatografisi *L. cephalus*'ta saflaştırma sağlamamıştır. Son saflaştırma basamağında kullanılan fenil sefaroz CL-4B ile elde edilen saflaştırma parametreleriyle *C. chalcoides*'te 52.84 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite ve 48.88 kat saflık, *L. cephalus*'ta 51.41 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite ve 54.84 kat saflık, *C. carpio*'da 90.38 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite ve 75.50 kat saflık elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, en yüksek saflaştırma parametreleri *C. carpio*'da belirlenmiştir.

Kinetik parametreler karşılaştırıldığında, incelenen türlerin karaciğer lipazlarının optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 37 °C ve 8.00 olarak belirlenmiştir.  $K_m$  değerleri *C. chalcoides* için 0.77 mM pNPB, *L. cephalus* için 0.58 mM pNPB ve *C. carpio* için 0.17 mM pNPB olarak bulunmuştur.  $V_{max}$  değerleri *C. chalcoides*'te ve *L. cephalus*'ta 2.8 µmol/mL.dk, *C. carpio*' da 2.6 µmol/mL.dk olarak belirlenmiştir.

% 0.5 oranındaki SDS, Triton X-100 ve Sodyum taurokolik asit'in, saflaştırılan karaciğer lipazlarına etkileri, bu ajanlarla belirli sürelerde inkübe etmek suretiyle değerlendirilmiştir. SDS enzimde hızlı bir inaktivasyona neden olmuştur. Triton X-100 ve sodyum taurodeoksikolat benzer bir etki göstermiş ve genel olarak 2. saatin sonunda enzim aktivitesinde önemli bir düşüşün olduğu tespit edilmiştir. SDS-PAGE tekniği ile yapılan saflık kontrolü sonucunda her üç türün karaciğer lipaz enzimlerinin tek bant ve 74.05 kDa olduğu bulunmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** Tödürge Gölü, *Chalcalburnus chalcoides*, *Leuciscus cephalus*, *Cyprinus carpio*, karaciğer, kas dokusu, yağ asiti bileşimi, lipaz (E.C. 3.1.1.3), saflaştırma, karakterizasyon.

**SUMMARY**  
**PhD THESIS**  
**DETERMINATION OF SEASONAL CHANGES OF FATTY ACID**  
**COMPOSITION OF LIVER AND MUSCLE TISSUE OF SOME CYPRINIDAE**  
**SPECIES LIVING IN THE LAKE TÖDÜRGE (SIVAS) AND PURIFICATION**  
**AND COMPARISON OF BIOCHEMICAL PROPERTIES OF LIVER LIPASE**  
**ENZYME**

**Salih GÖRGÜN**  
**Cumhuriyet University**  
**Graduate School of Natural and Applied Sciences**  
**Department of Biology**

**Supervisor**  
**Prof. Dr. Mehmet Ali AKPINAR**

In this study, it has been aimed to determine seasonal changes in the liver and muscle fatty acid compositions and purification of liver lipases (E.C. 3.1.1.3) together with the determination of some kinetic properties of the lipases from liver of *Chalcalburnus chalcoides*, *Leuciscus cephalus* and *Cyprinus carpio*.

Although liver and muscle fatty acid composition of the species investigated did not show any qualitative differences, it was observed that there were quantitative differences depending on seasons. Fatty acids were analyzed in Gas Chromatography (GC).

It was found that the most abundant fatty acids in liver and muscle fatty acids in all seasons were palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), palmitoleic acid (C16:1 n-7), oleic acid (C18:1 n-9), C18:1 n-7, linoleic acid ((C18:2 n-6), aracidonic acid (C20:4 n-6), eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3), docosapentaenoic acid (C22:5 n-3) and docosahexaenoic acid (C22:6 n-3).

Total saturated (SFA) and unsaturated (PUFA) fatty acid amounts of liver and muscle tissue were found to be effected significantly, depending on the water temperature and reproduction periods of species. It was determined that SFA amounts

expressed in high ratios in summer season decreased together with the winter periods. However, there were significant recessions in the amounts of total PUFA during the reproduction periods of the species investigated. During this periods, it was determined that the fatty acids showing the highest recession were the C20:4 n-6 and C22:6 n-3. Together with the winter season, it was detected to be significant increases in the ratios of total PUFA. It was observed that the n-3 form of PUFA having important physiological effects on human health had the considerably high amounts in the liver and muscle tissues of the species investigated.

In this study, liver lipase enzymes of *C. chalcoides*, *L. cephalus* and *C. carpio* were purified and characterized some kinetic properties of the purified enzymes. The purification procedure consisted of the preparation of homogenate, precipitation with PEG-6000 and chromatographic operations involving in the Q sepharose, Sephacryl S 200 HR and Phenyl sepharose CL-4B.

Q sepharose, which is an anion exchange chromatography, provided significant purification parameters in all species (32.96 U/mg.protein specific activity and 30.49 fold purity in *C. chalcoides*, 30.99  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein specific activity and 33.05 fold purity in *L. cephalus*, 29.72  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein specific activity and 24.83 fold purity in *C. carpio*). Sephacryl S 200 HR did not provided any purification in *L. cephalus*. The purification parameters obtained with the phenyl sepharose CL-4B chromatography used in the final purification step were found to be 52.84  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein specific activity and 48.88 fold purity in *C. chalcoides*, 51.41  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein specific activity and 54.84 fold purity in *L. cephalus*, 90.38  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein specific activity and 75.50 fold purity in *C. carpio*. According to these results, the highest purification parameters have been determined in *C. carpio*.

When compared the kinetic parameters, the temperature and pH optimums of liver lipases of the species investigated were found as 37 °C and 8.00, respectively.  $K_m$  values were determined as 0.77 mM pNPB for *C. chalcoides*, 0.58 mM pNPB for *L. cephalus* and 0.17 mM pNPB for *C. carpio*.  $V_{\text{max}}$  values were the same in *C. chalcoides* and *L. cephalus* as 2.8  $\mu\text{mol/mL.dk}$ , while 2.6  $\mu\text{mol/mL.dk}$  in *C. carpio*.

The effects of SDS, Triton X-100 and Sodium taurocholic acid in the ratio of % 0.5 were assessed on the liver lipases purified, incubating them these agents in given times. SDS caused a fast inactivation on the enzymes. Triton X-100 and sodium

taurocholic acid exhibited similar effects and in general, it was detected that there was a marked decrease in the enzyme activity. In the result of the purity control by revealed SDS-PAGE technique, the liver lipase enzymes in every three species were found to be a single band and 74.05 kDa.

**Key words:** The Lake Tödürge, *Chalcalburnus chalcoides*, *Leuciscus cephalus*, *Cyprinus carpio*, liver, muscle tissue, fatty acid composition, lipase (E.C. 3.1.1.3), purification, characterization.

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması sayın Prof. Dr. Mehmet Ali AKPINAR hocamın danışmanlığında yerine getirilmiştir. Bana bu imkanları sağladığı ve danışmanlığı altında çalışma fırsatını verdiği için çok teşekkür ederim. Akademik çalışmalarım esnasında yapıcı eleştirileri, rehberliği ve karşılaştığım zorluklarda bana vermiş olduğu cesareten dolayı sonsuz derecede minnetar olduğumu belirtmek isterim.

Çalışmalarım esnasında yağ asiti analizlerim için bana destek veren ve Tez İzleme Komitemde yer alan, Selçuk Üniversitesi (Konya) Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK hocama teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, yağ asit analizlerinde yardımlarını gördüğüm Selçuk Üniversitesi doktora öğrencisi Yavuz Selim ÇAKMAK ve Öğretim Görevlisi Dr. G. Özmen GÜLER'e de teşekkür ederim. Tez izleme komitemde yer alan sayın hocam Prof. Dr. Naci DEĞERLİ'ye değerli eleştiri ve katkılarından dolayı teşekkür ederim. Örnek toplamamda yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Bülent ÜNVER'e teşekkür ederim. Tez yazımı esnasında yardımlarını esirgemeyen üniversitemiz Antropoloji Bölümü'nden sayın Uzm. Faruk AY'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım doğrultusunda, burslu olarak yurtdışında çalışma imkanı sağlaması ve bilimsel bilgi ve görgüme katkılarından dolayı Türkiye Cumhuriyeti Yükseköğretim Kurumu'na (YÖK) çok teşekkür ederim. Ayrıca, yurtdışında bulunduğum süre içerisinde laboratuvarlarının kapılarını bana açan Dr. Lars Haastруп PEDERSEN ve araştırma grubuna, bana sağladıkları katkı ve arkadaşça ortamlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu (CÜBAP) tarafından F-243 No'lu proje olarak desteklenmiştir. Üniversitemiz araştırma fonu ve çalışanlarına desteklerinden ve yardımlarından ötürü teşekkürlerimi sunarım. Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü akademik ve idari personeline sağladıkları olanak ve yardımları nedeniyle teşekkür ederim.

Bana ülke ve insan sevgisini aşıl原因an, ilk öğretmenlerim ve sonsuza kadar da öyle kalacak olan sevgili anne ve babama hayatım boyunca bana sağladıkları maddi ve manevi desteklerinden dolayı sonsuz şükranlarımı sunar, her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa no</u>
<b>Tablo 1.</b> Yağ asiti analizi için kullanılan balıkların mevsimlere göre boy (cm) ve ağırlıkları (g)	45
<b>Tablo 2.</b> 2005-2006 yıllarında Tödürge gölünde mayıs, temmuz, eylül ve kasım aylarında ölçülen ortalama su sıcaklık değerleri	45
<b>Tablo 3.</b> <i>Chalcalburnus chalcoides</i> 'in karaciğer yağ asitlerinin mevsimsel değişimi	48
<b>Tablo 4.</b> <i>Leuciscus cephalus</i> 'un (Kefal) karaciğer yağ asitlerinin mevsimsel değişimi	51
<b>Tablo 5.</b> <i>Cyprinus carpio</i> 'nun (Sazan) karaciğer yağ asitlerinin mevsimsel değişimi	54
<b>Tablo 6.</b> <i>Chalcalburnus chalcoides</i> 'in kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi	57
<b>Tablo 7.</b> <i>Leuciscus cephalus</i> 'un kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi	60
<b>Tablo 8.</b> <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan) kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimleri	63
<b>Tablo 9.</b> <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> karaciğer toplam yağ asiti miktarlarının mevsimsel olarak karşılaştırılması	65
<b>Tablo 10.</b> <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> kas dokusu toplam yağ asiti miktarlarının mevsimsel olarak karşılaştırılması	65
<b>Tablo 11.</b> <i>C. chalcoides</i> karaciğer lipazı saflaştırma basamakları	74
<b>Tablo 12.</b> <i>L. cephalus</i> karaciğer lipazının saflaştırma basamakları	81
<b>Tablo 13.</b> <i>C. carpio</i> karaciğer lipazının saflaştırma basamakları	88
<b>Tablo 14.</b> <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> 'nun karaciğer lipazının spesifik aktivitelerinin ve saflaştırma katsayılarının karşılaştırılması	90
<b>Tablo 15.</b> Sıcaklığın karaciğer lipazlarının aktivitesi üzerine etkileri	92
<b>Tablo 16.</b> pH'nın karaciğer lipaz aktivitesi üzerine etkisi	94
<b>Tablo 17.</b> <i>C. chalcoides</i> karaciğer lipaz aktivitesi üzerine substrat (pNPB) miktarının etkisi	95
<b>Tablo 18.</b> <i>L. cephalus</i> karaciğer lipazı aktivitesi üzerine substrat (pNPB) miktarının etkisi	98
<b>Tablo 19.</b> <i>C. carpio</i> lipazı üzerine substrat miktarının etkisi	101
<b>Tablo 20.</b> Sodyum taurokolik asitin karaciğer lipaz aktivitesi üzerine etkisi	106
<b>Tablo 21.</b> Triton X-100'ün karaciğer lipaz aktivitesi üzerine etkisi	108
<b>Tablo 22.</b> Elektroforez analiz sonuçları	109

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1. PEG-6000 protein çöktürmesi üst sıvı ve çökelti lipaz aktiviteleri	66
Şekil 2. Q sefaroz iyon değişim kolonuna proteinlerin bağlanmasının test edilmesi	67
Şekil 3. <i>C. chalcoides</i> karaciğer lipazının Q sefaroz iyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	69
Şekil 4. <i>C. chalcoides</i> karaciğer lipazı Sefakril S 200 HR jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	71
Şekil 5. <i>C. chalcoides</i> karaciğer lipazı karaciğer lipazı fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	72
Şekil 6. <i>L. cephalus</i> karaciğer lipazının Q sefaroz iyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	76
Şekil 7. <i>L. cephalus</i> karaciğer lipazının Sefakril S 200 HR jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	78
Şekil 8. <i>L. cephalus</i> karaciğer lipazı karaciğer lipazı fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	79
Şekil 9. <i>C. carpio</i> karaciğer lipazının Q sefaroz iyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	83
Şekil 10. <i>C. carpio</i> karaciğer lipazının Sefakril S 200 HR jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	85
Şekil 11. <i>C. carpio</i> karaciğer lipazının karaciğer lipazı fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	86
Şekil 12. <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> karaciğer lipazlarının sıcaklığa bağlı aktivite eğrileri	92
Şekil 13. <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> karaciğer lipazının pH'a bağlı aktivite eğrileri	94
Şekil 14. <i>C. chalcoides</i> karaciğer lipazı Michaelis-Menten eğrisi	96
Şekil 15. <i>C. chalcoides</i> karaciğer lipazı Lineweaver-Burke eğrisi	97
Şekil 16. <i>L. cephalus</i> karaciğer lipazı Michaelis-Menten eğrisi	99
Şekil 17. <i>L. cephalus</i> karaciğer lipazı Lineweaver-Burke eğrisi	100
Şekil 18. <i>C. carpio</i> karaciğer lipazı Michaelis-Menten eğrisi	102
Şekil 19. <i>C. carpio</i> karaciğer lipazının Lineweaver-Burke eğrisi	103
Şekil 20. <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> karaciğer lipaz aktivitesi üzerine % 0.5 (w/v) SDS'in etkileri	104
Şekil 21. Sodyum taurokolik asitin <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> 'nun karaciğer lipazına etkisi	106
Şekil 22. Triton X-100'ün <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> karaciğer lipaz aktivitesi üzerine etkisi	108
Şekil 23. Karaciğer lipazlarının SDS-PAGE sonuçları	110
Şekil 24. <i>C. chalcoides</i> , <i>L. cephalus</i> ve <i>C. carpio</i> karaciğerinin Sefakril S	



200 HR	
kromatografisi sonucunda elde edilen lipaz enzim preparatına ait elektroforez bantları	111
<b>Şekil 25.</b> Elektroforetik analiz sonucunda moleküler belirteç için elde edilen Rf değerlerinin moleküler ağırlıklarıyla ilişkilendirilmesi	112
<b>Şekil 26.</b> <i>C. chalcoides</i> 'in mayıs ayı (ilkbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	180
<b>Şekil 27.</b> <i>L. cephalus</i> 'un mayıs ayı (ilkbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	181
<b>Şekil 28.</b> <i>C. carpio</i> 'nun mayıs ayı (ilkbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	182
<b>Şekil 29.</b> <i>C. chalcoides</i> 'in mayıs ayı (ilkbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı	183
<b>Şekil 30.</b> <i>L. cephalus</i> 'un mayıs ayı (ilkbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı	184
<b>Şekil 31.</b> <i>C. carpio</i> 'nun mayıs ayı (ilkbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı	185
<b>Şekil 32.</b> <i>L. cephalus</i> 'un temmuz ayı (yaz) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	186
<b>Şekil 33.</b> <i>C. chalcoides</i> 'in temmuz ayı (karaciğer) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	187
<b>Şekil 34.</b> <i>C. carpio</i> 'nun temmuz ayı (yaz) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	188
<b>Şekil 35.</b> <i>C. chalcoides</i> 'in temmuz ayı (yaz) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı	189
<b>Şekil 36.</b> <i>L. cephalus</i> 'un temmuz ayı (yaz) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı	190
<b>Şekil 37.</b> <i>C. carpio</i> 'nun temmuz ayı (yaz) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı	191
<b>Şekil 38.</b> <i>C. chalcoides</i> 'in eylül ayı (sonbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	192
<b>Şekil 39.</b> <i>L. cephalus</i> 'un eylül ayı (sonbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	193
<b>Şekil 40.</b> <i>C. carpio</i> 'nun eylül ayı (sonbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	194
<b>Şekil 41.</b> <i>C. chalcoides</i> 'in eylül ayı (sonbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı	195
<b>Şekil 42.</b> <i>L. cephalus</i> 'un eylül ayı (sonbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı	196
<b>Şekil 43.</b> <i>C. carpio</i> 'nun eylül ayı (sonbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı	197
<b>Şekil 44.</b> <i>C. chalcoides</i> 'in kasım ayı (kış) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	198
<b>Şekil 45.</b> <i>L. cephalus</i> 'un kasım ayı (kış) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	199
<b>Şekil 46.</b> <i>C. carpio</i> 'nun kasım ayı (kış) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı	200
<b>Şekil 47.</b> <i>C. chalcoides</i> 'in kasım ayı (kış) kas dokusu yağ asiti metil esterleri	201

kromatogramı

**Şekil 48.** *L. cephalus*'un kasım ayı (kış) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı 202

**Şekil 49.** *C. carpio*'nun kasım ayı (kış) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı 203

## KISALTMALAR

<b>C10:0</b>	Dekanoik asit (kaprik asit)
<b>C12:0</b>	Dodekanoik asit (laurik asit)
<b>C14:0</b>	Tetradekanoik asit (miristik asit)
<b>C14:1</b>	Tetradekenoik asit ((miristoleik asit)
<b>C15:0</b>	Pentadekanoik asit
<b>C15:1</b>	Pentadekenoik asit
<b>C16:0</b>	Heksadekanoik asit (palmitik asit)
<b>C16:1</b>	Heksadekenoik asit (palmitoleik asit)
<b>C16:2</b>	Heksadekadienoik asit
<b>C17:0</b>	Heptadekanoik asit
<b>C17:1</b>	Heptadekenoik asit
<b>C18:0</b>	Oktadekanoik asit (stearik asit)
<b>C18:1</b>	Oktadekenoik asit (oleik asit)
<b>C18:2</b>	Oktadekadienoik asit (linoleik asit)
<b>C18:3</b>	Oktadekatrienoik asit (linolenik asit)
<b>C20:0</b>	Eikosanoik asit (arakidik asit)
<b>C20:1</b>	Erikosenoik asit
<b>C20:2</b>	Eikosadienoik asit
<b>C20:3</b>	Eikosatrienoik asit
<b>C20:4</b>	Eikosatetraenoik asit (arakidonik asit)
<b>C20:5</b>	Eikosapentaenoik asit
<b>C21:0</b>	Heneikosanoik asit
<b>C22:0</b>	Dokosanoik asit (behenik asit)
<b>C22:1</b>	Dokosenoik asit
<b>C22:2</b>	Dokosadienoik asit
<b>C22:4</b>	Dokosatetraenoik asit
<b>C22:5</b>	Dokosapentaenoik asit
<b>C22:6</b>	Dokosaheksaenoik asit

<b>APS</b>	Amonyum Per Sülfat
<b>ARA</b>	Araşidonik asit
<b>BSA</b>	Sığır Serum Albumin
<b>DHA</b>	Dokosahekzaenoik asit
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Etilendiamin tetra asetik asit
<b>EL</b>	Endotelyal Lipaz
<b>EYA</b>	Esansiyel Yağ Asitleri
<b>EPA</b>	Eikozapentaenoik asit
<b>HDL</b>	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
<b>HSL</b>	Hormon Duyarlı Lipaz
<b>HL</b>	Hepatik Lipaz
<b>KEL</b>	Karboksil Ester Lipaz
<b>LDL</b>	Düşük Dansiteli Lipoprotein
<b>LPL</b>	Lipoprotein Lipaz
<b>PEG-6000</b>	Polietilenglikol-6000
<b>PL</b>	Pankreatik (Trigliserit) Lipaz
<b>PLRP1</b>	Pankreatik Lipaz İlişkili Protein 1
<b>PLRP2</b>	Pankreatik Lipaz İlişkili Protein 2
<b>pNPB</b>	4-Nitrofenil Butirat
<b>PUFA</b>	Aşırı Doymamış Yağ Asiti (Polyunsaturated Fatty Acids)
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SDS-PAGE</b>	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>SFA</b>	Doymuş Yağ Asiti (Saturated Fatty Acid)

## 1. GİRİŞ

Lipitler, polar olmayan çözümlerde yüksek çözünürlükleri olmakla birlikte geniş ve heterojen bir grubu yansıtır. Ökaryotlarda lipitlerin büyük çoğunluğu asetil-CoA'dan türetilir ve düz zincirli yağ asitleri, dallı, halkasal ve diğer özelleşmiş yağ asitleri, karotenoidler, steroller ve türevlerinden oluşurlar. Lipitler tüm organizmalarda birçok önemli fonksiyona sahip olmakla birlikte, hücre membranlarının yapısal bileşenlerini oluşturmaları ve enerji kaynağı olmaları nedeni ile depo edilmelerinin gerekli olduğu söylenebilir (Leaver ve ark., 2008).

Balıklar açısından düşünüldüğünde, proteinler ve lipitler önemli makro besleyicilerdir. Balıklar mutlak bir protein gereksinimine sahip olmamakla birlikte, proteinleri meydana getiren amino asitlere gereksinim duymaktadırlar (Oliva-Teles, 2000).

Memeli ve kuşlar gibi karasal omurgalılara kıyasla, balıkların etkin karbonhidrat kullanım sistemleri geliştirmedikleri görünmektedir. Bu nedenle, karbonhidratlar çoğu balık türü için besleyiciler olarak kantitatif açıdan düşük öneme sahiptir. Bu fikir, balıkların yapısal ve depo karbonhidrat gereksinimlerini temel olarak, amino asitleri katabolize etmek suretiyle karşılayabileceklerini önermektedir (Leaver ve ark., 2008).

Balık türleri, karbonhidratları sindirme yetenekleri açısından oldukça büyük farklılıklar göstermektedirler. Bu farklılık sindirim kanalı ve birliktelikli organların anatomik ve fonksiyonel farklılıklarını yansıtmaktadır. Karbonhidrat içeren besin türlerinin geniş bir çeşidini hidroliz etme yeteneğinde olan sindirim fonksiyonları, herbivor ve omnivor balık türlerinde, karnivor türlere göre gelişmiştir. Günümüze kadar araştırılan tüm balık türlerinin basit ve kompleks karbonhidratların hidroliz ve emiliminde gerekli olan enzimatik etkiye sahip oldukları bilinmektedir (Krogdahl ve ark., 2005).

Bununla birlikte, birçok karnivor balık türü herbivor veya omnivor türlerden çok daha yüksek protein seviyelerine gereksinim duyarken, karnivor balık türlerindeki amilolitik enzim aktivitesinin omnivor türlerden düşük olduğu bildirilmiştir. Bu yüzden lipitler karnivor türlerin beslenmesinde karbonhidratlardan daha önemli enerji kaynağıdır ve protein tutumluluk etkisine sahiptirler (Hidalgo ve ark., 1999; Lee, 2001).

Balıklarda, memeliler ile kıyaslandığında lipit ve proteinlerin neden ana enerji kaynağı olarak kullanıldığına dair önemli ve olası bir açıklama daha önce yapılan çalışmaların ışığında, Dörücü (2000) tarafından tartışılmıştır. Buna göre ilk neden, balık besini genel olarak yüksek proteinden oluşmaktadır ve balık metabolizması böyle bir besine iyi adapte olmuştur. İkincisi, memelilerin aksine balıklar azotlu atıkları hızlı ve sürekli bir şekilde ortamdaki yok etme yeteneğine sahiptirler. Diğer bir neden ise, protein yıkımında gereksinilen lizozomal enzimlerin spesifik aktiviteleri balıklarda çok daha yüksektir.

Lipit ve amino asitlerin balıklardaki enerji üretimine görece katkıları göz önüne alınacak olursa, bu kavram tür, besinsel durum ve çevre sıcaklığı gibi birçok faktöre bağlıdır. Örneğin Salmonid'lerde rutin aktivite esnasında enerji üretiminin % 40'ı amino asit katabolizması yoluyla olduğu düşünülmektedir (Dörücü, 2000).

Besinsel lipitler enerji sağlamalarının yanı sıra esansiyel yağ asitlerinin (EYA) sağlanması açısından balık beslenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Bununla birlikte, yağda çözülebilir vitaminlerin taşıyıcıları olup, hücre membranlarının önemli yapısal bileşenleri olan polar lipitler ve steroller gibi diğer bileşenleri de sağlamaktadırlar. EYA, onarım ve birçok fizyolojik sürecin uygun fonksiyon yapması için gerekli olan ve hayvanlar tarafından ya sentezlenemeyen ya da yeteri oranlarda sentezlenemeyen yağ asitleridir (Lee, 2001). Buna göre, besinsel lipit ve yağ asitlerinin balıklarda üç primer akıbeti bulunmaktadır. Bunlar, hücre membranlarının yapısına girmeleri, enerji sağlamak için oksitlenmeleri ve enerji deposu olarak adipoz veya diğer dokularda depo edilmeleridir (Tocher, 2003).

Yağ asitleri doymuş, tekli doymamış ve aşırı doymamış olabilen hidrokarbon zincirleridir. Doymamış yağ asitleri komşu karbon çiftleri arasında çift bağ içerir. Aşırı doymamış yağ asitleri birden fazla çift bağ içerirken, tekli doymamış yağ asitleri sadece bir çift bağ içerir. Hayvan hücrelerinde linoleik ve  $\alpha$ -linolenik asit olmak üzere *de novo* olarak sentezlenemeyen iki yağ asiti bulunmaktadır ve beslenmeyle alınmaları zorunludur (Yaqoob, 2004).

Tüm omurgalı türleri, belirli spesifik aşırı doymamış yağ asitleri (ADmYA) için mutlak bir besinsel gereksinime ihtiyaç duyarlar. ADmYA'lar esansiyel yağ asitleri içerisinde bulunurlar ve linoleik asit (C18:2 n-6) ve linolenik asit (C18:3 n-3) tarafından spesifik olarak edinilen hem n-6 hem de n-3 serilerinin üyelerini içermektedirler (Das, 2006).

EYA'ların biyolojik olarak aktif formu, genel olarak C18:2 n-6 ve C18:3 n-3' ün C<sub>20</sub> ve C<sub>22</sub> metabolitleridir. Bu yağ asitleri, C20:4 n-6 (Araşidonik asit, ARA), C20:5 n-3 (Eikosapentaenoik asit, EPA) ve C22:6 n-3 (Dokosaheksaenoik asit, DHA)'dır (Tocher, 2010).

Balık türlerinin esansiyel yağ asiti gereksinimleri türler arasında farklılık göstermektedir. Buna göre, gökkuşuğu alabalığı C18:2 n-6'dan ziyade C18:3 n-3'e gereksinim duyar. Sazan (*Cyprinus carpio*) ve Japon yılan balığı (Japanese eel) C18:3 n-3 ve C18:2 n-6' nın bir karışımına, *Tilapia* ise sadece C18:2 n-6'ya gereksinim duymaktadır. Denizel kökenli balıkların EYA'larının ise EPA ve DHA gibi oldukça aşırı doymamış yağ asitlerinin olduğu bildirilmektedir (Lee, 2001).

Sınırlı sayıda türler üzerinde yapılan araştırmalar, genel olarak tatlı su balıklarının EYA gereksinimlerinin balık ağırlığının % 1-2 oranında bir konsantrasyonda C18:3 n-3 ve C18:2 n-6 asitlerinin besine ilavesiyle karşılanabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, denizel kökenli balıklarda ise EPA ve DHA gibi iki uzun zincirli yağ asitinin besine % 0.5-1.7 lik konsantrasyonlarda eklenmesiyle EYA gereksiniminin karşılanabildiği bildirilmiştir (Sargent ve ark., 1995; Bell 1998; Bell ve ark., 1999).

EYA açısından eksik besinlerle beslenen balıklarda myocarditis, soluk/şişmiş (yağlı) karaciğer, yüzgeç erozyonu, solungaçlarda kanama, düşük gelişim, yüksek karaciğer lipit içeriği, karaciğerin polar lipitlerinden C18:1'de artış gibi çeşitli anatomik ve lipit biyokimyasal parametrelerinde anormallikler görülmüştür. Bu semptomlara ilaveten, serumda daha düşük toplam protein ve glukoz seviyeleri, daha yüksek toplam kolesterol, glutamik-piruvik asit transaminaz ve glutamik oksaloasetik asit transaminaz seviyeleri gibi anomaliler kan parametrelerindeki değişimler olarak karşımıza çıkmaktadır (Lee ve ark., 1993; Tocher, 2010).

n-6 formu doymamış yağ asitlerinin farklı biyolojik fonksiyonlarının hangisinin patolojik durumlarda baskın olduğu hala tartışma konusudur. Çoğu durumda n-3 ve n-6 formu yağ asitleri gelişimin alıkonması gibi patolojik durumları düzeltmede birbirinin fonksiyonunu telafi edebilir. Diğer durumlarda, n-3 formu yağ asitlerinin biyolojik aktivitesi daha özgündür. Örneğin DHA gerçekte optimal nöronal ve sinirsel fonksiyon için sinir sisteminde gereksinilir ve sinir canlılığı ile farklılaşması için hayati olan sinyalleşmeyi etkiler (Kim, 2007, Russo, 2009).

Gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) ile yapılan deneylerde, esansiyel yağ asitlerinin aşırı miktarlarının da hastalık etmeni olabileceği belirlenmiştir. Buna göre, gökkuşağı alabalığında besine, gereksinilenden dört kat daha yüksek miktarda C18:3 n-3 veya C20:5 n-3 ve C 22:3 n-3' ün (1 / 1) karışımının eklenmesi zayıf gelişim ve düşük besin dönüşümüne yol açmıştır (Watanabe, 1982).

Günümüz besinsel tavsiyeler kalp damar hastalıkları ve kanser gibi dejeneratif patolojileri önlemek için önerilmektedir. Gerçekte aterosklerozün önlenmesi veya gelişimi spesifik bir besinsel diyetle etkilenebilir ve benzer olarak yiyecek ve beslenme gibi faktörler, belirli kanser tiplerinin sıklığını düşürebilir. Bu bağlamda, kalitatif ve kantitatif açıdan besinsel lipitlerin yeterli alınımı güçlü bir ilgi uyandırmaktadır. En yetkili besinsel organizasyonlar tarafından formüle edilen günümüz rehberleri, doymuş yağ asitleri açısından % 7-10 luk kaloriden fazla olmamasını, kolesterolün günlük 300 mg dan az olması ve trans yağ asiti tüketiminin ise en az düzeyde tutulması gerektiğini dünya popülasyonuna tavsiye etmektedir (Russo, 2009).

Geçmiş 20 yılda aşırı doymamış yağ asitleri ve özellikle de n-3 formu yağ asitleri üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Günümüzde n-3 formu yağ asitlerinin, normal büyüme ve gelişim için esansiyel olduğu gibi koroner arter hastalığı, hipertansiyon, diyabet, artrit, diğer yangısal ve oto-immün hastalıklar ve kanserin önlenmesi ve tedavisinde önemli bir rol oynayabileceği bilinmektedir. Araştırmalar hayvan modelleri, doku kültürü ve insanlarda yapılmaktadır. Çeşitli yağ asitlerinin hastalık ve sağlıkta fizyolojik ve moleküler mekanizmalarına ait bilgilerde büyük gelişmeler meydana gelmiştir. Paleolitik ve modern günümüz avcı-toplayıcı toplumlarındaki çalışmaların tahminleri temelinde görünen o ki, insanoğlu günümüz diyetinde doymuş yağ asitlerince çok daha düşük olan bir diyeti tüketmeyi geliştirdi. Günümüzden önceki diyetler trans yağ asitlerini çok daha düşük ve n-6/n-3 oranının kabaca eşit miktarlarını içermekteydi. Batı diyeti, doymuş yağ asitleri ile n-6 yağ asitlerinin yer değiştirmesi için önerilen tavsiye nedeniyle n-6 yağ asitleri açısından çok zengindir. n-3 formu yağ asitlerinin alınımındaki azalmanın başlıca nedeninin balık tüketimindeki düşüş olduğu vurgulanmış, ayrıca n-6 formu yağ asitlerini fazla oranda içeren tohumlardan endüstriyel yolla sağlanan besinlerinin tüketiminin yüksek oranda olmasıdır. Kültüre edilmiş bitkiler dahi yabani bitkilerden daha az n-3 yağ asitlerini



içermektedir. Sonuçta, günümüzde modern tarım birçok yiyecekteki n-3 yağ asit içeriğini düşürmüştür (Simopoulos, 1999).

Balık ve balık yağları EPA ve DHA olarak bilinen omega-3 (n-3) yağ asitlerini içermektedir. Epidemiyolojik çalışmalar EPA/DHA içeren balığın besinsel tüketimi ve koroner kalp hastalığından ölüm arasında ters orantı olduğunu göstermektedir (Holub ve Holub, 2004).

Lee ve ark. (2009), ARA, EPA ve DHA' nın sayısız fizyolojik ve biyokimyasal süreçlere aracılık eden eikozanoid ve prostanooidlerin önemli öncüleri olmaları nedeniyle kritik metabolitler olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, bu üç yağ asitinin balıklarda normal büyüme, gelişim ve üreme için gereksinildiği iyi bir şekilde ortaya konmuştur (Rodriguez ve ark., 2004).

Eikozanoidler, vücutta neredeyse her doku tarafından küçük veya hatta iz miktarlarda üretilirler. Bu kimyasallar, biyolojik açıdan oldukça yüksekte aktiviteye sahip olmakla birlikte, prostaglandinler, tromboksanlar, lökotrienler, lipoksinler, hidroperoksieikosatetraenoik asitler ve hidroksieikosatetraenoik asitleri içeren 20 karbonlu bileşiklerdir. Genel anlamda gerek hücresel gerekse tüm vücut seviyesinde stresli durumlara cevapta üretildikleri bilinmektedir. Monosit ve makrofajlar, membranlarında dihomo- $\gamma$ -linolenik asit ve EPA'dan ziyade, daha fazla ARA içermelerinden dolayı önemli eikozanoid kaynaklarıdır (Sargent ve ark., 1999; Yaqoob, 2004).

Memelilerde olduğu gibi balıklarda da eikozanoidlerin birincil öncüsü ARA'dır. Bununla birlikte, ARA'dan üretilenlerden biyolojik açıdan daha az aktif olan EPA'dan üretilen eikozanoidler de bulunmaktadır. Bu bulgu, eikozanoid üretiminde ARA ve EPA arasında yarışmalı bir durumun olduğunu göstermiştir. Bu yarışın bir sonucu olarak, EPA üzerinden oluşturulan eikozanoidler, yarışmalı bir şekilde ARA üzerinden de oluşturulmaktadır. Bu nedenle, vücuttaki eikozanoid faaliyetleri ARA / EPA'nın oranıyla belirlenir ve böylelikle dokularda ARA / EPA oranlarının yüksek oluşu, artırılmış eikozanoid faaliyetlerine neden olur. Bunun sonucunda ise kan pıhtılaşması ve yangısal cevabı da kapsayan, kalp-damar fonksiyonları gelişir. Oysa, EPA / ARA'nın yüksek oranlarının, eikozanoid faaliyetlerini azalttığı ve sağlık açısından daha faydalı olduğu bilinmektedir (Sargent ve ark., 1999).

Batılı diyetlerde, n-6 formu yağ asitlerinin miktarlarının artırılması durumunda C20:4 n-6 (ARA) üzerinden eikozanoid metabolik ürünlerinin sentezinin arttığı saptanmıştır. Bununla birlikte, n-3 formu yağ asitlerinden özellikle C22:5 n-3 (Dokosapentaenoik asit; DPA) üzerinden, sentezlenen eikozanoid miktarlarının, n-6 formu yağ asitleri tarafından oluşturulanlardan daha az olduğu bildirilmiştir (Simopoulos, 1999).

Harris ve ark. (2007)'e göre, balık tüketmeyen populasyonlarda ARA, aşırı doymamış yağ asitleri içerisindeki baskın yağ asitidir (toplamın % 80'i). Bu nedenle bu bireylerde üretilen eikozanoidlerin birincil olarak ARA üzerinden sentezlendiği, yüksek miktarda balık tüketen toplumlarda ise, n-3 formu aşırı doymamış yağ asiti içeriği artarken n-6 formu aşırı doymamış yağ asitlerinin % 60-65 oranına kadar düştüğü bildirilmiştir.

Yaqoob (2004)'e göre, laboratuvar hayvanlarında immun fonksiyon üzerine besinsel yağların etkilerini araştıran çalışmalar, yüksek yağ içeren besinlerin düşük yağ içerenlerle karşılaştırıldığında yağın seviye ve tipine bağlı olarak lenfosit fonksiyonlarını baskıladığını göstermiştir. Doymuş yağ asitleri ve n-6 formu aşırı doymamış yağ asitleri lenfosit proliferasyonu, sitokin üretimi veya doğal öldürücü (NK) hücre aktivitesi üzerine az etkiye sahiptir. Buna karşın, oleik asit ve n-3 formu aşırı doymamış yağ asitlerinin, hem lenfosit aktivasyonunu hem de NK hücre aktivitesini önlediği kanıtlanmıştır. Ek olarak, balık yağının lenfositler ve makrofajlar tarafından yangısal sitokinlerin üretimini önlediği ve lenfositler tarafından adezyon moleküllerinin ifadesini düşürdüğü kanıtlanmıştır.

Linoleik ve linolenik asit ve uzun zincirli türevleri bitki ve hayvan hücre membranlarının önemli bileşenidirler. İnsanlar balık yada balık yağını sindirdiklerinde, sindirilmiş olan EPA ve DHA özellikle plateletler, eritrositler, nötrofiller, monositler ve karaciğer hücrelerindeki n-6 yağ asitleri ile kısmi olarak yer değiştirir. Sonuçta ise balık ya da balık yağındaki EPA ve DHA şunlara yol açmaktadır:

- 1) düşük miktarda prostaglandin E2 metabolitlerinin üretimi
- 2) düşük miktarda tromboksan A2 üretimi
- 3) düşük miktarda lökotrien B4 üretimi
- 4) artan tromboksan A3 üretimi
- 5) artmış prostasiklin PGI3 miktarı

6) artmış lökotrien B5 konsantrasyonları (Simopoulos, 1999).

Kardiyovasküler hastalıklar, batı dünyasındaki ölümlerin büyük kısmını oluşturur. Genelde besinsel çalışmalar, üç temel yağ asit sınıfı olan doymuş yağ asiti, aşırı doymamış yağ asiti ve tek çift bağ içeren doymamış yağ asiti açısından yağın alınımını ve etkisini incelemeye yönelmiştir. Şimdi aynı sınıf içerisindeki bireysel yağ asitlerinin, kardiyovasküler hastalık riski üzerine çok farklı etkilere sahip oldukları kabul görmektedir. Doymuş yağ asiti ile ilgili olarak, laurik (C12:0), miristik (C14:0) ve palmitik (C16:0) asitin, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)-kolesterol seviyelerini artırdığı yönünde bilimsel fikir birliği vardır. Stearik asit (C18:0) nötral veya hafif bir şekilde LDL-kolesterol üzerine düşürücü etkiye sahiptir. Ek olarak, elaidik asitin trans izomeri (C18:1 t9) LDL-kolesterol seviyesini yükseltip, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)-kolesterol seviyelerini düşürürken, oleik asit (C18:1) gibi tek çift bağ içeren doymamış yağ asiti, LDL-kolesterolü düşürür ve HDL-kolesterol üzerine nötral bir etkiye sahiptir (Cantwell, 2000).

Kardiyovasküler hastalıklar ve bununla bağdaştırılmış bozuklukların önlenmesinde balık yağlarında bulunan  $\omega$ :3 (*omega-3*) veya n-3 formu yağ asitlerinin rolü hakkında gerek bilimsel, gerek klinik ve gerekse halk açısından belirgin bir ilgi oluşmuştur (Holub ve Holub, 2004). C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 gibi deniz kökenli aşırı doymamış yağ asitlerinin triaçilgliserol düşürücü etkisi de genel olarak kabul edilmektedir (Cantwell, 2000).

Balık yağlarının önemli bir etkisi dünya nüfusunda yüksek bir prevalansa sahip olan ve gerek genetik gerekse çevresel faktörlerce (beslenme, hayat tarzı) gelişimi desteklenen plurimetabolik sendrom üzerinde çalışılmıştır (Lombardo ve ark., 2007). Buna göre, besinsel balık yağı dislipidemiye iyileştirici etki göstermekte ve sukrozca zengin besinle beslenmiş farelerde insülin faaliyeti ve adipositiyi geliştirdiği bulunmuştur. Aynı çalışmada, balık yağının gerek oksidatif gerekse oksidatif olmayan glukoz yollarını kas dokusunda normalleştirdiği, membran fosfolipitlerinin yağ asiti bileşimini değiştirildiği ve izole edilmiş  $\beta$  hücrelerinde lipit içeriği ve glukoz oksidasyonunun normale döndüğü belirlenmiştir.

Bir araştırmada, aşırı doymamış yağ asitlerinin tip ve miktarının, kültürdeki osteoblastik hücre fonksiyonlarına ve hayvan modellerinde kemik oluşumuna etki ettikleri belirtilmiştir. Kemik, vücut için bir destek çerçevesi sağlaması yanında

kalsiyumun fizyolojik dengesini korumayı da sağlar. Asidik fosfolipitlerin, gelişim plağında kıkırdak mineralizasyonunu kolaylaştırdığı ve prostaglandinlerin kemik oluşumu ve rezorpsiyon faaliyetlerini kolaylaştırmak için insulin-benzeri gelişim faktörlerini kapsayan anabolik faktörleri düzenlemeye yardım eden biyo-mekanik kuvvetlerden mesajlara arabulduğu gösterilmiştir. İlgili prostanoid türevlerinin faaliyetleri açısından C20:4 n-6'ya antagonistik olarak işlev yapan  $\gamma$ -linolenik asit ve C22:5 n-3'ün yaşlı bayan deneklerde kemik kalitesini geliştirdiği gösterilmiştir. Bu temel yağ asitlerinin etkileri altında yatan mekanizma, bağırsakta kalsiyum emilimini artırma, kemik kollajeninin sentezini yükseltme ve kalsiyumun üriner atılımını düşürerek kemik yıkımını indirgeme yeteneklerine bağlanmaktadır (Watkins ve ark., 2003).

Dünya sağlık örgütü (WHO), majör depresif bozukluğun 2020 yılına kadar ikinci başta gelen problem olarak karşımıza çıkacağını belirtmektedir. Yüksek miktarda balık tüketen toplumlarda majör depresif bozukluğun prevalansının daha düşük olduğu ve aşırı doymamış yağ asitlerinin çeşitli psikiyatrik rahatsızlıkların tedavisinde oldukça etkili oldukları bildirilmiştir (Su ve ark., 2003). Bu yağ asitlerinin kardiyak ve nöral uyarılabilirliği düşürerek faydalı etkiler oluşturdukları saptanmıştır. Bu etki için açık yollar, bu uyarılabilirliğin etmeni olan nörotransmitter reseptörleri ve iyon kanallarıdır. Linolenik asitin iskemi uyarımlı nöral ölümü ve kainate uyarımlı nöbetler ve nöral ölümü önlediği belirlenmiştir. Palmitik asitin bu aktivitelerden yoksun olduğu ve aşırı doymamış yağ asitlerinin bu etkiyi glutamaterjik transmisyonu önleyerek nöral ölümü blokladıklarını ve sinir-koruyucu etkilerinin en azından bir kısmının  $K^+$  iyon kanalını açma ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir (Lauritzen ve ark., 2000).

Denizel kökenli aşırı doymamış yağ asitlerini sinir koruyucu etkilerinin iki temel nedeni olduğu düşünülmektedir. Bunlardan birincisi, temel yağ asitleri sinaptik membranların temel bileşenleridir ve sinyal transdüksiyonu dahil nörolojik fonksiyonda vazgeçilmez bir rol oynadıklarına inanılmaktadır. Diğer neden ise, bilindiği gibi serebral hücre membranları, sentezlenemeyen ve diyetten kazanılması gereken belirli aşırı doymamış yağ asitlerinden oluşur. Bu yüzden, hücre membranlarındaki aşırı doymamış yağ asiti anormallikleri, membran mikro yapısını değiştirebilir ve o zaman anormal sinyal transdüksiyonuna ve bağışıklıksal düzenlenmeye yol açar (Su ve ark., 2003; Holub & Holub, 2004).

n-3 formu yağ asitlerinin kalp damar hastalıklarında faydalı etki göstermeleri trigliserid ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) seviyesini düşürmelerine atfedilmektedir. Yine bu yağ asiti formunun kalpte ritim bozukluğunu önleyici etkisinin ise miyosit sarkolemma iyon kanallarının aktivitesini etkileme yetenekleri nedeniyle olduğu bildirilmiştir. Tüm bu moleküler mekanizmalarla birlikte, n-3 formu aşırı doymamış yağ asitlerinin tedavide kullanılmalarının olağanüstü yanı, uzun süre uygulanmalarına karşın iyi tolere edilebilmeleri ve ciddi bir yan etkilerinin bulunmaması olarak karşımıza çıkmaktadır (Russo, 2009).

Son zamanlarda sıçanların demir metabolizması üzerine yapılan bir çalışma balık yağlarının dezavantajını tartışmıştır. Buna göre, balık yağı veya n-3 formu aşırı doymamış yağ asitleri açısından zengin besinlerin, plazma ve membranların  $\alpha$ -tokoferol içeriğini düşürdüğü ve oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir. Oysa zeytinyağı açısından zengin besinler, peroksidasyon hızını ve serbest radikallerin üretimini düşürmektedir. Aynı çalışmada, zeytinyağı açısından zengin bir diyetle beslenen sıçanlarla kıyaslandığında, balık yağı ile beslenen sıçanların, karaciğer ve dalaklarındaki hem içermeyen demir depolarında bir düşüş gözlenmiştir (Miret ve ark., 2003).

Günümüzde ucuz protein ve enerji kaynağı gereksinimi her geçen gün artarken balık etinin önemi de buna paralel olarak artmaktadır. Balık eti dünya gıda üretiminde % 1'lik bir katkı sağlarken, toplam protein üretiminin % 5'ini, toplam hayvansal protein kaynağının da % 14'ünü oluşturmaktadır. Dünyanın karşı karşıya kaldığı açlık problemi ve insan sağlığına olumlu katkıları göz önüne alındığında balık, insan gıdası olarak daha fazla kullanılacaktır. Ayrıca balık etinin besin değeri bakımından çiftlik hayvanlarıyla karşılaştırıldığında, yüksek protein ve mineral içeriğinin yanı sıra düşük yağ içeriğine sahip olması nedeniyle daha avantajlı olduğu bilinmektedir (Aras ve ark., 2000; Hoşsu ve ark., 2001; Karabulut & Yandı, 2006).

Balıkların kimyasal bileşimini bilmek onun besin değerini tanımada ve besin teknolojisi açısından çok önemlidir. Balığın kimyasal bileşimi türden türe değiştiği gibi balığa verilen yem içeriği de balığın kimyasal bileşimi üzerinde etkilidir. Aynı balık türlerinin kimyasal bileşimleri de farklılık gösterebilmektedir (Uysal ve ark., 2002).

Yapılan çalışmalardan, balık türleri arasında ve tür içerisinde yağ asiti bileşiminin beslenme durumu, yaş, eşey, mevsimsel durum ve örneklenen doku gibi

birçok faktöre bağılı olarak değişkenlik gösterdiği iyi bir şekilde ortaya konmuştur (Rueda ve ark., 2001; Aras ve ark. 2003 a; b; c; Görgün ve Akpınar, 2007).

İçeriği farklılık gösteren besinlere bağılı olarak lipit biyosentezini değerlendiren ilkin çalışmalarda kullanılan balık türleri, *Cyprinus carpio* (Farkas ve ark., 1978) ve *Salmo gairdnerii* (Henderson ve Sargent, 1981) olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüze ait çalışmaların ise büyük ihtimalle insan beslenmesindeki önemlilikleri nedeniyle bitkisel ve balık yağı içeren besinlerle beslenen salmonidae ailesine ait balık türlerinin yağ asiti bileşimleri üzerinde odaklandığı anlaşılmaktadır (Bell ve ark., 2002; Fonseca-Madrigal ve ark., 2005). Pettersson ve ark. (2009) balık yağı ve kolza tohumu yağının *Salvelinus alpinus*'un kas ve karaciğerinin lipit ve yağ asiti bileşimine etkisini incelemişlerdir. Balık yağı ile karşılaştırıldığında kolza tohum yağının artan miktarlarının karaciğer total lipitini artırdığı ve incelenen dokuların yağ asitlerinde ise C20:5 n-3 ve C22:6 n-3 te düşüş, C18:2 n-6 da ise artış olduğunu belirlemişlerdir.

Balık yağı, soya yağı ve ayçiçeği yağı kullanılarak *Acipenser gueldenstedtii* türünde yapılan çalışmalar bu türün n-3 ve n-6 yağ asitlerine gereksindiğini belirtmekle birlikte, gerek karaciğer gerekse kas dokusunun besinde bulunan yağ asitleri ile etkilendiğini bildirmiştir (şener ve ark., 2003).

Bell ve ark. (1999) başlangıçta 1.2 gram ağırlığa sahip olan *Scophthalmus maximus*'u keten tohumu yağı (n-3 PUFA dan yoksun), zeytin yağı (n-3 PUFA dan yoksun) ve balık yağı olmak üzere üç farklı besinle 12 hafta süresince beslemişlerdir. Buna göre, balık yağı ile beslenen grupla karşılaştırıldığında keten tohumu ve zeytin yağının spesifik gelişim hızında düşüşe ve ölüm oranında ise bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Balık yağıyla beslenen grupların karaciğerlerinde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmazken, diğer grupların yarısında açık bir şekilde karaciğer patolojisine rastlanmiştir. Balıkların karkaslarından alınan örneklerde yapılan total lipit çalışmaları sonucunda elde edilen yağ asitlerinde keten tohumu yağıyla beslenen gruplarda C18:2 n-6 ve C18:3 n-3'ün seviyelerinin arttığı fakat fizyolojik açıdan önemli olan C20:4 n-6, C20:5 n-3 ve C22:6 n-3 yağ asitleri seviyelerinin balık yağıyla beslenen gruplara kıyasla düştüğü bulunmuştur. Zeytinyağı ile beslenen grupların karkasından elde edilen yağ asiti sonuçları bu balıklarda büyük çoğunluğunun tek çift bağ içeren yağ asitleri ve doymuş yağ asitlerinden oluşurken, C18:2 n-6 hariç, aşırı doymamış yağ asiti yüzdesinde önemli düşüşler olduğu belirlenmiştir. Benzer

bulgular karaciğer dokusu için de yinelenmiştir. Sonuç olarak, balık yağının balık beslenmesindeki önemi vurgulanmıştır.

Balık besinlerine ilave edilen yağ miktarının çeşitli dokuların lipit depolarına etkisi *Melanogrammus aeglefinus* üzerinde çalışılmıştır. Bu türde, besin lipit içeriğindeki artışa bağlı olarak gelişim ve besin dönüşüm oranının önemli bir şekilde artmadığı belirlenmiştir. Aynı şekilde kas lipit seviyeleri besinle önemli bir şekilde artmazken, karaciğer yağ asiti seviyeleri besinin yağ asiti seviyelerini yansıtmıştır. Bu türde yüksek enerjili ve lipit içeriği yüksek besinlerle beslemeye bağlı olarak yağlı karaciğer durumu gözlenmiştir. Bu durumun, balıkta somatik gelişim ve yağlanmış karaciğere bağlı olarak, balığın sağlığının etkilendiği bildirilmiştir (Nanton ve ark., 2001).

Balıklarda temel lipit depo yerinin türler arasında farklılık gösterebileceği ve yağın balıkta subkutanöz, karaciğer, kas miyoseptası veya mezenterik membranlarda yığılabileceği bildirilmektedir. Bu depo yerlerinin görece önemliliği değişiklik göstermektedir. Genelde, *Gadus morhua* gibi derinlerde yaşayan deniz balıklarında karaciğer, bir yağ deposu olarak görev yapar. Buna karşın, *Scomber scombrus* gibi pelajik balıklarda yağ kasta depolanır. Bununla birlikte, çok fazla aktif olmayan *Anguilla anguilla* gibi türlerde ise miyoseptalar çok yüksek yağ depolama yeteneğine sahiptir (Sheridan, 1988; van den Thillart ve ark., 2002).

Lipitlerin, organizmaların kendilerini yaşadıkları ortama adapte ederken, vücut yoğunluklarını düzenlemede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Eastman ve DeVries, 1982; Clarke ve ark., 1984; Kozlova, 1998; Kozlova & Khotimchenko, 2000). Bu olguyu aydınlatmak için Baykal (Baikal) gölüne özgü iki tür olan *Cottocomephorus grewingki* ve *Cottocomephorus inermis* ile yapılan çalışmalarda, bu türlerin temel lipit sınıflarının triaçilgliseroller ve fosfolipitler olduğu ve araştırılan dokularda miktarları değişmekle birlikte ana fosfolipit sınıflarının fosfotidilkolin ve fosfotidiletanolamin olduğu belirlenmiştir (Kozlova, 1998).

Kozlova ve Khotimchenko (2000) yine Baykal gölünün iki endemik türü olan ve yüzme kesesi bulundurmeyen pelajik *Comephorus baicalensis* ve *Comephorus dybowski* türlerinin ergin dişilerinin tüm vücut ve bazı dokularını (karaciğer, kas, ovaryumlar) lipit ve yağ asitleri açısından araştırmışlardır. *C. baicalensis* türünün vücut (% 38.9), karaciğer (% 23.5) ve kas (% 14.5) dokusunda bulunan lipit miktarlarının *C.*

*dybowski* (sırasıyla, % 4.7, 8.7 ve 2.6) türünde bulunandan daha fazla olduğu belirlenmiştir. İki türün ovaryum lipit miktarları benzerlik göstermiştir (% 5,3-5,6). Yine fosfotidiletanolamin ve fosfotidilkolin'in temel fosfolipit türleri olduğu belirlenmiştir. Çoğu durumda, tek çift bağ içeren yağ asitleri *C. baicalensis*'te majör yağ asiti sınıfını oluştururken, *C. dybowski*'de aşırı doymamış yağ asitlerinin majör yağ asiti sınıfı olduğu belirlenmiştir.

Membranlardaki kolesterol içeriği, lizofosfolipitlerin seviyesi ve aşırı doymamış yağ asitlerinin varlığı membran akışkanlığını kontrol etmede oldukça önemlidir. Bu bileşenlerin miktarlarının veya fosfolipit yağ asitlerinin doymamışlık derecesinin artması geçirgenlik, aktivite ve membran bağımlı birkaç enzimin allosterik davranışında değişim ile birlikte daha düşük sıcaklıklara doğru membranların faz geçişlerine neden olur. Bu nedenle tüm organizmaların bu bileşenleri membranlarında doğru oranda tutmaları kaçınılmazdır. Sıcak kanlı hayvanlarda membranların faz geçiş noktası vücut sıcaklığından oldukça aşağıdadır ve membran akışkanlığının kontrolü gerekli değildir. Ancak balıklar gibi poikloterm hayvanlar sabit bir vücut sıcaklığına sahip değildirler. Bu nedenle, her zaman değişen sıcaklıklara membranlarının fiziko kimyasal özelliklerinin adaptasyonu oldukça hayati bir değer taşımaktadır (Farkas ve Csengeri, 1976).

Farkas ve Csengeri (1976), *Cyprinus carpio*'da yağ asiti biyosentezi üzerine çevresel sıcaklığın etkisini araştırmışlar ve hem total lipit hem de fosfolipit fraksiyonlarında bulunan uzun zincirli aşırı doymamış yağ asitlerinin seviyelerinin soğuğa adapte olan balıklarda sıcağa adapte olanlardan daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlardan doymuş yağ asiti fraksiyonunu meydana getiren sitoplazmik yağ asiti sentetaz enzim kompleksi ve uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin sentezini gerçekleştiren sistemlerin sıcaklıktaki değişimlere farklı cevaplar verdiklerini bildirmişlerdir.

Enterosit membranların lipit kompozisyonunun ince bağırsağın sindirim fonksiyonunu etkilediği ve membranöz sindirim enzimlerinin hayvanın besinsel durumunun bir belirteci olabileceği saptanmıştır (Raul ve ark., 1982; Duddley ve ark., 1994; Goda ve Takase, 1994 a; b; Wang ve ark., 1996; Cahu ve ark. 2000).

Erginleşmemiş *Dicentrarchus labrax*'ın üç grubu 13 hafta boyunca farklı lipit içeriğine sahip (% 12, % 21 ve % 30) üç izonitrojenöz besinle beslenmişlerdir. Bu



deney sonucunda, üç balık grubunda da ağırlık kazanımının eşit olduğu görülmüştür. Üç deneysel besininin aynı yağ asit bileşimine sahip olmasına karşın, fırça kenarlı membranların yağ asiti bileşimi üç grupta da farklılık göstermiştir. Besinsel lipit seviyesinin artmasına bağlı olarak tek çift bağ içeren yağ asiti formu artış gösterirken, n-3 formu aşırı doymamış yağ asiti sınıfında meydana gelen düşüş bu bulguya paralellik göstermiştir. Yine aynı şekilde besinsel lipit seviyesinin artışıyla birlikte, fırça kenarlı membranlarda bulunan alkalın fosfataz, aminopeptidaz N,  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz ve maltaz enzimlerinin aktivitelerinde düşüş olduğu belirlenmiştir. Membran bağımlı olan ince bağırsak sindirim enzimlerinin aktivitelerindeki değişimin fırça kenarlı membranların akışkanlığı ve yağ asiti bileşiminin değişimi ile olabileceği vurgulanmıştır (Cahu ve ark., 2000).

Yapılan besleme deneylerinde besinsel yağ asitlerinin balıkların yağ asiti bileşimine doğrudan yansıdığı ve besinde bulunan temel yağ asitlerinin balık dokularında doğrudan depolandığı belirlenmiştir. Balıkların yağ asiti bileşimini etkileyen çevresel faktörler olan besin, sıcaklık ve açlık, Kangal Balıklı Kaplıcası'nda aşağı yukarı 35°C sıcaklıkta yaşayan *Garra rufa*'nın kas dokusu üzerinde değerlendirilmiştir. 35°C sıcaklıkta 20 ve 22 karbonlu doymamış yağ asitlerinin azaldığı, 24°C sıcaklıkta ise bu yağ asitlerinin arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada besinsel yağ asitlerinin (miristik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, oleik asit, linoleik asit, linolenik asit) doğrudan depo edildiği, açlık sırasında ise palmitoleik, stearik, linoleik, linolenik ve araşidonik asit yüzdelerinde önemli bir azalış, oleik asit yüzdesinde ise artış olduğu saptanmıştır (Akpınar ve Aksoylar, 1988).

Akpınar (1999) Kangal Balıklı Kaplıcası'nda 35°C sıcaklıkta yaşayan bir diğer tür olan *Cyprinion macrostomus*'un kas dokusu yağ asiti bileşimine sıcaklık ve açlığın etkilerini araştırmıştır. Buna göre, 35°C sıcaklıkta beslenen ve aç bırakılan balıkların yağ asiti bileşiminde kalitatif olarak bir değişiklik görülmemiştir. 24°C sıcaklıkta beslenen ve aç bırakılan balıklarda ise besinde bulunmayan dokosapentaenoik asit (C22:5 n-3) ve dokosaheksaenoik (C22:6 n-3) asitin sentezlenebildiği ve linoleik asit (C18:2 n-6) yüzdesinin çok azaldığı belirlenmiştir. 35 ve 24°C sıcaklıkta beslenen ve aç bırakılan balıklarda en fazla değişime uğrayan yağ asitlerinin uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin (C18:2, C18:3, C20:3, C22:4, C22:5, C22:6) olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

Farklı koşullarda yetiştirilen ve Avrupa'da yayılış gösteren *Silurus glanis* filetoları üzerinde yapılan çalışmalar, bu türün yarı yağlı bir tür olduğunu ve protein içeriğinin de su sıcaklığıyla etkilendiğini bildirmiştir. Ayrıca, türün lipit içeriğinin yetiştirilme koşulları ile besin veya gerek yetiştirme koşulları gerekse besinin önemli etkileşimlerine bağlı olarak yağ asiti oranlarının etkilendiği bildirilmiştir (Hallier ve ark., 2007).

Balık dokularının yağ asiti bileşimi, temel olarak besinsel lipit bileşimiyle ve besinsel yağ asiti girişini modifiye etme yoluyla belirlenir. Bu modifikasyon gerek katabolizma gerekse polar ve nötral lipitlere desaturasyon, elongasyon ve esterifikasyon metabolik yollarıyla meydana gelir (Bell ve ark., 1993; Sargent ve ark., 1995; Henderson, 1996; Ruyter ve ark., 2000). Lipit elongasyon ve desaturasyonunda gereksinilen metabolik enzimlerin özgüllükleri nedeniyle, besindeki yağ asiti aileleri ve yağ asiti oranlarının tam miktarları fizyolojik ilgidedir. Bu nedenle besinsel lipitler sadece fosfolipitlere dahil edilen yağ asitlerinin farklı tipleri arasında dengeyi düzenlemekle kalmayıp, aynı zamanda metabolik enerjinin bir kaynağı olarak ta önemli bir rol oynamaktadır. Spesifik metabolik gereksinimlerini düşündüğümüzde, bu bağlamda organizmalardaki yağ asiti profilleri belirgin bir şekilde balığın vücut kısımları arasında farklılık göstermektedir (Bell ve ark., 2001; Tocher, 2003; Turchini ve Francis, 2009; Magalhaes ve ark., 2010).

Balıklarda özellikle metabolik açıdan oldukça aktif bir organ olan karaciğer ve balığın insanlar tarafından asıl yenilebilir kısmı olan kas dokusunun yağ asiti bileşimleri, adipöz doku ve gonadlarıyla yapılan birbirinden bağımsız alışmalar (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta macrostigma*, *Salmo trutta labrax*) gerek metabolizmanın aydınlatılması gerekse insan beslenmesine tavsiyelerde bulunmak amacıyla yapılmıştır (Aras ve ark., 2003 a; b; Görgün ve Akpınar, 2007; Akpınar ve ark., 2009). Bununla birlikte, Aras ve ark. (2003 c) damızlık gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) yumurta ve spermelerinin yağ asiti bileşimlerini, aldıkları yemin yağ asiti profili ile karşılaştırmışlardır. Besine bağlı olarak doymuş yağ asiti (DYA), tek çift bağ içeren doymamış yağ asiti (TçDmYA), n-3 ve n-6 aşırı doymamış yağ asiti (ADmYA) oranları açısından sperm ve yumurta dokusu arasında çok önemli istatistiksel farkların olduğu belirlenmiştir.

Yukarıda anlatılanlar kapsamında her ne kadar balık dokularının besinsel yağ asiti kompozisyonlarını bünyelerinde yansıttığını bildiren çalışmaların varlığına rağmen, Arzel ve ark. (1994), lipit kaynağı değiştirildiğinde, kahverengi alası *Salmo trutta* L.'nin karaciğer dokusunda daha belirgin olmakla birlikte, kas dokusunda da az çok sabit bir yağ asiti kalıbının varlığını gözlemişlerdir. Bu araştırma sonucunda doku lipitleri bileşiminin besinsel lipitlerinkini basit bir tarzda yansıtmadığı, bundan daha ziyade bazı yağ asitlerinin türe ve çalışılmakta olan dokunun doğasına bağlı olarak tanımlanmış oranlar içerisinde olduğu vurgulanmıştır. Aynı türün yabani ve beslenen balıkları ile yapılan kontrollü deneyler, balıklarda metabolizmanın karmaşık iç yüzünü ortaya koymak için oldukça aydınlatıcı olmuşlardır. Yine de bu çalışmalardan elde edilen bulgular farklı sonuçları tavsiye etmektedir. Şöyle ki, yabani ve beslenen gökkuşacağı alabalığı *Oncorhynchus mykiss*'in et ve derisinden elde edilen sonuçlarda, kültüre edilen balığın yağ asiti bileşiminin besininkine bağlı olmadığı ortaya çıkmıştır (Sağlık Aslan ve ark., 2007).

Rueda ve ark. (1997) *Pagrus pagrus* türünün yabani ve kültüre edilmiş türleriyle yaptıkları çalışmada, yabani balıkların toplam lipitindeki n-3 ve n-6 oranlarını daha fazla bulmuşlardır. Oysa Rueda ve ark. (2001) *Diplodus puntazzo*'nun beslenen ve yabani bireyleri ile yapmış oldukları araştırmayla ise, beslenen türün insan sağlığına daha faydalı olabileceğini belirtmişlerdir. Sağlık ve ark. (2003) *Sparus aurata* ve *Dicentrarchus labrax* türlerinin yabani ve kültüre edilmiş bireylerinin yağ asiti bileşimlerini karşılaştırdıklarında kültüre edilen balıkların etinde insan sağlığı açısından önemli olan C20:5 n-3 ve C22:6 n-3 yağ asiti miktarlarının daha fazla olduğunu ortaya koymuştur.

Tatlı su ve deniz kökenli balıkların yağ asiti bileşimleri arasında da farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalar tatlı su balıklarının deniz balıklarından çok daha düşük n-3 formu yağ asiti seviyelerini içerdiğini göstermektedir. Bununla birlikte, zincir uzatılması ve desaturasyon süreçleri tatlı su balıklarında deniz balıklarından daha etkindir. Bu nedenle, tatlı su balıklarının beslenme ile yüksek besinsel değere sahip olan bir yiyeceğe dönüştürülebileceği vurgulanmaktadır (Steffens, 1997; Vujkovic v ark., 1999; Jankowska ve ark., 2003; Akpınar ve ark., 2009).

Tuzluluğun balık dokularının yağ asiti miktarlarına etkisi Haliloğlu ve ark. (2004) tarafından deniz ve tatlı su da yaşayan gökkuşacağı alabalığı *Oncorhynchus*

*mykiss*'te DYA, TÇDmYA ve ADmYA miktarları esas alınarak araştırılmıştır. Buna göre, % 0.17 oranında ki tuzluluğun kas dokusunda yağ asiti sınıflarını etkilememekle birlikte sadece EPA/DHA oranına etki ettiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada karaciğer ve gonad dokularının tuz oranına bağlı olarak, tek çift bağ içeren yağ asiti fraksiyonu ve n-3 formu ADmYA içeriği önemli bir ölçüde etkilendiği bildirilmiştir. Adipöz doku da ise tüm yağ asiti sınıflarının tuz oranına bağlı olarak etkilendiği bulunmuştur.

Özoğul ve ark. (2007) Türkiye'de ticari olarak önem arz eden deniz ve tatlı su balıklarının yağ içerikleri ve yağ asiti bileşimlerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada Seyhan gölünden alınan tatlı su balıklarının % 28-34.6 oranında DYA, % 10.7-22.7 arasında TÇDmYA, % 23.2-43.7 oranları arasında ADmYA içermelerine karşın, denizel balıklarda bu oranlar DYA'da % 25.5-39.4, TÇDmYA'da %13.2-29.0 ve ADmYA'da ise % 25.2-48.2 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada göze çarpan bir diğer husus ise denizel balıklarda bulunan n-3 formu doymamış yağ asitlerinin (% 22.6-44.2) tatlı su balıklarında bulunan oranlardan (% 11.5-28.4) daha yüksek olmasına rağmen, n-6 formu doymamış yağ asitleri tatlı su balıklarında daha yüksek oranlarda temsil edilmesidir.

Balık türlerinin sahip oldukları lipit ve yağ asiti bileşimi yaşadıkları ortamın yanı sıra belirli dönemlerdeki fizyolojik faaliyetlere bağlı olarak değişim göstermektedir. Balıklar üreme evresi öncesinde bol besine gereksinim duyarlar ve üreme evresinden önce gonadların gelişimi için protein, karbohidrat ve lipite olan gereksinim fazladır. Karaciğer, gonad gelişimi ve gamet oluşturulması için kullanılacak lipitin büyük bir kısmını depo eder. Bununla birlikte, balık türlerinin eşeyssel olgunluk dönemlerinde lipitleri tercih ettikleri ve bu dönemde enerji ihtiyaçlarını ise daha çok kas dokularından sağladıkları ifade edilmektedir (Metin ve Akpınar, 2000 a; Konar ve ark., 1999).

Ülkemiz sularından Sır baraj gölünde yaşayan *Chondrostoma regium* (Heckel, 1843)'un erkek ve dişi bireylerinin kas dokusu yağ asiti bileşiminde üreme periyodu sonrasında önemli miktarda azalma olduğu tespit edilmiştir (Kara, 2001). Aynı şekilde, *Capoeta capoeta umbla*'nın erkek ve dişi bireylerinin karaciğer ve kas dokusu lipit miktarlarının üreme dönemi sonrasında azaldığı belirlenmiştir (Yılmaz ve ark., 1995). Ceyhan gölünde yaşayan *Chondrostoma regium*'un erkek ve dişi bireylerinin gonad dokularının yağ asiti bileşimi üreme öncesi ve sonrasında belirlenmiştir. Buna göre,

gerek erkek gerekse dişi bireylerin gonad yağ asiti içeriği üreme dönemi öncesinde üreme dönemi sonrasına göre yüksek olduğu bulunmuştur (Kara ve Çelik, 2000).

Yumurtlayan ve yumurtlamayan *Clupea harengus palas*'ın karaciğer, incebağırsak, kas dokusu üzerinde yapılan çalışmalardan da önemli sonuçlar elde edilmiştir. Yumurtlama durumu nedeniyle lipit tüketiminin, yumurtlayan balığın kas ve diğer incelenen dokularında önemli olduğu bulunmuştur (Huynh ve ark., 2007).

Embriyonik gelişim esnasında vücut gelişimine bağlı olarak katabolizma faaliyeti artış göstermektedir. Son zamanlarda balıkların lipit biyokimyası alanında yapılan çalışmalar, amino asit, yağ asitleri gibi farklı besleyicilerin ontogeni esnasında ne genişlikte katabolize edildiğini belirlemeye yönelmiştir. *Perca fluviatilis*'in embriyolojisine yönelik olarak yapılan çalışmada embriyogenesis esnasında türün enerji kaynağı olarak lipit ve yağ asitlerini katabolize etmediğini bildirmişlerdir. (Abi-Ayad ve ark. 2000). Bununla birlikte, yumurta sarısının embriyonun gereksinimlerini karşılamak için oldukça uygun olduğu ve yumurta sarısının yapısal lipit ve aşırı doymamış yağ asiti depolarının larval canlılık ve embriyo gelişimi için önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir (Desvilettes ve ark., 1997).

*Oncorhynchus mykiss*'in embriyogenez ve erken gelişim evrelerindeki yağ asiti bileşimlerinde meydana gelen değişimler iki farklı bağımsız çalışma ile ortaya konmuştur. Haliloğlu ve ark. (2003) türün gelişimi esnasında enerji kaynağı olarak C14:0, C16:1 n-7 ve C18:1 n-9 gibi yağ asitlerini fazla miktarda kullandıklarını ve erken gelişim süreci içerisinde C18:3 n-6, C18:4 n-3, C20:2 n-6, C22:5 n-3 miktarlarının azaldığını ve en yüksek azalmanın ise tekli doymamış yağ asitlerinde olduğunu belirlemişlerdir. Daha ayrıntılı diğer çalışma ise Zengin ve Akpınar (2006)'ya ait olup, bu çalışmada türün embriyonik gelişimi esnasında C18:2, C18:3 ve C20:5 asitlerinde artış, C14:0, C16:2, C20:0, C20:2, C20:3, C20:4 ve C22:0 yağ asitlerinde genel olarak bir düşüşün olduğu görülmüştür. Bu bulgulara ilaveten, embriyodan keseli duruma geçişte C20:0, C20:3, C20:5'in miktarlarında artış, C18:3 ve C22:1 de ise düşüş olduğu belirlenmiştir. Yüzme evresine geçmiş olan balıklarda ise C18:0 ve C20:2 de düşüş, C14:0, C16:2, C18:2, C18:3 miktarlarında artış gözlenmiştir. Tüm gelişim evrelerinde kalitatif bir farklılık gözlenmezken, C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 ve 18 ve 20 karbonlu aşırı doymamış yağ asitlerinin, türün normal gelişimi için gerekli olduğu vurgulanmıştır.

Su akıntı sistemlerinin özellikle alabalık türlerinin filetolarının yağ asiti bileşimlerini değiştirdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Çelik (2000) *Oncorhynchus mykiss*'in filetosunda n-3 yağ asitlerinin su sirkülasyonuna bağlı olarak değişimini araştırmıştır. Su akıntısına maruz tutulmuş deney grubundaki balıklarda kontrol grubuna göre C18:3 n-3, C18:4 n-3, C20:4 n-3, C20:5 n-3 yağ asitlerinin istatistiksel olarak daha fazla, C22:6 n-3'ü ise daha az bulunmuştur. McKenzie ve ark. (1998), aynı azot miktarı ve enerjiye sahip, lipit içeriği farklı besinlerle beslenen *Salmo salar* türünün yüzme performansına etki ettiğini ve bunda ise özellikle 18 karbonlu doymamış yağ asitlerinin sorumlu olabileceğini bildirmişlerdir.

Balıklarda yağ asit bileşimine etki eden en önemli faktörlerden birisinde mevsim olduğu bilinmektedir ve bu nedenle bazı araştırmacılar çeşitli balık türlerinde mevsime bağlı olarak yağ asit kompozisyonunda meydana gelen değişimleri araştırmışlardır. Buna göre, Akpınar (1986) ve (1987) Mogan gölünde yaşayan *Cyprinus carpio*'nun karaciğer ve kas dokusu yağ asiti bileşimini eşey ve mevsime bağlı olarak araştırmış ve her iki çalışmada da doku yağ asit bileşiminin önemli derecede kantitatif farklılıklar gösterdiklerini belirlemiştir. Ayrıca özellikle uzun zincirli yağ asitlerinin üreme dönemlerinde en fazla etkilenen yağ asitleri olduklarını rapor etmiştir.

Uysal ve Aksoylar (2005) *Sander lucioperca*'nın erkek ve dişi bireylerinin kas dokusu yağ asit bileşimindeki mevsimsel değişimleri araştırmışlardır. Bu çalışmada, doymamış yağ asitlerinin toplam yağ asitlerinin yarısından fazlasını meydana getirdiği belirlenmiştir. TÇDmYA'nın, ADmYA'ından fazla olduğu görülmekle birlikte, EPA, DHA ve ARA'nın ADmYA sınıfının en baskın yağ asitleri oldukları tespit edilmiştir. Türün kas dokusu yağ asit bileşiminin mevsim ve üreme periyoduyla önemli derecede etkilendiği vurgulanmıştır.

Uysal ve ark. (2006), gonadlardaki olgunlaşmaya bağlı olarak *S. lucioperca* eşeylerinin karaciğer yağ asitlerindeki mevsimsel değişimleri araştırmışlardır. Eşeylerin karaciğer lipitlerinin eylül ve kasım aylarında arttığı, mayıs ayında ise azaldığı saptanmıştır. C16:0, C20:4 n-6, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün tüm mevsimlerde en fazla bulunan yağ asitleri olduğu belirlenmekle birlikte, ADmYA'ndeki mevsimsel değişimlerin daha belirgin olduğu rapor edilmiştir.

Yenisei nehrinde düşük su sıcaklıkları altında yaşayan *Thymallus arcticus*'un kas dokusu yağ asiti bileşimi mevsime göre çalışılmıştır. Buna göre, üreme periyodunun yağ asitlerinin mevsimsel değişimindeki birincil neden olduğu bildirilmiştir. Üreme periyodu öncesinde özellikle EPA ve DHA gibi uzun zincirli EYA'nın kas dokusunda biriktirildiği ve üreme faaliyetiyle birlikte gonadlara transfer edildiği saptanmıştır (Sushchik ve ark., 2007).

Güler ve ark. (2007) Beyşehir gölünde yaşayan *C. carpio*'nun kas dokusu yağ asitlerinde meydana gelen mevsimsel değişimleri araştırmışlardır. Buna göre, ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde ADmYA'nın DYA'dan fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca TÇDmYA fraksiyonunun da ilkbahar ve yaz periyotlarındaki seviyelerinin DYA seviyelerinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Uzun zincirli doymamış yağ asitlerinden C22:6 n-3 yaz ve kış periyotlarında yüksek seviyelerdeyken, C18:2 n-6'nın ilkbahar ve sonbahar periyotlarındaki baskın ADmYA olduğu rapor edilmiştir. Türün kas dokusu yağ asiti kompozisyonunun beslenme periyodu ve mevsimle etkilendiği vurgulanmıştır.

Kalyoncu ve ark. (2009), *Vimba vimba tenella*'nın kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimini belirlemişlerdir. Buna göre, tüm mevsimlerde TÇDmYA sınıfının DYA ve ADmYA sınıflarından daha yüksek seviyelerde olduğu görülmüştür. C16:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün tüm mevsimlerde en fazla miktarlarda bulunan yağ asitleri oldukları bildirilmiştir.

Lipitler en önemli enerji depo molekülleri olmaları, biyolojik membranların yapılarına katılmaları ve hücre sinyalleşmesi olaylarında gereksinilmeleri gibi nedenlerden dolayı canlı sistemler için esansiyeldir (Gilham & Lehner, 2005). Bununla birlikte, lipitler dünya biyo-kütlesinin geniş bir kısmını teşkil etmekte olup, lipolitik enzimler bu suda çözülmeyen bileşenlerin dönüşümünde önemli rol oynamaktadır. Lipolitik enzimler bağların kırılmasında gereklidirler ve bu yüzden bir organizmanın hücrelerinde olduğu kadar, bir organizmadan diğer organizmaya lipitlerin transferinde de gereksinilirler. Lipolitik enzimlerin bir önemli özelliği ise, interfasiyal bağlanması ve sonra katalizini (*sensu stricto*) gerektiren lipit-su ara yüzeyinde katalizledikleri reaksiyonların eşsiz fizikokimyasal karakteridir (Beisson ve ark., 2000). Bu süreçlerde gereksinilen temel lipolitik enzimler olarak lipaz ve esterazların benzerliği ve aktivitelerini veya substrata ulaşmalarını düzenleyen mekanizmalar yapılan araştırmalarla ortaya çıkarılmaya devam etmektedir ( Gilham & Lehner, 2005).

Lipaz ve esterazlar, hidrolaz enzim sınıfına ait olup özellikle organik çözücüler içerisinde çok kararlı ve aktif olmaları nedeniyle endüstriyel uygulamalarda çok önemli yer tutan enzimlerdir (Schmidt & Bornscheuer, 2005). Lipazlar (triacylglycerol acylhydrolase; E.C.3.1.1.3) triaçilgliserollerin serbest yağ asitleri ve gliserole hidrolizini katalizlemektedirler. Bu hidrolitik reaksiyon geri dönüşümlüdür (Gupta ve ark., 2003) ve yalnızca iz miktarda suyun varlığında tersine reaksiyon olan esterifikasyon tepkimelerini de katalizlemektedirler. Bu bağlamda, lipazlar geleneksel olarak uzun zincirli yağ asiti ester hidrolazları veya alternatif olarak, oleik asitin esterlerini hidrolizleme yeteneğinde olan esterazlar olarak isimlendirilmektedirler (Paiva ve ark., 2000).

İlk olarak 1856 yılında Claude Bernard tarafından suda çözünmeyen yağ damlalarını hidroliz eden ve bunları suda çözülebilir ürünlere dönüştüren bir enzim olarak pankreatik sıvıda bir lipaz tanımlanmıştır. Bununla birlikte, lipazların hidroliz olayını katalizleme ve esterleri sentezleyebilme yetenekleri günümüzden yaklaşık olarak 70 yıl öncesinde fark edilmiştir (Hasan ve ark., 2006).

Hidrolazlar, enzimlerin  $\alpha/\beta$  katlı grup ailesinde bulunmaktadır (Schrag & Cygler, 1997). Esterazların büyük çoğunluğu da dahil olmak üzere tüm lipazlar bu katlanmayı paylaşırlar. Triaçilgliserol lipazlar tüm fungal, bakteriyel ve pankreatik lipazları içerirler. Esterazlar ise flavodoksin benzeri katlanma grubuna ait olan kutinaz grubu ile  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanmasına sahip olan esteraz ve asetilkolinesteraz grubu olmak üzere üçe ayrılmaktadırlar (Fojan ve ark., 2000).

$\alpha/\beta$  hidrolaz süper ailesinin üyeleri belirli bir  $\alpha$  heliks ve  $\beta$  plakalı yapının topolojisini göstermektedirler. Bu uzaysal katlanmaya bakıldığında, yapının birkaç  $\alpha$  heliks tarafından çevrelenen merkezi bir  $\beta$  plakadan oluştuğu belirlenmiştir.  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlı proteinlerin katalitik üçlüsü (catalytic triad), nükleofil grup olarak bir serin, asit grup olarak aspartik veya glutamik asit ve bir de histidin gruptan oluşmaktadır. Bu katalitik üçlü Gly X Ser X Gly (bu dizide X, prolin haricindeki herhangi bir amino asidi temsil etmekte) motifindeki serin amino asitli nükleofilik dirsekte bulunmaktadır. Katalitik olaylarda bu katalitik üçlü grubun rolü aktif merkez içerisindeki oryantasyonları ile uyumluluk göstermekte ve yaklaşık olarak enzimin merkezindeki dip aktif merkez oyuğunun altında konuşlanmaktadır. Lipazlarda bulunan bu katalitik merkez ise serin proteaz grubunda bulunan serin-histidin-aspartik asit motif



dizisi ile, sadece amino asit dizisi bakımından farklılık göstermektedir. (Schrag & Cygler, 1997; Wong & Schotz, 2002; Gilham & Lehner, 2005; Kurtovic ve ark., 2009).

Lipazların sınıflandırılmaları moleküler biyolojideki amino asit dizisi, cDNA klonlaması ve gen organizasyonu tekniklerinin gelişmesine bağlı olarak netlik kazanmaya devam etmektedir. Buna göre, lipaz gen ailesi ilk başlarda pankreatik lipaz (PL), lipoprotein lipaz ve hepatik lipazdan oluşmaktaydı. Pankreatik lipaz (PL) ile ilişkili protein 1 ve 2, fosfatidilserin fosfolipaz 1 ve endotelyal lipazı içine alan bazı proteinlerin amino asit dizisi esas alınarak aileye dahil edilmiş ve aile üyelerinin sayısı da artmıştır. Bazı lipaz gen ailesi üyelerinin kristalizasyonu ailenin bir süper enzim ailesi olduğunu ortaya koydu. Bu süper ailenin, amino asit dizisinden daha ziyade, tersiyer yapıyla ilişkili olduğu ve doğada bulunan en popüler enzim ailesini temsil ettiği bildirilmektedir (Wong & Schotz, 2002). Bu ailenin üyeleri baskın olarak trigliseritler, digliseritler ve fosfolipitleri hidroliz etmekte olup, gliserol-sn-1-yağ asit hidrolazlar olarak düşünülmektedirler. Ailede bulunan proteinlerin çoğu glikozilatlanmış olup, tipik olarak 450-500 rezüdeli ve glikolizasyonun seviyesine bağlı olarak molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 50-70 kDa arasındadır (Choi ve ark., 2002; Wong & Schotz, 2002; Kurtovic ve ark., 2009).

Pankreasın trigliserid lipazları (PL) Lowe (2002) tarafından oldukça iyi bir şekilde incelenmiştir. Buna göre, PL ve kofaktörü olan kolipaz (colipase) besinlerle alınan lipitlerin etkin bir şekilde sindirilmesi için gereksinilmektedir. PL'in esasında açilgliseridler, kolesterol esterleri ve galaktolipitler üzerine yüksek tercihlili bir karboksil esteraz olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda trigliserid hidrolizindeki rolüne ek olarak, *in vivo* retinil esterlerin hidrolizine de yardım ettiği bulunmuştur. PL haricinde pankreas asinar hücreleri tarafından sentezlenen ve PL ile yüksek derecede dizi ve yapısal homolojiye sahip olan PL ile ilişkili iki protein (PLRP 1 ve PLRP 2) keşfedilmiştir. Bu proteinlerden PLRP 1'in bilinen herhangi bir aktiviteye sahip olmadığı, buna karşın PLRP 2'nin çeşitli substratlara karşı aktiviteye sahip olduğu ancak substrat seçiciliğinin türden türe değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. Substrat katalizleme etkinliklerindeki farklılıklarla birlikte, PL ve PLRP 2 safra tuzları ve kolipaz'a bağımlılıklarında da farklılık göstermektedir. Kolipaz'ın yapı, fonksiyon ve PL'ye bağlanma durumu van Tilbeurg ve ark. (1999) tarafından ortaya konmuştur ve PL'in fonksiyonel olabilmesi için gereksinilen küçük bir protein kofaktördür. Literatürde lipaz aktivitesi üzerine safra

tuzlarının inhibe edici etkisini giderdiği bildirilmekle birlikte etkin bir sindirim olayının gözlenmesi için lipaz-kolipaz ve safra tuzlarından oluşan üçlünün bir arada olması gerektiği net olarak açıklanmıştır.

PL suda çözülebilir bir enzim olmakla birlikte enzim lipit/su ara yüzeyini oluşturan, suda çözünmeyen substratlar üzerinde aktiftir ve safra tuzları ile çevrili lipit kümelerini hidroliz etmeden önce yapısal modifikasyonlar geçirilir. Bu durum interfasiyal aktivasyon olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalar lipazların, aktif siteyi taşıyan N-terminal domain ve kolipaz bağlanma sitesini taşıyan C-terminal domain olmak üzere iki domainli bir organizasyona sahip olduğunu ortaya koymuştur (Thomas ve ark., 2005). Lipazların önemli bir özelliği ise serin hidrolazlar ile karşılaştırıldıklarında, katalitik sitenin kapak (lid) olarak adlandırılan bir yüzey loop'u tarafından korunduğu ve bu kapak yapısının hareketine bağlı olarak substrata ulaşılabilirliğine göre enzimin inaktif (closed conformation) ya da aktif (open conformation) konformasyonlara maruz kaldığı saptanmıştır. Kristalizasyon çalışmalarından elde edilen bulgular lipazın tek başına iken kapalı konformasyonda bulunmasına karşın, aktif yapının sadece kofaktörü kolipaz ve safra tuzları ile birlikte kristallendirildiğinde elde edildiği bulunmuştur (van Tilbeurgh ve ark., 1993; Hermoso ve ark., 1996; Thomas ve ark., 2005).

Günümüzde kapak bölgesi ve aktif sitenin durumuna göre lipazlar üç tipe ayrılmaktadır. Bu tiplerden ilki enzim yüzeyinde bir aktif site ve kapak bölgesine sahip olan *Thermomyces lanuginosa* (eskiden *Humicola lanuginosa*)'yı kapsayan Rizomucor grubuna tekabül etmektedir. Diğer tip lipazlar ise bir aktif site ve huni benzeri bir kapağa sahip olan *Pseudomonas* ve *Candida antarctica* grubuna karşılık gelmektedir. *Candida antarctica* lipaz B çok küçük bir kapak ve huni benzeri bağlanma sitesi içermektedir. Son lipaz tipi ise *Candida rugosa* grubuna karşılık gelmektedir ve dış kısmında, kapağı içeren bir tünelin sonunda aktif sitenin varlığıyla karakterize edilmektedir (Pleiss ve ark., 1998; Gutierrez-Ayesta ve ark., 2007).

Misel yapılarının lipaz aktivitesi üzerinde oldukça etkili olduğu görülmüştür. Pignol ve ark. (1998) nötron kristalografisi kanıtlarına dayandırarak yapmış oldukları çalışmadan, lipaz aktivasyonunun interfasiyal olmadığını ancak, sulu fazda meydana gelmekle birlikte kolipaz ve bir misel yardımıyla tepkimelerde arabulduğunu bildirmişlerdir. Ayvazian ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmalar ise temel kolipaz

bağlanma sitesi olan C terminal bölgesini izole etmişler ve bu bölgenin *in vitro* şartlarda lipaz enziminin yetenekli bir nonkovalent inhibitörü olduğunu göstermiştir.

Lipaz ailesinin diğer iki proteini ise lipoprotein lipaz (LPL) ve hepatik lipaz (HL)'dir. Bu iki enzimin PL ile karşılaştırıldıklarında birbirlerine çok daha yakın oldukları anlaşılmaktadır. Gerek LPL gerekse HL, lipoprotein metabolizmasında merkezi rol oynayan kritik enzimler olup, temel fonksiyonları dolaşım sıvısının lipoproteinlerindeki trigliserit ve fosfolipitleri hidrolizlemektir (Dugi ve ark., 1995; Kurtovic ve ark., 2009). HL hepatositler tarafından sentezlenir ve karaciğer sinuzoid kılcallarının yüzeyinde lokalize edilmektedir. HL'nin dolaşım yoluyla adrenaller ve ovaryumda da bulunduğu gösterilmiştir (Perret ve ark., 2002). Buna karşın, LPL primer olarak adipositler, kas hücreleri ve makrofajlarda sentezlenmektedir. HL ve LPL arasında ki diğer önemli bir farklılık ise, LPL, 1 M'luk NaCl çözeltisi ile inhibe olurken, HL'nin yüksek tuz konsantrasyonlarında aktif olduğu bilinmektedir. İki enzim, substrat özgülükleri açısından da farklılık göstermektedir (Dugi ve ark., 1995).

LPL ve HL aktiviteleri ve canlılarda izledikleri gelişim süreçleri Lindberg ve Olivecrona (1995) tarafından çeşitli canlılar üzerinde yapılan çalışmada değerlendirilmiştir. Buna göre ekstra hepatik dokularda LPL'nin yüksek aktiviteleri bulunurken, HL aktivitesinin çok daha değişken olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada balık ve kurbağada düşük LPL aktiviteleri saptanırken, balık karaciğerinde HL aktivitesinin de düşük olmasına karşın, LPL aktivitesinden bir miktar fazla olduğu gösterilmiştir.

Trigliserid lipaz gen ailesinin yeni tanımlanmış bir üyesi ise endotelial lipaz (EL) olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapısal analizler EL'nin LPL ile % 44, HL ile ise % 41 oranında yapısal homoloji gösterdiğini ortaya koymuştur. LPL ve HL'nin aksine, bu enzim endotelial hücreler tarafından sentezlenmekte ve sentezlendiği yerde fonksiyon yapmaktadır. Dokulardaki dağılımı LPL ve HL'den farklı olmakla birlikte, karaciğer, akciğer, tiroid ve üreme organları gibi birkaç dokuda saptanmıştır. EL'nin ekspresyonu fiziksel kuvvetler ve sitokinler tarafından düzenlenmekte ve bu lipaza HDL metabolizmasında gereksinilebileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte, bu enzimin gerçekte fizyolojik fonksiyonunun ne olduğu henüz tam olarak anlaşılmış değildir (Choi ve ark., 2002; Wong & Schotz, 2002; Kurtovic ve ark., 2009).

Yüksek memeliler ve özellikle son zamanlarda balıklarda lipit sindiriminden sorumlu olan bir diğer lipolitik enzimin, karboksil ester lipaz (KEL) olduğu tanımlanmıştır. Bu enzimin substrat spektrumu oldukça geniş olup, trigliseritler, digliseritler, monogliseritler, kolesteril esterleri, vitamin A ve E esterleri, aril esterler, fosfolipitler, lizofosfolipitler, mum esterleri ve seramidi hidrolizleme yeteneğindedir. Bu geniş substrat özgülüğü nedeniyle non-spesifik lipaz olarak ta adlandırılmaktadır. Ayrıca safra tuzu bağımlı veya uyarımlı lipaz olarak adlandırılmakta ve bu ise uzun zincirli yağ açıl grupları ile suda çözünür olmayan karboksil esterlerin hidrolizinin safra tuzlarını gerektirdiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, KEL kısa zincirli yağ asitli kolesterol esterleri veya lizofosfolipitler gibi safra tuz aktivasyonuna tam bağımlılık göstermeyen substratların hidrolizini gerçekleştirebilmektedir. KEL, başlıca pankreasta ve yüksek memelilerin süt bezlerinde sentezlenmekle birlikte, karaciğer, makrofaj ve damar duvarlarında da sentezlendiği bildirilmektedir. KEL'in fonksiyonunun sindirim kanalında bulunan diğer lipolitik enzimlere, lipit besleyicilerin etkin sindirim ve emilimi için yardım etmek olduğu ortaya konmuştur. Yapılan son çalışmalara göre, KEL şilomikron kurulması ve salınımında da görev almakta ve ateroskleroz oluşumunda fizyolojik önem arz ettiği bildirilmektedir (Hui & Howles, 2002). Yapılan saflaştırma çalışmaları sonucunda enzimin molekül ağırlığının 120-140 kDa arasında ve oldukça polimorfik olduğu saptanmıştır. Sıçan, fare, koyun ve tavşan KEL'inin moleküler ağırlığı daha düşük ve yaklaşık 74 kDa olduğu bulunmuştur. Bu moleküler ağırlık farklılıklarının proteinin karboksil terminalindeki proline zengin tekrarların sayısındaki farklılıktan kaynaklandığı da ispat edilmiştir (Hui ve Kissel, 1990).

Hormon duyarlı lipaz (HSL), memelilerde iyi bir şekilde çalışılmış geniş substrat spesifiteli bir diğer lipolitik enzimdir. Bu enzim intraselüler veya nötral lipaz olarak ta bilinmektedir. HSL fosfolipitleri substrat kabul etmemekle birlikte, trigliseritler, digliseritler ve monogliseritleri 1 ve 3 pozisyonlarında hidrolizler ve aynı zamanda kolesteril ve retinil esterleri ve steroid hormonların lipoidal esterlerine karşı aktiviteye sahiptirler (Kurtovic ve ark., 2009). Lipoliz olayının hormonal kontrol ve bu kontrol mekanizmasına bağlı olarak artan lipaz aktivitesine bağlı olduğu bilinmektedir. HSL'nin temel enerji kaynağı olan yağ asitlerini başlıca adipoz dokudan serbestlemek suretiyle enerji homeostazisi ve metabolizmasında öncü rol oynadığı ileri sürülmüştür (Osterlund, 2001).

Lipazlar substrat özgülüğüne göre sınıflandırılabilir. Buna göre nonspesifik, yağ asiti spesifik, regioselektif ve substrat spesifik olmak üzere dört grup altında incelenmektedirler (Kurtovic ve ark., 2009). Bunlardan nonspesifik lipazlar, trigliserit molekülünün üzerinde rasgele hareket etmekte ve trigliseritlerin yağ asitleri ve gliserole tam olarak yıkılmasını katalizlemektedirler. Bu tip lipazlar *Corynebacterium acnes* ve *Chromobacterium viscosum*'dan elde edilen enzimleri içermektedir. İkinci sınıf lipazlar, göze çarpan bir yağ asiti tercihi sergileyen, yağ asiti spesifik lipazlardır. *Achromobacterium lipolyticum*, yağ asiti spesifitesi gösteren tek bakteri türü olarak örnek teşkil etmektedir. Bir diğer grup olan regioselektif lipazlar gliserolün birinci (C1) ve üçüncü (C3) karbon atomlarını hidrolizleyen 1,3-spesifik lipazlardır. Bazı *Bacillus* türleri ve *Aspergillus niger*'den elde edilen lipazlar bu sınıfa dahildirler. Sonuncu ve lipazların bir diğer önemli özelliği olan enantio/steroselektif yapılarını yansıtan grup, kimyasal ve farmasötik alanlarda oldukça yaygın kullanıma sahiptir (Hassing, 1971; Sugihara ve ark., 1991; Torossian & Bell, 1991; Davranov, 1994; Jaeger ve ark., 1994; Lanser ve ark., 2002; Gupta ve ark., 2004).

Lipazların aktif merkezi, serin proteazlarınkinden sadece dizi sırası bakımından farklılık göstermesi nedeniyle, katalitik mekanizma da benzerlik göstermekte ve serin amino asidi merkezlidir. İki katalitik sistem arasındaki tek farklılık, yöndedir. Günümüzde lipazlar ve esterazlar için geçerli olan katalitik mekanizmaya göre, ilk etapta aktif merkez, serininin triaçilgliserid ile tetrahedral bir hemiasetal ara bileşik meydana getirmesidir. Daha sonra hemiasetalin ester bağı hidroliz edilmekte ve diaçil gliserid serbestlenmektedir. Son aşamada ise aktif site serin açil esterinin bir molekül su ile etkileştigiğine inanılmakta ve açil enzim kesilip, yağ asiti ayrılmaktadır (Petersen ve ark., 2001; Kurtovic ve ark. 2009). Bu son basamaktaki yağ asitinin aktif merkezden salınımı çok önem arz etmektedir. Petersen ve ark. (2001) bu olguyu açıklamak için farklı pH'ların enzim üzerindeki elektrostatik etkilerini değerlendirmek suretiyle elektrostatik sapan modelini "the electrostatic catapult model" önermişlerdir. Bu modele göre, ester bağ kesimin takiben, açığa çıkan negatif yüklü yağ asiti, nötral ve bazik pH değerleri civarında negatif bir elektrostatik potansiyel sergileyen aktif siteden hızla çıkarılmaktadır. Böylece aktif merkez yeniden kataliz olayı için temizlenmiş olmaktadır.

Son zamanlarda bitki, hayvan ve doğal yada genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmalardan köken alan 50'den fazla lipaz enzimi tanımlanmış, saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Paiva ve ark., 2000).

Farklı enzimolojik özellikli ve substrat spesifiteli çeşitli mikrobiyal lipazlar bulunmuş ve karakterize edilmiştir. Mikrobiyal lipaz veya esterazların metabolik fizyolojik fonksiyonlarından daha ziyade endüstriyel uygulamalardaki yeteneklerinden dolayı ilgi odağında oldukları söylenebilir (Prim ve ark., 2003). Mikrobiyal kökenli lipazlar daha çok bakteri ve mantar kökenlidirler ve bunların çoğu ekstraselüler olarak sentezlenmektedirler (Aravindan ve ark., 2007). Bu özelliklerinin avantajı ile birlikte, elde edilmelerinin düşük pahalar gerektirmesi, fazla miktarlarda üretilebilmeleri ve daha kararlı olmaları gibi nedenlerden dolayı bitki ve hayvansal kökenli lipazlardan çok daha kullanışlı oldukları bildirilmiştir (Hasan ve ark., 2006).

Lipaz araştırmaları kapsamında sayısız saflaştırma örneğine rastlanabilmekle birlikte (Gupta ve ark., 2005) mikrobiyal organizmalarda yapılan ilkin çalışmaların enzimin saflaştırılması ve saflaştırılmış enzimin bazı özelliklerinin belirlenmesi üzerine odaklandığı görülmektedir. Bu çalışmalardan birine konu olan *Propionibacterium shermanii*' den (Oterholm ve ark., 1970) amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografileri kullanılarak hücre içi bir lipaz saflaştırılmış ve substrat olarak tributirinin kullanıldığı aktivite çalışmalarından enzimin optimum pH'ının 7.2, sıcaklığının ise 47°C olduğu belirlenmiştir. Hassing (1971) ergenlik dönemlerinde deri hastalıklarına neden olduğu bilinen *Corynebacterium acnes*'den bir lipaz saflaştırmış ve enzimin izoelektrik noktasının 3.8, trioleinin substrat olarak kullanıldığı çalışmalardan da optimum pH aralığını 7.5 - 9 olarak bulmuştur. Sztajer ve ark. (1988) bakteri, fungi ve aktinomisetes'lerin hücre dışı enzimlerini araştırmışlardır. Jacobsen ve ark. (1989) *Geotrichum candidum* lipazının çoklu izoformları üzerinde araştırmalar yapmışlar ve molekül ağırlıklarının 57 ile 61 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Bu belirtilen saflaştırma çalışmalarını takiben mikrobiyal kaynaklardan günümüz endüstrisinin gereksinimlerine cevap verecek nitelikte lipaz ya da esteraz enzimlerinin belirlenmeye çalışıldığı ve endüstrinin aynı zamanda ucuz, hızlı ve yüksek verimli saflaştırma stratejilerine gereksinim duyduğu belirtilmektedir (Gupta ve ark., 2005). Bu bağlamda, Sharma ve Gupta (2001) *Chomobacterium viscosum*, buğday tohumu ve domuz lipazını kapsayan bir çalışmalarında aljinatın lipazlar için iyi bir

afinite matriksi olduğunu, lipaz aktivitesini artırdığını ve sıcaklığa bağlı aktivite kaybını aza indirdiğini bulmuşlardır. Bir başka çalışmada Gupta ve ark. (2005) polipropilen matriks kullanmak suretiyle *Burkholderia multivorans* lipazını tek basamakta ve yüksek verimlilikle saflaştırılmasını başarmışlardır.

Mikrobiyal lipazların aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve dayanıklılık oldukça değişkenlik göstermektedir. Lopes ve ark. (2002) *Lactobacillus plantarum*'un ekstraselüler lipazını saflaştırmışlar ve elektroforezde molekül ağırlıkları 45 ve 98 kDa arasında değişen dört aktivite bandı belirlemişlerdir. Saflaştırılmış enzim 30 dakika ve 100°C'ta ısıtıldığında aktivitenin % 91 oranında korunduğunu kaydetmişlerdir. Saflaştırılan bu lipolitik enzimin yüksek bir şekilde termostabil olduğu anlaşılmaktadır. Castro-Ochoa ve ark. (2005) *Bacillus thermoleovorans* CCR11 türünden bir lipaz enzimi saflaştırmışlar ve optimum pH'ı 9 - 10 arasında, sıcaklığı ise 60°C olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada nativ formdaki enzimin 11 kDa'luk bir molekül ağırlığa sahip olduğu belirlenmiştir. Faiz ve ark. (2007) *Anoxybacillus gonensis* A4'ten termostabil bir esterazı saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Elde edilen esterazın molekül ağırlığı 62 kDa, optimum sıcaklığı 60 - 80°C arasında ve pH ise 5.5 olarak belirlenmiştir.

Yukarıda yüksek sıcaklıklarda aktivite gösteren ve kararlılıklarını koruyabilen mikrobiyal lipaz ve esterazların aksine, düşük sıcaklıklarda optimum aktivite gösteren ve kararlı kalabilen soğuk uyumlu lipazlar keşfedilmiştir. Cai ve ark. (2009), mezofilik *Geotrichum sp.* SYBC WU-3 suşundan bu tarz bir lipazı saflaştırmışlar ve 41.1 ve 35.8 kDa ağırlığında lipaz A ve B olmak üzere iki lipaz belirlemişlerdir. Lipaz A için optimum sıcaklık 20 °C, B için ise 15 °C olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada her iki enzim için optimum pH 9.5 olarak belirlenmiştir. Bu tip lipazların deterjan ve yiyecek endüstrisinde geniş uygulama alanları buldukları vurgulanmıştır.

Lipazlar geniş bir dağılım gösterdikleri bitkilerden de saflaştırıldıkları bilinmektedir. Lipazların yanı sıra, glikolipaz ve sulfolipaz aktiviteleri de bitkiler de mevcuttur. Bitkisel kökenli lipazlar eşsiz substrat özgünlükleri ve tasarlanmış esterleri sentezlemedeki yetenekleri nedeniyle ilgi odağındadırlar (Kurtovic ve ark., 2009).

Abigor ve ark. (2002) *Jatropha curcas*'dan amonyum sülfat çöktürmesi ve ultrafiltrasyon teknikleriyle kısmi bir lipaz saflaştırmışlardır. Enzimin optimum sıcaklığı 37 °C ve pH'sı ise 7.5 olarak bulunmuştur. Karakterizasyon çalışmaları demir iyonunun

lipaz aktivitesini % 90 oranında azalttığını, kalsiyum ve magnezyum iyonlarının ortama eklenmesi durumunda ise sırasıyla % 130 ve % 30'luk bir aktivite artışı meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Fahmy ve ark. (2008) *Cucurbita pepo*'nun esterazlarını çalışmışlardır. Bu çalışmada elde edilen altı esterazdan en yüksek aktivite gösteren ikisi anyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri ile saflaştırılmışlardır. Saflaştırılan *C. pepo* esterazlarından EII'nin molekül ağırlığı 50 kDa, EII'nin ise 68 kDa olarak belirlenmiştir. Her iki esterazında optimum sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur. *Pachira aquatica* bitkisinin tohumlarından elde edilen lipaz enziminde yapılan çalışmalar optimum sıcaklığının 40 °C, pH'ı 8.0 ve molekül ağırlığını ise 55 kDa olarak bulmuştur. Saflaştırılmış enzimin  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarıyla artan aktivite sergilemesine karşın,  $Hg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Al^{+2}$  ve çeşitli oksidize edici ve indirgeyici unsurlar vasıtasıyla inhibe edildiği bildirilmiştir (Polizelli ve ark., 2008). *Laurus nobilis* bitkisinden saflaştırılan lipaz enziminin de oldukça ilginç kinetik karakter sergilediği görülmüştür. Bu türün lipaz enzimi pH 7 - 10 arasında oldukça kararlı ve optimum sıcaklığının 50°C olduğu bildirilmiştir. Enzimin bir saat 60°C'de inkübe edilmesi sonrasında orijinal aktivitenin % 68'ini koruduğu bildirilmiştir (İşbilir ve ark., 2008). Bitkilerden saflaştırılmış lipazların kinetik özellikleri dikkate alındığında mikrobiyal esteraz ya da lipazlar ile benzerlik gösterdikleri anlaşılmaktadır.

Böcek lipazları üzerinde yapılan çalışmalar çoğunlukla böceklerde uçuş mekanizmasında lipolitik enzimlerin nasıl rol oynadıklarına odaklanmıştır. Arrese ve Wells (1994), *Manduca sexta*'nın yağ dokusu triaçilgliserol lipaz enzimini DEAE selüloz, fenil sefroz, Q sefroz ve hidroksilapatit kromatografilerinin bir kombinasyonu ile saflaştırmışlardır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları, enzimin omurgalı hormon duyarlı lipaz enziminin özelliklerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu tür üzerinde daha sonra yapılan bir başka saflaştırma çalışması, böcek yağ dokusundaki trigliserit lipazın aktif bir fosfolipaz A<sub>1</sub> olduğunu ortaya koymuştur (Arrese ve ark., 2006)

Kısıtlı da olsa, omurgasız türlerinde yapılan lipaz saflaştırma çalışmaları ilginç bulguları beraberinde getirmiştir. Saflaştırılmış olan akrep sindirim lipazının kinetik özellikleri incelendiğinde, optimum pH'nın 9 olduğu belirlenmiş ve izoelektrik noktasının 9.6 olarak tahmin edilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaların



hiçbirinin bu kadar yüksek bazik özellik gösteren bir sindirim lipazının varlığını bildirmedığı vurgulanmıştır (Zouari ve ark., 2007). Salyangoz hepatopankreasından saflaştırılan lipaz enziminin de ilginç özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Buna göre, saflaştırılan 60 kDa ağırlığındaki enzim, interfasiyal aktivasyon olgusunu sergilememiştir. Bununla birlikte, uzun zincirli triaçilgliserollerden ziyade, kısa zincirli substratlar üzerinde daha aktif olduğu belirlenmiştir (Amara ve ark., 2010).

Omurgalılar üzerinde yapılan lipaz saflaştırma çalışmalarına bakıldığında ilk zamanlarda daha çok rat, domuz ve tavşanlardan lipolitik enzimlerin saflaştırılması yoluna gidildiği söylenebilir. Şöyle ki, Claycomb ve Kilsheimer (1971) rat karaciğer mitokondrisinden bir lipaz, Matsumura ve ark. (1976) domuz adipöz doku trigliserit lipazının kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonunu, Jensen ve Bensadoun (1981) rat hepatik trigliserit lipazını, Field ve Scow (1983) rat lingual lipazının saflaştırılması ve karakterizasyonunu, Abouakil ve ark (1993) ise rat pankreatik AR 4-2 J hücrelerinde safra tuz aktiviteli lipaz aktivitesini ve glikolizasyonunu ortaya koymuşlardır.

Wang (1980) insan sütünden safra tuz aktiviteli lipazı, kolik asit kaplı sefaroze 4B afinite kromatografisi ile saflaştırmıştır. Imanaka ve ark. (1984) tarafından tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada karaciğerden asit lizozomal lipazı saflaştırılmış ve hidrofobik glikoprotein yapıdaki enzimin izoelektrik noktasının 5.15 - 5.90 arasında olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada sadece bir enzimin lizozomlarda açilgliseroller ve kolesterol esterlerinin hidrolizinde gereksinildiği fikri ortaya atılmıştır.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, köpek klasik pankreatik lipazı saflaştırılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmalarında enzimin yaklaşık 50.7 kDa molekül ağırlığında olduğu ve izoelektrik noktasının 6 ile 6.2 arasında olduğu belirlenmiştir (Steiner ve Williams, 2002).

Hindi pankreatik lipazı amonyum sülfat çöktürmesini takiben sefakril S-200 jel filtrasyon kromatografisi, DEAE sefaroze anyon değişim kromatografisi ve HPLC'nin kombinasyonu vasıtasıyla saflaştırılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda optimum sıcaklık 37°C, pH ise 8.5 olarak bulunmuştur (Sayari ve ark., 2000). Yine son zamanlarda hindi farinjal dokudan saflaştırılan bir esterazın biyoteknolojik açıdan oldukça etkin katalitik özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Bu saflaştırma çalışmasından elde edilen esterazın 50°C'de optimum sıcaklık aktivitesi gösterdiği ve optimum pH'nın ise 8.5 olduğu belirlenmiştir (Cherif ve Gargouri, 2010)

Günümüzde denizel kökenli canlılarda yapılan enzim saflaştırma çalışmaları giderek yoğunluk kazanmakta olup, bunlar içerisinde sucul omurgasızlarda dahil olmak üzere elde edilen enzimlerin karakterizasyonu önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalar, özellikle de balıklarla ilgili enzim çalışmaları, balıkların erken gelişim dönemlerini (Chakrabarti ve ark., 2006 a; Chakrabarti ve ark., 2006 b; Lazo ve ark., 2007) yada yetiştirilme koşullarına bağlı olarak sindirim sisteminin enzimlerini kapsamaktadır (de la Para ve ark., 2007).

Cherif ve ark., (2007) crustaceae'den elde edilen lipazlar hakkında bilgi eksikliği bulunduğunu bildirmişler ve yengeç sindirim lipazını (YSL) saflaştırmaya çalışmışlardır. Saflaştırma sonucunda 65 kDa molekül ağırlığındaki lipazın 60 °C gibi oldukça yüksek bir optimum sıcaklığa sahip olduğu belirlenmiştir.

Balıklarda lipaz saflaştırma çalışmalarının da sindirim sistemi üzerine odaklandığı anlaşılmaktadır. Iijima ve ark (1998) *Pagrus major*'un hepatopankreasından kademeli amonyum sülfat çöktürmesini takiben, anyon değişim kromatografileri, hidrofobik etkileşim, jel filtrasyon ve yüksek basınçlı sıvı (HPLC) kromatografilerinin bir kombinasyonu ile safra tuz aktiviteli bir lipazı saflaştırmışlar ve kinetik karakterizasyonunu başarmışlardır. Denatüre edici elektroforezle yapılan çalışmalar enzimin 64 kDa ağırlığında ve tek bant olduğunu belirlerken, optimum pH'ın ise 7 - 9 arasında olduğu belirlenmiştir. Bu türden elde edilen bu lipazın memeli safra tuz aktiviteli lipaza homolog olduğu vurgulanmıştır.

Balıklarda safra tuz aktiviteli lipazın gelişimi larva dönemindeki turbot türü *Scophthalmus maximus* üzerinde iyi çalışılmıştır. Bu çalışmalardan Hoehne-Reitan ve ark. (2001 a) kuluçkadaki larvaların safra tuz aktiviteli lipaz aktivitesine sahip olduklarını ve gelişim sürecinin ilerlemesine bağlı olarak enzim içeriğinin arttığını göstermişlerdir. Bu sonuçlara bağlı olarak, türün eksojen beslenmenin başlangıcından itibaren lipitleri sindirme yeteneğinde olduğu bildirilmiştir. Larval turbot üzerinde, lipit içeriği yüksek ve düşük rotiferlerle yapılan çalışmalar (Hoehne-Reitan ve ark., 2001 b) safra tuz aktiviteli lipaz üzerine lipit içeriğinin önemli bir etkisi olmadığını ortaya koymuştur. Aynı tür üzerinde yapılan bir diğer çalışma ise gelişen turbot larvalarındaki lipolitik enzim aktiviteleri üzerine odaklanmıştır. Nötral lipaz ve fosfolipaz aktivitelerinin yaşlanan larvalarda düştüğü belirlenmiş ve bunda eksojen beslenmedeki besin kaynaklı lipolitik enzimlerin etkisinin önemsiz olduğu vurgulanmıştır. Izquierdo

ve Henderson (1998) *Scophthalmus maximus*'un farklı hacimli balıklarında bağırsak içeriklerindeki lipaz ve fosfolipaz aktivitelerini flüoresan esaslı denemeler yoluyla araştırmışlardır. Gerek nötral lipaz enzimi gerekse fosfolipaz enzim aktiviteleri tüm denemelerde son bağırsak kısmında daha yüksek olduğu belirlenip, artan vücut ağırlığına paralel olarak her iki enzimin aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Bununla birlikte, Koven ve ark. (1997) bu aktivitenin balığın kendisinden mi yoksa bakteriyel bağırsak florasından mı kaynaklandığının belirgin olmadığını bildirmişlerdir.

*Pseudopleuronectes americanus*'un ontogenez süreci içerisinde yapılan bir çalışmayla, biri diğer omurgalıların gastrik, lingual ve lizozomal asit lipazına yakın olan, diğeri ise safra tuz aktiviteli lipaza yakın olmak üzere, iki lipaz saflaştırılmış ve çeşitli dokularda dağılımı gösterilmiştir (Murray ve ark., 2003). Safra tuz aktiviteli lipazın kemikli balıklarda en önemli sindirim lipazı olduğu vurgulanmakla birlikte (Patton ve ark., 1977), memeli safra tuz aktiviteli lipazına benzeyen bir lipaz Atlantik kod balığı *Gadus morhua*'dan farklı çalışmalar sonucunda saflaştırılabilmektedir (Gjellesvik ve ark., 1989; 1992). *Gadus morhua* üzerinde yapılan yeni bir çalışma, türün fonksiyonel bir safra tuz aktiviteli lipaz ile birlikte fonksiyonel olmayan bir pankreatik lipaz ilişkili bir proteini de içerdiğini bildirmiştir (Saele ve ark., 2010).

Lopez-Lopez ve ark. (2003) *Cherax quadricarinatus*'un sindirim bezinden bir esteraz-lipaz aktivitesini göstermişlerdir. Darias ve ark. (2007) cDNA çalışmalarının katkısıyla *Pagrus pagrus*'un larval gelişim esnasında tripsinojen ve safra tuzu aktiviteli lipazın zamansal ekspresyonunu değerlendirmişler ve bu balık türünün dışardan beslenme öncesinde protein ve lipid sindirimi açısından hazır olduğunu bildirmişlerdir. Rivera-Perez ve ark. (2010) *Penaeus vannamei* balık türünün orta bağırsak bezinden bir sindirim lipazı saflaştırıp, karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Aryee ve ark. (2007) gri kefal *Mugil cephalus*'un viserasından bir lipaz fraksiyonunu kısmi saflaştırıp bazı biyokimyasal özelliklerini belirlemişlerdir. Noriega-Rodriguez ve ark. (2009) ise sardalya balığı *Sardinops sagax caerulea* türünün viserasından bir lipolitik fraksiyon tanımlamışlardır. Bir başka sardalya türü olan *Sardinella aurita*'nın pilorik çekasından asit kararlı bir lipaz saflaştırılmış ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir (Smichi ve ark., 2010). Kurtovic ve ark. (2010) *Oncorhynchus tshawytscha* ve *Macruronus novaezelandiae* türlerinden sindirim lipazlarını saflaştırıp karakterizasyonunu çalışmışlardır.

Balık türlerinin sindirim kanalı haricindeki dokularından lipolitik enzimlerin saflaştırılmasına bakıldığında, gökkuşuğu alabalığı *Oncorhynchus mykiss* üzerinde yapılan birbirinden bağımsız iki çalışma (Harmon ve ark., 1991; Metin ve Akpınar, 2000 b) karaciğer hücrelerindeki aktiviteye odaklanmıştır. Her iki çalışmada da lipaz enziminin sitosolik fraksiyonda bulunduğu bildirilmiştir. Sidell ve Hazel (2002) dört Antarktik balık türünün kalp, karaciğer, kas dokusu ve adipoz dokusunun triaçilgliserol aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Benzer bir çalışma Nayak ve ark. (2003) tarafından dört farklı balık türünün farklı dokularındaki lipaz aktivitesini değerlendirmek suretiyle yapılmıştır. Yine, Nayak ve ark. (2004) sazan türü olan *Labeo rohita*'nın ince bağırsak lipazını, Hazel ve Sidell (2004) Antarktik balığı *Trematomus newnesi*'nin adipoz dokusundan hormon duyarlı bir lipazın saflaştırılması ve substrat özgüllüğünü, Islam ve ark. (2009) *Cirrhinus reba* türünün sırt kısmından bir lipazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu belirlemişlerdir.

Yukarıda anlatılanlardan çıkarsanabileceği gibi, günümüz çalışmaları, balıkların yüksek protein içeriklerinden daha ziyade, çeşitli koşullara bağlı olarak değişebilen kendi fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri için gereksinim duydukları yağ asitleri ve bu yağ asitlerinin ne oranlarda olduğunu belirlemeye odaklanmıştır. Balık yağlarında bol miktarlarda bulunan özellikle n-3 yağ asiti formu içerisinde yer alan C22:6 n-3 gibi insan sağlığına hiçbir yan etkisi olmaksızın önemli katkılar sağlayan bireysel yağ asitlerinin insan beslenmesindeki önemleri nedeniyle birçok araştırmaya konu oldukları açıktır. Ancak araştırmaların büyük çoğunluğu alabalık türleri gibi kültürü gerçekleştirilen ve ekonomik önem arz eden sınırlı sayıdaki tür üzerinde gerçekleştirilmektedir.

Yine yukarıda anlatılanlar doğrultusunda, canlılarda yağ asiti profilini ortaya koyan temel enzimatik süreçlerden biri lipazlar olup, balıklardaki çalışmalar daha çok sindirim sisteminden saflaştırılan enzimleri kapsamaktadır. Bu çalışmalar dikkatle incelendiğinde, gerçekleştirilen saflaştırma çalışmalarının büyük bir çoğunluğunun kısmi bir saflaştırmayı ortaya koyduğu ve tam saflaştırmayı başarabilen çalışmaların ise oldukça az sayısında olduğu görülecektir. Aynı zamanda, karaciğer, kas gibi dokulardan elde edilen lipolitik enzimlerin de oldukça az olduğu görülmektedir. Bu konuda ülkemizde yapılan çalışmalarında oldukça sınırlı olduğu anlaşılmaktadır (Metin 1997; Değerli ve Akpınar, 1995; Değerli, 1999; Değerli ve Akpınar, 2002).

Son yıllarda dünyada balık tüketimi giderek artmakta ve bu artış nedeniyle gerek deniz gerekse tatlı su balıkçılığı alanındaki araştırmalar hız kazanmaktadır. Yaptığımız çalışmada örnekleme alanı olarak seçilen Tödürge gölü, yöre balıkçılığı açısından önem arz etmektedir. Gölde yaşayan balık türlerinden *Cyprinus carpio*'nun yağ asiti dinamikleri farklı bölgelerde çalışılmasına karşın, bu göl popülasyonu ile çalışılmamıştır. Çalışmamızda kullanılan diğer iki tür olan *Leuciscus cephalus* ve *Chalcalburnus chalcoides*'in yağ asiti bileşimlerine ait herhangi bir veri bulunmamaktadır. Aynı zamanda, *C. carpio* hariç bu türlerden saflaştırılan herhangi bir lipolitik enzim bilgisine de rastlanmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı, bu çalışmada ismi geçen türlerin karaciğer ve kas dokusu yağ asiti bileşimlerinin mevsimsel değişiminin belirlenmesi ve karaciğer dokularından lipolitik bir enzimin saflaştırılması amaçlanmıştır.

## **2. MATERYAL VE METOT**

### **2.1. Materyal Seçimi**

Bu çalışmada kullanılan *Chalcalburnus chalcoides* (Gümüş), *Leuciscus cephalus* (Kefal) ve *Cyprinus carpio* (Sazan) türleri Tödürge Gölü'nden (Sivas) Mayıs, Temmuz, Eylül ve Kasım aylarında avlanmıştır. Yağ asiti çalışmalarında kullanılmak üzere her türden en az 3 birey seçilmiştir. Karaciğer dokusundan lipaz saflaştırılması amacıyla *L. cephalus*'tan 15, *C. chalcoides*'ten 20, *C. carpio*'dan ise 5 birey kullanılmıştır.

### **2.2. Örneklerin Diseke Edilmesi**

Avlanan türler buzluk içerisinde laboratuara getirildikten sonra toplam boy ve ağırlıkları belirlenmiştir. Yağ asiti çalışmalarında kullanılmak üzere karaciğer dokuları buzlu ortamda çıkarılmış ve 1'er g'lık doku parçaları alınmıştır. Yine yağ asiti çalışmalarında kullanılmak üzere her balık türünün dorsal yüzgecinin hemen altındaki bölgeden 1'er g'lık kas doku parçaları alınmıştır. Yağ asiti çalışmalarında kullanılmak üzere alınan bu doku parçaları, kloroform/metanol (2/1, v/v) çözeltisine konularak özütleme işlemine geçinceye kadar dondurularak -20 °C'ta saklanmıştır. Enzim çalışmalarında kullanılmak üzere her bir türün bireylerinden diseke edilen karaciğer dokularından 6 g kütle kullanılmıştır. Tez projesinde balıkların incebağırsak dokusu lipaz enzimlerinin de inceleneceği belirtilmiştir. Bu konuda gerekli incebağırsak örnekleri balıklardan alınmış ve stoklanmıştır. Ancak, Sanyo ultra low marka derin dondurucuda meydana gelen teknik bir arıza nedeniyle dokular bozulduğu için analiz işlemleri bu dokuda yapılamamıştır.

### **2.3. Lipit Çalışmaları İçin Örneklerin Özütlenmesi**

Alınan doku örneklerinden toplam lipit ve toplam yağ asitlerinin özütlenmesi ve saflaştırılması, Folch ve ark. (1957) yöntemine göre yapılmıştır.

#### **2.3.1. Toplam Lipit Eldesi**

Doku örnekleri, 10-20 katı kloroform/metanol (2/1) çözeltisiyle Ultra-Turrax T25 homojenizatörde 24.000 devir/dakika hızda 5 dakika süreyle buzlu ortamda homojenize edilmiştir. Ham özüt, Buchner hunisinde iki kat mavi bantlı süzme kâğıdı ile vakum motoru kullanılarak sağlanan hafif vakumla süzülmüştür. Süzüntü, döner buharlaştırıcı (Büchi marka Rotary Evaporatör) ile hafif vakumda buharlaştırılıp, kalan kısım 10-15 ml hekzan ile ayırma hunisine alınmıştır. Hekzanlı faz 3 kez damıtık su ile yıkanmıştır.

Hekzanlı karışım tekrar buharlaştırılarak, çözücü uçurulmuştur. Evaporasyon sonucu geri kalan kısım sabit tartıma geldikten sonra tartılarak toplam lipit miktarı olarak kaydedilmiştir. Tüm dokulardan bu işlemle kazanılan toplam lipitler etiketlendikten sonra bir miktar kloroform içerisinde buzdolabında dondurucu kısmında yağ asit eldesi işlemlerine kadar korunmuştur.

### **2.3.2. Toplam Yağ Asiti Eldesi**

Dokulardan elde edilen toplam lipit 10 katı kadar % 6'lık metanollü potasyum hidroksit (KOH) ile su banyosunda 80°C'ta 45 dakika sabunlaştırılmıştır. N<sub>2</sub> altında metanolün büyük bir kısmı uçurulduktan sonra bir miktar damıtık su ilave edilen örnekler, ayırma hunisine aktarılmıştır. Sulu örneklerin pH'sı 1 olana kadar 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilmiştir. Asitlendirilmiş örnekler 3 kez 5'er mL hekzan/kloroform (4/1) karışımı ile çekilip, hekzan/kloroform'lu örnekler bir balonda biriktirilmiştir. Balondaki hekzan/kloroform karışımı hafif vakumda evapore edilip kalan kısım sabit tartıma gelene kadar tartılarak toplam yağ asiti miktarı kaydedilmiştir. Bu örnekler bir miktar hekzan/kloroform içerisinde yağ asiti metil esterleri elde etmek için derin dondurucuda stoklanmıştır. Örneklerin azot ortamında olması sağlanmıştır (Blight ve Dyer, 1959).

### **2.3.3. Yağ Asiti Metil Esterlerinin Eldesi**

Hekzan/kloroform (4/1) içerisinde saklanan yağ asiti karışımı örneklerinden hekzan/kloroform azot altında uçurulmuştur. Kalan örnek üzerine 3-4 mL metanollü BF<sub>3</sub> (Bor Triflorür-Metanollü) karışımı ilave edilerek 10-15 dk. sıcak su banyosunda (80 - 90°C) bekletilmiştir. Örnek soğutulduktan sonra ayırma hunisine aktarılıp üzerine 7 - 8 mL doymuş NaCl (Sodyum klorür) ve 7 - 8 mL hekzan /kloroform (4/1) karışımı ilave edilerek çalkalanmıştır. Oluşan posalı kısım atılarak geri kalan yağ asitleri metil esterleri hekzan/kloroform'lu fazı kapaklı tüplere alınmıştır. Hekzan/kloroform karışımının fazlası azot akımında uçurularak, örnekler Gaz Kromatografisi'ne verilecek yoğunluğa getirilip derin dondurucuda bekletilmiştir (Moss ve ark., 1974).

### **2.3.4. Yağ Asitlerinin Gaz Kromatografik Analizi**

Gaz kromatografik analizler HP (Hewlett Packard) Agilent marka 6890 N model FID (Flame Ionization Detector, Alev İyonlaşma Dedektör) dedektörlü ve otomatik injektörlü gaz kromatograf ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde 100 metrelik HP-88 kapiler kolon (0.20 mm i.d., 0.25 µm) kullanılmıştır. Gaz kromatografte injektör bloğu sıcaklığı 240°C, dedektör bloğu sıcaklığı ise 250°C olarak ayarlanmıştır. Kolona

sıcaklık programı uygulanmıştır ve başlangıç sıcaklığı 160°C olarak ayarlanmıştır. Bu sıcaklıkta 2 dk. bekletildikten sonra dakikada 4°C artırılarak 185°C'ye ulaşması sağlanmıştır. Bu sıcaklığı takiben dakikada 1 °C artırılarak 200°C'ye ulaşılmış ve bu sıcaklıkta 46.75 dakika bekletilmiştir. Analizler 70 dakikada tamamlanmıştır. Gaz kromatografin gaz akış hızları hidrojen: 30 mL/dk., kuru hava: 300 mL/dk. ve taşıyıcı gaz olarak kullanılan helyum: 1 mL/dk. olarak ayarlanmıştır.

Yağ asiti metil esterleri standartları Alltech ve Accu firmalarından elde edilmiştir. Standartların bağıl alıkonma zamanları (relative retention time) gaz kromatografi cihazında aynı koşullarda analizlenerek belirlenmiştir. Böylece elde edilen standartların bağıl alıkonma zamanları yardımı ile kromatogramlardaki piklere karşılık gelen yağ asitleri belirlenmiştir. Üç tekrarlı olarak elde edilen kromatogramlardaki piklerin yüzde alanlarının aritmetik ortalaması tablolaştırılmıştır.

#### **2.4. Lipaz Saflaştırılması İçin Karaciğer Dokusunun Homojenizasyonu**

Yapılan deneme çalışmaları hariç, *L. cephalus*, *C. chalcoides* ve *C. carpio* türlerinden 6'şar g'lık karaciğer dokuları enzim saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır. Bu amaçla -70°C'de saklanan doku parçaları çalışmaya başlanmadan bir gece öncesinde -20°C'ye daha sonra ise birkaç saat süreyle +4 °C'de çözündürülmüştür. Karaciğer dokusunun proteaz aktivitesi Gessesse ve ark. (2003)'e göre 20 mM Tris-HCl tamponu içerisinde % 0.5 azokazein'in substrat olarak kullanıldığı bir metot vasıtasıyla değerlendirilmiştir. Her üç balık türününün karaciğer dokularının homojenizasyonu pH'ı 7.40 olan 60 mM Tris-HCl (0.25 mM Mannit, 1 mM Na<sub>4</sub>EDTA) tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon aşamasında doku, buzlu ortamda öncelikle makas yardımıyla parçalanmış ve Electromag M 11 tipi homojenizatör ile 1500 devir/dk hızla birkaç vuruşla homojenleştirilmiştir.

#### **2.5. Santrifüjleme İşlemleri**

Uygun tampon içerisinde homojenleştirilen karaciğer dokusu örnekleri cam elyaf vasıtasıyla yerçekimine karşı hiçbir müdahale yapılmaksızın süzdürüldükten sonra, Beckman Coulter marka yüksek hız kapasiteli soğutmalı santrifüj ile santrifüjlenmiştir. Bu amaçla her doku 60.000xg'de 1 saat süreyle +4°C'ta santrifüjlenmiştir. Bu işlemle elde edilen fraksiyonlar çökelti 1 ve üst sıvı 1 olarak adlandırılmıştır. Tüm dokuların gerek çökelti gerekse üst sıvılarında protein miktarı ve enzim aktivitesi ölçülmüştür.



## **2.6. Polietilen glikol 6000 (PEG 6000) ile Proteinlerin Çöktürülmesi**

Her üç balık türünün santrifüjleme sonucunda elde edilen üst sıvı 1 fraksiyonları polietilen glikol 6000 (PEG 6000) ile çöktürülmüştür. Metodol kitaplarda %20 PEG 6000 konsantrasyonlarının tüm proteinleri çöktürdüğü genel kanısına rağmen, % 10 - 40 aralığındaki PEG 6000 protein çöktürme çalışmaları sonucunda, tüm dokular % 30 (w/v) PEG 6000 çöktürmesine maruz bırakılmıştır. Elde edilen protein çöktürmeleri çözünebilecekleri en az miktardaki homojenizasyon tamponu içerisinde tekrardan çözündürülmüş ve kromatografik işlemler için kısa süreli olarak -20°C'ta saklanmışlardır. Çalışmamızda amonyum sülfat ile de protein çöktürme çalışmaları yapılmıştır. Ancak PEG'un daha iyi sonuçlar vermesi nedeniyle, bu yöntemin kullanılmasına karar verilmiştir.

## **2.7. Protein Miktar Tayinleri**

Kromatografik işlemler esnasında elüsyon tüplerinin protein içerikleri 280 nm dalga boyunda UV absorbansı alınarak kabaca belirlenmiştir. Ancak tüm saflaştırma basamaklarının protein miktarları, Coomassie Brilliant Blue G-250'nin boya olarak kullanıldığı metot vasıtasıyla ölçülmüştür (Bollag ve ark., 1996). Protein standart eğrilerinin hazırlanmasında, BSA (sığır serum albumini) standart olarak kullanılmış ve tüm örnekler 595 nm dalga boyunda Shidmadzu marka Cecil 5000 seri spektrofotometrede ölçülmüştür.

## **2.8. Enzim Aktivitesi Tayinleri**

Karaciğer dokusu lipaz enzimi aktiviteleri Bülow ve Mosbach (1987)'nin kısmi olarak değiştirilmiş yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Tüm aktivite ölçümleri Grant LTD 60 sirkülatörlü su banyosu vasıtasıyla sıcaklık ayarlaması yapılabilen Shidmadzu marka Cecil 5000 seri UV spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda ve 30°C sıcaklıkta kör tüpe karşı gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar esnasında bazı örnekler seyreltilmiş ve hesaplamalarda bu seyreltme oranları dikkate alınmıştır. Substrat çözeltisi olarak 4-nitrofenil butirat (pNPB) kullanılmıştır. Bu çözelti saf etanol içerisinde 50 mM konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Enzim aktivite ölçümlerinde ise yine derişimi 50 mM ve pH'ı 8.0 olan % 4 etanol katkılı Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Ölçümler esnasında örnek tüpü, 2930 µL aktivite tamponu, 60 µL pNPB ve 10 µL enzim çözeltisinden oluşmuştur. Kör tüp, enzim çözeltisi içermemekle birlikte, sadece substrat ve tampon çözeltiden oluşmuştur. Enzim aktivitesinin başlangıç

hızı, 405 nm de ilk 5 dk.'da oluşan p-nitrofenol (pNP) miktarı ölçülerek saptanmıştır. Bir enzim ünitesi (IU) 30 °C'ta 1 dk. içerisinde, 1 µmol pNPB'nin pNP'e dönüşümünü sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

## **2.9. Kromatografik İşlemler**

*L. cephalus*, *C. chalcoides* ve *C. carpio* türlerinin karaciğer lipaz enzimlerinin kromatografik saflaştırma işlemlerinde sırasıyla, güçlü anyon değişim kromatografisi olan Q sefaroz, jel filtrasyon kromatografisi olan Sefakril S 200 HR kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi olan fenil sefaroz CL-4B kromatografisi aynı koşullar altında uygulanmıştır.

### **2.9.1. Q Sefaroz Fast Flow Anyon Değişim Kromatografisi**

Ticari olarak % 20 Etanol çözeltisi içerisinde hazır olarak kullanıma sunulan Q sefaroz güçlü anyon değişim kromatografisinden 20 mL alınarak kolona doldurulmuştur. Kolona doldurulmuş olan materyal 100 mL distile su ile yıkanmak suretiyle etanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 20 mM derişiminde ve pH'ı 7.80 olan 1 mM Na<sub>4</sub>EDTA ve 0.2 mM DTT içeren kolon dengeleme çözeltisiyle kolon maddesi dengelenmiştir. PEG 6000 çöktürmesi sonucu elde edilen protein çöktürmelerinden her bir tür için 5 mL çökelti alınmış ve seyreltikten sonra farklı zamanlarda ayrı olarak 1.6 mL/dk. hızla kolona aynı şartlar altında uygulanmıştır. Kolona bağlanmayan seriler toplandıktan sonra kolon sırasıyla 100, 200, 300, 400, 600, 800 ve 1000 mM NaCl çözeltileri ile yıkanarak bağlanmış olan proteinler geri alınmıştır.

Diğer kullanımlar için kolon öncelikle distile su ile yıkanmış ve daha sonra 1.5 M NaCl çözeltisi ile yıkanarak, dolgu maddesinin rejenerasyonu sağlanmıştır. Kolon rejenere edildikten sonra tekrar distile su ile yıkanmış ve denge tamponuyla tekrar dengelenerek örnekler uygulanmıştır.

### **2.9.2. Sefakril S 200 HR Jel Filtrasyon Kromatografisi**

Sefakril S 200 HR jel filtrasyon kolon dolgu maddesi % 20 etanol içerisinde kullanıma hazır olarak alınmıştır. 20 mL kolon dolgu maddesi uygun kolona doldurulduktan sonra, distile su ile yıkanmak suretiyle etanolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kolon 20 mM'lık ve pH'ı 7.80 olan 0.2 mM DTT katkılı dengeleme tamponuyla dengelenmiştir. Bu işlemlerden sonra bir önceki saflaştırma basamağı olan Q sefaroz anyon değişim kromatografisinden elde edilen aktivite gösteren elüsyon tüpleri yoğunlaştırılarak, aynı şartlar altında bahsedilen tamponla dengelenmiş kolona

uygulanmış ve elüsyon türleri toplanarak 280 nm dalga boyunda UV absorbanları ve 405 nm dalga boyunda lipaz aktiviteleri araştırılmıştır. Aktivite gösteren tüpler toplanarak bir sonraki saflaştırma basamağı için hazırlanmıştır.

### **2.9.3. Fenil Sefaroz CL-4B Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi**

Fenil Sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kolon dolgu maddesi yine % 20 etanol çözeltisi içerisinde rejenerasyonu sağlanmış olarak hazır alınmıştır. Çalışmada kullanılan diğer kolon kromatografik işlemlerde olduğu gibi 20 mL yatak hacmine sahip olacak şekilde kolona doldurulan madde distile su ile yıkanmak suretiyle etanol uzaklaştırılmıştır. Kolon, 20 mM derişiminde ve pH'ı 7.80 olan 150 mM amonyum sülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tuz çözeltisini içeren kolon denge tamponuyla dengelenmiştir. Daha sonra önceki saflaştırma basamağı olan jel filtrasyon kromatografisinden alınan örnekler yoğunlaştırılarak farklı zamanlarda aynı şartlar altında kolona uygulanmıştır. Kolon, örneğin uygulanması sonrasında kolona bağlanmayan proteinleri almak için öncelikle bu işlem için bahsedilen dengeleme tamponuyla yıkanmıştır. Daha sonra amonyum sülfatsız kolon denge tamponu ile yıkanmış ve takiben % 10, 20 ve 50 oranında izopropanol ile belirli hacimlerde yıkanarak bağlı proteinler elde edilmişlerdir. Bu kromatografik adım bazı teorik bilgiler doğrultusunda tarafımızdan balık dokuları için optimize edilmiş ve uygulanmıştır.

### **2.10. Enzim Kinetiği Çalışmaları**

#### **2.10.1. Optimum pH çalışmaları**

Elde edilen karaciğer lipazı 30°C sabit sıcaklıkta değişken pH'larda (5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 ve 10) 20 dk. ön inkübasyona maruz bırakılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Çalışmalar esnasında pH'ın 7.5 olduğu çözeltiler için 50 mM fosfat, diğerleri için ise 50 mM tris tamponu kullanılarak reaksiyon ortamında son konsantrasyonu 1 mM olan pNPB substratına karşı aktiviteler elde edilmiştir. Bu verilerden optimum pH belirlenmiştir.

#### **2.10.2. Optimum sıcaklık çalışmaları**

Elde edilen karaciğer lipazı sabit pH'ta (pH 8.0) farklı sıcaklık değerlerinde (5, 10, 20, 30, 33, 35, 37, 38, 40, 45, 50, 60°C) inkübe edilerek reaksiyon ortamında son konsantrasyonu 1 mM olan pNPB substratına karşı spektrofotometrik olarak aktiviteler elde edilmiş ve tabloluşturulmuştur. Bu verilerden optimum sıcaklık tespit edilmiştir.

### **2.10.3. Enzim aktivitesi üzerine substrat miktarının etkileri**

Lipaz enziminin kinetiğini değerlendirmek amacıyla substrat olarak pNPB kullanılmıştır (pH 8 ve 30 °C). Bu substratın aktivite ortamındaki son konsantrasyonları 0.16-2.00 mM olacak şekilde değişim gösteren derişimleri kullanılmış ve aktiviteler elde edilmiştir.

### **2.10.4. Enzim aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerin etkileri**

Elde edilen karaciğer lipazı üzerine Triton X-100, sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum taurokolat'ın etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla bahsedilen tüm yüzey aktif maddelerin % 0.5 oranındaki zlteleri hazırlanarak pH 8 ve 30°C sabit sıcaklık altında son konsantrasyonu 1 mM olan pNPB substratı kullanılarak 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 saat sonrasında zlti ortamında kalan lipolitik aktiviteler elde edilmiştir.

### **2.11. Elektroforetik Teknikler**

Saflaştırma işleminin son basamağında, yapılan saflaştırmanın protein bantları boyutunda izlenmesi amacıyla Temizkan ve Arda (1999) tarafından optimize edilen sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. Bu çalışmada yürütücü jel % 5, ayırıcı jel ise % 8 ve 10 oranlarında dklmştir. zlteler şu şekilde hazırlanmıştır:

#### **A. Akrilamid / Bisakrilamid zltisi**

- 29.2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid 100 mL distile suda zndrlmştir.

#### **B. 4 x Ayırma Jeli Tamponu**

- 18.15 g Tris 5 N HCl eşliğinde pH 8.8 olacak şekilde distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

#### **C. 4 x Yükleme Jeli Tamponu**

- 3 g Tris 5 N HCl eşliğinde pH 6.8 olacak şekilde distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

#### **D. % 10 SDS**

- 5 g SDS distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

#### **E. %10 Amonyum Persülfat (APS) (kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır).**

- 0.5 g APS katısı 5 mL distile su içerisinde zndrlmştir.

#### **F. 2 x rnek Uygulama Tamponu**

• 2.5 mL C çözeltisi, 4 mL D özetlisi, 2 mL gliserol, 1 mL  $\beta$ -merkaptoetanol, 0.01 g Bromophenol mavisi, distile su vasıtasıyla 10 mL'ye tamamlanmıştır.

**G. 5 x Tank Tamponu** (5 kat seyreltilerek kullanılmıştır)

• 15 g Tris, 72 g glisin, 5 g SDS tartılarak distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

**2.11.1. Gümüş Boyama**

Elektroforez sonrasında jellerin boyanmasında gümüş boyama tekniği kullanılmıştır. Çözeltiler şu şekilde hazırlanmıştır:

**H. Fiksatif Çözeltisi**

• % 40 metanol çözeltisi içerisine 0.5 mL % 37'lik formaldehit ilave edilerek distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

**İ. Ön Geliştirme Çözeltisi**

• 0.2 g Sodyum Tiyosülfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 1 L distile su içerisinde çözündürülmüştür.

**J. Boya Çözeltisi**

• 0.1 g Gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) 1 L distile su içerisinde çözündürülmüştür. Oda sıcaklığında ve koyu renkli şişe içerisinde saklanmıştır.

**K. Görüntü oluşturma çözeltisi**

• 30 g sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ve İ çözeltisinin 20 mL'si 1 L distile su içerisinde çözündürülmüştür. Kullanılmadan hemen önce 0.5 mL % 37'lik Formaldehit çözeltisi ilave edilmiştir.

**L. 2.3 M Sitrik asit çözeltisi**

• 22.1 g sitrik asit 50 mL distile su içerisinde çözündürülmüştür.

**2.11.2. SDS-PAGE işlemi**

İşlemler esnasında elektroforez camları distile su ile yıkanmış ve daha sonra etanol ile silinmiştir. Jel dökme aparatına konulan camlar arasına öncelikle % 10 oranında ayırıcı jel dökülmüştür. Bu amaç için, 9.975 mL A çözeltisi, 7.5 mL B çözeltisi, 0.3 mL D çözeltisi, 11.925 mL distile su, 0.3 mL APS çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti üzerine 20  $\mu\text{L}$  TEMED çözeltisi ilave edilmesini takiben bu çözelti karışımından 20 mL camlar arasına hava kabarcığı bırakmayacak şekilde dikkatlice dökülmüştür. Bir damlalık vasıtasıyla üzerine bir miktar n-bütanol ilave edilerek yüzey

düzeltilmiş ve jelin donması sağlanmıştır. Daha sonra n-bütanol bir kurutma kağıdı vasıtasıyla iyice uzaklaştırılarak, donan jel üzerine % 8'lik bir diğer ayırıcı jel dökülmüştür. Bu amaçla, 9.3 mL distile su, 5.3 mL A çözeltisi, 5 mL B çözeltisi, 0.2 mL D çözeltisi, 0.2 mL APS çözeltisi karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım üzerine 10 µL TEMED çözeltisi ilave edilir edilmez jel dökülerek donması sağlanmıştır. Yüzey yine n-bütanol çözeltisi ile düzeltilmiş ve jelin donmasını takiben uzaklaştırılmıştır. Bu işlem sonrasında % 8'lik ayırıcı jel üzerine % 5'lik yürütücü jel dökülmüştür. Bu amaç için, 1.6 mL A çözeltisi, 2.5 mL C çözeltisi, 0.1 mL D çözeltisi, 0.1 mL APS ve 5.63 mL distile su karıştırılmıştır. Bu karışım üzerine son olarak 10 µL TEMED çözeltisi ilave edilerek daha önceden jel dökme aparatının en üst seviyesine yerleştirilmiş tarak üzerinden hafifçe hava kabarcığı bırakmayacak şekilde dökülmüş ve donması sağlanmıştır. Jelin donmasıyla tarak çıkarılmış ve proteinlerin yükleneceği kuyucuklar düzeltilerek elektroforeze yerleştirilmiştir.

Beş kat seyreltilmiş tank tamponu, jelin üst ve alt tabakasında belirlenen seviyelere kadar doldurulmuştur. Daha sonra 25 µL yüklem tamponu içinde 5 ile 25 µL çeşitli fraksiyonlardaki protein çözeltileri 70°C'de denatüre edilmiş ve kuyucuklara yüklenmiştir. Örneklere, yürütücü jelden çıkana kadar 80 mA akım uygulanmış ve yürütücü jelden çıkmasıyla, akım 110 mA'e çıkarılarak işleme devam edilmiştir. İşaret boyası jelin en alt tabakasından yürütme tamponuna çıktığında işleme son verilerek boyama işlemine geçilmiştir.

Jel elektroforezden çıkarıldıktan sonra boyama için fiksatif (H) çözeltisi içerisine alınmış ve bir saat süresince bekletilmiştir. Daha sonra iki kez 10'ar dakika boyunca distile su ile yıkanmıştır. Jel, yıkanmayı takiben ön geliştirme çözeltisi (I) içerisine alınmış ve 1 dakika bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra jel iki kez 40'ar saniye boyunca distile su ile yıkanmıştır. Bu yıkama sonrasında boyama çözeltisi (J) içerisine alınarak 20 dakika hafif hızda çalkalanmıştır. Süre sonunda çözelti uzaklaştırılmış ve distile su ile yıkandıktan sonra geliştirme çözeltisi (K) içerisine alınarak, bantlar görünene kadar hafif hızda çalkalanmıştır. Bantlar görüldüğünde çözeltilere 10 mL sitrik asit çözeltisi ilave edilerek ortamın nötrleşmesi sağlanmıştır. Jel çıkarılarak distile su içerisine alınmış ve fotoğraflanmıştır. Protein markırları sayesinde ilgili bantlara dair molekül ağırlığı tayinleri gerçekleştirilmiştir.

## 2.12. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırmada kullanılan *L.cephalus*, *C. chalcoides* ve *C. carpio* türlerinin farklı mevsimlere ait karaciğer ve kas dokusu yağ asitleri üç tekrar üzerinden değerlendirilmiş ve ortalama değerler kullanılmıştır. İstatistiki analiz için “SPSS 15.0 for Windows” istatistik paket programı kullanılmıştır. Tekrar ve deney ortalamaları arasındaki farkların önem kontrolü, Duncan (1955)’in Multiple Range Test’ine göre yapılmıştır. Ortalamalar arası farklar 0.05 olasılık düzeyinde F değerinden daha büyük olduğu zaman önemli kabul edilmiştir.

Üç türe ait karaciğer lipaz enzimi  $K_m$  ve  $V_{max}$  parametrelerinin çözümünde “Microsoft Word Excell” ve “GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software” programları kullanılarak değerler ve grafikler elde edilmiştir.

### 3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan *Leuciscus cephalus*, *Chalcalburnus chalcoides* ve *Cyprinus carpio* türlerinde eşey ayrımı yapılmamıştır. Bununla birlikte, avlanan balıklardan enzim saflaştırma ve özellikle de yağ asiti çalışmalarında kullanılacak olan örneklerin kendi aralarında olabildiğince birbirlerine yakın boy ve ağırlıkta olmasına özen gösterilmiştir (Tablo 1). Örneklerin alındığı aylara ait ortalama su sıcaklıkları Tablo 2’de verilmiştir. En düşük su sıcaklığı kasım ayında (6 °C), en yüksek sıcaklığın ise temmuz ayında (24 °C) olduğu saptanmıştır.

Buna göre mayıs (ilkbahar), temmuz (yaz), eylül (sonbahar) ve kasım (kış) aylarında yağ asiti çalışmalarında kullanılmak üzere yakalanan *L. cephalus* bireylerinin boy ve ağırlıkları değerlendirildiğinde, mayıs ayında yakalanan bireylerin boyları 12.50 - 17.50 cm, ağırlıkları 32.15 - 80.14 g, temmuz ayındaki bireylerin boyları 18.50 - 19.00 cm, ağırlıkları 84.07 - 94-93 g, eylül ayındaki bireylerinin boyları 16.50 - 17.50 cm ve ağırlıkları 66.40 - 82.71 g, kasım ayındaki bireylerinin boylarının 19.00 - 21.00 cm, ağırlıklarının 94,83 - 111.75 g arasında olduğu belirlenmiştir. Eylül ayında avlanan balıklar mayıs ve temmuz aylarında avlananlardan boy ve ağırlık açısından istatistiki fark göstermemesine rağmen ( $P>0.05$ ), mayıs ve temmuz aylarında avlanan balıkların boy ve ağırlıkları farklılık göstermiştir ( $P<0.05$ ). Kasım örnekleri sadece temmuz ayındaki balıklardan boy ve ağırlık açısından farklı olmadığı belirlenmiştir ( $P>0.05$ ).

*C. chalcoides* bireylerinin boyları değerlendirildiğinde, mayıs ayında 15.00 - 17.00 cm, ağırlıkları 51.72 - 72.93 g, temmuz ayındaki bireylerin boyları 15.50 - 17.50 cm ve ağırlıkları 41.40 - 60.85 g, eylül ayındaki bireylerinin boyları 15.00 - 16.50 cm ve ağırlıklarının 47.62 - 53.53 g, kasım ayındaki bireylerin boylarının 13.50 - 15.00 cm ve ağırlıklarının 40.21 - 48.54 g arasında olduğu belirlenmiştir. Bu belirtilen aylarda yakalanan *C. chalcoides* bireyleri ağırlık açısından istatistiki fark göstermemiştir ( $P>0.05$ ). Bununla birlikte, sadece temmuz ve kasım aylarında yakalanan bireylerin boyları arasında bir fark gözlenmiştir ( $P<0.05$ ).

Mayıs, temmuz, eylül ve kasımda avlanan *C. carpio* bireyleri boy ve ağırlıkları açısından değerlendirildiğinde, mayıs ayında 34.00 - 36.00 cm boy ve 701.34 - 1003.76 g ağırlık, temmuz ayında 32.00 - 35.00 cm ve ağırlıklarının 593.80 - 816.55 g, eylül ayında 20.50 - 28.50 cm boy ve 156.93 - 408.35 g ve kasım ayında ise 22.50 - 32.00 cm



boy, 219.06 - 450.85 g ağırlık aralığında oldukları saptanmıştır. Mayıs ve temmuz ayında avlanan bireylerde gerek boy ve gerekse ağırlık açısından bir fark gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ). Aynı durum eylül ve kasım ayları arasında da belirlenmiştir. Bu aylarda avlanan örneklerin mayıs ve temmuz aylarındakinden daha düşük boy ve ağırlığa sahip oldukları görülmüştür ( $P<0.05$ ).

**Tablo 1.** Yağ asiti analizi için kullanılan balıkların mevsimlere göre boy (cm) ve ağırlıkları (g)\*

Aylar	<i>L. cephalus</i> (Kefal)		<i>C. chalcoides</i> (Gümüş)		<i>C. carpio</i> (Sazan)	
	Boy (cm) Ort±S.H	Ağırlık (g) Ort±S.H	Boy (cm) Ort±S.H	Ağırlık (g) Ort±S.H	Boy (cm) Ort±S.H	Ağırlık (g) Ort±S.H
<b>Mayıs</b> (İlkbahar)	14.66±1.48a	51.27±14.68a	15.50±0.76ac	58.98±6.98a	34.33±0.88a	818.83±93.58a
<b>Temmuz</b> (Yaz)	18.50±0.28bc	88.10±3.43bc	16.83±0.67a	54.29±6.44a	33.33±0.88a	700.12±64.50a
<b>Eylül</b> (Sonbahar)	16.83±0.33ac	75.23±4.76ab	15.50±0.50ac	50.85±1.73a	23.88±2.40b	250.13±79.52b
<b>Kasım</b> (Kış)	20.00±0.58b	104.44±5.01c	14.33±0.44c	44.37±2.41a	26.00±1.62b	307.98±72.14b

\*: Her veri üç farklı bireyin boy ve ağırlıklarının ortalamasıdır. t: Her bir sütunda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir ( $P>0.05$ ).

**Ort. ±S.H:** Ortalama±Standart Hata.

**Tablo 2.** 2005-2006 yıllarında Tödürge gölünde mayıs, temmuz, eylül ve kasım aylarında ölçülen ortalama su sıcaklık değerleri

Aylar	Mayıs (İlkbahar)	Temmuz (yaz)	Eylül (sonbahar)	Kasım (kış)
Sıcaklık (°C)	12	24	19	6

### 3.1. *C. chalcoides*'in (Gümüş) karaciğer yağ asitlerinde mevsimsel değişim

*C. chalcoides*'in mayıs, temmuz, eylül ve kasım aylarına ait karaciğer yağ asitleri mevsimsel değişimi Tablo 3 ve Şekil 26, 33, 38, 44'de sunulmuştur.

Karaciğer yağ asiti bileşimleri mevsime bağlı olarak kalitatif açıdan bir fark göstermemesine karşın, kantitatif farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Palmitik asit (C16:0), stearik asit (C18:0), palmitoleik asit (C16:1 n-7), oleik asit (C18:1 n-9), C18:1 n-7, linoleik asit (C18:2 n-6), arakidonik asit (C20:4 n-6), eikosapentaenoik asit (C20:5 n-3), dokosapentaenoik asit (C22:5 n-3) ve dokosaheksaenoik asit (C22:6 n-3)'in tüm mevsimlerdeki yağ asitlerinin büyük bir kısmını teşkil ettiği saptanmıştır. Bu yağ asitlerinden en fazla bulunanların ise C16:0, C18:0, C18:1 n-9, C20:4 n-6, 20:5 n-3 ve C22:6 n-3 olduğu görülmüştür.

Karaciğer doymuş yağ asiti (DYA) sınıfının en baskın yağ asitinin C16:0 (%16.76±0.21 - %20.57±0.29) olduğu saptanmakla birlikte, yaz aylarındaki yüksek miktarlarının sonbahar ve kış periyoduna doğru düşüş gösterdiği belirlenmiştir. DYA'da ikinci en yüksek miktara sahip olan C18:0'ın en yüksek oranına ilkbaharda (%12.30±0.30) rastlanmış ve C16:0'a benzer olarak, kış periyotlarına doğru azaldığı görülmüştür.

Karaciğer C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C15:0, C19:0 ve C24:0 yağ asitlerinin tüm mevsimlerde %1'in altında temsil edildikleri saptanmıştır.

Toplam DYA yüzdelerinin ilkbahardan (%38.59±0.30) kışa doğru (%28.59±0.26) önemli ölçüde düştüğü bulunmuştur.

C18:1 n-9, tek çift bağ içeren doymamış yağ asiti (TÇDmYA) sınıfının en yüksek yüzdeye sahip yağ asiti olmuştur. Tüm mevsimlerde istatistiki farklar görülmekle birlikte ( $P<0.05$ ), yazdan itibaren artarak sonbaharda en yüksek seviyeye (%32.96±0.76) ulaşan bu asitin kış periyodunda da (%25.80±.28) yüksek oranlarda temsil edildiği belirlenmiştir. TÇDmYA sınıfının ara metabolitlerinden C16:1 n-7'nin en yüksek miktarına sonbahar (%11.23±0.21) ve kış (%10.91±0.19) mevsiminde rastlanmıştır ( $P>0.05$ ). Bir diğer ara metabolit olan C18:1 n-7 en yüksek oranda ilkbaharda (%7.25±0.08) görülmüştür.

C14:1 n-5, C15:1 n-5, C22:1 n-9 ve C24:1 n-9'un TÇDmYA sınıfının iz miktarlarda temsil edilen yağ asitleri oldukları belirlenmiştir.

Sonbaharda en yüksek yüzdede temsil edilen toplam TÇDmYA'nın (% 51.79±0.24) bir miktar düşüşe rağmen, kış mevsiminde de (% 45.73±0.17) yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Toplam TÇDmYA miktarlarının mevsimlere göre belirgin istatistiki fark gösterdikleri saptanmıştır (P<0.05).

n-6 formu aşırı doymamış yağ asiti (ADmYA) sınıfı içerisinde en yüksek seviyeye sahip olan yağ asitinin C20:4 n-6 olduğu bulunmuştur. Bu yağ asitinin miktarları yazdan itibaren azalarak (% 7.08±0.50) sonbaharda en düşük seviyeye (% 0.97±0.01) ulaşmış ve kış periyodunda (% 4.81±0.30) tekrar artmaya başlamıştır. C18:2 n-6'da C20:4 n-6'ya tamamen benzer değişim göstermiştir.

C18:3 n-6, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C22:2 n-6, C22:4 n-6 ve C22:5 n-6'nın n-6 ADmYA sınıfının %1'in altında temsil edilen yağ asitleri oldukları saptanmıştır.

Toplam n-6 formu ADmYA miktarları tüm mevsimlerde istatistiki farklar göstermekle birlikte (P<0.05), sonbaharda en düşük oranda (% 2.60±0.15) rastlanmış ve kış periyoduyla tekrar artmıştır (% 8.25±0.18).

n-3 formu ADmYA sınıfında C20:5 n-3, yaz (% 7.49±0.51), sonbahar (% 7.06±0.16) ve kış (% 6.84±0.46) periyotlarında herhangi bir değişime uğramamıştır (P>0.05). C22:5 n-3'ün en yüksek yüzdesine ilkbaharda rastlanmış ve eylül ve kasım aylarında belirgin bir düşüşün olduğu gözlenmiştir. n-3 formu ADmYA sınıfı içerisinde en yüksek miktarda temsil edilen C22:6 n-3'e yazın en yüksek oranda (% 17.33±1.03) rastlanmış ve sonbaharda ani bir düşüş (% 5.27±0.21) gösterdikten sonra kış periyoduyla (% 7.86±0.14) birlikte tekrar arttığı gözlenmiştir.

Toplam n-3 ADmYA miktarları mevsimlere göre önemli farklar göstermişlerdir (P<0.05). En yüksek toplam n-3 ADmYA yüzdesi yaz (% 28.95±0.16), en düşük ise üreme periyoduna denk gelen ayları kapsayan sonbaharda (% 14.84±0.12) saptanmış ve kış mevsimiyle birlikte tekrar artmaya başlamıştır. Toplam ADmYA miktarları da toplam n-6 ve n-3 ADmYA miktarlarına benzer paralellikte bir değişim sergilemiştir.

**Tablo 3.** *Chalcalburnus chalcoides*'in karaciğer yağ asitlerinin mevsimsel değişimi (%)

Yağ asitleri	İlkbahar (Mayıs) Ort*±S.H	Yaz (Temmuz) Ort*±S.H	Sonbahar (Eylül) Ort*±S.H	Kış (Kasım) Ort*±S.H
C 8:0	0.03±0.07a	0.03±0.01a	0.01±0.01a	0.02±0.01a
C 10:0	0.06±0.00a	0.03±0.01a	0.01±0.00a	0.03±0.01a
C 11:0	0.05±0.03a	0.09±0.01b	0.09±0.00b	0.15±0.00c
C 12:0	0.12±0.01ab	0.17±0.03b	0.15±0.03b	0.06±0.12a
C 13:0	0.05±0.01a	0.06±0.01a	0.01±0.00b	0.05±0.01a
C 14:0	1.19±0.19a	1.54±0.17a	3.25±0.09b	2.61±0.16c
C 15:0	0.51±0.08a	0.26±0.05b	0.19±0.01b	0.31±0.08b
C 16:0	20.57±0.29a	19.40±0.41a	17.19±0.32b	16.76±0.21b
C 17:0	1.68±0.10a	1.57±0.24a	0.77±0.13b	0.56±0.02b
C 18:0	12.30±0.30a	8.62±0.14b	4.71±0.17c	4.79±0.22c
C 19:0	0.41±0.07a	0.20±0.03b	0.07±0.00c	0.10±0.03bc
C 20:0	0.24±0.03a	0.86±0.08ab	1.35±0.13b	0.96±0.02b
C 21:0	0.29±0.04a	0.77±0.09b	1.42±0.09c	1.15±0.11c
C 22:0	0.80±0.11a	1.21±0.13a	1.18±0.08a	0.82±0.05a
C 24:0	0.31±0.06ac	0.16±0.02bd	0.38±0.01a	0.24±0.03cd
<b>Σ DYA</b>	<b>38.59±0.30a</b>	<b>34.93±0.22b</b>	<b>30.77±0.33c</b>	<b>28.59±0.26c</b>
C 14:1 n-5	0.15±0.02ad	0.08±0.01ab	0.05±0.02b	0.16±0.03d
C 15:1 n-5	0.11±0.01a	0.08±0.01ab	0.05±0.02b	0.07±0.04ab
C 16:1 n-7	4.92±0.08a	6.23±0.14a	11.23±0.21b	10.91±0.19b
C 17:1 n-8	0.77±0.13a	1.04±0.09a	1.29±0.20a	0.96±0.10a
C 18:1 n-9	13.82±0.70a	18.86±0.17b	32.96±0.76c	25.80±0.28d
C 18:1 n-7	7.25±0.08a	4.17±0.13b	4.36±0.17b	5.74±0.11c
C 20:1 n-9	0.14±0.01a	0.96±0.03b	1.80±0.14c	2.03±0.11c
C 22:1 n-9	0.02±0.00a	0.02±0.01a	0.02±0.00a	0.04±0.03a
C 24:1 n-9	0.05±0.01a	0.08±0.04a	0.04±0.01a	0.04±0.01a
<b>Σ TÇDmYA</b>	<b>27.21±0.32a</b>	<b>31.50±0.27b</b>	<b>51.79±0.24c</b>	<b>45.73±0.17d</b>
C 18:2 n-6	2.88±0.12a	1.02±0.06b	0.96±0.04b	1.93±0.15c
C 18:3 n-6	0.48±0.04a	0.11±0.01b	0.09±0.01b	0.22±0.03c
C 20:2 n-6	0.14±0.03a	0.02±0.05a	0.16±0.08a	0.41±0.09b
C 20:3 n-6	0.08±0.01a	0.05±0.02ac	0.02±0.00c	0.03±0.01c
C 20:4 n-6	7.08±0.50a	3.06±0.14b	0.97±0.01c	4.81±0.30d
C 22:2 n-6	0.03±0.01a	0.01±0.00a	0.03±0.02a	0.04±0.04a
C 22:4 n-6	0.10±0.02a	0.35±0.04ab	0.30±0.08a	0.66±0.17b
C 22:5 n-6	0.23±0.04a	0.12±0.01ab	0.07±0.01b	0.21±0.06ab
<b>Σ n-6 ADmYA</b>	<b>11.02±0.19a</b>	<b>4.62±0.11b</b>	<b>2.60±0.15c</b>	<b>8.25±0.18d</b>
C 18:3 n-3	1.07±0.04a	0.31±0.05b	0.37±0.02b	0.70±0.05c
C 20:3 n-3	0.03±0.01a	0.04±0.01a	0.20±0.03b	0.06±0.01a
C 20:5 n-3	5.52±0.33a	7.49±0.51b	7.06±0.16b	6.84±0.46b
C 22:3 n-3	0.03±0.01a	0.01±0.00a	0.25±0.05b	0.05±0.01a
C 22:5 n-3	4.53±0.01a	3.69±0.02b	1.74±0.19c	1.90±0.23c
C 22:6 n-3	12.07±0.15a	17.33±1.03b	5.27±0.21c	7.86±0.14d
<b>Σ n-3 ADmYA</b>	<b>23.21±0.19a</b>	<b>28.95±0.16b</b>	<b>14.84±0.12c</b>	<b>17.43±0.20d</b>
<b>Σ ADmYA</b>	<b>34.23±0.28a</b>	<b>33.57±0.24a</b>	<b>17.44±0.14b</b>	<b>25.68±0.21c</b>

\*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. t: Her satırda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. S.H: Standart Hata. Σ DYA: Toplam doymuş yağ asiti. Σ TÇDmYA: Toplam tek çift bağ içeren doymamış yağ asiti. Σ n-6 ADmYA: Toplam n-6 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ n-3 ADmYA: Toplam n-3 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ ADmYA: Toplam aşırı doymamış yağ asiti.

### 3.2. *L. cephalus*'un (Kefal) karaciğer yağ asitlerinde mevsimsel değişim

*L. cephalus*'un mayıs, temmuz, eylül ve kasım aylarını kapsayan, karaciğer yağ asitleri mevsimsel değişimi Tablo 4 ve Şekil 27, 32, 39, 45'de sunulmaktadır.

Karaciğer yağ asiti bileşimleri mevsime bağlı olarak kalitatif açıdan bir fark göstermemesine karşın, kantitatif farklar gösterdiği tespit edilmiştir. C16:0, C18:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C18:2 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün karaciğer yağ asitlerinin büyük bir kısmını teşkil ettiği saptanmıştır. Bu yağ asitlerinden en fazla bulunanların ise C16:0, C18:0, C18:1 n-9, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 olduğu görülmüştür.

C16:0'm, karaciğer DYA'nin en yüksek yüzdedeği yağ asiti olduğu belirlenmiş ve sonbahardan (eylül) itibaren düşüş göstererek kış periyodunda (kasım) en düşük seviyeye ulaşmıştır (% 17.46±0.27). C16:0'm, eylül ayında en yüksek yüzdeye (% 25.93±0.53) sahip olduğu saptanmıştır. DYA'inden C18:0'm en yüksek seviyesi ilkbahar (% 8.48±0.27), en düşük ise kış periyodunda (% 4.34±0.08) gözlenmiştir (P<0.05)

Karaciğer C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C15:0, C19:0, C21:0 ve C24:0 yağ asitlerinin tüm mevsimlerde %1'in altında temsil edildikleri saptanmıştır.

İlkbahar (% 33.83±0.26) ve yaz (% 32.16±0.31) periyotlarında fark göstermeyen toplam DYA miktarının sonbaharda en yüksek (% 43.38±0.29) olduğu ve kış periyoduyla (% 28.80±0.24) birlikte bir hayli azaldığı gözlenmiştir.

*L. cephalus*'ta da karaciğer TÇDmYA'nin en baskın yağ asiti C18:1 n-9'dur. Bu yağ asitinin kış periyodunda (% 18.79±0.74) en yüksek seviyeye ulaştığı ve değişimin diğer mevsimlerden önemli ölçüde farklı olduğu belirlenmiştir (P<0.05). Ara metabolitlerden C16:1 n-7 ve C18:1 n-7'nin, sonbaharda artmaya başlayarak kış mevsiminde en yüksek yüzdeye (sırasıyla % 18.03±0.34 ve % 13.61±0.48) sahip oldukları tespit edilmiştir.

C14:1 n-5, C15:1 n-5, C22:1 n-9 ve C24:1 n-9'un tüm mevsimlerde %1'in altında temsil edilen yağ asitleridir. C14:1 n-5, C15:1 n-5 ve C20:1 n-9'un kışın oranları düşükte olsa artış göstermiştir.

Yaz aylarında düşüş gösteren toplam TÇDmYA (% 23.39±0.21), sonbahar itibariyle (%33.64±0.24) artmaya başlamış ve kış periyodunda en yüksek yüzdede (% 28.80±0.24) gözlenmiştir.

54.64±0.37) bulunmuştur. Mevsimlere göre toplam TÇDmYA miktarlarının birbirlerinden belirgin istatistiki fark gösterdikleri görülmüştür (P<0.05).

n-6 formu ADmYA sınıfının en yüksek yüzdede ki yağ asiti olan C20:4 n-6'nın yazın % 6.27±0.15'ye ulaştığı, sonbahar (% 3.33±0.21) ve kış (% 2.66±0.13) aylarında azaldığı belirlenmiştir. n-6 ADmYA içerisinde ikinci derecede önem arzeden C18:2 n-6, % 1.72±0.12 – 2.71±0.17 arasında değişim göstermiş ve en düşük değere kasım en yüksek ise mayıs ayında rastlanmıştır.

C18:3 n-6, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C22:2 n-6, C22:4 n-6 ve C 22:5 n-6'nın % 1'in altında temsil edilen n-6 formu ADmYA oldukları bulunmuştur. Bu yağ asitlerinde kışın azalma kaydedilmiş, C22:2 n-6 hariç diğerleri yaz ve sonbaharda diğer mevsimlere göre artış göstermişlerdir.

Toplam n-6 ADmYA yüzdeleri mevsimlere göre istatistiksel farklar göstermekle birlikte (P<0.05), sonbahar (% 7.51±0.33) ve kış (% 5.11±0.18) periyotları boyunca düşüş göstermiştir.

n-3 formu ADmYA içerisinde, C20:5 n-3'ün en yüksek yüzdesine yaz ayında (temmuz) rastlanırken (% 9.32±0.57), sonbahardan itibaren düşüş göstererek (% 6.13±0.33) kışın (kasım) en düşük yüzdeye (% 3.39±0.41) sahip olmuştur. C22:5 n-3'ün sonbahar ve kış periyotları boyunca azaldığı, temmuzda ise en yüksek yüzdeye (% 3.45±0.10) ulaştığı belirlenmiştir. C22:6 n-3, yazın en yüksek değerde bulunurken (% 20.45±0.31), sonbahar itibarıyla bir hayli düşüş gösterdiği (% 6.13±0.18) ve kış periyodunda en düşük değere indiği görülmüştür (P>0.05).

Toplam n-3 formu ADmYA miktarları mevsimlere göre istatistiksel farklar göstermekle birlikte (P<0.05), en düşük miktar kış periyodunda saptanmıştır. Toplam ADmYA miktarları da toplam n-6 ve n-3 ADmYA miktarlarına benzer paralellikte bir değişim profili sergilemiştir.

**Tablo 4.** *Leuciscus cephalus*'un (Kefal) karaciğer yağ asitlerinin mevsimsel değişimi (%)

Yağ asitleri	İlkbahar (Mayıs) Ort*±S.H	Yaz (Temmuz) Ort*±S.H	Sonbahar (Eylül) Ort*±S.H	Kış (Kasım) Ort*±S.H
C 8:0	0.02±0.01a	0.04±0.02a	0.02±0.00a	0.02±0.01a
C 10:0	0.06±0.04a	0.05±0.03ab	0.03±0.01ab	0.01±0.00b
C 11:0	0.05±0.04a	0.14±0.01b	0.44±0.06c	0.11±0.01ab
C 12:0	0.24±0.06a	0.13±0.04ab	0.16±0.03ab	0.09±0.01b
C 13:0	0.02±0.01a	0.06±0.02b	0.06±0.00b	0.07±0.04b
C 14:0	1.36±0.10a	1.44±0.03a	2.44±0.30b	3.23±0.44b
C 15:0	0.57±0.24a	0.37±0.02a	0.58±0.10a	0.92±0.10b
C 16:0	19.88±0.32a	19.05±0.54a	25.93±0.53b	17.46±0.27c
C 17:0	1.44±0.14ac	1.65±0.37ab	2.36±0.21b	0.72±0.16c
C 18:0	8.48±0.27a	6.61±0.11b	7.14±0.27b	4.34±0.08b
C 19:0	0.26±0.09a	0.28±0.02a	0.28±0.00a	0.14±0.07b
C 20:0	0.21±0.03a	0.62±0.18b	1.16±0.26c	0.38±0.11ab
C 21:0	0.18±0.15a	0.73±0.11b	0.69±0.12bc	0.35±0.03ac
C 22:0	0.97±0.09a	0.81±0.11a	1.26±0.15b	0.84±0.09a
C 24:0	0.10±0.02a	0.21±0.08a	0.86±0.12b	0.15±0.04a
<b>Σ DYA</b>	<b>33.83±0.26a</b>	<b>32.16±0.31a</b>	<b>43.38±0.29b</b>	<b>28.80±0.24c</b>
C 14:1 n-5	0.19±0.06a	0.27±0.02a	0.18±0.11a	0.73±0.09b
C 15:1 n-5	0.10±0.02a	0.20±0.06a	0.28±0.16a	0.55±0.13b
C 16:1 n-7	7.78±0.19a	4.44±0.33b	7.60±0.22a	18.03±0.34c
C 17:1 n-8	1.31±0.31a	0.81±0.16a	1.16±0.42a	1.82±0.20a
C 18:1 n-9	11.18±0.64a	11.71±0.40a	16.61±0.35b	18.79±0.74c
C 18:1 n-7	9.74±0.27a	4.83±0.11b	6.84±0.24c	13.61±0.48d
C 20:1 n-9	0.26±0.02ab	0.74±0.17ac	0.85±0.25c	1.09±0.03c
C 22:1 n-9	0.02±0.01a	0.36±0.11b	0.05±0.02a	0.02±0.00a
C 24:1 n-9	0.02±0.01a	0.05±0.02ab	0.09±0.04b	0.01±0.00a
<b>Σ TÇDmYA</b>	<b>30.57±0.32a</b>	<b>23.39±0.21b</b>	<b>33.64±0.24c</b>	<b>54.64±0.37d</b>
C 18:2 n-6	2.71±0.17a	2.04±0.08b	2.48±0.19ac	1.72±0.12b
C 18:3 n-6	0.15±0.02ac	0.24±0.02ab	0.21±0.05ab	0.09±0.02c
C 20:2 n-6	0.07±0.02a	0.15±0.02a	0.60±0.11b	0.25±0.06a
C 20:3 n-6	0.06±0.02a	0.08±0.02a	0.05±0.00a	0.03±0.01a
C 20:4 n-6	5.03±0.01a	6.27±0.15b	3.33±0.21c	2.66±0.13d
C 22:2 n-6	0.02±0.00a	0.02±0.01a	0.01±0.00a	0.02±0.00a
C 22:4 n-6	0.30±0.06a	0.47±0.07ab	0.69±0.11b	0.25±0.08a
C 22:5 n-6	0.16±0.08a	0.27±0.04a	0.17±0.00a	0.13±0.05a
<b>Σ n-6 ADmYA</b>	<b>8.50±0.21a</b>	<b>9.50±0.27b</b>	<b>7.51±0.33c</b>	<b>5.11±0.18d</b>
C 18:3 n-3	0.84±0.09a	1.54±0.12b	0.73±0.10a	0.64±0.06a
C 20:3 n-3	0.04±0.01a	0.10±0.03b	0.09±0.00b	0.08±0.00ab
C 20:5 n-3	6.00±0.21a	9.32±0.57b	6.13±0.33a	3.39±0.41c
C 22:3 n-3	0.04±0.01a	0.11±0.04a	0.07±0.00a	0.66±0.18b
C 22:5 n-3	2.84±0.25a	3.45±0.10b	2.35±0.20a	1.31±0.06c
C 22:6 n-3	17.37±0.56a	20.45±0.31b	6.13±0.18c	5.39±0.23c
<b>Σ n-3 ADmYA</b>	<b>27.10±0.25a</b>	<b>34.97±0.23b</b>	<b>15.50±0.18c</b>	<b>11.47±0.16d</b>
<b>Σ ADmYA</b>	<b>35.60±0.28a</b>	<b>44.47±0.26b</b>	<b>23.01±0.22c</b>	<b>16.58±0.15d</b>

\*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. t: Her satırda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. S.H: Standart Hata. Σ DYA: Toplam doymuş yağ asiti. Σ TÇDmYA: Toplam tek çift bağ içeren doymamış yağ asiti. Σ n-6 ADmYA: Toplam n-6 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ n-3 ADmYA: Toplam n-3 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ ADmYA: Toplam aşırı doymamış yağ asiti.

### 3.3. *C. carpio*'nun (Sazan) karaciğer yağ asitlerinde mevsimsel değişim

*C. carpio*'nun mayıs, temmuz, eylül ve kasım aylarına ait karaciğer yağ asitlerinin mevsimsel değişimi Tablo 5'te ve Şekil 28, 34, 40, 46'da sunulmuştur.

Bu türde de karaciğer yağ asiti bileşimleri mevsime bağlı olarak kalitatif açıdan bir fark göstermemesine karşın, kantitatif farklılıkların olduğu belirlenmiştir. C16:0, C18:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C18:2 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün tüm mevsimlerdeki yağ asitlerinin büyük bir kısmını teşkil ettiği saptanmıştır. Bu yağ asitlerinden en fazla bulunanların ise C16:0, C18:0, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C18:2 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 olduğu görülmüştür.

DYA sınıfında en fazla bulunan C16:0'ın en yüksek yüzdesine yazın (% 21.96±0.32) rastlanmakla birlikte, sonbahar ve kış periyotlarına doğru azaldığı saptanmıştır. C18:0'ın (% 4.01±0.10 – 8.65±0.11) tüm mevsimlerde istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür (P<0.05). Bu yağ asitinde de kış periyodunda azalma olmuştur.

C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C19:0, C20:0 ve C24:0'ın tüm mevsimlerde % 1'in altında temsil edildikleri saptanmıştır. Bu yağ asitleri mevsimlere göre farklı değişim göstermişlerdir.

Tüm mevsimlerde istatistiki açıdan farklı olduğu görülen toplam DYA (P<0.05), yazın en yüksek yüzdede (% 38.42±0.22) olmakla birlikte, sonbahar periyodunda en düşük yüzdeye (% 26.20±0.11) sahip olduğu bulunmuştur.

Karaciğer TÇDmYA'ndan en fazla yüzdeye sahip yağ asitleri C18:1 n-9 (% 7.90±0.32 – 12.93±0.28) ve C18:1 n-7 (% 8.17±0.41 – 11.43±0.33) olup, tüm mevsimlerde farklı bir değişim göstermişlerdir (P<0.05). Bu yağ asitleri sonbaharda en yüksek yüzdeye ulaşmış ve kış periyodunda ise düşüş olmuştur. Bir diğer ara metabolit olan C16:1 n-7'nin (% 4.90±0.14 – 9.08±0.07) tüm mevsimlerde farklı bir değişim sergilemiştir (P<0.05). Kışın en düşük, yaz ve sonbaharda yüksek orana sahiptir.

C14:1 n-5, C15:1 n-5, C22:1 n-9 ve C24:1 n-9'un *C. carpio* karaciğerinde % 1'in altında bir değere sahip oldukları gözlenmiştir. C24:1 n-9 hiçbir değişim göstermezken diğerleri kışın artış göstermiştir.



Yaz dönemi (% 34.26±0.21) itibariyle artış gösteren toplam TÇDmYA'nın sonbaharda (% 37.38±0.26) en yüksek yüzdede olduğu ve kış periyodunda en düşük yüzdeye (% 24.57±0.31) gerilediği görülmüştür.

n-6 formu ADmYA'den C18:2 n-6'da en düşük yüzdeye (% 2.79±0.08) kış periyodunda rastlanmıştır. C20:4 n-6 yaz periyodundan sonra sonbahar ve kış periyotları süresince artış (% 3.09±0.06 – 5.37±0.21) göstermiştir.

C18:3 n-6, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C22:2 n-6, C22:4 n-6 ve C22:5 n-6'nın n-6 formu ADmYA içerisinde en düşük yüzdelere sahip (% 1'in altında) yağ asitleri olduğu saptanmıştır. Bu yağ asitleriyle birlikte, toplam n-6 ADmYA, mayıs ve temmuz aylarında önemli bir değişim göstermemesine rağmen, eylülde en yüksek seviyeye (% 13.27±0.26) sahip olmuştur. Ancak kasım ayında önemli bir azalma (% 9.92±0.15) göstermiştir (P<0.05).

n-3 formu ADmYA'nden C18:3 n-3, % 0.33±0.05 – 2.14±0.08 arasında bir değişim göstermiştir. Temmuz ve eylül aylarına ait değerlerin yüksek ve benzer oldukları görülmüştür. C20:3 n-3 mayıs, temmuz ve eylül aylarında çok düşük (% 1'in altında) değere sahipken, kışın (kasım) % 2.81±0.17'lik değere yükselmiştir. C20:5 n-3'ün sadece ilkbaharda (mayıs) çok küçük bir istatistik fark gösterdiği ve mevsime göre pek değişim göstermediği saptanmıştır. C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 mevsime bağlı olarak benzer bir değişim profili sergileyerek, *C. carpio*'nun üreme aylarına rastlayan yaz periyodunda en düşük saptanan miktarları, sonbahar ve kış periyotları süresinde artış göstermiştir.

Yaz periyodunda en düşük yüzdelere temsil edilen toplam n-3 ADmYA ve toplam ADmYA miktarları sonbaharda artarak, kış döneminde en yüksek yüzdede oldukları tespit edilmiştir. Tüm mevsimlerde istatistiksel farkların olduğu görülmüştür. Bu yağ asitlerinde görülen mevsimsel değişimlerin önemli olduğu belirlenmiştir (P<0.05).

**Tablo 5.** *Cyprinus carpio*'nun (Sazan) karaciğer yağ asitlerinin mevsimsel değişimi (%)

Yağ asitleri	İlkbahar (Mayıs) Ort*±S.H	Yaz (Temmuz) Ort*±S.H	Sonbahar (Eylül) Ort*±S.H	Kış (Kasım) Ort*±S.H
C 8:0	0.05±0.01a	0.02±0.00a	0.03±0.00a	0.06±0.01a
C 10:0	0.07±0.02a	0.04±0.00a	0.04±0.01a	0.06±0.02a
C 11:0	0.10±0.02a	0.04±0.01a	0.21±0.06a	0.82±0.10b
C 12:0	0.28±0.04a	0.20±0.02ab	0.09±0.01b	0.18±0.07ab
C 13:0	0.04±0.00a	0.04±0.00a	0.05±0.01a	0.16±0.07b
C 14:0	1.38±0.11ac	2.01±0.17b	1.15±0.00a	1.65±0.10bc
C 15:0	0.79±0.06a	0.80±0.11a	0.97±0.02a	1.00±0.04a
C 16:0	17.60±0.16a	21.96±0.32b	15.66±0.38c	16.03±0.31c
C 17:0	1.65±0.13ad	1.91±0.09ab	1.28±0.03c	2.11±0.14cd
C 18:0	8.65±0.11a	7.14±0.10b	4.01±0.10c	6.03±0.05d
C 19:0	0.08±0.00a	0.32±0.09b	0.31±0.05b	0.45±0.09b
C 20:0	0.16±0.02a	0.82±0.10b	0.25±0.03a	0.84±0.10b
C 21:0	0.24±0.04a	1.17±0.16b	0.21±0.02a	0.54±0.07c
C 22:0	1.38±0.02a	1.37±0.10a	1.75±0.08b	1.83±0.04b
C 24:0	0.28±0.01a	0.60±0.05b	0.23±0.04a	0.13±0.08c
<b>Σ DYA</b>	<b>32.71±0.37a</b>	<b>38.42±0.22b</b>	<b>26.20±0.02c</b>	<b>31.87±0.16d</b>
C 14:1 n-5	0.26±0.00a	0.36±0.01ab	0.31±0.05a	0.48±0.07b
C 15:1 n-5	0.15±0.01a	0.57±0.09b	0.63±0.01b	0.57±0.07b
C 16:1 n-7	5.58±0.14a	9.08±0.07b	7.93±0.25c	4.90±0.14d
C 17:1 n-8	1.12±0.06ab	0.86±0.08a	1.36±0.25b	0.83±0.10a
C 18:1 n-9	9.04±0.17a	12.29±0.21b	12.93±0.28c	7.90±0.32d
C 18:1 n-7	9.40±0.11a	8.55±0.05b	11.43±0.33c	8.17±0.41d
C 20:1 n-9	1.97±0.05a	2.50±0.06b	2.71±0.18b	1.57±0.13c
C 22:1 n-9	0.06±0.01ab	0.04±0.01a	0.07±0.00b	0.13±0.02c
C 24:1 n-9	0.04±0.00a	0.05±0.01a	0.02±0.00a	0.02±0.00a
<b>Σ TÇDmYA</b>	<b>27.60±0.33a</b>	<b>34.26±0.21b</b>	<b>37.38±0.26c</b>	<b>24.57±0.31d</b>
C 18:2 n-6	3.81±0.14a	5.98±0.27b	6.38±0.04b	2.79±0.08c
C 18:3 n-6	0.35±0.02a	0.32±0.04b	0.27±0.08c	0.26±0.00c
C 20:2 n-6	0.17±0.01a	0.13±0.04a	0.75±0.11b	0.78±0.09b
C 20:3 n-6	0.10±0.00ab	0.10±0.01ab	0.08±0.04a	0.13±0.04b
C 20:4 n-6	5.37±0.21a	3.09±0.06b	4.70±0.16c	5.00±0.23ac
C 22:2 n-6	0.03±0.00a	0.02±0.00a	0.08±0.02b	0.06±0.02a
C 22:4 n-6	0.09±0.01a	0.45±0.11b	0.45±0.08b	0.62±0.09b
C 22:5 n-6	0.13±0.01a	0.18±0.01a	0.32±0.03b	0.30±0.03b
<b>Σ n-6 ADmYA</b>	<b>10.03±0.17a</b>	<b>10.25±0.12a</b>	<b>13.27±0.26b</b>	<b>9.92±0.15a</b>
C 18:3 n-3	0.61±0.04a	2.14±0.08b	2.02±0.04b	0.33±0.05c
C 20:3 n-3	0.11±0.00a	0.06±0.01a	0.79±0.10b	2.81±0.17b
C 20:5 n-3	7.68±0.31a	6.41±0.05b	6.47±0.10b	6.13±0.08b
C 22:3 n-3	0.12±0.05a	0.03±0.01a	2.16±0.09b	2.80±0.17c
C 22:5 n-3	4.41±0.14a	2.94±0.09b	3.45±0.17c	6.71±0.25d
C 22:6 n-3	16.75±0.36a	5.50±0.14b	8.25±0.20c	14.89±0.27d
<b>Σ n-3 ADmYA</b>	<b>29.67±0.22a</b>	<b>17.08±0.13b</b>	<b>23.14±0.09c</b>	<b>33.64±0.32d</b>
<b>Σ ADmYA</b>	<b>39.70±0.30a</b>	<b>27.33±0.21b</b>	<b>36.41±0.14c</b>	<b>43.56±0.41d</b>

\*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. t: Her satırda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. S.H: Standart Hata. Σ DYA: Toplam doymuş yağ asiti. Σ TÇDmYA: Toplam tek çift bağ içeren doymamış yağ asiti. Σ n-6 ADmYA: Toplam n-6 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ n-3 ADmYA: Toplam n-3 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ ADmYA: Toplam aşırı doymamış yağ asiti.

### 3.4. *C. chalcoides*'in (Gümüş) kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi

*C. chalcoides*'in mayıs, temmuz, eylül ve kasım aylarına ait kas dokusu yağ asitleri mevsimsel değişimi Tablo 6'da ve Şekil 29, 35, 41, 47'de sunulmuştur.

Kas dokusu yağ asiti bileşimleri karaciğerdeki gibi mevsime bağlı olarak kalitatif fark göstermemekle birlikte, kantitatif farkların olduğu belirlenmiştir. Kas dokusu genel yağ asiti bileşimlerinin C14:0, C16:0, C18:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C18:2 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3'ten meydana geldiği belirlenmiştir. Bu yağ asitleri içerisinde en fazla bulunanların ise C16:0, C18:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C20:4 n-6, C20:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün olduğu görülmüştür.

DYA'ndan C14:0'in (% 2.16±0.12 - 5.63±0.14) mevsimsel dağılımında istatistiki olarak fark olduğu saptanmıştır. DYA arasında en yüksek yüzdede bulunan C16:0'in (% 15.75±0.19 - 19.48±0.27) en yüksek değeri yaz periyodunda gözlenmiş ve kış periyodunda bir düşüş olmuştur. C18:0'in en yüksek yüzdesi yaz periyodunda (% 8.40±0.23) bulunmakla birlikte, sonbahar ve kış periyotlarındaki değerler arasında bir fark olmadığı belirlenmiştir (P>0.05). Heneikosanoik asit (C21:0)'in *C. chalcoides*'in kas dokusunda bütün mevsimlerde % 1.22±0.13 - 3.32±0.18 arasında temsil edildiği belirlenmiştir. C20:0, temmuz ve eylülde (% 2.36±0.08, 3.02±0.21) artış göstermesine rağmen, kasım ayında düşüş (% 1.57±0.10) gözlenmiştir.

C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C19:0, C22:0 ve C24:0'ın bütün mevsimlerde çok düşük yüzdelerde (%1'in altında) temsil edildikleri saptanmıştır. Bu yağ asitlerinde de mevsimlere bağlı olarak çeşitli değişimlerin olduğu kaydedilmiştir.

Mevsimsel olarak istatistiki fark gösteren toplam DYA miktarı (P<0.05), yaz döneminde (% 41.65±0.37) en yüksek seviyeye ulaşarak, sonbahar (% 37.62±0.35) ve kış periyotları (% 28.97±0.19) boyunca bu değer in kademeli olarak düştüğü gözlenmiştir.

İlkbaharda % 9.11±0.19 seviyesinde olan C16:1 n-7, yaz periyodunda düşüş göstermiş (% 5.02±0.26), sonbahar (eylül) ve kış (kasım) periyotlarında ise tekrar artış göstermiştir (% 7.98±0.31 - 9.85±0.22). C18:1 n-9'un TÇDmYA'nin en yüksek oranlarda temsil edilen yağ asiti olduğu ve yaz periyodunda (% 10.10±0.37) düşen miktarlarının sonbahar itibarıyla (% 20.30±0.61) artarak kışın en yüksek yüzdeye (% 22.68±0.33) ulaşmıştır. C18:1 n-7'de de C18:1 n-9'a benzer bir değişim gözlenmiştir.

Bu yağ asitinde en yüksek yüzdeye kış ve ilkbahar mevsimlerinde rastlanmıştır (% 5.12±0.20 - 6.62±0.11).

C14:1 n-5, C15:1 n-5, C22:1 n-9 ve C24:1 n-9'un karaciğerde olduğu gibi kas dokuda da TÇDmYA sınıfının % 1'in altında temsil edilen yağ asitleri olduğu saptanmıştır. Bu yağ asitleri ve C17:1 n-8, C20:1 n-9 düşük yüzdelerde olsalarda yüksek yüzdedeki yağ asitlerine benzer bir değişim profili sergilemişlerdir.

*C. chalcoides*'in kas dokusunda yazın en düşük yüzdede temsil edilen toplam TÇDmYA (% 21.12±0.26), sonbahar itibariyle (% 34.43±0.19) artışa geçtiği ve kış periyodunda en yüksek yüzdede (% 40.04±0.22) olduğu belirlenmiş ve mevsime bağlı olarak istatistiki farklar ortaya çıkmıştır ( $P<0.05$ ). Bu toplam yağ asitlerinde kış mevsimi sonrası ilkbahar sezonunda, kışa göre azalma olduğu kaydedilmiştir.

n-6 formu ADmYA'den C18:2 n-6 (%2.22±0.20 - 4.88±0.49 ) ve C20:4 n-6 (% 1.06±0.11 - 5.49±0.22) mevsimlere bağlı olarak benzer bir değişim profili sergilemiştir. C20:4 n-6'da farklılıkların daha belirgin olduğu saptanmıştır. Yaz periyodundan itibaren düşüş gösteren bu asitlerin en düşük seviyeye sonbaharda inmişler ve kış periyoduyla birlikte tekrar artış olduğu ortaya çıkmıştır.

C18:3 n-6, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C22:2 n-6, C22:4 n-6 ve C22:5 n-6 kas dokusunda n-6 formu ADmYA'nın en düşük yüzdeye sahip (% 1'in altında) yağ asitleridir. Bu yağ asitlerinden C18:3 n-6 ve C20:2 n-6 hariç diğerlerinde önemli bir değişim saptanmamıştır.

Toplam n-6 ADmYA miktarlarının tüm mevsimlerde istatistiksel farklar göstermekle birlikte ( $P<0.05$ ), yaz (% 6.00±0.11) ve sonbahar (% 4.19±0.15) itibariyle azalan miktarlarının kış periyodunda (% 8.12±0.13) arttığı belirlenmiştir.

n-3 formu ADmYA'de C20:5 n-3'ün yaz ve sonbahar dönemlerindeki yüksek miktarlarının farksız oldukları ortaya çıkmıştır. C22:5 n-3 (% 2.51±0.17 - 3.44±0.02) ve C22:6 n-3'ün (% 7.18±0.88 - 13.06±0.10) mevsime bağlı olarak benzer bir değişim profili sergiledikleri görülmüştür. Her iki yağ asitinin de yazın en yüksek yüzdede olduğu, sonbahar döneminde ise önemli düşüş kaydedilmiştir. Kış döneminde tekrar arttığı saptanmıştır. C22:6 n-3'te değişimlerin daha belirgin olduğu görülmektedir.

Toplam n-3 ADmYA miktarları mevsimlere göre istatistiksel fark göstermekle birlikte ( $P<0.05$ ), sonbahar periyodunda görülen düşüşün kış itibariyle tekrar artışa

**Tablo 6.** *Chalcalburnus chalcoides*'in kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi (%)

Yağ asitleri	İlkbahar (Mayıs) Ort*±S.H	Yaz (Temmuz) Ort*±S.H	Sonbahar (Eylül) Ort*±S.H	Kış (Kasım) Ort*±S.H
C 8:0	0.01±0.00a	0.09±0.02b	0.01±0.01a	0.01±0.00a
C 10:0	0.02±0.00a	0.13±0.03b	0.02±0.00a	0.01±0.00a
C 11:0	0.02±0.00a	0.35±0.05b	0.26±0.03b	0.12±0.01a
C 12:0	0.13±0.04a	0.33±0.04b	0.18±0.02a	0.13±0.02a
C 13:0	0.02±0.00a	0.29±0.09b	0.05±0.01a	0.02±0.00a
C 14:0	2.16±0.12a	2.65±0.08b	5.63±0.14c	2.94±0.10d
C 15:0	0.45±0.04a	1.25±0.10b	0.42±0.11a	0.42±0.05a
C 16:0	15.75±0.19a	19.48±0.27b	18.93±0.32b	16.06±0.44a
C 17:0	0.77±0.13a	2.20±0.17b	0.91±0.00a	0.65±0.15a
C 18:0	5.06±0.25a	8.40±0.23b	3.05±0.15c	3.92±0.53c
C 19:0	0.14±0.03a	0.79±0.12b	0.16±0.06a	0.13±0.04a
C 20:0	0.95±0.10a	2.36±0.08b	3.02±0.21c	1.57±0.10d
C 21:0	1.22±0.13ac	2.44±0.02bc	3.32±0.18b	2.07±0.44c
C 22:0	0.71±0.02a	0.72±0.01a	0.91±0.05b	0.72±0.02a
C 24:0	0.21±0.00a	0.21±0.00a	0.79±0.08b	0.21±0.01a
<b>Σ DYA</b>	<b>27.58±0.22a</b>	<b>41.65±0.37b</b>	<b>37.62±0.35c</b>	<b>28.97±0.19d</b>
C 14:1 n-5	0.17±0.01a	0.74±0.09b	0.15±0.03a	0.16±0.02a
C 15:1 n-5	0.11±0.00a	0.23±0.03b	0.09±0.01a	0.08±0.00a
C 16:1 n-7	9.11±0.19a	5.02±0.26b	7.98±0.31c	9.85±0.22a
C 17:1 n-8	1.15±0.08a	0.62±0.06b	1.21±0.12a	1.21±0.05a
C 18:1 n-9	19.65±0.59a	10.10±0.37b	20.30±0.61c	22.68±0.33d
C 18:1 n-7	6.62±0.11a	3.89±0.27b	3.56±0.18b	5.12±0.20c
C 20:1 n-9	1.11±0.35a	0.44±0.03b	0.98±0.10ab	0.88±0.05ab
C 22:1 n-9	0.02±0.00a	0.04±0.01a	0.05±0.01a	0.04±0.01a
C 24:1 n-9	0.04±0.01a	0.05±0.01a	0.12±0.03b	0.03±0.00a
<b>Σ TÇDmYA</b>	<b>37.97±0.38a</b>	<b>21.12±0.26b</b>	<b>34.43±0.19c</b>	<b>40.04±0.22d</b>
C 18:2 n-6	4.88±0.49a	2.54±0.16bc	2.22±0.20b	3.44±0.25c
C 18:3 n-6	0.35±0.02a	0.19±0.06ab	0.11±0.04b	0.25±0.09ab
C 20:2 n-6	0.18±0.06abc	0.18±0.01abc	0.08±0.02b	0.31±0.05c
C 20:3 n-6	0.05±0.01a	0.18±0.04b	0.08±0.02a	0.04±0.01a
C 20:4 n-6	5.49±0.22a	2.50±0.30b	1.06±0.11c	3.54±0.17d
C 22:2 n-6	0.02±0.00a	0.04±0.01a	0.02±0.01a	0.02±0.01a
C 22:4 n-6	0.57±0.27a	0.21±0.08a	0.43±0.01a	0.39±0.11a
C 22:5 n-6	0.33±0.12a	0.17±0.02a	0.24±0.03a	0.13±0.01a
<b>Σ n-6 ADmYA</b>	<b>11.84±0.24a</b>	<b>6.00±0.11b</b>	<b>4.19±0.15c</b>	<b>8.12±0.13d</b>
C 18:3 n-3	1.46±0.15	0.86±0.03	0.86±0.09	1.22±0.07
C 20:3 n-3	0.03±0.01a	0.22±0.08b	0.27±0.04b	0.02±0.00a
C 20:5 n-3	9.24±0.13a	13.62±0.70b	12.85±0.46b	10.77±0.15c
C 22:3 n-3	0.03±0.01a	0.05±0.00a	0.10±0.01b	0.03±0.02a
C 22:5 n-3	3.31±0.18a	3.44±0.02a	2.51±0.17b	2.82±0.07b
C 22:6 n-3	8.53±0.27a	13.06±0.10b	7.18±0.88c	8.04±0.60ac
<b>Σ n-3 ADmYA</b>	<b>22.60±0.12a</b>	<b>31.25±0.18b</b>	<b>23.77±0.29c</b>	<b>22.88±0.10d</b>
<b>Σ ADmYA</b>	<b>34.44±0.26a</b>	<b>37.25±0.21b</b>	<b>27.96±0.33c</b>	<b>31.00±0.14d</b>

\*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. t: Her satırda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. S.H: Standart Hata. Σ DYA: Toplam doymuş yağ asiti. Σ TÇDmYA: Toplam tek çift bağ içeren doymamış yağ asiti. Σ n-6 ADmYA: Toplam n-6 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ n-3 ADmYA: Toplam n-3 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ ADmYA: Toplam aşırı doymamış yağ asiti.

geçtiği gözlenmiştir. Toplam ADmYA miktarlarının da mevsimlere göre anlamlı derecede farklı olduğu tablodan anlaşılmaktadır.

Genel olarak toplam doymuş yağ asitlerinin yaz ve sonbahar mevsimlerindeki yüksek değerlerinin kışın azaldığı, buna karşın tüm doymamış yağ asitlerinde ise (TÇDmYA ve ADmYA) kışın artış olduğu söylenebilir.

### **3.5. *L. cephalus*'un (Kefal) kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi**

*L. cephalus*'un mayıs, temmuz, eylül ve kasım aylarına ait kas dokusu yağ asitleri mevsimsel değişimleri Tablo 7 ve Şekil 30, 36, 42, 48'de sunulmuştur.

Kas dokusu yağ asitleri bileşimi mevsimsel olarak kalitatif bir fark göstermemiştir ancak kantitatif farkların olduğu saptanmıştır. Tablo 7'den de görülebileceği gibi, en yüksek yüzdeye sahip olan yağ asitlerinin DYA'dan C14:0, C16:0 ve C18:0, TÇDmYA'dan C16:1 n-7, C18:1 n-9 ve C18:1 n-7, n-6 ADmYA'den C18:2 n-6 ve C20:4 n-6, n-3 ADmYA'lerinde ise C20:5 n-3, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 olduğu görülmektedir. Bu yağ asitlerinden en fazla bulunanların ise C16:0, C18:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C18:2 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 olduğu saptanmıştır.

DYA'da C14:0'ın en yüksek miktarı sonbaharda görülmüş (% 2.97±0.28) ve diğer mevsimlerden farklı olduğu belirlenmiştir (P<0.05). DYA sınıfının en baskın yağ asitlerinden olan C16:0 sonbahar periyodunda en yüksek yüzdeye iken, kış periyodunda azaldığı saptanmıştır. C18:0'ın ilkbahar (% 7.97±0.56) ve yazın (% 6.34±0.32) yüksek olan değeri kış mevsiminde azalma göstermiştir (% 5.28±0.18).

C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C19:0 ve C24:0 en düşük yüzdeyle (% 1'in altında) temsil edilen yağ asitleridir. C19:0, C20:0, C21:0 ve C22:0'da mevsimsel bir değişim gözlenmemiştir.

Toplam DYA tüm mevsimlerde istatistiksel fark göstermiştir (P<0.05). En yüksek yüzdeye sonbaharda rastlanmış ancak kış periyodunda hissedilir derecede azalmıştır.

TÇDmYA'den C16:1 n-7'nin en düşük miktarına sonbahar (% 4.87±0.25) en yüksek ise kış periyodunda (% 8.71±0.51) rastlanmış ve bu değerlerin diğer mevsimlere göre farklı oldukları belirlenmiştir (P<0.05). C18:1 n-9, en yüksek yüzdeye kış periyodunda ulaşmış, diğer mevsimlerde farklılık göstermemiştir. C18:1 n-7 ilkbahar ve

yaz periyodunda değişim göstermezken, sonbaharda önemli derecede azalmış ve kışın çok önemli bir artış göstermiştir.

C14:1 n-5, C15:1 n-5, C20:1 n-9, C22:1 n-9 ve C24:1 n-9'un TÇDmYA sınıfının %1'in altında temsil edilen yağ asitleri olmuştur. C14:1 n-5 ve C15:1 n-5 hariç diğerlerinde herhangi bir değişim belirlenmemiştir.

Toplam TÇDmYA mevsimlere göre farklılık göstermesiyle birlikte ( $P<0.05$ ), sonbaharda düşüş ( $\% 21.32\pm 0.10$ ), kış periyodunda ise artış ( $\% 33.74\pm 0.12$ ) gösterdiği belirlenmiştir.

n-6 formu ADmYA sınıfı içerisinde, gerek C18:2 n-6 ( $\% 2.85\pm 0.09 - 3.60\pm 0.11$ ) gerekse C20:4 n-6'nın ( $\% 3.30\pm 0.08 - 4.45\pm 0.14$ ) mevsime göre benzer bir değişim profili sergilediği ve her ikisinde sonbaharda görülen en düşük değerlerin kış periyodunda arttığı saptanmıştır. Kas dokusunda C18:3 n-6, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C22:2 n-6, C22:4 n-6 ve C22:5 n-6'nın, n-6 ADmYA sınıfının en düşük seviyeye sahip yağ asitleri oldukları belirlenmiştir.

Toplam n-6 ADmYA miktarlarında yaz ( $\% 7.68\pm 0.10$ ) ve sonbahar ( $\% 7.43\pm 0.07$ ) periyotlarında fark görülmemekle birlikte ( $P>0.05$ ), kış periyodunda ( $\% 8.13\pm 0.13$ ) artışı gözlenmiştir.

C18:3 n-3, mevsimlere göre kayda değer değişim göstermemiştir. Ancak kış mevsiminde azda olsa azalmıştır. C20:5 n-3'te istatistiki farklar görülmüş ( $P<0.05$ ) ve bu yağ asitine en fazla sonbaharda ( $\% 12.65\pm 0.12$ ) rastlanmıştır. Sonbaharda en düşük yüzdede ( $\% 2.88\pm 0.11$ ) temsil edilen C22:5 n-3'ün kış periyoduyla birlikte arttığı belirlenmiştir. C22:6 n-3'de  $\% 15.10\pm 0.12 - 17.77\pm 0.24$  arasında değişim göstermiştir. En düşük miktarı sonbahar ve kışın saptanmasıyla birlikte, ilkbahar ve yazın önemli denecek oranda artış görülmüştür.

Toplam n-3 ADmYA miktarının, en düşük kış periyodunda olduğu belirlenmiş ( $\% 28.38\pm 0.09$ ) ve mevsimlere göre istatistiki fark göstermiştir ( $P<0.05$ ). Toplam n-6 ve n-3 ADmYA'ndeki dalgalanmalara bağlı olarak toplam ADmYA'nde de mevsimlere göre değişim olmuştur. Bu yağ asitleri yüzdelерinde kış periyodunda azalma meydana gelmiştir.

**Tablo 7.** *Leuciscus cephalus*'un kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi (%)

Yağ asitleri	İlkbahar (Mayıs) Ort*±S.H	Yaz (Temmuz) Ort*±S.H	Sonbahar (Eylül) Ort*±S.H	Kış (Kasım) Ort*±S.H
C 8:0	0.12±0.02a	0.02±0.00b	0.02±0.00b	0.01±0.00b
C 10:0	0.18±0.04a	0.02±0.00b	0.03±0.01b	0.02±0.00b
C 11:0	0.25±0.02a	0.02±0.00b	0.38±0.05c	0.24±0.04a
C 12:0	0.60±0.12a	0.17±0.04b	0.33±0.07b	0.11±0.02b
C 13:0	0.11±0.02ac	0.03±0.00b	0.06±0.02b	0.07±0.00bc
C 14:0	1.76±0.02a	2.00±0.17a	2.97±0.28b	2.12±0.06a
C 15:0	0.47±0.03	0.57±0.13	0.85±0.25	1.00±0.20
C 16:0	18.22±0.13a	20.33±0.21b	22.56±0.28c	17.09±0.11d
C 17:0	0.61±0.00a	1.05±0.21ab	1.36±0.21b	1.04±0.03ab
C 18:0	7.97±0.56a	6.34±0.32b	5.98±0.27b	5.28±0.17b
C 19:0	0.26±0.02a	0.29±0.01a	0.23±0.03a	0.23±0.01a
C 20:0	0.65±0.08a	0.74±0.01a	1.57±0.32b	0.80±0.09a
C 21:0	0.61±0.06a	1.12±0.16b	1.53±0.07c	0.60±0.06a
C 22:0	1.00±0.12a	0.88±0.22a	0.81±0.11a	1.10±0.12a
C 24:0	0.17±0.01a	0.01±0.00b	0.42±0.17c	0.07±0.02b
<b>Σ DYA</b>	<b>32.96±0.19a</b>	<b>33.58±0.25b</b>	<b>39.06±0.22c</b>	<b>29.75±0.13d</b>
C 14:1 n-5	0.23±0.04a	0.16±0.02a	0.14±0.01a	0.69±0.09b
C 15:1 n-5	0.18±0.02ab	0.15±0.07a	0.12±0.00a	0.36±0.05b
C 16:1 n-7	7.41±0.35ac	6.66±0.48a	4.87±0.25b	8.71±0.51c
C 17:1 n-8	0.74±0.02a	0.68±0.11a	0.71±0.01a	1.19±0.21b
C 18:1 n-9	10.71±0.40a	11.32±0.24a	10.96±0.38a	13.33±0.12b
C 18:1 n-7	6.40±0.11a	6.00±0.20a	4.09±0.17b	8.83±0.28c
C 20:1 n-9	0.44±0.02a	0.37±0.02a	0.35±0.09a	0.56±0.10a
C 22:1 n-9	0.07±0.02a	0.09±0.02a	0.04±0.01a	0.04±0.01a
C 24:1 n-9	0.07±0.02a	0.02±0.00a	0.07±0.00a	0.04±0.01a
<b>Σ TÇDmYA</b>	<b>26.23±0.37a</b>	<b>25.42±0.11b</b>	<b>21.32±0.10c</b>	<b>33.74±0.12d</b>
C 18:2 n-6	3.60±0.11a	3.44±0.25a	2.85±0.09b	2.44±0.13b
C 18:3 n-6	0.32±0.07a	0.15±0.01b	0.17±0.04b	0.14±0.03b
C 20:2 n-6	0.11±0.02a	0.07±0.01a	0.29±0.08b	0.27±0.04b
C 20:3 n-6	0.11±0.01a	0.05±0.00b	0.08±0.02ab	0.05±0.02b
C 20:4 n-6	3.52±0.05ab	3.78±0.10b	3.30±0.08a	4.45±0.14c
C 22:2 n-6	0.09±0.01a	0.01±0.00b	0.02±0.00b	0.07±0.02c
C 22:4 n-6	0.22±0.03a	0.03±0.01b	0.57±0.04c	0.50±0.06c
C 22:5 n-6	0.39±0.03a	0.18±0.05b	0.19±0.01b	0.24±0.02b
<b>Σ n-6 ADmYA</b>	<b>8.32±0.05a</b>	<b>7.68±0.10b</b>	<b>7.43±0.07b</b>	<b>8.13±0.13a</b>
C 18:3 n-3	1.25±0.03a	1.21±0.04a	1.28±0.01a	1.04±0.02b
C 20:3 n-3	0.18±0.01ac	0.05±0.00b	0.20±0.05a	0.11±0.01bc
C 20:5 n-3	9.48±0.10a	11.72±0.17b	12.65±0.12c	8.14±0.21d
C 22:3 n-3	0.28±0.04a	0.20±0.06a	0.05±0.02b	0.24±0.03a
C 22:5 n-3	3.54±0.08a	3.97±0.21a	2.88±0.11b	3.71±0.14a
C 22:6 n-3	17.77±0.24a	16.14±0.14b	15.16±0.19c	15.10±0.12c
<b>Σ n-3 ADmYA</b>	<b>32.50±0.18a</b>	<b>33.31±0.11b</b>	<b>32.22±0.10c</b>	<b>28.38±0.09d</b>
<b>Σ ADmYA</b>	<b>40.82±0.16a</b>	<b>40.99±0.10a</b>	<b>39.65±0.11b</b>	<b>36.51±0.13c</b>

\*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. t: Her satırda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. S.H: Standart Hata. Σ DYA: Toplam doymuş yağ asiti. Σ TÇDmYA: Toplam tek çift bağ içeren doymamış yağ asiti. Σ n-6 ADmYA: Toplam n-6 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ n-3 ADmYA: Toplam n-3 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ ADmYA: Toplam aşırı doymamış yağ asiti.



### 3.6. *C. carpio*'nun (Sazan) kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi

*C. carpio*'nun mayıs, temmuz, eylül ve kasım aylarına ait kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimleri Tablo 8 ve Şekil 31, 37, 43, 49'da sunulmuştur.

Kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişiminde kantitatif farkların olduğu saptanmıştır. Kas dokusunda otuzsekiz yağ asiti içerisinde C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C18:2 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün en fazla bulunanlardır.

DYA'ndan C14:0'ın sadece ilkbaharda (%2.59±0.11), C15:0'ın ise yaz mevsiminde (% 3.30±0.12) yüksek miktarlarda olduğu bulunmuştur. C17:0'ın ilkbaharda yüksek olan miktarı yazın azalmış, sonbaharda tekrar artarak kışın en düşük seviyeye inmiştir. Aynı dalgalanma C20:0'de de görülmektedir. C16:0, gerek DY A içerisinde gerekse diğer yağ asiti sınıfları içerisinde tüm mevsimlerde en yüksek seviyeye sahip olmuştur. Bu asit, yazdan itibaren artarak (% 20.77±0.39), eylül ayında (% 27.96±1.19) en yüksek seviyesine ulaşmış ve kış periyodunda önemli derecede azalmıştır. C18:0, tüm mevsimlerde belirgin istatistiksel farklar göstermiş (P<0.05) ve kış periyodunda en düşük seviyeye ulaşmıştır (%6.68±0.11 - 14.76±0.30).

C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C19:0 ve C24:0'ın % 1'in altında temsil edilmelerine rağmen mevsimsel olarak önemli dalgalanmalar göstermişlerdir. Bu yağ asitlerinin en düşük seviyelerine kış mevsiminde rastlanmıştır.

Toplam DY A miktarı mevsimlere göre istatistiki farklar göstermekle birlikte (P<0.05), sonbaharda en yüksek yüzdede (% 54.34±1.10) olduğu ve kış periyodunda ise en düşük seviyeye indiği (% 30.77±0.11) ortaya çıkmıştır.

TÇDmYA'da ara metabolitler olan C16:1 n-7 (% 4.23±0.09 - 6.98±0.14) ve C18:1 n-7'nin (% 6.48±0.23 - 9.35±0.20) en düşük miktarlarına yaz döneminde rastlanmış ve kış periyoduyla birlikte artış gösterdikleri bulunmuştur. C14:1 n-5 ve C15:1 n-5 çok düşük miktarlarda bulunmalarına rağmen, kışın daha düşük seviyeye inmişlerdir. TÇDmYA'nın en yüksek yüzdeye sahip yağ asiti olan C18:1 n-9, en fazla kış periyodunda bulunmuş (% 13.36±0.30) ve bu değer ilkbahar ve yaz mevsimlerindeki değerlerden (% 10.50±0.18 - 10.29±0.21) farklı olduğu görülmüştür (P<0.05).

C14:1 n-5, C15:1 n-5, C17:1 n-8, C20:1 n-9, C22:1 n-9 ve C24:1 n-9'un TÇDmYA sınıfının % 1'in altında temsil edilen yağ asitleri oldukları saptanmıştır.

Toplam TÇDmYA miktarlarındaki dağılımın (% 22.32±0.15 - 31.01±0.19 arasında) mevsime göre farklı olduğu (P<0.05) ve yaz döneminde en düşük yüzdede olduğu belirlenmiştir.

C18:2 n-6'nın yaz (% 3.43±0.09) ve sonbahar (% 3.30±0.12) periyotlarında düşen miktarlarının kışın arttığı (% 5.41±0.18) görülmüştür. C20:4 n-6'nın yazın en yüksek yüzdede (% 7.79±0.35) olduğu, sonbahar itibariyle en düşük değere indiği (% 2.98±0.11) ve kışın ise artış gösterdiği (% 7.72±0.28) belirlenmiştir.

C18:3 n-6, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C22:2 n-6, C22:4 n-6 ve C22:5 n-6 çok düşük yüzdelerde temsil edilmektedirler. Bu yağ asitlerinden C22:5 n-6 hariç diğerlerinde önemli bir değişim gözlenmemiştir.

*C. carpio*'nun kas dokusu n-6 formu ADmYA'nin toplam yüzdelerinde mayıs ve temmuz aylarında istatistiki olarak önemli bir değişim görülmezken, eylül ayında en düşük seviyeye (% 7.75±0.17) inmiştir. Kasım ayı yüzdesi en yüksek değer olarak kaydedilmiştir (% 15.05±0.16) ve diğer mevsimlerden oldukça farklı olduğu belirlenmiştir.

C18:3 n-3'ün ilkbahar (1.19±0.08) ve yaz (1.33±0.08) periyotlarındaki değerlerinin diğer mevsimlerden yüksek olduğu ve sonbahar, kış mevsimlerinde azaldığı gözlenmektedir. C20:5 n-3 mevsimlere göre önemli fark göstermiş (P<0.05) ve sonbaharda en düşük yüzdeye sahiptir (% 2.57±0.11). Bu yağ asitinde sonbahara göre kışın çok önemli bir artış olmuştur. C22:5 n-3 ve C22:6 n-3'te de C20:5 n-3'de görülen değişime benzer değişim gözlenmiştir. Bu asitlerde kış mevsiminde sonbahara göre çok önemli artışlar meydana gelmiştir. C22:6 n-3'teki artış oldukça fazladır.

Gerek toplam n-3 ADmYA gerekse toplam ADmYA miktarlarındaki mevsime bağlı değişimler istatistiki önem arz etmektedir (P<0.05) ve özellikle sonbaharda oldukça azalma meydana gelmesine rağmen kışın ve diğer mevsimlerde önemli artışlar olmuştur.

**Tablo 8.** *Cyprinus carpio* (Sazan) kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimleri (%)

Yağ asitleri	İlkbahar (Mayıs) Ort*±S.H	Yaz (Temmuz) Ort*±S.H	Sonbahar (Eylül) Ort*±S.H	Kış (Kasım) Ort*±S.H
C 8:0	0.02±0.00a	0.08±0.01b	0.06±0.02ab	0.02±0.00a
C 10:0	0.06±0.00a	0.06±0.02a	0.09±0.00a	0.02±0.00b
C 11:0	0.16±0.02a	0.04±0.00b	0.13±0.02a	0.57±0.06c
C 12:0	0.29±0.04a	0.09±0.01b	0.42±0.07c	0.13±0.03b
C 13:0	0.09±0.00a	0.03±0.01a	0.50±0.07b	0.09±0.01a
C 14:0	2.59±0.11a	0.84±0.07b	1.84±0.04c	0.75±0.06b
C 15:0	2.10±0.05a	3.30±0.12b	1.58±0.05c	1.38±0.12c
C 16:0	17.12±0.50a	20.77±0.39b	27.96±1.19c	17.92±0.55a
C 17:0	2.00±0.05a	1.42±0.12b	3.30±0.09c	1.33±0.12b
C 18:0	8.33±0.17a	9.97±0.22b	14.76±0.30c	6.68±0.11d
C 19:0	0.22±0.02a	0.54±0.04b	0.45±0.06b	0.25±0.03a
C 20:0	1.07±0.04a	0.21±0.03b	1.72±0.06c	0.66±0.03d
C 21:0	1.01±0.06a	0.30±0.03b	0.31±0.00b	0.19±0.05b
C 22:0	1.03±0.01a	1.07±0.04a	0.67±0.10b	0.79±0.05b
C 24:0	0.38±0.03a	0.04±0.00b	0.57±0.07c	0.04±0.00b
<b>Σ DYA</b>	<b>36.45±0.13a</b>	<b>38.71±0.10b</b>	<b>54.34±1.10c</b>	<b>30.77±0.11d</b>
C 14:1 n-5	0.48±0.07a	0.09±0.01b	0.91±0.13c	0.10±0.02b
C 15:1 n-5	0.29±0.05ac	0.50±0.06b	0.46±0.08ab	0.17±0.2c
C 16:1 n-7	5.37±0.11a	4.23±0.09b	5.38±0.20a	6.98±0.14c
C 17:1 n-8	0.82±0.06a	0.45±0.09b	0.71±0.06a	0.62±0.01ab
C 18:1 n-9	10.50±0.18a	10.29±0.21a	13.36±0.30b	13.59±0.28b
C 18:1 n-7	8.19±0.11a	6.48±0.23b	9.35±0.20c	7.77±0.16a
C 20:1 n-9	0.98±0.05a	0.21±0.03b	0.65±0.12c	0.77±0.06ac
C 22:1 n-9	0.06±0.01a	0.05±0.01a	0.09±0.02a	0.11±0.02a
C 24:1 n-9	0.08±0.00ab	0.03±0.01a	0.11±0.04b	0.03±0.00a
<b>Σ TÇDmYA</b>	<b>26.75±0.13a</b>	<b>22.32±0.15b</b>	<b>31.01±0.19c</b>	<b>30.12±0.14d</b>
C 18:2 n-6	5.28±0.11a	3.43±0.09b	3.30±0.12b	5.41±0.18a
C 18:3 n-6	0.35±0.02a	0.26±0.04a	0.30±0.07a	0.29±0.01a
C 20:2 n-6	0.28±0.05a	0.17±0.04a	0.42±0.23b	0.33±0.07ab
C 20:3 n-6	0.09±0.01a	0.04±0.00a	0.44±0.08b	0.19±0.05a
C 20:4 n-6	5.01±0.16a	7.79±0.35b	2.98±0.11c	7.72±0.28b
C 22:2 n-6	0.06±0.01a	0.01±0.00a	0.02±0.00a	0.05±0.01a
C 22:4 n-6	0.37±0.04a	0.07±0.01b	0.23±0.06a	0.39±0.05a
C 22:5 n-6	0.26±0.03ab	0.37±0.06a	0.10±0.00b	0.71±0.12c
<b>Σ n-6 ADmYA</b>	<b>11.67±0.09a</b>	<b>12.14±0.12a</b>	<b>7.75±0.17b</b>	<b>15.05±0.16c</b>
C 18:3 n-3	1.19±0.08a	1.33±0.08a	0.69±0.03b	0.69±0.05b
C 20:3 n-3	0.09±0.01a	0.05±0.01a	0.90±0.13b	0.17±0.03c
C 20:5 n-3	12.69±0.24a	10.37±0.36b	2.57±0.11c	8.64±0.28d
C 22:3 n-3	0.07±0.01a	0.39±0.05b	0.18±0.05a	0.20±0.03a
C 22:5 n-3	5.27±0.16a	4.76±0.17b	1.25±0.06c	3.70±0.12d
C 22:6 n-3	5.84±0.13a	9.98±0.22b	1.33±0.14c	10.67±0.37d
<b>Σ n-3 ADmYA</b>	<b>25.15±0.09a</b>	<b>26.85±0.12b</b>	<b>6.92±0.18c</b>	<b>24.07±0.22d</b>
<b>Σ ADmYA</b>	<b>36.82±0.12a</b>	<b>38.99±0.20b</b>	<b>14.67±0.16c</b>	<b>39.12±0.19b</b>

\*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. t: Her satırda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. S.H: Standart Hata. Σ DYA: Toplam doymuş yağ asiti. Σ TÇDmYA: Toplam tek çift bağ içeren doymamış yağ asiti. Σ n-6 ADmYA: Toplam n-6 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ n-3 ADmYA: Toplam n-3 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ ADmYA: Toplam aşırı doymamış yağ asiti.

### **3.7. *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer toplam yağ asiti miktarlarının mevsimsel olarak karşılaştırılması**

*C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğer toplam yağ asiti bileşimleri Tablo 9'da sunulmuştur.

Toplam DYA, *C. chalcoides* (% 34.93±0.22) ve *C. carpio*'da (% 38.42±0.22) yazın, *L. cephalus*'ta ise sonbahar periyodunda (% 43.38±0.29) en yüksek oranlarda bulunmuş ve kış periyoduyla birlikte düşüş kaydedilmiştir. Toplam TÇDmYA miktarları mevsimsel olarak önemli dalgalanmalar göstermiştir. Buna göre en yüksek oranlar *C. chalcoides* (% 51.79±0.24) ve *C. carpio*'da (% 37.38±0.26) sonbahar periyodunda, *L. cephalus*'ta ise kış periyodunda (% 54.64±0.37) belirlenmiştir.

Toplam n-6 formu ADmYA miktarlarının yaz periyodundan itibaren azalarak sonbaharda en düşük oranlarına ulaştığı görülmüştür. Toplam n-3 formu ADmYA'nın en düşük miktarları *C. chalcoides* ve *L. cephalus* için sonbahar (sırasıyla % 14.84±0.12 ve % 15.50±0.18), *C. carpio* için ise yaz periyodunda (% 17.08±0.13) belirlenmiştir. bu verilere göre *C. carpio* hariç diğer türlerde toplam ADmYA miktarlarının sonbahar periyodunda azaldığı, kış periyoduyla birlikte arttığı saptanmıştır.

### **3.8. *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* kas dokusu toplam yağ asiti miktarlarının mevsimsel olarak karşılaştırılması**

*C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun kas dokusu toplam yağ asiti bileşimleri Tablo 10'da sunulmuştur.

Yaz ve sonbahar periyotlarında yüksek oranlarda olan toplam DYA'nın tüm türlerde kış periyoduyla birlikte düşüş gösterdiği belirlenmiştir (*C. chalcoides*'te % 28.97±0.19, *L. cephalus*'ta % 29.75±0.13 ve *C. carpio*'da % 30.77±0.11). Toplam TÇDmYA'nın en yüksek miktarları *C. chalcoides* (% 40.04±0.22) ve *L. cephalus*'ta (% 33.74±0.12) kışın, *C. carpio*'da ise sonbahar periyodunda (% 31.01±0.19) belirlenmiştir.

Toplam n-6 formu ADmYA tüm türlerde sonbahar periyodunda en düşük miktarlarda bulunmuştur (*C. chalcoides*'te % 4.19±0.15, *L. cephalus*'ta % 7.43±0.07 ve *C. carpio*'da % 7.75±0.17). Kış periyoduyla birlikte n-6 formu ADmYA miktarlarının önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Toplam n-3 ADmYA miktarları *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'ta sonbahar ve kış periyotlarında düşük miktarlarda bulunurken, *C. carpio*'da kış periyodunda hissedilir bir artış saptanmıştır. Sonbahar periyodunda tüm

türlerin kas dokusunda düşüş gösteren toplam ADmYA miktarları, kış periyoduyla birlikte artış göstermiştir.

**Tablo 9.** *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer toplam yağ asiti miktarlarının mevsimsel olarak karşılaştırılması (%)

		İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış
ΣDYA	<i>C. chalcoides</i>	38.59±0.30a	34.93±0.22b	30.77±0.33c	28.59±0.26c
	<i>L. cephalus</i>	33.83±0.26a	32.16±0.31a	43.38±0.29b	28.80±0.24c
	<i>C. carpio</i>	32.71±0.37a	38.42±0.22b	26.20±0.02c	31.87±0.16d
ΣTÇDmYA	<i>C. chalcoides</i>	27.21±0.32a	31.50±0.27b	51.79±0.24c	45.73±0.17d
	<i>L. cephalus</i>	30.57±0.32a	23.39±0.21b	33.64±0.24c	54.64±0.37d
	<i>C. carpio</i>	27.60±0.33a	34.26±0.21b	37.38±0.26c	24.57±0.31d
Σn-6 ADmYA	<i>C. chalcoides</i>	11.02±0.19a	4.62±0.11b	2.60±0.15c	8.25±0.18d
	<i>L. cephalus</i>	8.50±0.21a	9.50±0.27b	7.51±0.33c	5.11±0.18d
	<i>C. carpio</i>	10.03±0.17a	10.25±0.12a	13.27±0.26b	9.92±0.15a
Σn-3 ADmYA	<i>C. chalcoides</i>	23.21±0.19a	28.95±0.16b	14.84±0.12c	17.43±0.20d
	<i>L. cephalus</i>	27.10±0.25a	34.97±0.23b	15.50±0.18c	11.47±0.16d
	<i>C. carpio</i>	29.67±0.22a	17.08±0.13b	23.14±0.09c	33.64±0.32d
ΣADmYA	<i>C. chalcoides</i>	34.23±0.28a	33.57±0.24a	17.44±0.14b	25.68±0.21c
	<i>L. cephalus</i>	35.60±0.28a	44.47±0.26b	23.01±0.22c	16.58±0.15d
	<i>C. carpio</i>	39.70±0.30a	27.33±0.21b	36.41±0.14c	43.56±0.41d

**Tablo 10.** *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* kas dokusu toplam yağ asiti miktarlarının mevsimsel olarak karşılaştırılması (%)

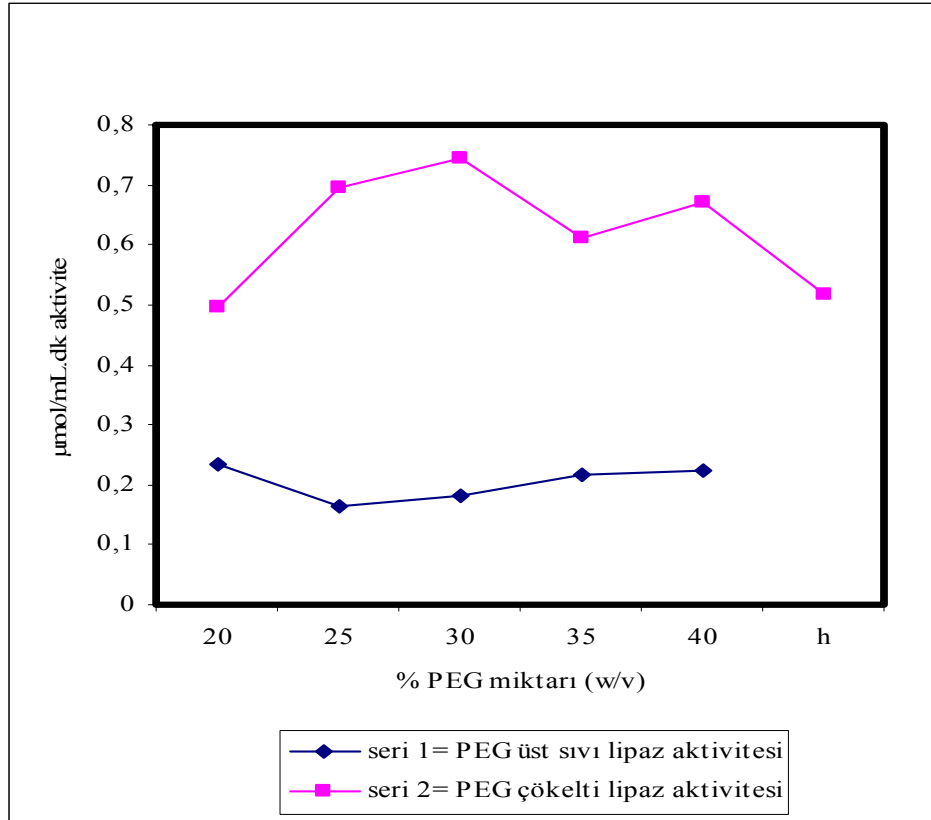
		İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış
ΣDYA	<i>C. chalcoides</i>	27.58±0.22a	41.65±0.37b	37.62±0.35c	28.97±0.19d
	<i>L. cephalus</i>	32.96±0.19a	33.58±0.25b	39.06±0.22c	29.75±0.13d
	<i>C. carpio</i>	36.45±0.13a	38.71±0.10b	54.34±1.10c	30.77±0.11d
ΣTÇDmYA	<i>C. chalcoides</i>	37.97±0.38a	21.12±0.26b	34.43±0.19c	40.04±0.22d
	<i>L. cephalus</i>	26.23±0.37a	25.42±0.11b	21.32±0.10c	33.74±0.12d
	<i>C. carpio</i>	26.75±0.13a	22.32±0.15b	31.01±0.19c	30.12±0.14d
Σn-6 ADmYA	<i>C. chalcoides</i>	11.84±0.24a	6.00±0.11b	4.19±0.15c	8.12±0.13d
	<i>L. cephalus</i>	8.32±0.05a	7.68±0.10b	7.43±0.07b	8.13±0.13a
	<i>C. carpio</i>	11.67±0.09a	12.14±0.12a	7.75±0.17b	15.05±0.16c
Σn-3 ADmYA	<i>C. chalcoides</i>	22.60±0.12a	31.25±0.18b	23.77±0.29c	22.88±0.10d
	<i>L. cephalus</i>	32.50±0.18a	33.31±0.11b	32.22±0.10c	28.38±0.09d
	<i>C. carpio</i>	25.15±0.09a	26.85±0.12b	6.92±0.18c	24.07±0.22d
ΣADmYA	<i>C. chalcoides</i>	34.44±0.26a	37.25±0.21b	27.96±0.33c	31.00±0.14d
	<i>L. cephalus</i>	40.82±0.16a	40.99±0.10a	39.65±0.11b	36.51±0.13c
	<i>C. carpio</i>	36.82±0.12a	38.99±0.20b	14.67±0.16c	39.12±0.19b

\*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. t: Her satırda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. S.H: Standart Hata. Σ DYA: Toplam doymuş yağ asiti. Σ TÇDmYA: Toplam tek çift bağ içeren doymamış yağ asiti. Σ n-6 ADmYA: Toplam n-6 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ n-3 ADmYA: Toplam n-3 formu aşırı doymamış yağ asiti. Σ ADmYA: Toplam aşırı doymamış yağ asiti.

### 3.9. Karaciğer lipazının saflaştırılması

*C. carpio*, *L. cephalus* ve *C. chalcoides*'in karaciğer lipazlarının saflaştırma işlemlerine geçilmeden önce homejenatta bulunan proteinlerin PEG-6000 ile çöktürülmeleri ve değişen pH'larda kolona bağlanmaları test edilmiştir.

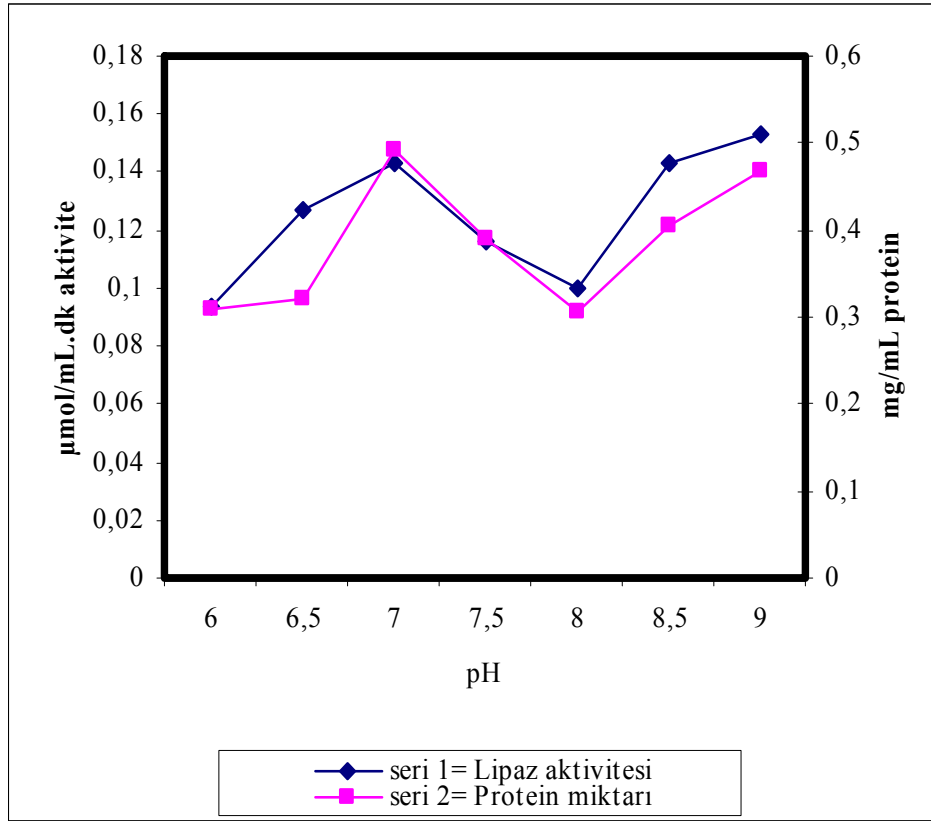
PEG çöktürme çalışmaları sonucunda % 20 (w/v) oranında PEG ilavesinin proteinleri çöktürmede yeterli olmadığı gözlenmiştir (Şekil 1). Artan PEG konsantrasyonuna bağlı olarak daha fazla proteinin çökeldiği ve lipaz aktivitesinin de çökeltide yer aldığı saptanmıştır. Burada belirtilmesi gereken bir husus, % 30 (w/v) oranındaki PEG'un homojenata ilavesiyle elde edilen çökelti protein miktarı ve lipaz aktivitesinin, % 35 ve 40 oranlarındaki PEG ilavesinden daha fazla olmasıdır.



Şekil 1. PEG-6000 protein çöktürmesi üst sıvı ve çökelti lipaz aktiviteleri (h, homojenatı belirtmektedir. Homojenat uygun oranlarda seyreltilmiştir)

PEG-6000 ile çökeltme işlemi sonucunda, %30 (w/v) PEG-6000 uygulamasının gerek proteinleri çöktürmede gerekse çökeltide temsil edilen aktivitede en uygun oran olduğu gözlenmiştir.

Çökeltme işlemi sonrasında elde edilen proteinlerin fraksiyonlanmasında kullanılan iyon değişim kromatografisi şartlarının belirlenmesi amacıyla, farklı pH'larda (6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 ve 9) dengelenen eşit hacimli Q sefaroz materyaline, seyreltilmiş olan % 30 PEG çökeltisinden 100'er µL ilave edilmiştir. Materyal iyice karıştırıldıktan sonra üst sıvıdan alınan örneklerde protein absorbansı ve lipaz absorbans değerleri elde edilmiş ve Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Q sefaroz iyon değişim kolonuna proteinlerin bağlanmasının test edilmesi.

Kolona bağlanma denemeleri sonucunda, pH'nın 7, 8.5 ve 9 olduğu durumlarda üst sıvıda elde edilen aktivite ve protein miktarının fazla olduğu görülmüştür. Buna karşın, pH'nın 6, 6.5 ve 8 olduğu durumlarda ise kolona etkin bir bağlanma gözlenmiştir. Materyal ve metot kısmında bahsedilen aktivite prosedürü ile uygun olması nedeniyle kolon dengeleme işlemleri esnasında kullanılacak olan pH'nın 8 olması kararlaştırılmıştır.

### 3.9.1. *C. chalcoides*'in karaciğer lipazının saflaştırılması

#### 3.9.1.1. Q sefaroz anyon değişim kromatografisi ile saflaştırma

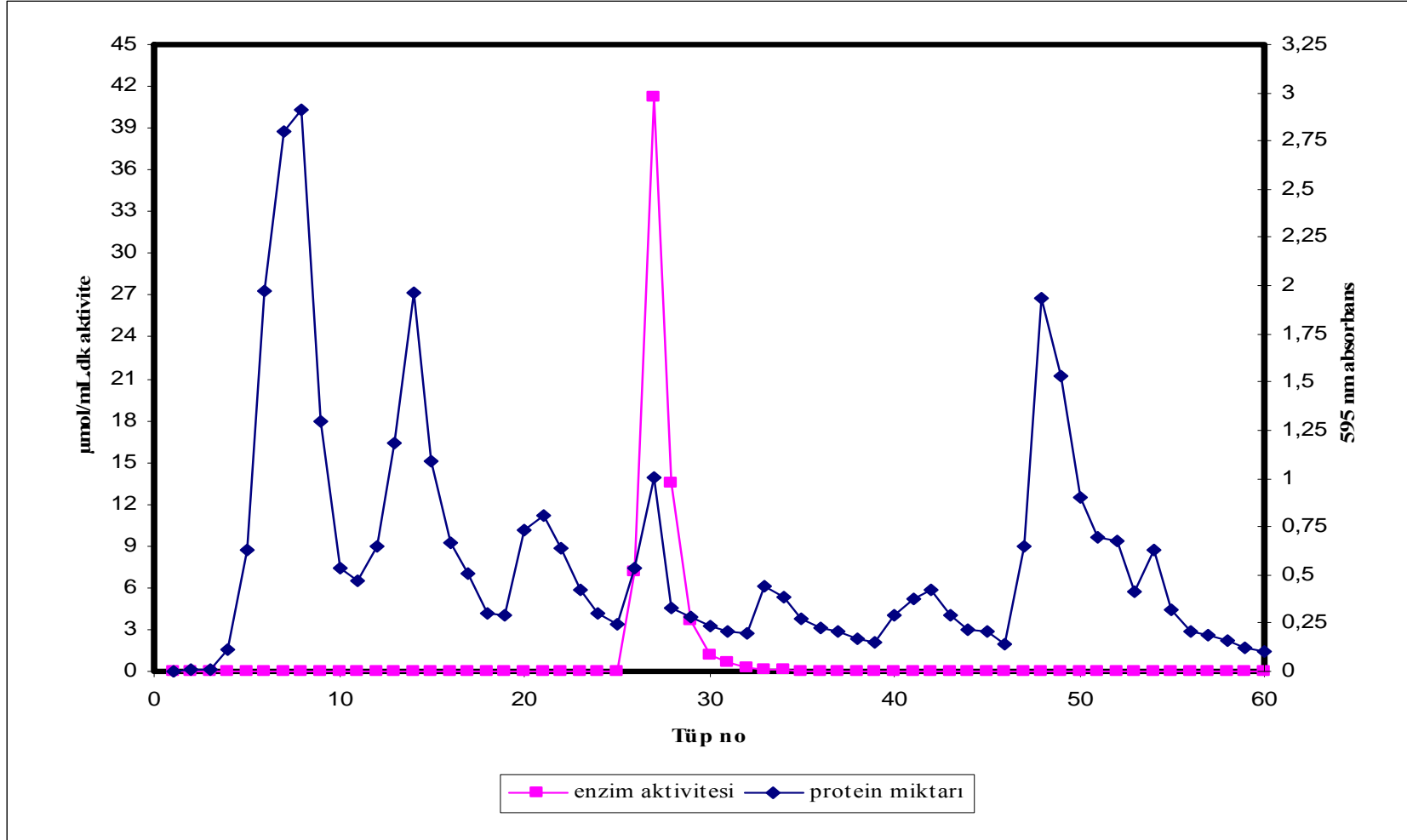
Materyal metod kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanan kolon dolgu maddesine 214 mg protein ve 246 µmol/dk aktivite içeren % 30 (w/v) PEG çökeltisi seyreltilerek kolona uygulanmıştır. Burada metin içerisinde belirtilen aktivite ve protein miktarları toplam değerler olup, belirtilen her bir kesitin fraksiyon hacmi ile çarpılarak belirlenmiştir. Diğer kromatografik verilerde de aynı metod geçerlidir. Fraksiyonlama sonucunda elde edilen protein ve aktivite miktarları Şekil 3 ve EK 1'de sunulmuştur.

Seyreltilmiş PEG çökeltisinin uygulanmasıyla birlikte kolonun 20 mM'lık denge tamponuyla yıkanması sonucunda ilk on tüpte lipaz aktivitesi göstermeyen ve 30.834 mg protein içeren bir kesitin kolonla hiçbir bağ kurmaksızın doğrudan aktığı gözlenmiştir. 100 mM NaCl içeren kolon denge tamponuyla yıkama sonucunda yine herhangi bir aktivite gözlenmemekle birlikte 19.566 mg proteinin kolonu terk ettiği saptanmıştır. Tuz içeriği 200 mM'a çıkarılarak yapılan yıkama işleminde de herhangi bir aktivite kaydedilmemiş ve 10.452 mg protein içeriğine sahip bir protein pikinin olduğu gözlenmiştir. NaCl içeriği 300 mM olan denge tamponuyla yıkanma sonucunda 8.505 mg protein içeren ve oldukça yüksek aktiviteye sahip olan bir protein pikine (26-31 nolu tüpler arası) rastlanmıştır. Bu kesitin aktivitesinin yaklaşık olarak 202 µmol/dk olduğu bulunmuştur. 400 mM tuz içeren kolon uygulama tamponunda 32-38 nolu tüplerde düşük bir aktiviteye rastlanmış (1.512 µmol/dk) ve 5.682 mg proteine tekabül ettiği saptanmıştır.

600 ve 800 mM NaCl içeren kolon denge çözeltisiyle yıkama sonucunda aktivite göstermeyen iki küçük protein pikine rastlanmıştır. NaCl miktarı 1000 mM'a çıkarılmasıyla birlikte yine aktivite içermeyen ancak büyük bir protein piki belirlenmiştir. 39-60 nolu tüpleri kapsayan tüm bu elüsyon serilerinin 31.926 mg protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir.

Q sefaroz iyon değişim kromatografisi sonucunda toplamda yedi protein bantı belirlenmekle birlikte, lipaz aktivitesi sadece 300 mM NaCl uygulamasında ve düşük bir protein içeriğine sahip olan kesitte belirlenmiştir. İstenmeyen birçok protein, kolondan başarılı bir şekilde arındırılmış ve tek pikte ve konstre edilmiş bir tarzda temsil edilen bu fraksiyonun, neredeyse toplam aktivitenin % 99'unu içeren tüpleri olan 26, 27 ve 28 nolu tüpler bir sonraki saflaştırma basamağına uygulanmıştır.





**Şekil 3.** *C. chalcoides* karaciğer lipazının Q sefaroz iyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram. Tüpler 3'er mL olarak toplanmış ve buradaki aktivite  $\mu\text{mol/mL.dk}$ , protein miktarı değerleri ise  $\text{mg/mL}$  cinsinden sunulmuştur.

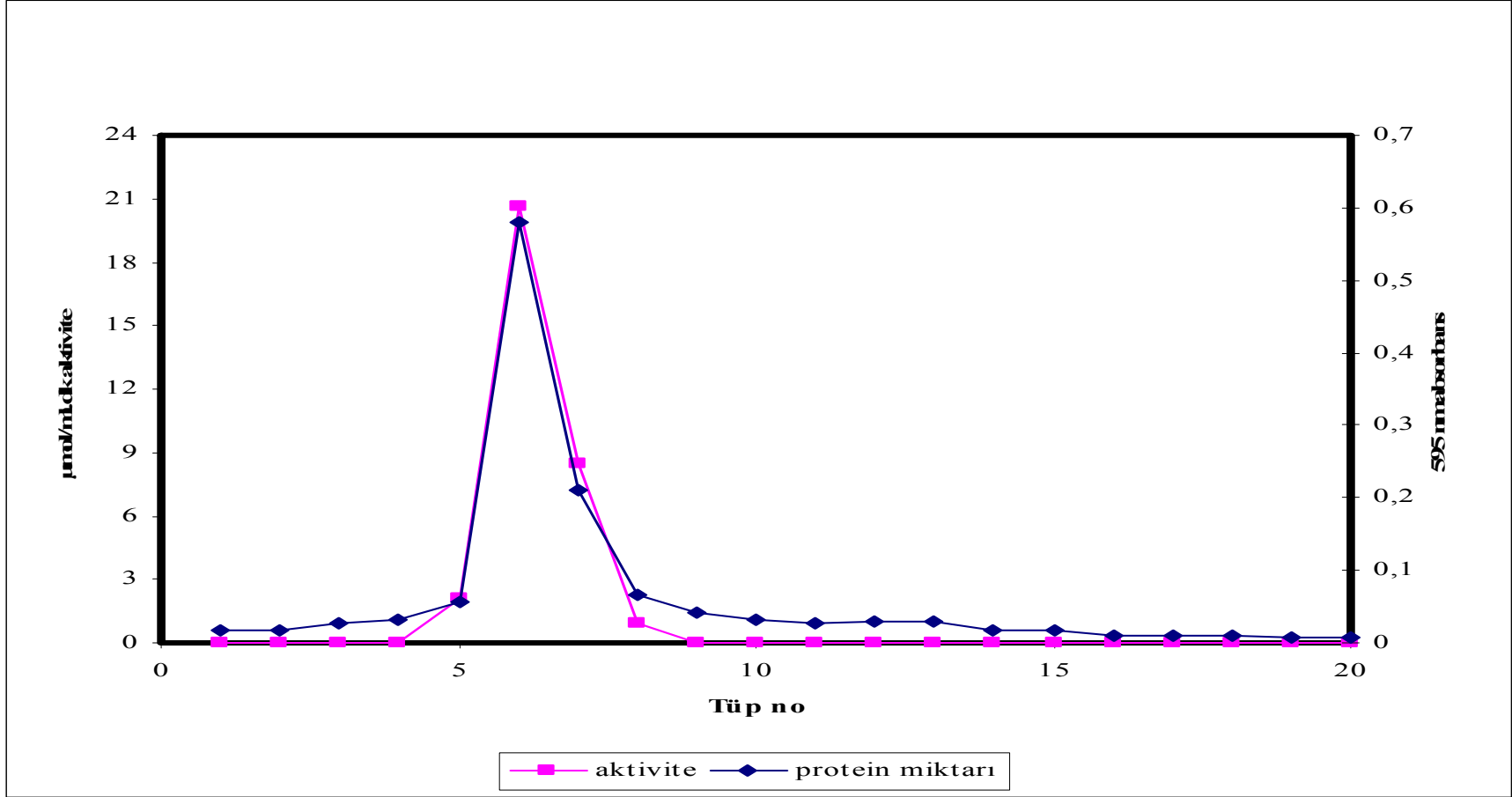
### **3.9.1.2. Sefakril S 200 HR jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma**

Q sefaroza alınmış protein çözeltisi, gerek bir saflaştırma adımı olması gerekse tuz bileşenlerinden arındırılması amacıyla sefakril S 200 HR kromatografisine uygulanmıştır. Bu kromatografik işlem sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarları Şekil 4'te görülmektedir. Uygulama sonucunda ilk dört tüpte herhangi bir aktiviteye rastlanmamış ve protein içeriğinin 0.186 mg olduğu belirlenmiştir. 5-8 nolu tüpleri kapsayan elüsyon serilerinde 64.38 µmol/dk aktivite ve 1.83 mg protein içeren aktivite bandına karşılık gelen bir protein kesiti gözlenmiştir. Bu aşama sonrasında, kolon denge tamponuyla yıkamaya devam edilmesi sonucunda herhangi bir aktivite kaydedilmemekle birlikte, 0.488 mg proteinin kolondan ayrıldığı tespit edilmiştir (EK 1). 5, 6 ve 7 nolu tüpler bir sonraki saflaştırma basamağına uygulanmıştır.

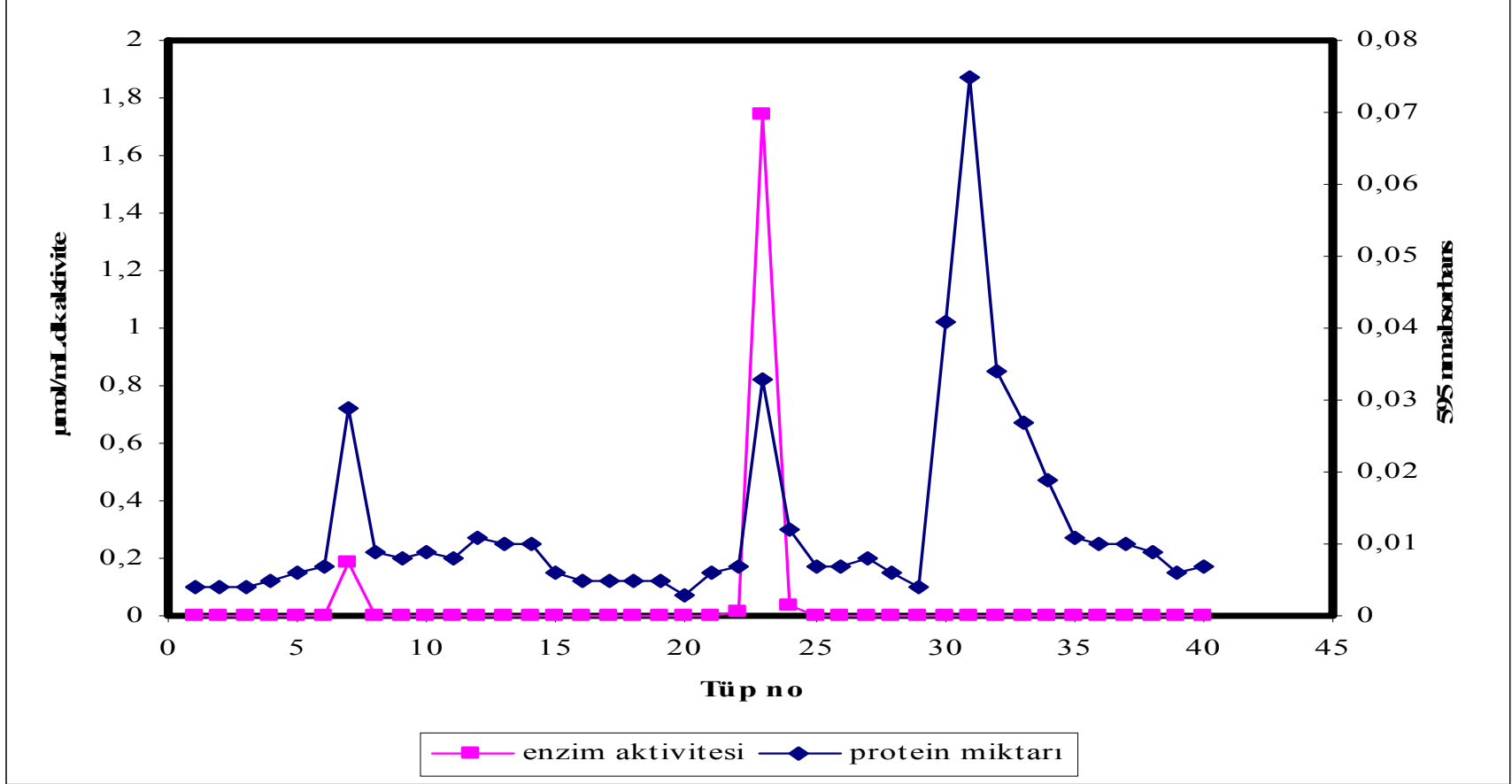
### **3.9.1.3. Fenil Sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırma**

Sefakril S 200-HR jel filtrasyon kromatografisinden alınan aktivite bandı hidrofobik etkileşim kromatografisi olan fenil sefaroza CL-4B'ye uygulanmıştır. Elde edilen protein ve aktivite miktarlarını gösteren kromatogram Şekil 5'te sunulmaktadır. Proteinlerin fraksiyonlanmasında öncelikle 150 mM amonyum sülfat içeren kolon denge tamponu uygulanmış ve ilk oniki tüpte yaklaşık 0.5 µmol/dk civarında oldukça düşük bir aktivite ve 0.312 mg proteinin etkileşmeden kolonu terk ettiği belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra % 10 izopropanol içeren denge tamponu uygulanmış ve aktivite içermeyen 0.093 mg proteinin kolondan uzaklaştığı görülmüştür. % 20 izopropanol uygulaması kayda değer bir protein fraksiyonlanması göstermemiştir (0.054 mg protein). % 50 izopropanol uygulamasında 22, 23 ve 24 nolu tüplerde 0.156 mg protein ve 5.382 µmol/dk aktiviteye rastlanmıştır. Bu yıkama ile, 30-40 nolu tüpler arasında 0.747 mg protein içeren bir protein bandının varlığı saptanmıştır (EK 1).

Fenil sefaroza CL-4B, proteinlerin oldukça iyi bir şekilde fraksiyonlanmasına olanak sağlamış ve üç belirgin protein piki ve biri çok düşük olmak üzere iki aktivite bantının varlığı izlenmiştir. Sadece yüksek aktiviteli protein piki değerlendirilmiştir.



Şekil 4. *C. chalcoides* karaciğer lipazı Sefakril S200-HR jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram. Tüpler 2'şer mL olarak toplanmış ve buradaki aktivite  $\mu\text{mol/mL}$ .dk, protein miktarı değerleri ise mg/mL cinsinden sunulmuştur.



Şekil 5. *C. chalcoides* karaciğer lipazı karaciğer lipazı fenil sefaroz CL-4B hidroforbik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram. Tüpler 3'er mL olarak toplanmış ve buradaki aktivite  $\mu\text{mol/mL.dk}$ , protein miktarı değerleri ise  $\text{mg/mL}$  cinsinden sunulmuştur.

#### 3.9.1.4. *C. chalcoides* karaciğer lipazının saflaştırma sonuçları

Karaciğer lipazının saflaştırma basamakları Tablo 11'de sunulmuştur. Karaciğerin homojenizasyonu sonucunda 40 mL toplam hacmindeki enzim homojenatının toplam protein miktarı 1010 mg, aktivitenin 1092  $\mu\text{mol/dk}$  ve 1.081  $\mu\text{mol/mg}$  protein'lik bir spesifik aktiviteye denk olduğu görülmüştür. 60.000xg'de 1 saat santrifüjleme sonucunda elde edilen çökeltinin spesifik aktivitesinin oldukça düşük olduğu görülmüştür. Buna karşın, üst sıvının spesifik aktivitesi 1.047  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein, verim % 78.269 ve saflaştırma katsayısı ise 0.968 olarak belirlenmiştir. Bu üst sıvının % 30 (w/v) PEG-6000 ile çöktürülmesi sonucunda spesifik aktivitenin 1.149  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein, verimin % 67.58 ve saflığın ise 1.062 olduğu gözlenmiştir. 5 mL hacmindeki % 30 (w/v) PEG çökeltisinin (214 mg protein ve 246  $\mu\text{mol/dk}$  aktivite), Q sefaroz anyon değişim kromatografisine uygulanması sonucunda, aktivitenin daha çok üç tüpte (26-28) toplandığı görülmüştür. Bu kromatografik adım sonucunda spesifik aktivitenin 32.965  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein, verimin % 16.981 ve saflaştırma katsayısının ise 30.494 olduğu saptanmıştır. Bir sonraki saflaştırma basamağını teşkil eden sefakril S 200 HR kromatografisi ile elde edilen spesifik aktivitenin 36.819  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein olmakla birlikte, verim % 5.725 ve saflığın ise 34.060 olduğu görülmüştür. Son saflaştırma basamağı olan fenil sefaroz CL-4B uygulamasıyla 48.88 kat saflaştırma, % 0.479 verim ve 52.848  $\mu\text{mol/dk.mg}$  proteinlik bir spesifik aktivite bulunmuştur.

**Tablo 11.** *C. chalcoides* karaciğer lipazı saflaştırma basamakları

Basamak	Aktivite ( $\mu\text{mol/mL.dk}$ )	Protein ( $\text{mg/mL}$ )	$\Sigma$ Hacim ( $\text{mL}$ )	$\Sigma$ Aktivite ( $\mu\text{mol/dk}$ )	$\Sigma$ Protein ( $\text{mg}$ )	Spesifik aktivite $\mu\text{mol/dk.mg}$	Verim (%)	Saflaştırma (Kat)
	Ort $\pm$ S.H	Ort $\pm$ S.H		Ort $\pm$ S.H	Ort $\pm$ S.H			
Homojenat	27.30 $\pm$ 0.13	25.25 $\pm$ 0.36	40	1092 $\pm$ 8.33	1010 $\pm$ 7.38	1.081	100	1
Üst sıvı (60.000xg)	23.10 $\pm$ 0.26	22.05 $\pm$ 0.33	37	854.70 $\pm$ 4.27	815.85 $\pm$ 5.62	1.047	78.269	0.968
% 30 (w/v) PEG-6000	49.20 $\pm$ 0.54	42.80 $\pm$ 0.62	15	738 $\pm$ 3.11	642 $\pm$ 2.71	1.149	67.58	1.062
Q sefaroze	20.60 $\pm$ 0.18	0.625 $\pm$ 0.11	9	185.4 $\pm$ 1.12	5.625 $\pm$ 2.16	32.965	16.981	30.494
Sefakril S 200-HR	10.42 $\pm$ 0.22	0.283 $\pm$ 0.08	6	62.52 $\pm$ 0.30	1.698 $\pm$ 0.71	36.819	5.725	34.060
Fenil sefaroze CL- 4B	1.744 $\pm$ 0.10	0.033 $\pm$ 0.06	3	5.232 $\pm$ 0.08	0.099 $\pm$ 0.02	52.848	0.479	48.888

**S.H.** : Standart hata.

**Ort.:** Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

### **3.9.2. *L. cephalus*'un karaciğer lipazının saflaştırılması**

#### **3.9.2.1. Q sefaroza anyon değişim kromatografisi ile saflaştırma**

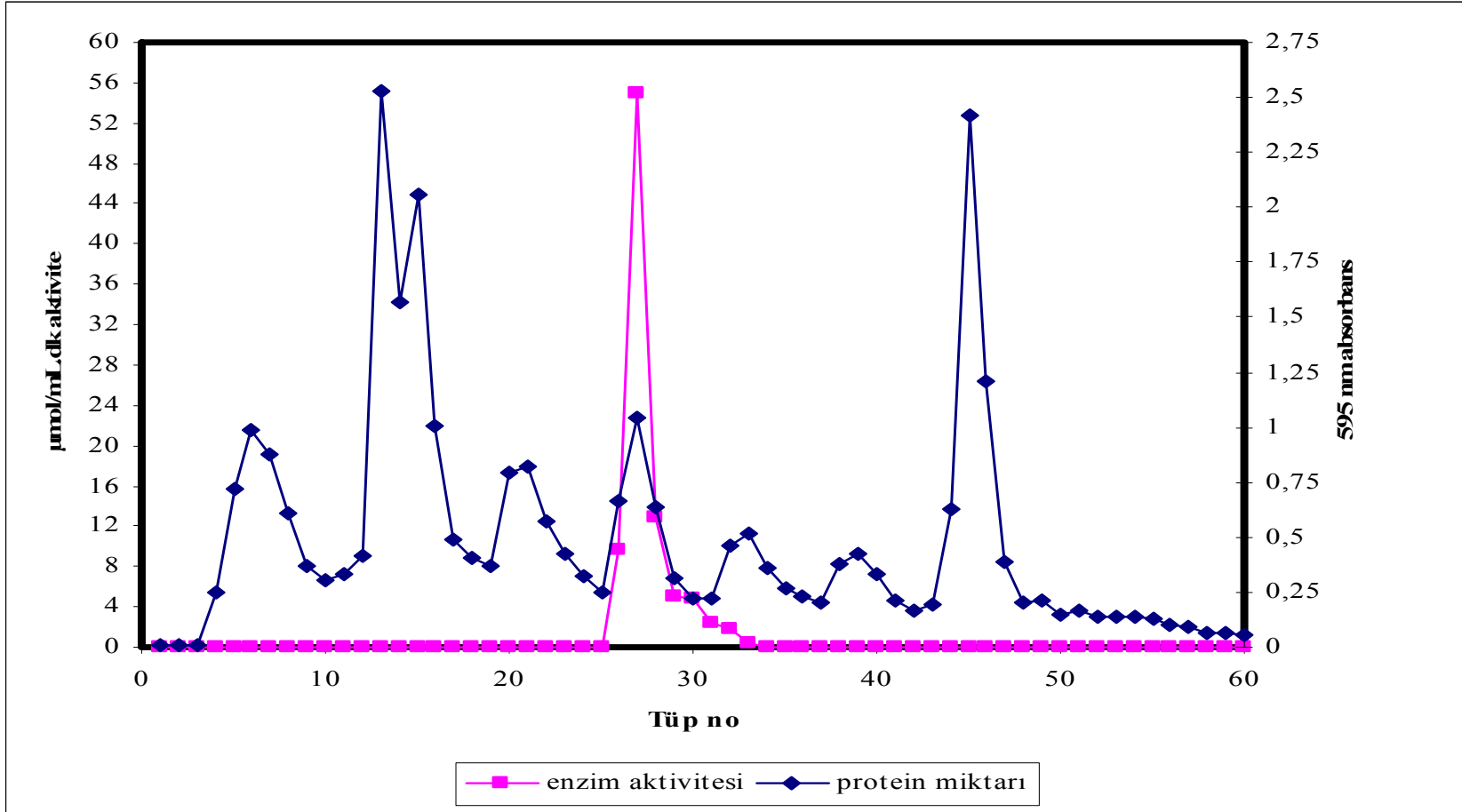
Karaciğer lipazının saflaştırılması amacıyla dengelenmiş Q sefaroza kolonuna, % 30 PEG çöktürülmesinin 285.50 µmol/dk aktivite ve 250.90 mg protein içeren bir fraksiyonu (5 mL) seyreltilerek uygulanmıştır. Fraksiyonlama sonucunda elde edilen protein ve aktivite miktarları Şekil 6'da ve EK 2'de sunulmuştur.

İlk on tüpe kolonla etkileşimsiz doğrudan akarak uzaklaşan kesitin protein miktarının 12.453 mg ve aktiviteden tamamen yoksun olduğu tespit edilmiştir. Denge tamponunda 100 ve 200 mM NaCl uygulamaları sonucundaki kesitlerde yine aktiviteye rastlanmamakla birlikte, kolonu terk eden bu kesitlerin protein miktarlarının sırasıyla 23.745 ve 10.377 mg protein olduğu gözlenmiştir.

300 ve 400 mM NaCl ile yıkama işlemleri esnasında 26 - 34 nolu tüpleri kapsayan kesitte 13.311 mg protein ve yaklaşık 276 µmol/dk aktiviteli bir fraksiyon belirlenmiştir. Aktivitenin daha çok 300 mM NaCl uygulamasının yapıldığı fraksiyondaki 26 - 28 nolu tüpleri kapsadığı görülmüştür.

600 mM NaCl uygulaması ile kolondan alınan protein miktarının aktiviteden yoksun ve 5.508 mg olduğu görülmüştür. Benzer şekilde 800 mM NaCl uygulamasında da aktiviteye rastlanmamış ve 14.505 mg'lık bir protein kesitine rastlanmıştır. 47-60 nolu tüpleri kapsayan ve tuz miktarının 1 M'a çıkarılmasıyla gerçekleştirilen yıkama işlemi sonucunda aktiviteye rastlanmamış ve 6.141 mg proteinin kolondan uzaklaştığı belirlenmiştir.

Karaciğer lipazının Q sefaroza ile saflaştırılması sonucunda yedi protein pikine rastlanmıştır ve aktivitenin sadece bir protein pikinde olduğu görülmüştür. Bu protein pikine denk gelen 26-29 nolu tüpleri kapsayan kesit (7.998 mg protein ve yaklaşık 247 µmol/dk aktivite) bir sonraki saflaştırma basamağına uygulanmıştır.



Şekil 6. *L. cephalus* karaciğer lipazının Q sefaroz iyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram. Tüpler 3'er mL olarak toplanmış ve buradaki aktivite µmol/mL.dk, protein miktarı değerleri ise mg/mL cinsinden sunulmuştur.



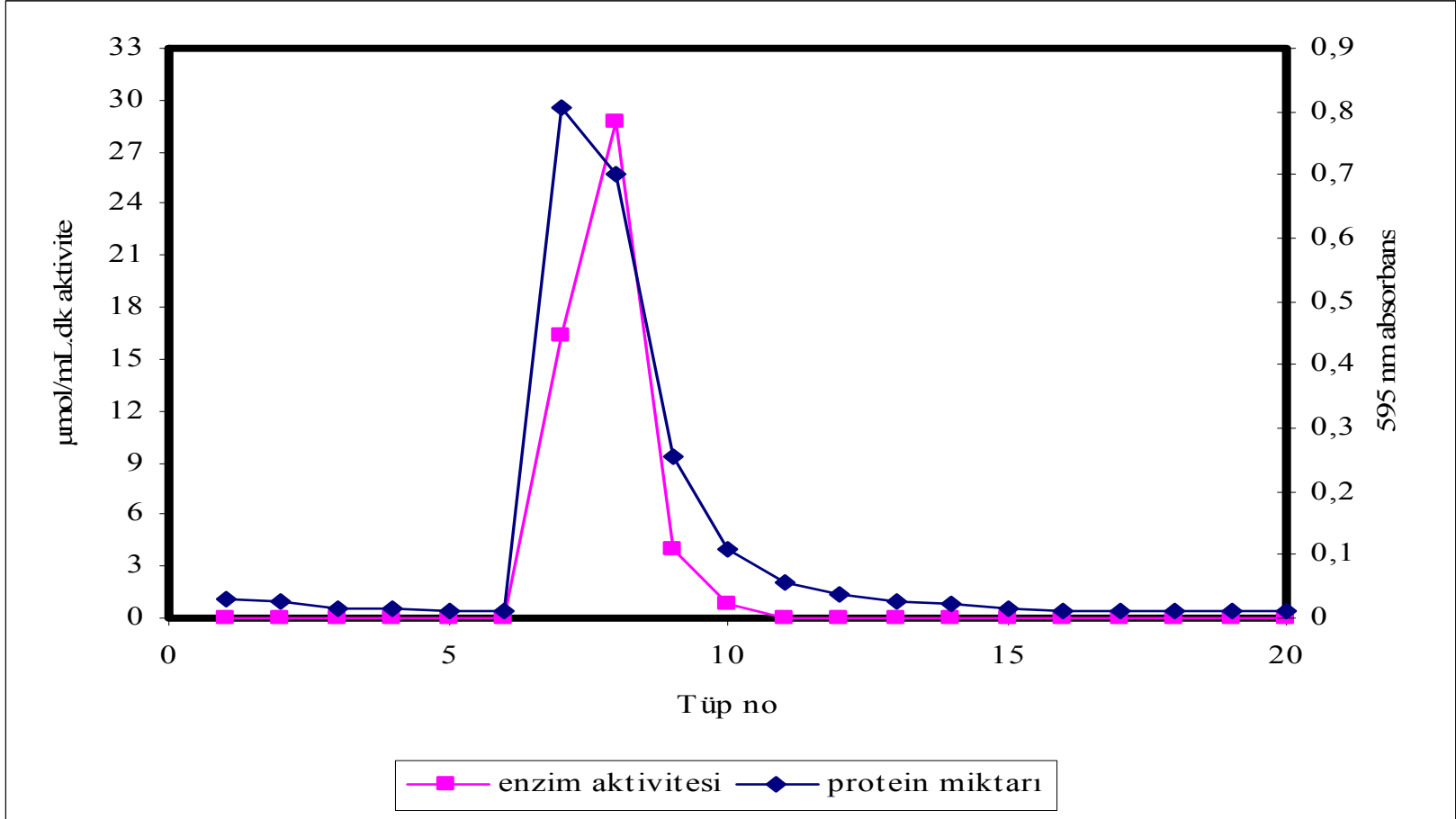
### **3.9.2.2. Sefakril S 200 HR jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma**

Q sefaroza ile oldukça konsantr formda alınan protein kesitinin sefakril S 200 HR'ye sunulması sonuçları Şekil 7'de görülmektedir. Buna göre, ilk altı tüpte aktivite göstermeyen 0.216 mg proteinin varlığı gözlenmiştir. 7-10 nolu tüplerde aktivite ve protein miktarınının büyük bir kısmını içeren bir kesit tespit edilmiştir (3.748 mg protein ve 99.964 µmol/dk aktivite). Kolonun daha fazla yıkanması sonucunda protein miktarı 0.422 mg olan ancak aktivite göstermeyen bir kesitin daha varlığı daha görülmüştür (EK 2). 7 - 9 nolu tüpler bir sonraki saflaştırma adımına uygulanmıştır.

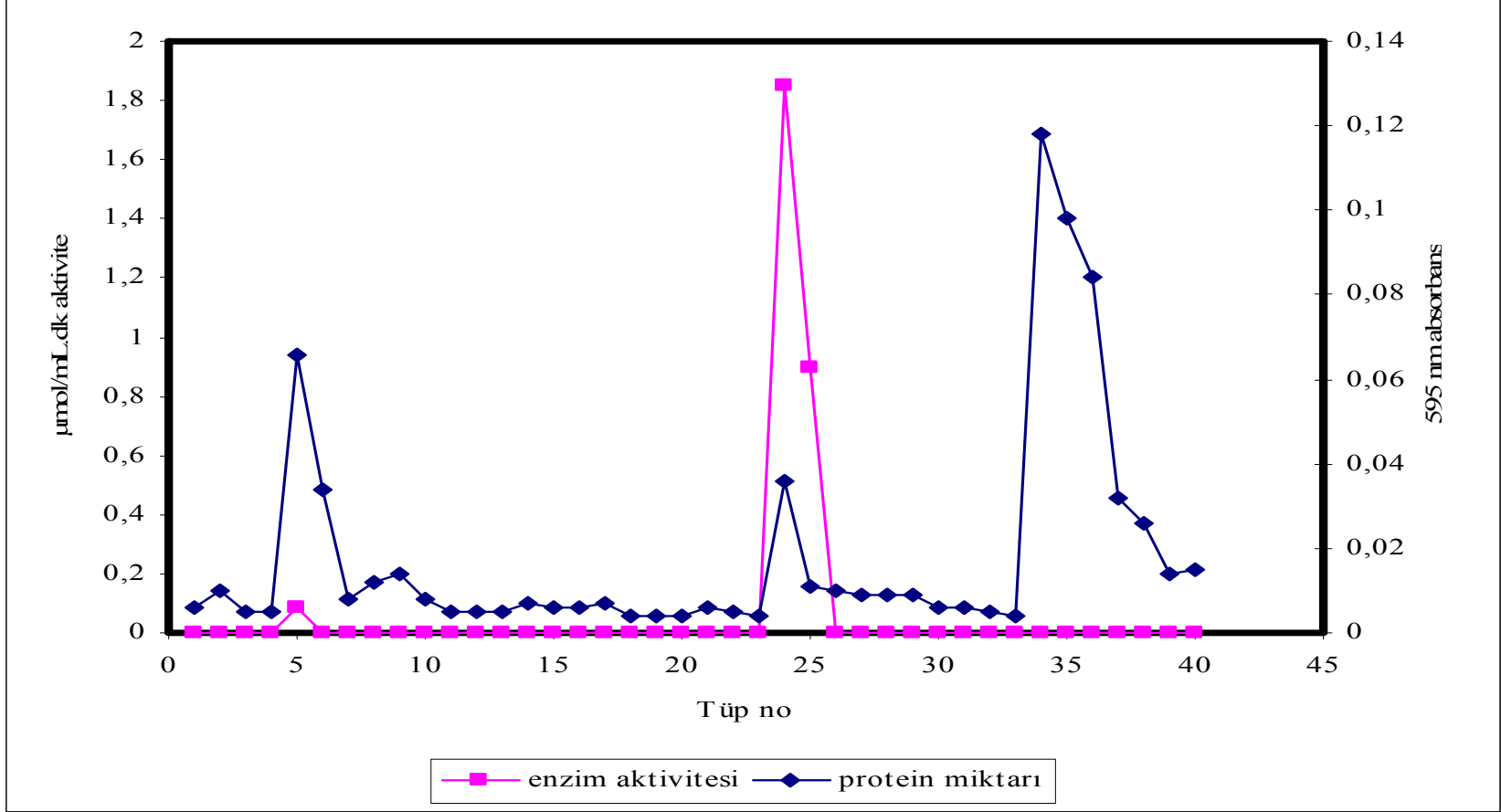
### **3.9.2.3. Fenil sefaroza CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırma**

Bir önceki saflaştırma basamağından alınan aktivite içeren kesitin hidrofobik etkileşim kromatografisine uygulanması sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarları Şekil 8'de görülmektedir.

Doğrudan 150 mM amonyum sülfat içeren kolon denge tamponuyla yıkama sonucunda 0.534 mg protein ve çok küçük bir aktivite gösteren bir kesitin varlığına rastlanmıştır (0.261 µmol/dk). 13-22 nolu tüpleri kapsayan ve % 10-20 izopropanol uygulamaları sonucunda aktivite göstermeyen 0.162 mg proteinin kolondan uzaklaştığı görülmüştür. Hemen sonrasında % 50 izopropanol uygulamasıyla birlikte, 24 ve 25 nolu tüplerde aktivitenin yoğun olduğu (8.25 µmol/dk) ve 0.141 mg protein içeren bir kesit bulunmuştur. 27-40 nolu tüpleri kapsayan % 50 izopropanol ile yıkamaya devam edilmesi sonucunda aktivite göstermeyen oldukça yüksek bir protein miktarına sahip (1.305 mg) üçüncü bir kesitin varlığı da tesbit edilmiştir (EK 2). Bu işlem sonucunda sadece 0.036 mg protein ve 1.851 µmol/mL.dk aktiviteye sahip olan 24 nolu tüp, kinetik analizlerde kullanılmak üzere ayrılmıştır.



**Şekil 7.** *L. cephalus* karaciğer lipazının Sefakril S 200-HR jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram. Tüpler 2'şer mL olarak toplanmış ve buradaki aktivite µmol/mL.dk, protein miktarı değerleri ise mg/mL cinsinden sunulmuştur.



**Şekil 8.** *L. cephalus* karaciğer lipazı karaciğer lipazı fenil sefroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram. Tüpler 3'er mL olarak toplanmış ve buradaki aktivite  $\mu\text{mol/mL.dk}$ , protein miktarı değerleri ise  $\text{mg/mL}$  cinsinden sunulmuştur.

#### 3.9.2.4. *L. cephalus* karaciğer lipazının saflaştırma sonuçları

*L. cephalus*'un karaciğer lipazının saflaştırma basamakları Tablo 12'de verilmiştir. 40 mL'lik hacimde elde edilen karaciğer enzim homojenatının toplam aktivitesi 1167  $\mu\text{mol/dk}$  ve toplam protein miktarı ise 1244.8 mg olarak belirlenmiştir. Homojenatta 0.9375  $\mu\text{mol/dk.mg}$  proteinlik bir spesifik aktivite saptanmıştır. 60.000xg'de bir saat santrifüjlenme sonucunda elde edilen 2 mL'lik çökeltinin spesifik aktivitesinin çok düşük olduğu belirlenmiştir. Bu işlem esnasında elde edilen üst sıvının spesifik aktivitesinin 1.076  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein, veriminin % 83.46 ve saflaştırma katsayısının ise 1.147 olduğu bulunmuştur. Üst sıvıya % 30 (w/v) oranında PEG-6000 ilavesiyle elde edilen protein çökeltisinin spesifik aktivitesi (1.078  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein) ve saflaştırma katsayısının (1.149) bir önceki basamağın üst sıvısıyla hemen hemen aynı olduğu gözlenmiştir. % 30 PEG çökeltisinin 285.5  $\mu\text{mol/dk}$  aktivite ve 250.9 mg protein içeren 5 mL'lik bir fraksiyonu Q sefaroz anyon değişim kromatografisine uygulanmış ve sonuçta 12 mL toplam hacimde, spesifik aktivitesi 30.991  $\mu\text{mol/dk.mg}$  proteine karşılık gelen bir kesit elde edilmiştir. Bu kesitte 33.057 değerinde bir saflıkla birlikte, % 21.239'lük bir verim elde edilmiştir. Bu fraksiyonun, bir sonraki saflaştırma basamağı olan sefakril S 200 HR jel filtrasyon kromatografisine sunulması sonucunda toplam hacmi 6 mL olan bir kesitte spesifik aktivitenin 27.827  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein, verimin % 8.417 ve 29.683'lük bir saflaştırma katsayısının olduğu belirlenmiştir. Bu kesitin son saflaştırma basamağı olarak kullanılan fenil sefaroz CL-4B'ye uygulanması sonucunda 3 mL'lik bir kesitte 51.416  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein'lik spesifik aktivite, % 0.4758 verim ve 54.843 katlık bir saflaştırma elde edilmiştir.

**Tablo 12.** *L. cephalus* karaciğer lipazının saflaştırma basamakları

Basamak	Aktivite ( $\mu\text{mol/mL.dk}$ )	Protein ( $\text{mg/mL}$ )	$\Sigma$ Hacim ( $\text{mL}$ )	$\Sigma$ Aktivite ( $\mu\text{mol/dk}$ )	$\Sigma$ Protein ( $\text{mg}$ )	Spesifik aktivite $\mu\text{mol/dk.mg}$	Verim (%)	Saflaştırma (Kat)
	Ort $\pm$ S.H	Ort $\pm$ S.H		Ort $\pm$ S.H	Ort $\pm$ S.H			
Homojenat	29.19 $\pm$ 1.10	31.12 $\pm$ 2.11	40	1167 $\pm$ 5.28	1244.80 $\pm$ 9.27	0.9375	100	1
Üst sıvı (60.000xg)	25.63 $\pm$ 0.87	23.80 $\pm$ 1.36	38	974 $\pm$ 3.18	904.4 $\pm$ 7.51	1.076	83.46	1.147
% 30 (w/v) PEG-6000	57.10 $\pm$ 1.38	50.18 $\pm$ 2.14	15	856.5 $\pm$ 5.84	752.7 $\pm$ 4.18	1.078	73.39	1.149
Q sefároz	20.655 $\pm$ 0.53	0.666 $\pm$ 0.30	12	247.86 $\pm$ 0.40	7.998 $\pm$ 0.41	30.991	21.239	33.057
Sefakril S200-HR	16.372 $\pm$ 0.31	0.588 $\pm$ 0.10	6	98.234 $\pm$ 0.22	3.53 $\pm$ 0.18	27.828	8.417	29.6832
Fenil sefároz CL- 4B	1.851 $\pm$ 0.24	0.036 $\pm$ 0.04	3	5.553 $\pm$ 0.13	0.108 $\pm$ 0.09	51.416	0.4758	54.843

**S.H.:** Standart hata.

**Ort.:** Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

### 3.9.3. *C. carpio*'nun karaciğer lipazının saflaştırılması

#### 3.9.3.1. Q sefaroza anyon değişim kromatografisi ile saflaştırma

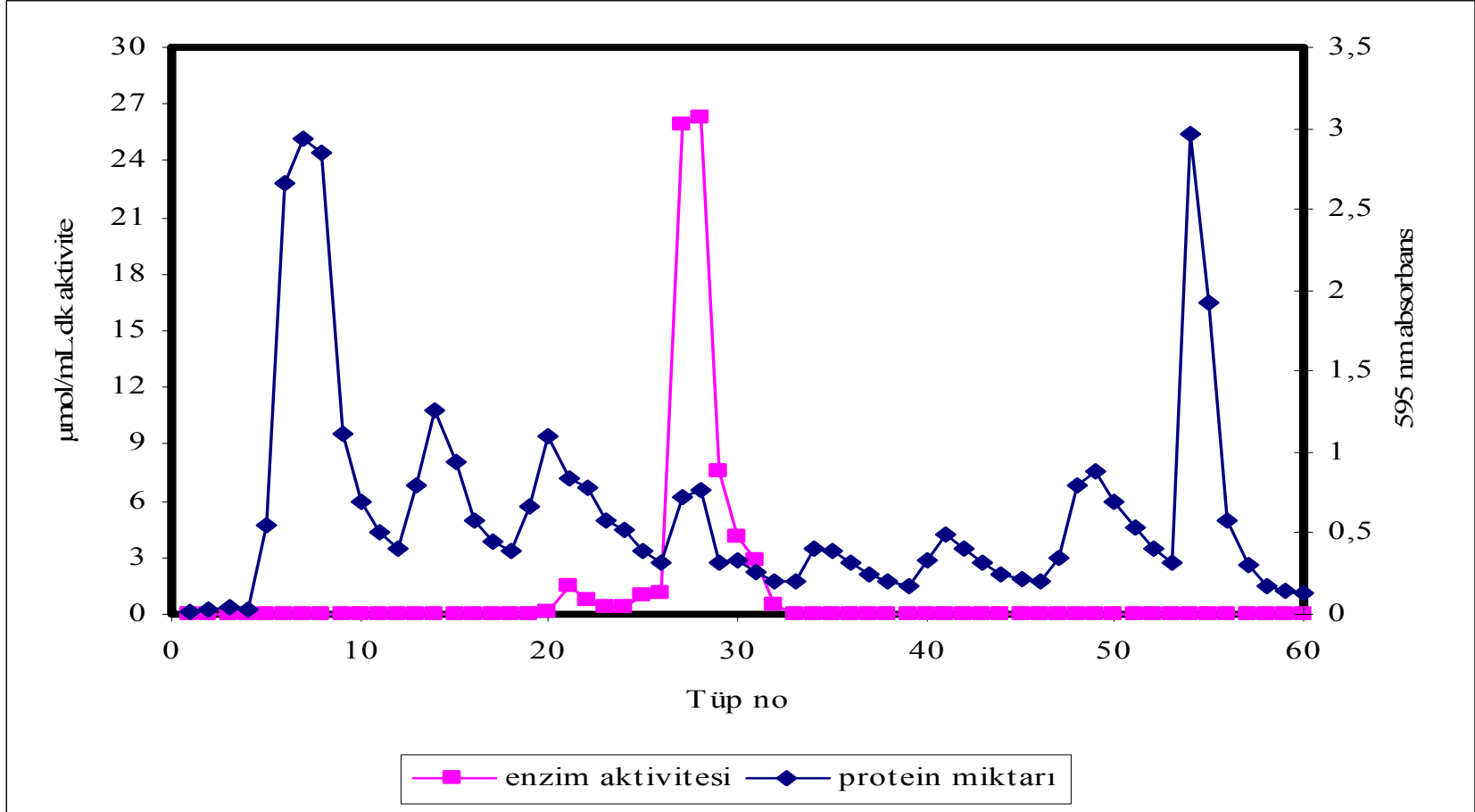
*C. carpio* karaciğer lipazının Q sefaroza anyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarları Şekil 9 ve EK 3'te görülmektedir.

Diğer türlerin uygulamalarında da olduğu gibi 263 µmol/dk aktivite ve 217.2 mg protein içeren % 30 PEG çöktürücü seyreltilerek kolona uygulanmıştır. Kolonun, kolon denge tamponuyla yıkanması sonucunda ilk on tüpte aktivite görülmesizden yaklaşık 32.76 mg proteine denk gelen bir kesitin bağlanmaksızın doğrudan aktığı görülmüştür. Bağlanan proteinleri almak amacıyla öncelikle, 100 mM NaCl ile yıkama sonucunda alınan kesitin protein miktarının 13.401 mg ve aktiviteden yoksun olduğu gözlenmiştir. 200 mM'lık tamponla yıkama sonucunda 12.663 mg protein içeren kesitte 6.939 µmol/dk aktiviteye sahip olan bir bant elde edilmiştir.

300 ve 400 mM NaCl içeren kolon denge tamponu uygulamaları sonrasında 24-33 nolu tüplerde oldukça yoğun bir aktivite (209.58 µmol/dk) ve yaklaşık olarak 12 mg proteinin varlığı tespit edilmiştir. Aktivitenin en yoğun olduğu kesit ise 300 mM tuz içeren tamponla yıkamada elde edilmiştir. Bu kesitte 188.47 µmol/dk aktivite ve 10.818 mg protein saptanmıştır.

36-48 nolu tüpleri kapsayan 500 ve 600 mM NaCl içeren denge tamponuyla yıkama uygulamalarında herhangi bir aktivite gözlenmemiştir. Bu fraksiyonların protein içeriğinin 12.945 mg olduğu belirlenmiştir. Yine 800 mM ve 1000 mM tuz ile fraksiyonlama sonucunda aktivitenin görülmediği, piklerindeki protein miktarının toplamda (49-60 nolu tüpler) 27.186 mg olduğu bir kesit saptanmıştır.

*C. carpio* karaciğerinin Q sefaroza ile fraksiyonlanmasına bağlı olarak 8 protein pikine rastlanmıştır. Ayrıca 200 mM tuz ile kolondan alınan fraksiyonun diğer türlerin karaciğerlerinde rastlanmadığı ortaya çıkmıştır. 27-30 nolu tüpleri kapsayan 6.45 mg protein ve 191.757 µmol/dk aktiviteye karşılık gelen kesit bir sonraki saflaştırma basamağı için ayrılmıştır.



**Şekil 9.** *C. carpio* karaciğer lipazının Q sefroz iyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram. Tüpler 3'er mL olarak toplanmış ve buradaki aktivite  $\mu\text{mol/mL.dk}$ , protein miktarı değerleri ise  $\text{mg/mL}$  cinsinden sunulmuştur.

### **3.9.3.2. Sefakril S 200 HR jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma**

Q sefaroza alınan kesitin yoğunlaştırılması sonrasında jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram Şekil 10'da sunulmuştur.

Denge tamponuyla fraksiyonlamada ilk üç tüpte aktiviteye rastlanmamış ve bu kesitte 0.162 mg protein olduğu bulunmuştur. 4-8 nolu tüpleri kapsayan kesitte aktivite belirlenmiştir. Bu kesitteki aktivitenin 117.55 µmol/dk ve protein miktarının ise 2.218 mg protein olduğu gözlenmiştir. Daha sonraki yıkamalar sonucu elde edilen kesitin aktivite içermediği, 0.692 mg protein değerine sahip olduğu saptanmıştır (EK 3). 10 mL hacmindeki aktivite gösteren tüplerin tamamı bir sonraki saflaştırma basamağına uygulanmak üzere stoklanmıştır.

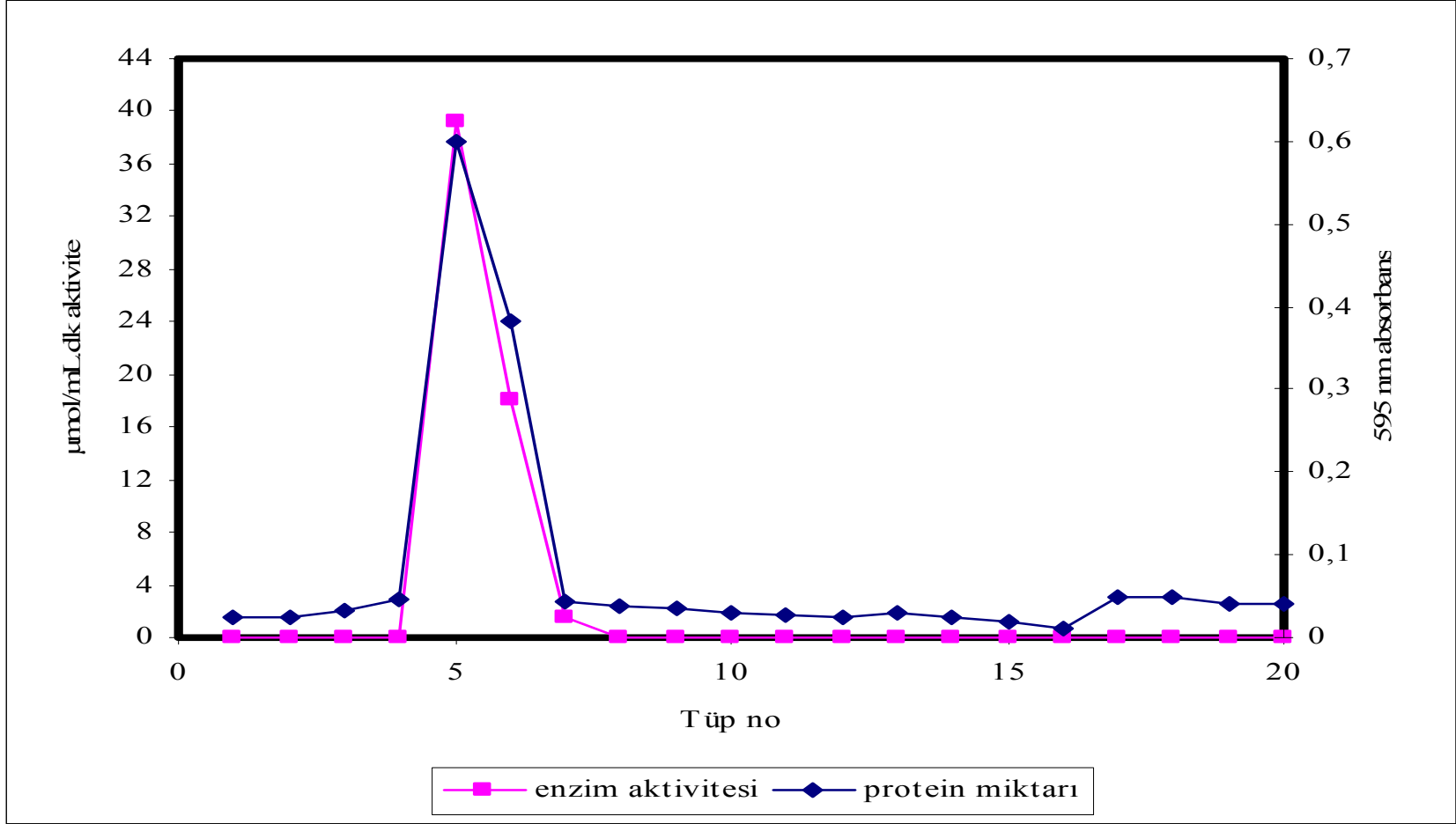
### **3.9.3.3. Fenil sefaroza CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırma**

Sefakril kolon dolgu maddesinden alınan aktivite içeren kesitin hidrofobik etkileşim kromatografisine uygulanması sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram Şekil 11 ve EK 3'te görülmektedir.

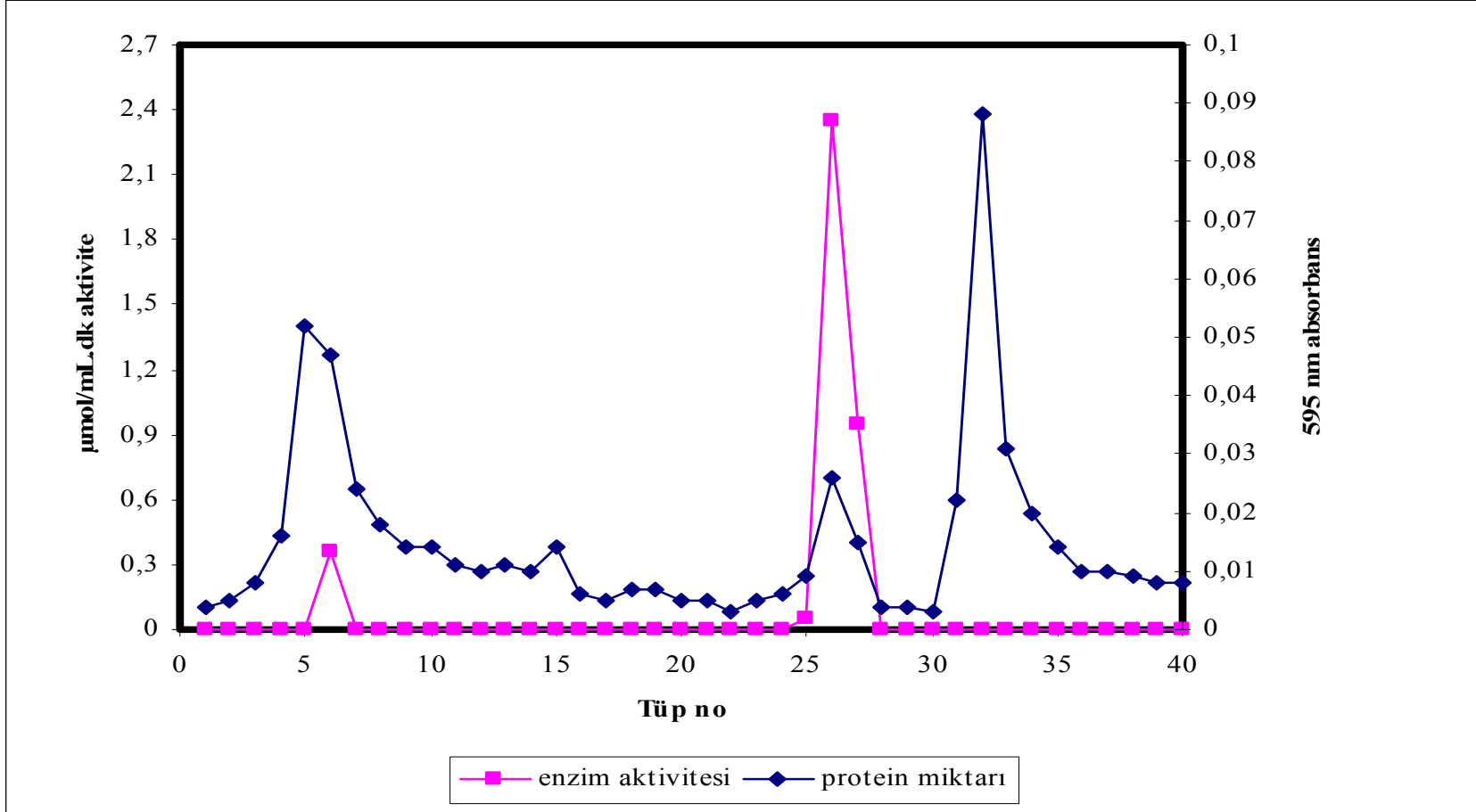
Kolonun 150 mM amonyum sülfat içeren kolon denge tamponuyla yıkanması sonucunda ilk 12 tüpte 0.669 mg protein ve bu kesitte yer alan altıncı tüpte 1.068 µmol aktivitenin varlığı kaydedilmiştir. % 10 ve 20 izopropanol içeren tamponun uygulanması sonrasında herhangi bir aktivite görülmemiş, 0.252 mg proteinlik bir kesitin kolondan uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir. Bu yıkama sonrasında % 50 izopropanol uygulamasıyla 25, 26 ve 27. tüplerde 10.044 µmol/dk aktivite ve toplamda 0.15 mg protein içeren bir fraksiyon elde edilmiştir. % 50 izopropanol uygulamasının devamı sonucunda 0.693 mg proteine sahip ancak aktivite vermeyen bir kesite rastlanmıştır (28-40 tüpleri arası).

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda 3 temel protein piki tanımlanmış ve 7.05 µmol/dk aktivite içeren 0.026 mg proteine sahip olan tüp kinetik analizler için ayrılmıştır.





**Şekil 10.** *C. carpio* karaciğer lipazının Sefakril S 200-HR jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram. Tüpler 2'şer mL olarak toplanmış ve buradaki aktivite  $\mu\text{mol/mL.dk}$ , protein miktarı değerleri ise  $\text{mg/mL}$  cinsinden sunulmuştur.



**Şekil 11.** *C. carpio* karaciğer lipazının karaciğer lipazı fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram. Tüpler 3'er mL olarak toplanmış ve buradaki aktivite µmol/mL.dk, protein miktarı değerleri ise mg/mL cinsinden sunulmuştur.

#### 3.9.3.4. *C. carpio* karaciğer lipazının saflaştırma sonuçları

Türün karaciğer lipazının saflaştırma basamakları Tablo 13’de görülmektedir. Saflaştırma işlemine 40 mL hacminde (1286  $\mu\text{mol/dk}$  toplam aktivite, 1074 mg toplam protein içeren) ve 1.197  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein spesifik aktiviteli enzim homojenatıyla başlanmıştır. Diğer türlerde olduğu gibi, 60.000xg’de bir saat santrifüjleme sonucunda elde edilen 2 mL hacmindeki çökelti kısmı, spesifik aktivitesi çok düşük olduğu için değerlendirilmemiştir. Bu santrifüjleme sonucunda, elde edilen üst sıvının spesifik aktivitesi 1.289  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein olarak belirlenmiş ve % 72.92’lik bir verimle birlikte 1.07 katlık bir saflaştırma sağlamıştır. Bu kesitin % 30 PEG-6000 çöktürmesiyle elde edilen protein çökeltisinde % 61.36’lık bir verimle birlikte, 1.01 kat saflaştırma ve 1.210  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein’lik bir spesifik aktivite elde edilmiştir. % 30 (w/v) PEG çökeltisininin 263  $\mu\text{mol/dk}$  aktivite ve 217.2 mg protein içeren 5 mL’lik bir fraksiyonu ilk saflaştırma basamağı olan Q sefaroz anyon değişim kromatografisine uygulanmıştır. Bu uygulama, toplam hacmi 12 mL olan, 29.729  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein’lik spesifik aktivite, % 14.911’lik verim ve 24.836 kat saflaştırmaya neden olmuştur. Buradan elde edilen kesit bir sonraki saflaştırma basamağı olan sefakril S 200 HR jel filtrasyon kromatografisine uygulanmıştır. Bu işlemle, 10 mL hacminde ve 52.99  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein değerinde bir spesifik aktivite elde edilmiştir. Bu kesitin verimi % 9.1407 ve saflığı ise 44.269 kat olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu kesitin son saflaştırma basamağı olan fenil sefaroz CL-4B’ye uygulanmasıyla da 3 mL’lik bir hacimde 90.384  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein’lik bir spesifik aktivite, % 0.548’lik bir verim ve 75.508 katlık bir saflaştırma sağlanmıştır.

**Tablo 13.** *C. carpio* karaciğer lipazının saflaştırma basamakları

Basamak	Aktivite ( $\mu\text{mol/mL.dk}$ )	Protein ( $\text{mg/mL}$ )	$\Sigma$ Hacim ( $\text{mL}$ )	$\Sigma$ Aktivite ( $\mu\text{mol/dk}$ )	$\Sigma$ Protein ( $\text{mg}$ )	Spesifik aktivite $\mu\text{mol/dk.mg}$	Verim (%)	Saflaştırma (Kat)
	Ort $\pm$ S.H	Ort $\pm$ S.H		Ort $\pm$ S.H	Ort $\pm$ S.H			
Homojenat	32.15 $\pm$ 0.28	26.85 $\pm$ 1.37	40	1286 $\pm$ 4.39	1074 $\pm$ 11.07	1.197	100	1
Üst sıvı (60.000xg)	26.57 $\pm$ 0.61	20.61 $\pm$ 2.08	38	1010 $\pm$ 7.01	783.18 $\pm$ 9.93	1.289	72.92	1.07
% 30 (w/v) PEG-6000	52.60 $\pm$ 2.05	43.44 $\pm$ 1.83	15	789 $\pm$ 4.73	651.6 $\pm$ 3.28	1.210	61.36	1.01
Q sefaroza	15.98 $\pm$ 1.16	0.537 $\pm$ 0.33	12	191.757 $\pm$ 3.19	6.45 $\pm$ 0.97	29.729	14.911	24.836
Sefakril S200- HR	11.755 $\pm$ 0.88	0.2218 $\pm$ 0.10	10	117.55 $\pm$ 2.48	2.218 $\pm$ 0.21	52.99	9.1407	44.269
Fenil sefaroza CL-4B	2.35 $\pm$ 0.24	0.026 $\pm$ 0.03	3	7.05 $\pm$ 0.04	0.078 $\pm$ 0.03	90.384	0.548	75.508

**S.H.:** Standart hata.

**Ort.:** Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

#### 3.9.4. *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğer lipazlarının spesifik aktivite ve saflıklarının karşılaştırılması

*C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğerinden saflaştırılan lipaz enzimlerinin saflaştırma basamaklarındaki spesifik aktivite ve saflaştırma katsayıları karşılaştırılmıştır (Tablo 14). Buna göre, saflaştırma katsayılarının 1 olarak alındığı kaba homojenatta spesifik aktiviteler *C. chalcoides*'te 1.081  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein, *L. cephalus*'ta 0.9375  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein ve *C. carpio*'da ise 1.197  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein olarak belirlenmiştir. 60.000xg'de 1 saat santrifüjleme sonucunda spesifik aktivitelerde önemli bir değişim gözlenmemiş ve saflaştırma katsayılarının *C. chalcoides*'te 0.968, *L. cephalus*'ta 1.147 ve *C. carpio*'da 1.070 olduğu belirlenmiştir. Elde edilen üst sıvıların % 30 (w/v) PEG ile çöktürülmesi sonucunda *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'da spesifik aktivitelerin sırasıyla 1.149  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein, 1.078  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein, 1.210  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein, saflaştırma katsayılarının ise 1.062, 1.149 ve 1.010 kat olduğu belirlenmiştir. Q sefroz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonucunda *C. chalcoides*'te 32.965  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein spesifik aktivite ve 30.494 kat saflık, *L. cephalus*'ta 30.991  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein spesifik aktivite ve 33.057 kat saflık, *C. carpio*'da ise 29.729  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein spesifik aktivite ve 24.836 kat saflık elde edilmiştir. Elde edilen bu aktivite kesitlerinin sefakril S 200 HR kromatografisine uygulanmasıyla birlikte *C. chalcoides*'te spesifik aktivite 36.180  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein'e saflaştırma katsayısı ise 34.060'a çıkmıştır. *L. cephalus*'ta bu adımda spesifik aktivite 27.828  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein ve saflık ise 29.683 olarak belirlenmiştir. Bu adımda en yüksek spesifik aktivite ve saflık *C. carpio*'da belirlenmekle birlikte, 52.990  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein ve 44.269 olarak bulunmuştur. Son saflaştırma basamağı olan fenil sefroz CL-4B ile karaciğer lipazları *C. chalcoides*'te 52.848  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein spesifik aktivite ve 48.888 kat saflık, *L. cephalus*'ta 51.416  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein spesifik aktivite ve 54.843 kat saflık, *C. carpio*'da ise 90.384  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein ve 75.08 kat saflık ile elde edilmiştir. Bu saflaştırma parametreleri sonucunda en yüksek spesifik aktivite ve saflaştırmanın *C. carpio*'da, *L. cephalus* 2. ve *C. chalcoides* ise 3. sırada yer almıştır.

**Tablo 14.** *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğer lipazının spesifik aktivitelerinin ve saflaştırma katsayılarının karşılaştırılması

Basamak	<i>C. chalcoides</i> Spesifik aktivite ( $\mu\text{mol/dk.mg}$ )	<i>L. cephalus</i> Spesifik aktivite ( $\mu\text{mol/dk.mg}$ )	<i>C. carpio</i> Spesifik aktivite ( $\mu\text{mol/dk.mg}$ )	<i>C. chalcoides</i> Saflaştırma (Kat)	<i>L. cephalus</i> Saflaştırma (Kat)	<i>C. carpio</i> Saflaştırma (Kat)
Homojenat	1.081	0.9375	1.197	1	1	1
Üst sıvı (60.000xg)	1.047	1.076	1.289	0.968	1.147	1.070
% 30 PEG-6000	1.149	1.078	1.210	1.062	1.149	1.010
Q sefaroze	32.965	30.991	29.729	30.494	33.057	24.836
Sefakril S 200-HR	36.18	27.828	52.99	34.060	29.683	44.269
Fenil sefaroze CL-4B	52.848	51.416	90.384	48.888	54.843	75.508

### 3.10. Karakterizasyon çalışmaları

#### 3.10.1. Sıcaklığın karaciğer lipazı aktivitesi üzerine etkisi

*C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* türlerinin karaciğer lipaz enzimleri üzerine sıcaklığın etkisi Tablo 15 ve Şekil 12’de sunulmuştur.

5 ve 10 °C sıcaklıklarda *C. chalcoides* karaciğer lipazının aktivitesinde bir değişim olmamıştır. Sıcaklığın 20 ve 30 °C’a artırılmasıyla aktivitede anlamlı bir artış meydana gelmiştir ( $P<0.05$ ). 33 °C’ta elde edilen aktivitenin 30 °C’dakinden rakamsal olarak farklı olmamasına karşın, istatistiki analiz sonucu fark görülmüştür ( $P<0.05$ ). Enzim aktivitesinin 37 °C’ta en yüksek olduğu (2.0133  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) tespit edilmiştir. Sıcaklığın 40 °C’a çıkarılmasıyla aktivitede hızlı bir düşüş gözlenmiş ve 45 °C’ta en düşük seviyeye (0.5320  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) inmiştir. 50 °C’ta herhangi bir aktiviteye rastlanmamıştır.

*L. cephalus* karaciğer lipazında da 5 ve 10 °C sıcaklıklarda elde edilen aktivitelerin birbirlerinden farksız oldukları gözlenmiştir ( $P>0.05$ ). Sıcaklığın 20 °C’a çıkarılmasıyla birlikte hızlı bir artış gösteren aktivitenin 1.1370  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ’ya ulaştığı tespit edilmiştir. 30-35 °C aralığında elde edilen aktivitelerin istatistiksel olarak farklı oldukları ortaya çıkmıştır ( $P<0.05$ ). 37 °C’ta aktivite maksimum değere ulaşmıştır (2.2011  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ). 40 ve 45 °C’larda aktivitede hızlı bir düşüş gözlenmiş ve 50 °C’ta herhangi bir aktiviteye rastlanmamıştır.

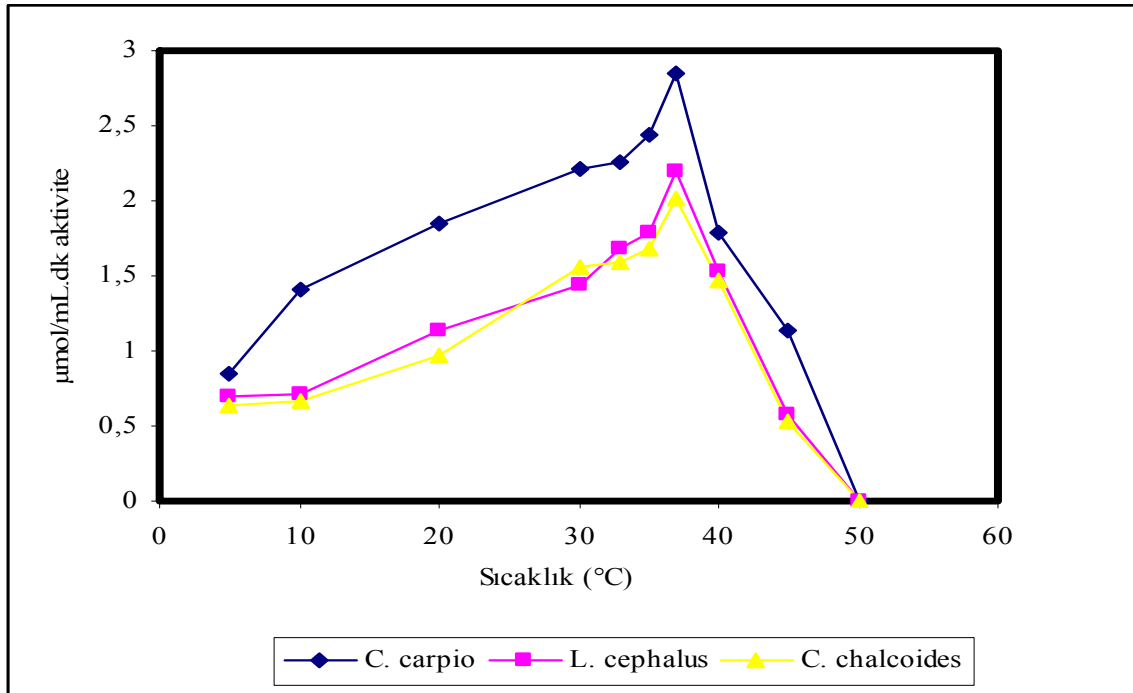
*C. carpio* karaciğer lipazının sıcaklığa bağlı olarak aktiviteleri değerlendirildiğinde, 5 °C’ta elde edilen aktivitenin en düşük olduğu (0.8550  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) ve sıcaklığın 10 °C’a çıkarılmasıyla birlikte aktivitenin hızlı bir şekilde arttığı görülmüştür (1.4135  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ). 30 ve 37 °C arasında elde edilen aktivitelerin sayısal olarak oldukça benzer olmalarına karşın 0.05 olasılık düzeyinde farklı oldukları görülmüştür. Diğer türlerin karaciğer lipazlarında olduğu gibi, *C. carpio*’nun karaciğer lipazının da en yüksek aktiviteyi (2.8479  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) 37 °C’ta vermiştir. Sıcaklığın 40 °C’ye çıkarılmasıyla birlikte enzim aktivitesinde ani bir düşüş gözlenmiş (1.7864  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) ve 50 °C’ta aktivite belirlenememiştir. Sonuç olarak, her üç türün karaciğer lipaz aktivitelerinin 37 °C’ta optimum olduğu belirlenmiştir (Şekil 12).

**Tablo 15.** Sıcaklığın karaciğer lipazlarının aktivitesi üzerine etkileri

Sıcaklık (°C)	<i>C. chalcoides</i> ( $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) Ort. $\pm$ S.H.	<i>L. cephalus</i> ( $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) Ort. $\pm$ S.H.	<i>C. carpio</i> ( $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) Ort. $\pm$ S.H.
5	0.6415 $\pm$ 0.07a	0.7041 $\pm$ 0.02a	0.855 $\pm$ 0.007a
10	0.6728 $\pm$ 0.11a	0.7145 $\pm$ 0.08a	1.4135 $\pm$ 0.14b
20	0.9753 $\pm$ 0.04b	1.1370 $\pm$ 0.14b	1.841 $\pm$ 0.009c
30	1.5543 $\pm$ 0.12c	1.4326 $\pm$ 0.11c	2.2168 $\pm$ 0.16d
33	1.5960 $\pm$ 0.09d	1.679 $\pm$ 0.07d	2.2585 $\pm$ 0.21e
35	1.6743 $\pm$ 0.11e	1.7890 $\pm$ 0.16e	2.4410 $\pm$ 0.10f
37	2.0133 $\pm$ 0.18f	2.2011 $\pm$ 0.18f	2.8479 $\pm$ 0.15g
40	1.4709 $\pm$ 0.01g	1.5335 $\pm$ 0.09g	1.7864 $\pm$ 0.02h
45	0.5320 $\pm$ 0.02h	0.5737 $\pm$ 0.03h	1.1318 $\pm$ 0.21i
50	---	---	---

**Ort.:** Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her sütunda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

**S.H.:** Standart hata.



**Şekil 12.** *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer lipazlarının sıcaklığa bağlı aktivite eğrileri.



### 3.10.2. pH'nın karaciğer lipazı aktivitesi üzerine etkisi

*C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğer lipazları üzerine pH'nın etkileri Tablo 16'da özetlenmiştir. Ayrıca her üç türün pH'ya bağlı aktivite değişimleri Şekil 13'te görülmektedir. Her üç türün enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkileri, 4-9.50 aralığında denenmiştir. pH 4 ve 5 değerlerinde herhangi bir aktiviteye rastlanmamıştır. *C. chalcoides* karaciğer lipazının pH 6'da aktivitesi 0.0625  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak kaydedilmiştir. pH'nın 7.5'e ulaşmasıyla aktivitede hızlı bir artış gözlenmiştir (1.4187  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ). En yüksek değere pH 8'de ulaşılmıştır (1.7403  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ). pH'nın 8.5'e ayarlanmasıyla aktivitede düşüş başlamış ve en düşük aktivite pH 9.5'te 0.2437  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak kaydedilmiştir.

*L. cephalus* karaciğer lipazının sergilediği aktivite değerleri araştırılan tüm pH değerlerinde istatistiksel olarak fark gösterdiği belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). pH 6'da 0.0730  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak kaydedilen aktivitenin pH'nın 7.5'e çıkarılmasıyla hızlı bir artış gösterdiği (1.5804  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) belirlenmiştir. En yüksek aktivite 1.6741  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak, pH 8 de görülmüştür. 8'den sonraki pH'larda aktivite düşmüş ve 9.5'de en düşük aktivite değeri (0.2167  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) kaydedilmiştir.

*C. carpio* lipazında da pH'nın 6-7.5 arasındaki aktivite değerlerinin istatistiksel olarak farklı olduğu gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). pH 7.5'te, aktivite 1.4500  $\mu\text{mol/mL.dk}$ 'ya yükselmiş ve en yüksek aktivite değeri pH 8'de kaydedilmiştir (2.2430  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ). pH'nın 8.5'e yükseltilmesiyle aktivite düşüş göstermiş ve pH 9'da elde edilen aktivitenin (0.9070  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ), pH 7'deki değerden farksız olduğu belirlenmiştir ( $P>0.05$ ). En düşük aktivite pH 9.5'te elde edilmiştir.

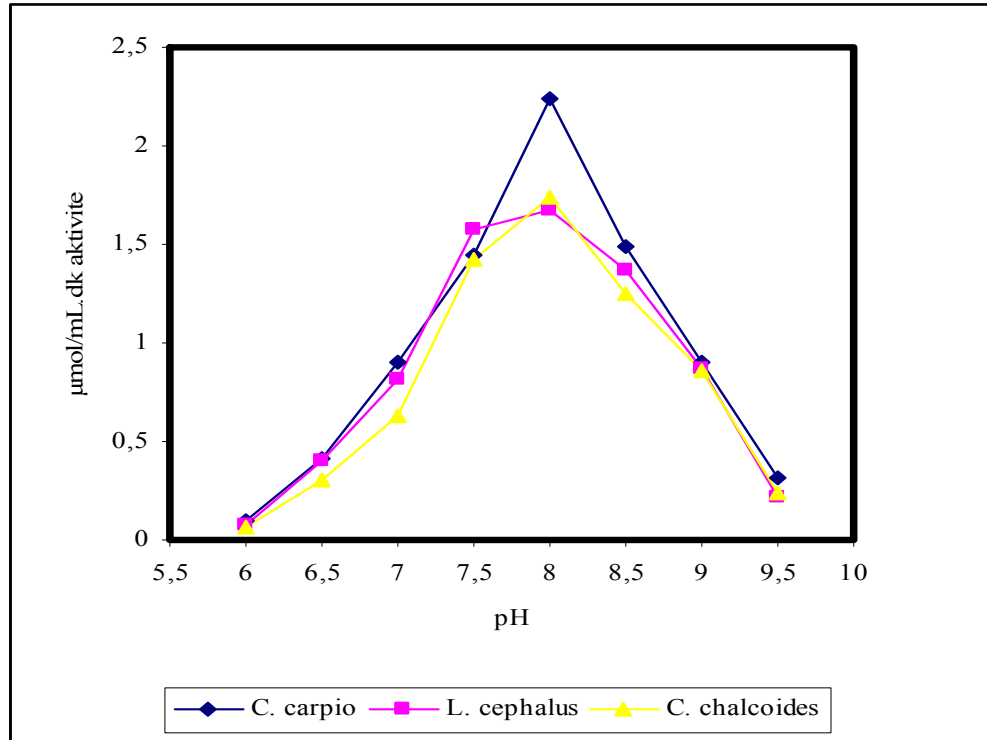
Üç türün karaciğer lipazlarının pH'ya bağlı aktivite değişimleri paralellik gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu sonuçlardan bu türler için optimum pH'nın 8 olduğu saptanmıştır.

**Tablo 16.** pH'nın karaciğer lipaz aktivitesi üzerine etkisi

pH	<i>C. chalcoides</i>	<i>L. cephalus</i>	<i>C. carpio</i>
	( $\mu\text{mol/mL.dk}$ )	( $\mu\text{mol/mL.dk}$ )	( $\mu\text{mol/mL.dk}$ )
	Ort. $\pm$ S.H.	Ort. $\pm$ S.H.	Ort. $\pm$ S.H.
6.00	0.0625 $\pm$ 0.03a	0.0730 $\pm$ 0.04a	0.0938 $\pm$ 0.06a
6.50	0.3077 $\pm$ 0.09b	0.4016 $\pm$ 0.01b	0.4172 $\pm$ 0.10b
7.00	0.6424 $\pm$ 0.21c	0.8150 $\pm$ 0.12c	0.8997 $\pm$ 0.01c
7.50	1.4187 $\pm$ 0.04d	1.5804 $\pm$ 0.22d	1.4500 $\pm$ 0.24d
8.00	1.7403 $\pm$ 0.11e	1.6741 $\pm$ 0.33e	2.2430 $\pm$ 0.33e
8.50	1.2551 $\pm$ 0.07f	1.3732 $\pm$ 0.09f	1.4984 $\pm$ 0.15f
9.00	0.8560 $\pm$ 0.02g	0.8730 $\pm$ 0.14g	0.9070 $\pm$ 0.08c
9.50	0.2437 $\pm$ 0.00h	0.2167 $\pm$ 0.03h	0.3114 $\pm$ 0.05g

Ort.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her sütunda aynı harflerle belirlene veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

S. H.: Standart hata.



**Şekil 13.** *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer lipazının pH'a bağlı aktivite eğrileri.

### 3.10.3. Substrat miktarının karaciğer lipazları üzerine etkileri

#### 3.10.3.1. *C. chalcoides* karaciğer lipaz aktivitesi üzerine substrat miktarının (pNPB) etkisi

Türün karaciğer lipaz aktivitesi üzerine substrat miktarının (pNPB) etkisi ile ilgili elde edilen veriler Tablo 17’de sunulmuştur.

pNPB miktarının aktiviteye etkisini değerlendiren uygulamalarda substrat miktarının 1.33 mM’a kadar artırılmasıyla aktivitenin oldukça hızlı bir şekilde arttığı ve bu artışın istatistiki açıdan önemli olduğu görülmüştür ( $P<0.05$ ). 1.33 ve 2 mM arasındaki pNPB uygulamalarına ait aktivitelere artış olmasına rağmen aktivite değerlerinin birbirinden farksız oldukları görülmüştür ( $P>0.05$ ). 2 mM’ın üzerindeki substrat miktarları denenmesine rağmen, tutarlı aktivite değerleri elde edilememiştir.

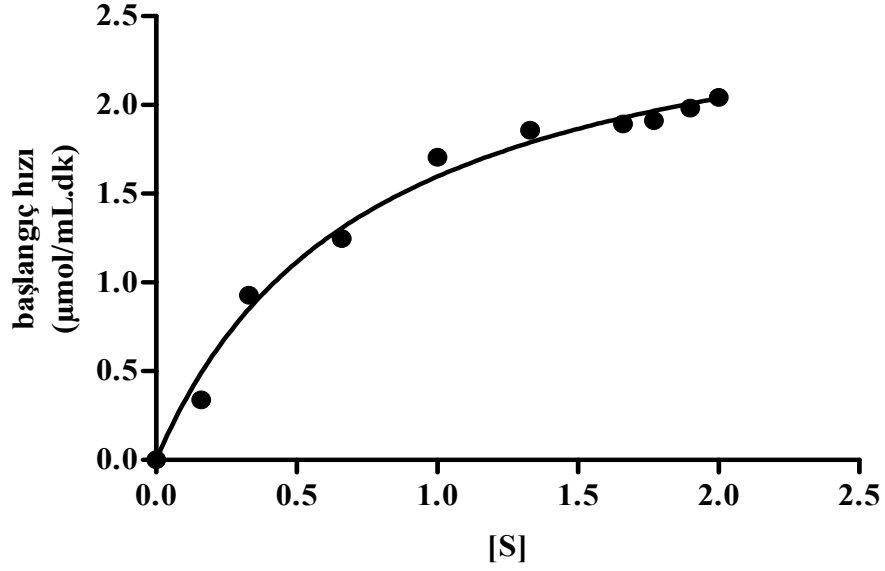
**Tablo 17.** *C. chalcoides* karaciğer lipaz aktivitesi üzerine substrat (pNPB) miktarının etkisi

[S] (mM)	V $\mu\text{mol/mL.dk}$	1/V	1/[S]	[S]/V	V/[S]
<b>0.16</b>	0.3390±0.03a	2.95	6.25	0.47	2.12
<b>0.33</b>	0.9284±0.07b	1.08	3.03	0.36	2.81
<b>0.66</b>	1.2463±0.04c	0.80	1.52	0.53	1.89
<b>1.00</b>	1.7060±0.10d	0.59	1.00	0.59	1.71
<b>1.33</b>	1.8568±0.09e	0.54	0.75	0.72	1.40
<b>1.66</b>	1.8930±0.14e	0.53	0.60	0.88	1.14
<b>1.77</b>	1.9112±0.04e	0.52	0.56	0.93	1.08
<b>1.90</b>	1.9821±0.03e	0.50	0.53	0.96	1.04
<b>2.00</b>	2.0431±0.22e	0.49	0.50	0.97	1.02

Ort.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her sütunda aynı harflerle belirlene veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

S.H. Standart hata.

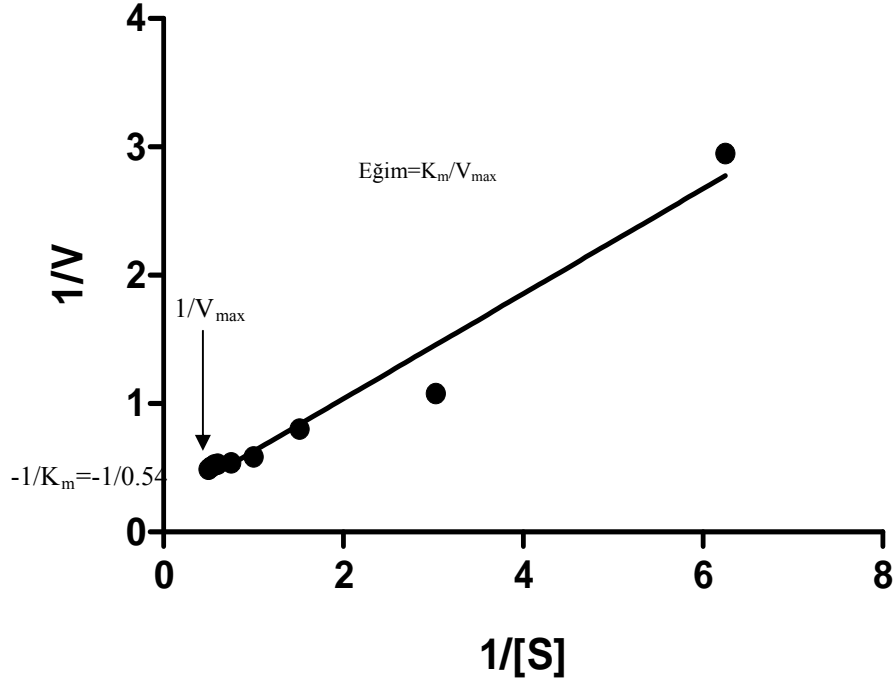
Tablo 17’den elde edilen veriler kullanılarak “GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software” programında nonlinear regression parametresi seçildikten sonra  $K_m$  ve  $V_{max}$ ’ değerleri belirlenmiş ve Michaelis-Menten eğrisi elde



Şekil 14. *C. chalcoides* karaciğer lipazı Michaelis-Menten eğrisi.

<b>Michaelis-Menten</b>	
<b>Best-fit values</b>	
Vmax	2,814
Km	0,7629
<b>Std. Error</b>	
Vmax	0,1631
Km	0,1202
<b>95% Confidence Intervals</b>	
Vmax	2.437 to 3.190
Km	0.4857 to 1.040
<b>Goodness of Fit</b>	
Degrees of Freedom	8
R <sup>2</sup>	0,9890
Absolute Sum of Squares	0,05387
Sy.x	0,08206
<b>Constraints</b>	
Km	Km > 0.0
<b>Number of points</b>	
Analyzed	10

Elde edilen Michaelis-Menten eğrisi üzerinden yine “GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software” programından “transform data” parametresi seçilmiş, buradan ise Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. *C. chalcoides* karaciğer lipazı Lineweaver-Burk eğrisi.

<b>Best-fit values</b>	
Slope	0.4089 ± 0.03110
Y-intercept when X=0.0	0.2192 ± 0.07570
X-intercept when Y=0.0	-0,5362
1/slope	2,445
<b>95% Confidence Intervals</b>	
Slope	0.3354 to 0.4825
Y-intercept when X=0.0	0.04022 to 0.3983
X-intercept when Y=0.0	-1.130 to -0.08759
<b>Goodness of Fit</b>	
r <sup>2</sup>	0,9611
Sy.x	0,1680
<b>Is slope significantly non-zero?</b>	
F	172,9
DFn, DFd	1.000, 7.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
<b>Data</b>	
Number of X values	9
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	9
Number of missing values	0

### 3.10.3.2. *L. cephalus* karaciğer lipaz aktivitesi üzerine substrat (pNPB) miktarının etkisi

Substrat miktarına bağlı olarak elde edilen aktivite değerleri ve veriler Tablo 18’de sunulmuştur.

Substrat miktarının 0.16-0.33 mM arasında olduğu değerlerde elde edilen aktivitelere hızlı bir artışın olduğu ve istatistiksel olarak farklı oldukları bulunmuştur ( $P<0.05$ ). 1.33 mM’dan sonraki miktarlarda da 2.00 mM’a kadar gözlenen aktivitelere de artış sağlanmış ancak aktivite değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. En yüksek aktivite 2.00 mM’da görülmüştür.

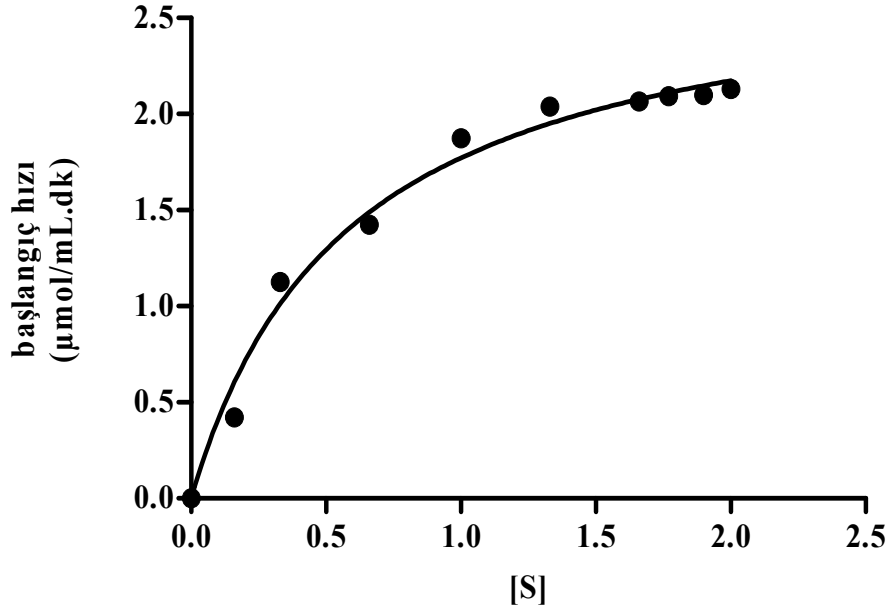
Tablo 18’den elde edilen veriler, “GraphPad Prism version 5.00 for Windows” programına girilmiş ve nonlinear regresyon menüsünden Michaelis-Menten eğrisi elde edilmiştir (Şekil 16). Buradan  $V_{max} = 2.8 \mu\text{mol/mL.dk}$  ve  $K_m$  ise 0.58 mM olarak belirlenmiştir.

**Tablo 18.** *L. cephalus* karaciğer lipazı aktivitesi üzerine substrat (pNPB) miktarının etkisi

[S] (mM)	V $\mu\text{mol/mL.dk}$	1/V	1/[S]	[S]/V	V/[S]
	Ort. $\pm$ S.H				
<b>0.16</b>	0.4224 $\pm$ 0.04a	2.37	6.25	0.38	2.64
<b>0.33</b>	1.1266 $\pm$ 0.13b	0.89	3.03	0.30	3.41
<b>0.66</b>	1.4250 $\pm$ 0.08c	0.70	1.52	0.46	2.16
<b>1.00</b>	1.8730 $\pm$ 0.20d	0.53	1.00	0.53	1.87
<b>1.33</b>	2.0394 $\pm$ 0.18e	0.49	0.75	0.65	1.53
<b>1.66</b>	2.0653 $\pm$ 0.11e	0.48	0.60	0.80	1.24
<b>1.77</b>	2.0917 $\pm$ 0.03e	0.47	0.56	0.84	1.18
<b>1.90</b>	2.1000 $\pm$ 0.07e	0.47	0.53	0.90	1.11
<b>2.00</b>	2.1300 $\pm$ 0.25e	0.47	0.50	0.94	1.07

Ort.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her sütunda aynı harflerle belirlene veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

S.H. Standart hata.



Şekil 16. *L. cephalus* karaciğer lipazı Michaelis-Menten eğrisi.

**Michaelis-Menten**

**Best-fit values**

**Vmax** 2,809

**Km** 0,5853

**Std. Error**

**Vmax** 0,1466

**Km** 0,09463

**95% Confidence Intervals**

**Vmax** 2.471 to 3.147

**Km** 0.3671 to 0.8036

**Goodness of Fit**

**Degrees of Freedom** 8

**R<sup>2</sup>** 0,9866

**Absolute Sum of Squares** 0,07237

**Sy.x** 0,09511

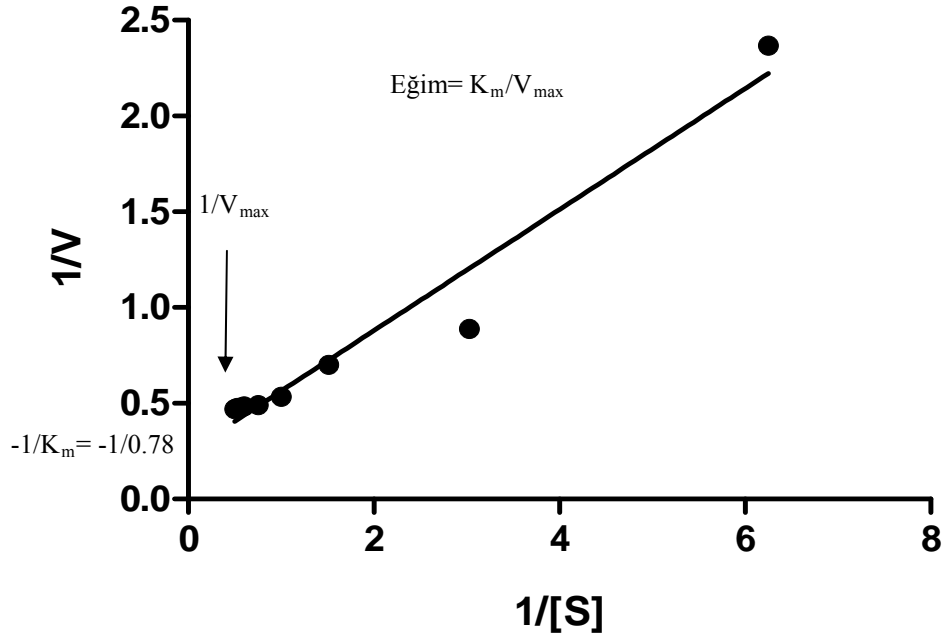
**Constraints**

**Km** Km > 0.0

**Number of points**

**Analyzed** 10

Elde edilen Michaelis-Menten eğrisi üzerinden programda yine transform uygulanmış ve Lineweaver-Burk eğrisi elde edilmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. *L. cephalus* karaciğer lipazı Lineweaver-Burk eğrisi.

**Best-fit values**

Slope	0.3159 ± 0.02582
Y-intercept when X=0.0	0.2480 ± 0.06284
X-intercept when Y=0.0	-0,7850
1/slope	3,165
<b>95% Confidence Intervals</b>	
Slope	0.2549 to 0.3770
Y-intercept when X=0.0	0.09938 to 0.3966
X-intercept when Y=0.0	-1.481 to -0.2770
<b>Goodness of Fit</b>	
r <sup>2</sup>	0,9553
Sy.x	0,1394
<b>Is slope significantly non-zero?</b>	
F	149,7
DFn, DFd	1.000, 7.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
<b>Data</b>	
Number of X values	9
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	9
Number of missing values	0



### 3.10.3.3. *C. carpio* karaciğer lipaz aktivitesi üzerine substrat (pNPB) miktarının etkisi

*C. carpio*'nun karaciğer lipazının substrat miktarına bağlı olarak gösterdiği aktiviteler ve diğer parametreler Tablo 19'da görülmektedir.

0.16 ve 0.66 mM arasındaki pNPB uygulamasında aktivitede önemli bir artış gözlenmiştir. 0.66 mM'da elde edilen aktivite ve 1 mM'daki aktivite arasında artış olmasına rağmen, bu artış önemli bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Ancak 1.33 mM'daki aktivitenin diğerlerine göre anlamlı olduğu ortaya çıkmıştır. 1.33-2.00 mM arasındaki substrat miktarlarındaki aktivite artışları sabit kalmıştır. Bu veriler arasında istatistiksel bir önem gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ). Bu sonuçlardan elde edilen aktivite bilgileri, *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'tan elde edilenlerle karşılaştırıldığında, her üç türde de 1.33 mM pNPB miktarına kadarki dozlarda aktivitede hızlı bir yükseliş gözlemlendiği söylenebilir.

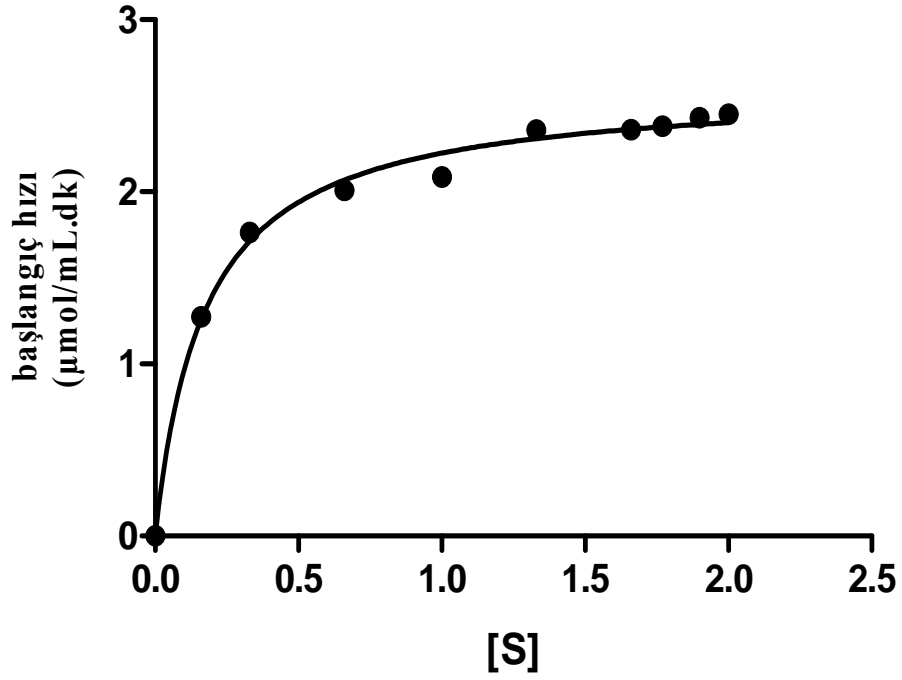
**Tablo 19.** *C. carpio* lipazı üzerine substrat miktarının etkisi

[S] (mM)	V $\mu\text{mol/mL.dk}$	1/V	1/[S]	[S]/V	V/[S]
<b>0.16</b>	1.2727 $\pm$ 0.03a	0.78	6.25	0.12	7.95
<b>0.33</b>	1.7630 $\pm$ 0.06b	0.56	3.03	0.18	5.34
<b>0.66</b>	2.0081 $\pm$ 0.10c	0.50	1.52	0.32	3.04
<b>1.00</b>	2.0864 $\pm$ 0.05c	0.48	1	0.48	2.08
<b>1.33</b>	2.3576 $\pm$ 0.18d	0.42	0.75	0.56	1.77
<b>1.66</b>	2.3608 $\pm$ 0.12d	0.42	0.60	0.70	1.42
<b>1.77</b>	2.3800 $\pm$ 0.04d	0.42	0.56	0.74	1.34
<b>1.90</b>	2.4310 $\pm$ 0.07d	0.41	0.53	0.78	1.28
<b>2.00</b>	2.4515 $\pm$ 0.04d	0.40	0.50	0.82	1.23

Ort.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her sütunda aynı harflerle belirlene veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

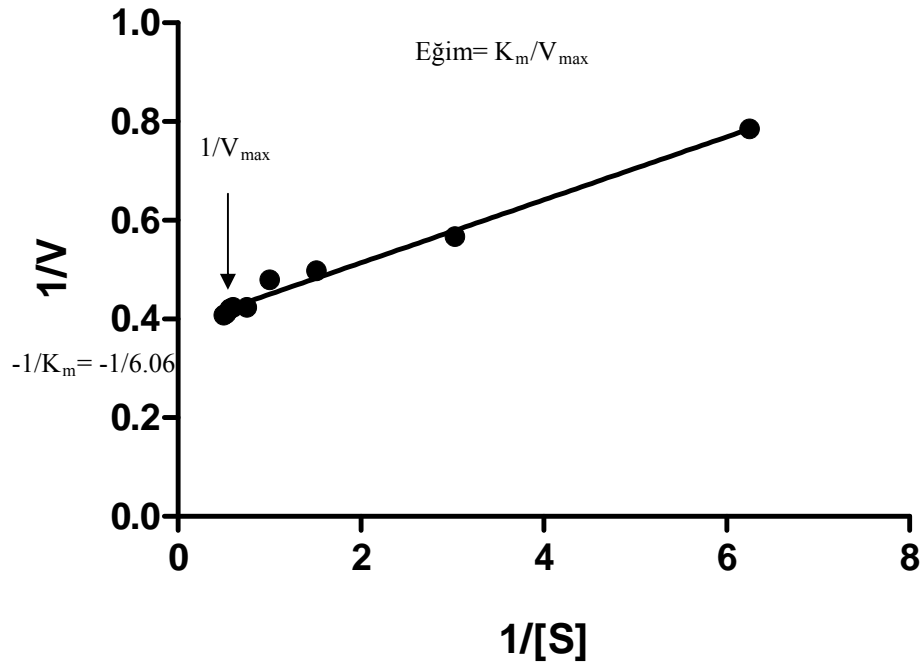
S.H. Standart hata.

Tablo 19’da elde edilen verilerin “GraphPad Prism version 5.00 for Windows” programında değerlendirilmesi sonucunda Michaelis-Menten (Şekil 18) ve Lineaver-Burk eğrileri (Şekil 19) elde edilmiştir. Buradan  $K_m = 0.17 \text{ mM}$ ,  $V_{max} = 2.6 \text{ } \mu\text{mol/mL.dk}$  olarak bulunmuştur.



Şekil 18. *C. carpio* karaciğer lipazı Michaelis-Menten eğrisi.

<b>Michaelis-Menten</b>	
<b>Best-fit values</b>	
Vmax	2,609
Km	0,1727
<b>Std. Error</b>	
Vmax	0,04410
Km	0,01653
<b>95% Confidence Intervals</b>	
Vmax	2.508 to 2.711
Km	0.1346 to 0.2108
<b>Goodness of Fit</b>	
Degrees of Freedom	8
R <sup>2</sup>	0,9940
Absolute Sum of Squares	0,03198
Sy.x	0,06323
<b>Constraints</b>	
KM	Km > 0.0
<b>Number of points</b>	
Analyzed	10



Şekil 19. *C. carpio* karaciğer lipazının Lineweaver-Burk eğrisi.

**Best-fit values**

Slope	0.06377 ± 0.002728
Y-intercept when X=0.0	0.3864 ± 0.006639
X-intercept when Y=0.0	-6,059
1/slope	15,68

**95% Confidence Intervals**

Slope	0.05732 to 0.07022
Y-intercept when X=0.0	0.3707 to 0.4021
X-intercept when Y=0.0	-6.946 to -5.331

**Goodness of Fit**

r <sup>2</sup>	0,9874
Sy.x	0,01473

**Is slope significantly non-zero?**

F	546,5
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

### 3.11. Yüzey aktif maddelerin karaciğer lipazları üzerine etkisi

#### 3.11.1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)'in etkisi

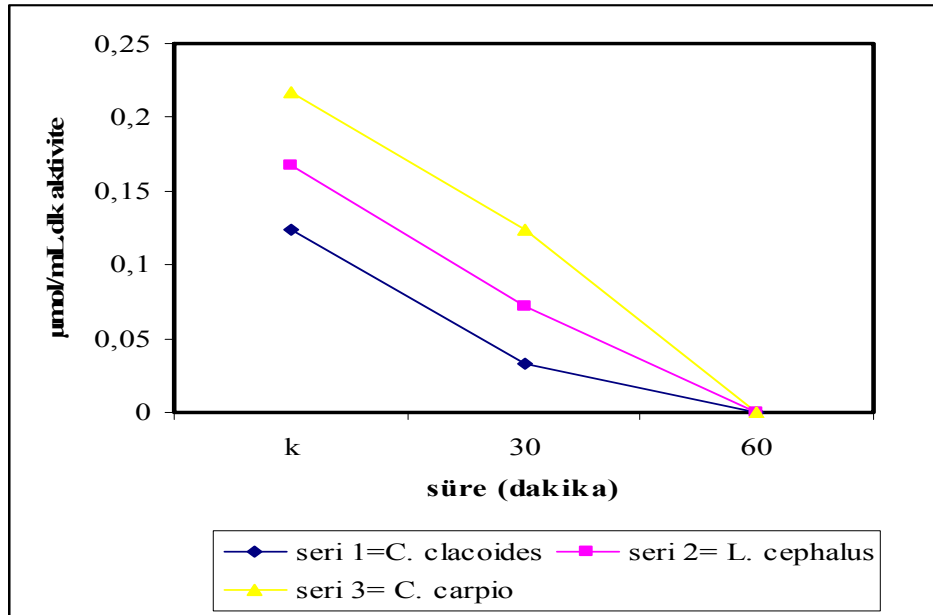
*C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğerinden saflaştırılan lipaz aktiviteleri üzerine SDS'in etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, SDS içermeyen kontrol örneğine karşı, % 0.5 (w/v) SDS ile inkübe edilen enzim çözeltilerinin aktiviteleri 30 ve 60 dakika sonrasında belirlenmiştir (Şekil 20).

*C. chalcoides* karaciğer lipazının kontrol değeri 0.1241  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenmiştir. Bu türün SDS ile inkübe edilen örneğinin 30 dakika sonundaki aktivitesinin düşerek 0.033  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olduğu tespit edilmiştir.

Kontrol değeri 0.1669  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenen *L. cephalus* karaciğer lipazının da 30 dakika sonunda aktivite değerinde düşüş gözlenmiş ve 0.072  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak kaydedilmiştir.

0.2173  $\mu\text{mol/mL.dk}$  kontrol aktivite değerine sahip olan *C. carpio* karaciğer lipazının SDS ile inkübe edilen örneğinin de diğer türlerde olduğu gibi 30 dakika sonrasında düşüş göstererek, 0.124  $\mu\text{mol/mL.dk}$  aktivite değeriyle temsil edildiği görülmüştür.

Her üç türün karaciğer lipazı 1 saatlik süre sonunda SDS karşısında aktivitesini yitirmiştir. Bu sonuçlardan, SDS'in karaciğer lipazlarının yapısında oldukça hızlı bir şekilde denaturasyona neden olduğu söylenebilir.



Şekil 20. *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer lipaz aktivitesi üzerine % 0.5 (w/v) SDS'in etkileri. "k" kontrolü temsil etmekte.

### 3.11.2. Sodyum taurokolik asit'in etkisi

*C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer lipaz aktiviteleri üzerine sodyum taurokolik asitin etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, literatür bildirimleri doğrultusunda hazırlanan % 0.5 (w/v) sodyum taurokolik asit içeren enzim çözeltilerinin 1, 2, 3, 4, 6 ve 24 saat sonundaki aktivite değerleri kontrole karşı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 20 ve Şekil 21'de görülmektedir.

*C. chalcoides* karaciğer lipazının kontrol aktivitesi 0.5737  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenmiştir. Bu aktivite değerinin inkübe edilen örneğinin 1. saat sonunda elde edilen aktivite değeriyle farklı olmadığı bulunmuş ( $P>0.05$ ) ve 2. saat itibariyle aktivitede önemli bir düşüşün olduğu belirlenmiştir. Aktivitede düşüşün devam ettiği 3 ve 6. saatler arasında elde edilen değerlerin kendi aralarında farklı olmadığı ( $P>0.05$ ), ancak diğer elde edilen aktivite değerlerinden farklı oldukları görülmüştür. Enzim aktivitesi 24. saat sonunda düşerek 0.089  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenmiştir.

Kontrol aktivitesi 0.6780  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenen *L. cephalus* lipazının, ilk iki saat içerisinde kaydedilen aktivitelerinin farklı olmadıkları belirlenmekle birlikte, 3. saat itibariyle aktivitede kayda değer bir düşüşün (0.2173  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) olduğu tespit edilmiştir. 6. saat itibariyle 0.1743  $\mu\text{mol/mL.dk}$  aktivite gösteren enzimin ( $P<0.05$ ), 24. saat sonunda 0.1069  $\mu\text{mol/mL.dk}$  aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

*C. carpio* karaciğer lipazıda saflaştırılan diğer karaciğer lipazlarına benzer özellikler sergilemiştir. 0.7476  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenen kontrol aktivitesine karşın, sodyum taurokolik asit ile muamele edilen örnekte 2. saat itibariyle önemli bir düşüş kaydedilmiştir ( $P<0.05$ ). 3. saat itibariyle 0.4433  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenen aktivite değerinin elde edilen diğer değerlerden farklı olduğu görülmüştür ( $P<0.05$ ). 4 ve 6. saatlerde belirlenen aktiviteler düşüş göstermekle birlikte kendi aralarında farksız oldukları tespit edilmiştir ( $P>0.05$ ). 24 saatlik süre sonunda enzimin aktivitesinin 0.2046  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenmiştir.

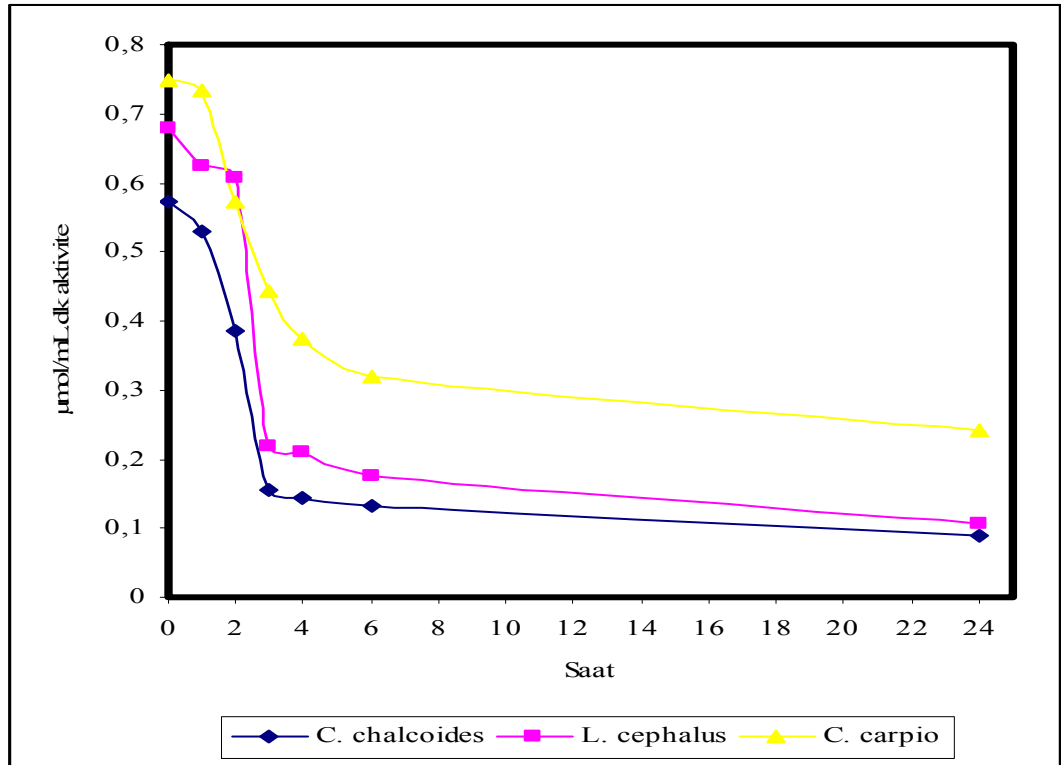
Her üç türün karaciğer lipazının genel olarak 3. saat sonunda aktivitelerinde önemli düşüşlerin olduğu saptanmıştır.

**Tablo 20.** Sodyum taurokolik asitin karaciğer lipaz aktivitesi üzerine etkisi

Süre (saat)	<i>C. chalcoides</i> $\mu\text{mol/mL.dk}$ Ort. $\pm$ S.H	<i>L. cephalus</i> $\mu\text{mol/mL.dk}$ Ort. $\pm$ S.H	<i>C. carpio</i> $\mu\text{mol/mL.dk}$ Ort. $\pm$ S.H
<b>kontrol</b>	0.5737 $\pm$ 0.07a	0.6780 $\pm$ 0.02a	0.7476 $\pm$ 0.09a
<b>1</b>	0.5285 $\pm$ 0.10a	0.6254 $\pm$ 0.05a	0.7337 $\pm$ 0.03a
<b>2</b>	0.3862 $\pm$ 0.03b	0.6085 $\pm$ 0.12a	0.5734 $\pm$ 0.03b
<b>3</b>	0.1564 $\pm$ 0.05c	0.2173 $\pm$ 0.08b	0.4433 $\pm$ 0.07c
<b>4</b>	0.1426 $\pm$ 0.02c	0.2108 $\pm$ 0.03b	0.3740 $\pm$ 0.10d
<b>6</b>	0.1337 $\pm$ 0.04c	0.1743 $\pm$ 0.04c	0.3185 $\pm$ 0.06d
<b>24</b>	0.0890 $\pm$ 0.01d	0.1069 $\pm$ 0.01d	0.2406 $\pm$ 0.03e

Ort.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her sütunda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

S.H. Standart hata.



**Şekil 21.** Sodyum taurokolik asitin *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğer lipazına etkisi.

### 3.11.3. Triton X-100'ün etkisi

*C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer lipazları üzerine Triton X-100'ün etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla, SDS ve sodyum taurokolik asit uygulamalarında olduğu gibi % 0.5 (v/v) Triton X-100 ile inkübe edilen karaciğer enzim örneklerine ait aktivite değerleri, kontrol çözeltilerine karşı, 1, 2, 3, 4, 6 ve 24 saatlik süreler sonunda belirlenmiştir. Elde edilen veriler Tablo 21 ve Şekil 22'de sunulmuştur.

*C. chalcoides* karaciğer lipazı aktivitesinin kontrol değeri 0.5216  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenmiştir. triton X-100'lü ortamda 1 ve 2. saat sonunda birbirinden farksız olan aktivite değerlerinin, kontrolden farklı oldukları görülmüştür. 3-24 saat arasındaki inkübasyon sürelerinde elde edilen aktivite değerleri düşmüş ve istatistiksel farklar göstermişlerdir. 24. saat sonunda karaciğer lipaz aktivitesinin 0.1090  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olduğu tespit edilmiştir.

*L. cephalus* karaciğer lipazının kontrol aktivitesi 0.6693  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenmiştir. Triton X-100 ile muamele edilen enzim çözeltisinde 1. saat süre sonunda aktivitede meydana gelen düşüşün kontrolden farklı olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Enzim aktivitesi 2 ve 4. saatler arasında da düşüş göstermiş ancak bu aralıkta elde edilen aktivite değerleri birbirinden farksızdır ( $P>0.05$ ). 6. saatte 0.2495  $\mu\text{mol/mL.dk}$ 'ya düşen aktivitenin, 24. saat sonunda da düşerek 0.1836  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olduğu tespit edilmiştir.

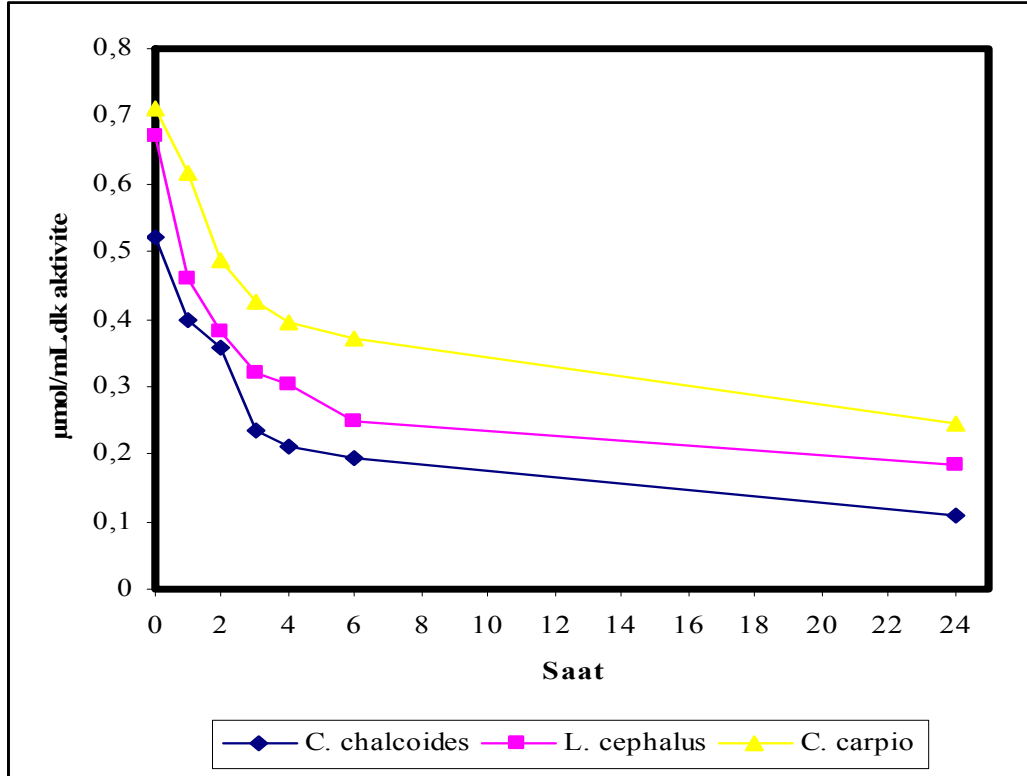
Kontrol aktivitesi 0.7128  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenen *C. carpio* karaciğer lipazında da, diğer türlerde olduğu gibi, Triton X-100 ile inkübasyonu sonucunda 1. saat sonunda elde edilen aktivitenin düşük (0.6172  $\mu\text{mol/mL.dk}$ ) ve kontrolden farklı olduğu görülmüştür ( $P<0.05$ ). 2 ve 3. saatlerde düşüş gösteren aktivite değerleri kendi aralarında fark göstermemekle birlikte, aynı durum 4 ve 6. saatlerde de tekrarlanmıştır. Enzim aktivitesinin 24. saat sonunda  $0.2437\pm 0.06$   $\mu\text{mol/mL.dk}$  olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 21.** Triton X-100'ün karaciğer lipaz aktivitesi üzerine etkisi

Süre (saat)	<i>C. chalcoides</i> µmol/mL.dk Ort.±S.H	<i>L. cephalus</i> µmol/mL.dk Ort.±S.H	<i>C. carpio</i> µmol/mL.dk Ort.±S.H
<b>kontrol</b>	0.5216±.04a	0.6693±0.03a	0.7128±0.09a
<b>1</b>	0.3998±0.09b	0.4607±0.04b	0.6172±0.06b
<b>2</b>	0.3564±0.02b	0.3825±0.02c	0.4863±0.01c
<b>3</b>	0.2347±0.10c	0.3216±0.01c	0.4259±0.02c
<b>4</b>	0.2114±0.14cd	0.3014±0.06c	0.3944±0.11d
<b>6</b>	0.1925±0.08d	0.2495±0.06d	0.3726±0.03d
<b>24</b>	0.1090±0.01e	0.1836±0.03e	0.2437±0.06e

Ort.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her sütunda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

S.H. Standart hata.



**Şekil 22.** Triton X-100'ün *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer lipaz aktivitesi üzerine etkisi.



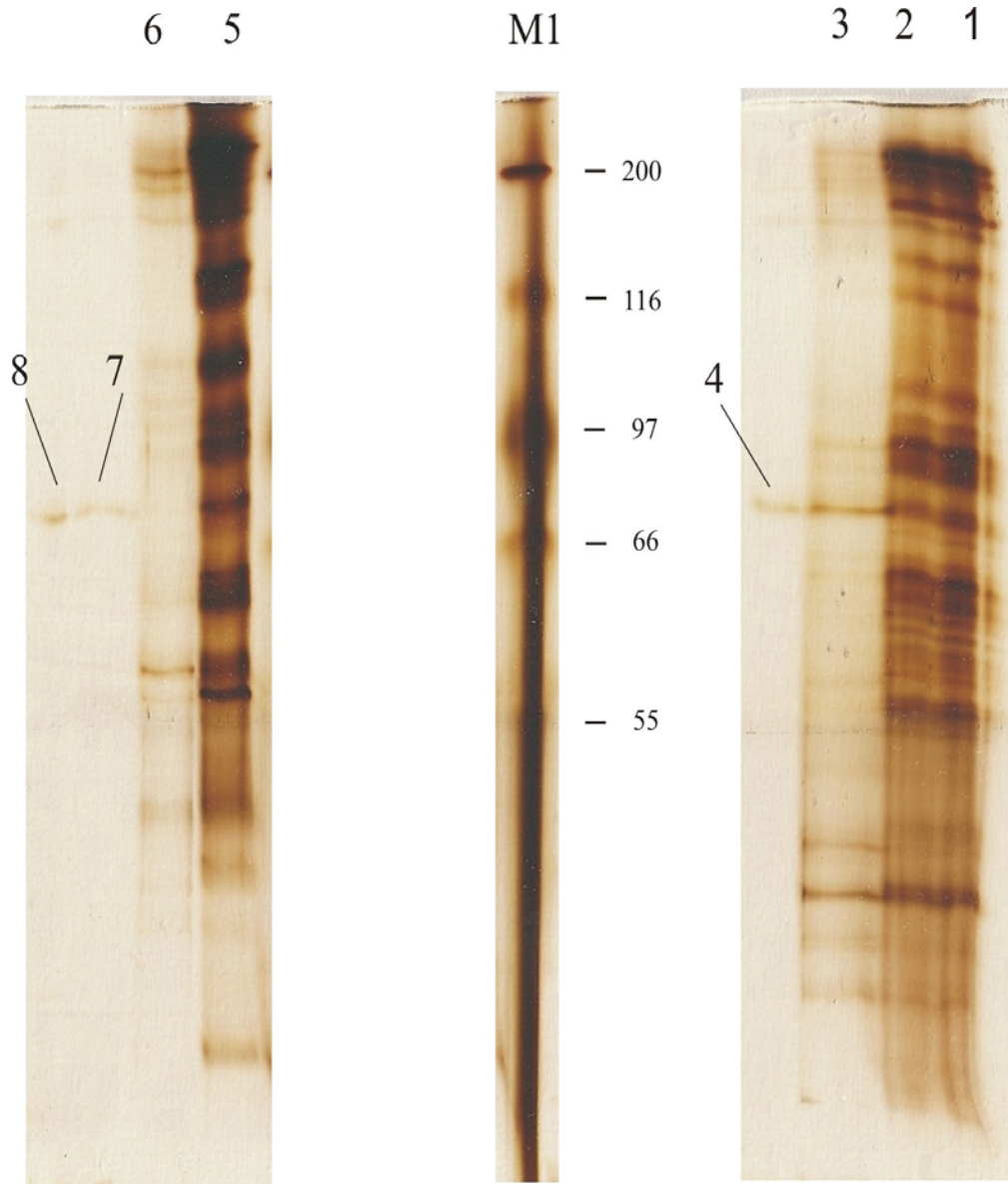
### 3.12. Elektroforetik Analizler

*C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer lipazlarının Q sefaroza, sefakril S 200-HR ve fenil sefaroza CL-4B kolon kromatografileri ile saflaştırılmalarını kapsayan temel basamaklarda, saflaştırmanın boyutları SDS-PAGE tekniğiyle gözlenmiştir. Ayrıca en son basamakta elde edilen enzim preparatlarının moleküler ağırlığı moleküler belirteçler kullanılarak saptanmıştır (Şekil 23).

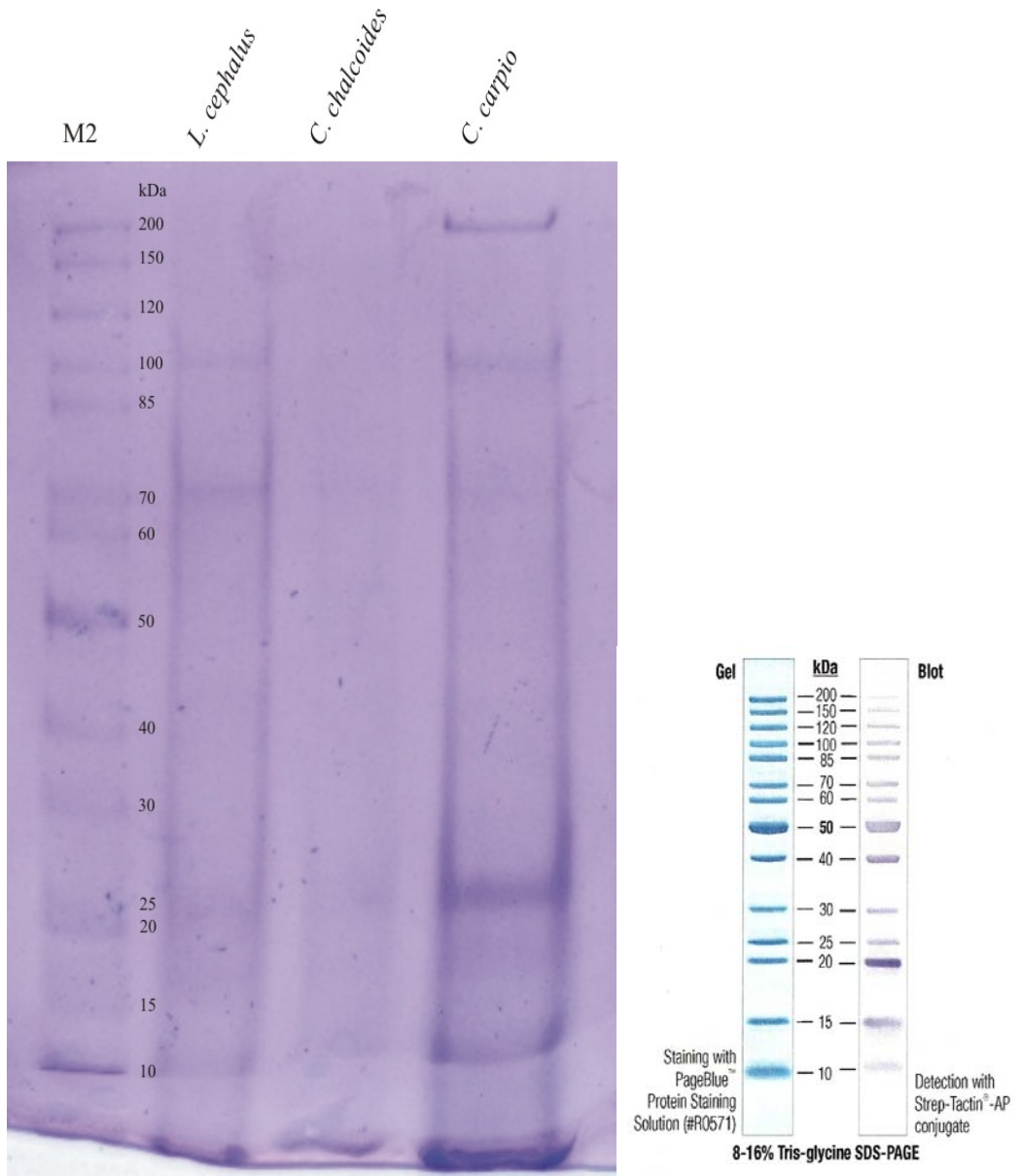
M1 belirtecine ait jelde gözlenen her bir protein bandının Rf değerleri ve moleküler ağırlıkları Tablo 22’de görülmektedir. Kullanılan standart proteinlerin Rf değerleri, tavşan kas miyozini 0.06, E.coli  $\beta$ -Galaktozidaz’ı 0.16, tavşan kas fosforilaz b’si 0.27, sığır serum albumini 0.37 ve sığır karaciğer glutamik dehidrojenaz’ı için 0.50 olarak belirlenmiştir. *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer lipazları için Rf değeri 0.35 olarak hesaplanmıştır. Moleküler belirtecin içerdiği standart proteinlerin molekül ağırlıkları ve Rf değerlerinden elde edilen grafik Şekil 24’te görülmektedir. Elde edilen logaritmik eğrinin denklemi  $y = -68.391 \ln(x) + 2.2607$  olarak belirlenmiş ve  $R^2$  değeri 0.9821’dir. Çalışmamızda kullanılan her bir türün karaciğer lipazı için elde edilen Rf değeri (0.35) denklemde “x” değişkeni yerine konularak, her üç türün karaciğer lipazının molekül ağırlığının 74 kDa olduğu saptanmıştır.

**Tablo 22.** Elektroforez analiz sonuçları

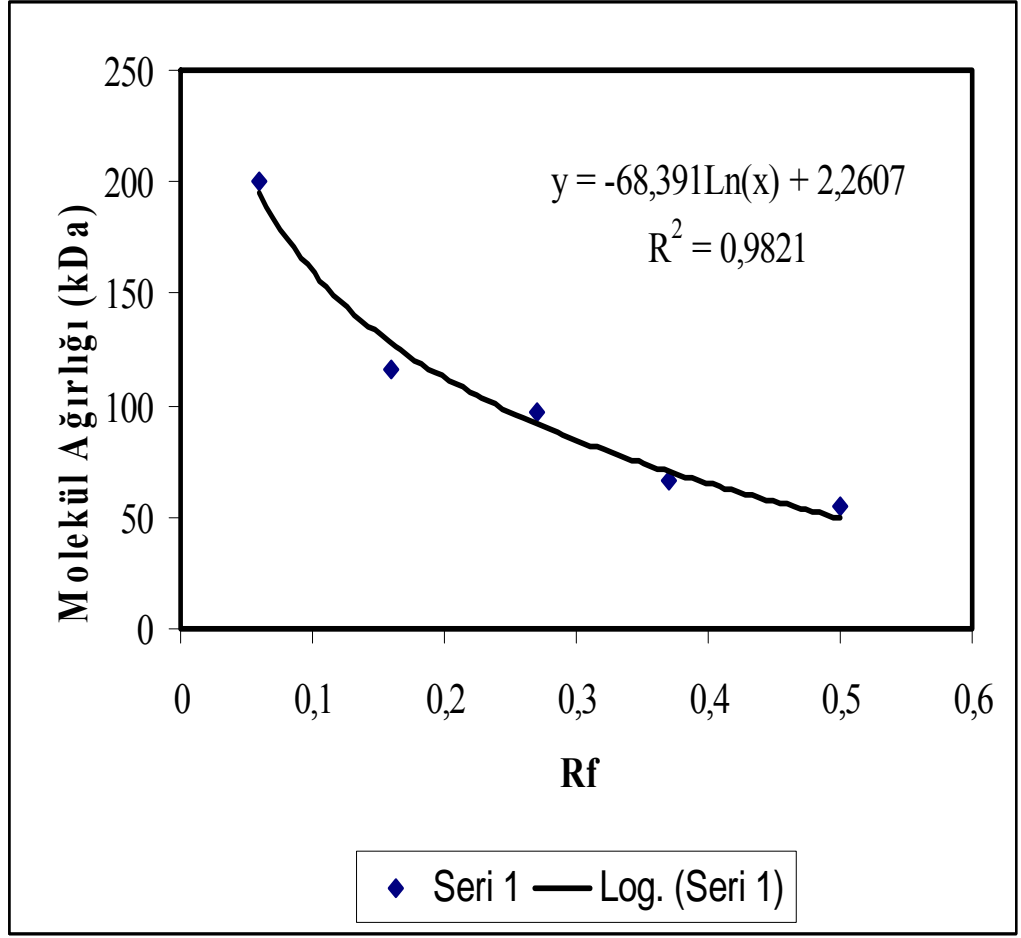
Standart proteinler	Molekül ağırlığı (kDa)	Rf
Miyozin	200	0.06
B-Galaktozidaz	116	0.16
Fosforilaz b	97	0.27
Albumin	66	0.37
Glutamik Dehidrojenaz	55	0.50
Karaciğer lipazı	74.05	0.35



**Şekil 23.** Karaciğer lipazlarının SDS-PAGE sonuçları. Burada 1, 2, 3 ve 4 sırasıyla, *C. carpio*'nun homojenat, PEG çökelti, Q sefaroze ve fenil sefaroze CL-4B sonuçlarıdır. 5, 6, ve 7 sırasıyla, *L. cephalus*'un homojenat, Q-sefaroze ve fenil sefaroze CL-4B sonuçlarını göstermektedir. 8 numaralı örnek fenil sefaroze CL-4B sonucunda elde edilen *C. chalcoides* lipazını göstermektedir. M1 moleküler ağırlık belirlemede kullanılan standart proteinleri içerip, moleküler ağırlıkları şekil üzerinde belirtilmiştir.



**Şekil 24.** *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğerinin Sefakril S 200 HR kromatografisi sonucunda elde edilen lipaz enzim preparatına ait elektroforez bantları. M2 moleküler ağırlık belirlemede kullanılan standart proteinleri içerip, moleküler ağırlıkları şekil üzerinde belirtilmiştir.



Şekil 25. Elektroforetik analiz sonucunda moleküler belirteç için elde edilen Rf değerlerinin moleküler ağırlıklarıyla ilişkilendirilmesi.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *Chalcalburnus chalcoides*, *Leuciscus cephalus* ve *Cyprinus carpio*'nun karaciğer ve kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi ve karaciğer lipazlarının saflaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda yağ asiti analizlerinde kullanılmak üzere yakalanan balıkların, gerek boy gerekse ağırlık açısından bazı mevsimlerde farklılıklar gösterdikleri görülmüştür. Her balığın gelişiminde, yapısal bileşenler ve enerji kaynağı olarak lipitlere büyük bir gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle balıkların lipit bileşenlerinin değişimi üzerine birçok araştırma yapıldığı belirtilmiştir (Atchison, 1975; Akpınar, 1987; Testi ve ark., 2006; Görgün ve Akpınar, 2007; Jankowska ve ark., 2010). Balığın kimyasal bileşimi türden türe değiştiği gibi, besin içeriği de balığın kimyasal bileşimi üzerinde etkilidir. Aynı balık türlerinin kimyasal bileşimleri de farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılıklar balığın türüne, yaşına, cinsiyetine, hasat zamanına, yetiştirildiği bölgeye, beslenme şekline ve zamanına, vücut bölgelerine, eşeyssel olgunluk durumuna ve büyüklüğüne bağlıdır (Uysal ve ark., 2002).

Balıklarda yağ asiti bileşimini belirlemeye yönelik çalışmaların daha çok karaciğer ve kas dokusunda gerçekleştirildiği görülmektedir. Bunun nedeni, karaciğerin yağ asitlerinin alınımı, oksidasyonu ve dönüşümü gibi, lipit metabolizmasının çeşitli aşamalarında kritik roller üstlenmesidir. Kas ise, insanlar tarafından temel besin maddesi olarak kullanılmasından dolayı yoğun araştırma materyali olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, doğal beslenme ve fiziksel koşullar altında yaşayan balık türlerinin karaciğer ve kas dokusunun lipit içerikleri ve yağ asiti bileşimlerinin belirlenmesi bu türlerin besinsel gereksinimlerini aydınlatılabilir (Rodriguez ve ark., 2004; Görgün ve Akpınar, 2007).

Haliloğlu ve ark. (2002) aynı koşullar altında yetiştirilen *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta fario* ve *Salvelinus alpinus* olmak üzere üç farklı alabalık türünün kas dokusu yağ asit kompozisyonlarını araştırmışlardır. Toplam DYA'leri içerisinde C16: 0, TÇDmYA içerisinde ise C18: 1n-9'in en çok bulunan yağ asiti olduğu ve türler arası farkın önemli olduğu görülmüştür. DYA'leri bakımından türler arasında önemli farklılıkların var olduğu gözlenmekle birlikte, *O. mykiss* en yüksek değere, *S. trutta fario*'un ise en düşük değere sahip olduğu gözlenmiştir. TÇDmYA'leri açısından ise, *S. trutta fario* en yüksek değerdeyken, *O. mykiss*'in en düşük değere sahip olduğu

gözlenmiştir. Türler arasında ADmYA'leri bakımından önemli bir farklılık görülmezken, n-3 formu ADmYA açısından en zengin olan türün *O. mykiss* olduğu, n-6 formu AD<sub>m</sub>YA bakımından ise, *S. trutta fario*'un olduğu gözlenmiştir. *O. mykiss*'in gerek C22:6 n-3 gerekse C22:5 n-3 açısından en zengin tür olduğu ve bu açıdan çok önemli olduğu bildirilmiştir.

Çoruh havzası Kazandere çayında yaşayan yabani *Salmo trutta labrax* bireylerinin karaciğer, kas dokusu, gonad, yumurta ve adipoz dokularındaki toplam lipit ve yağ asitleri araştırılmıştır. Toplam DYA'leri en fazla kasta, en az yumurtada bulunduğu belirlenmiştir. TÇDmYA açısından dokular arası fark önemsiz bulunmuş ve aşırı doymamış yağ asitlerinden n-3 formu ADmYA miktarının yumurtada diğer dokulardan önemli derecede fazla olmasına karşın, gonatta en az olduğu belirlenmiştir. Benzer sonuçlar yumurtanın n-6 formu ADmYA ve n-3/n-6 oranında da görülmüştür. Yağ asitleri genel kompozisyonuna bakıldığında C16:0, C18:1 n-9 ve C22:6 n-3'ün bu türün dokularında temel olarak bulunduğu ve dokular arası farkın önemli olduğu bildirilmiştir (Aras ve ark., 2003 a).

*Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* ve *O. mykiss*'in kültüre edilmiş bireylerinin dorsal ve ventral kas doku kısımlarının yağ asiti bileşimi belirlenmiştir. Buna göre, her üç balık türünde en fazla temsil edilen yağ asitlerinin C16:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C20:5 n-3 ve C22:6 n-3 olduğu saptanmıştır. *S.aurata* ve *O. mykiss*'in dorsal ve ventral kas kısımlarında görülen kantitatif farkların önemsiz olduğu belirlenmekle birlikte, *D. labrax*'ta C14:0 dorsalde % 3.81, ventralde 4.58, C16:1 n-7 dorsalde % 4.51, ventralde % 5.05, C18:2 n-6 dorsalde % 5.44, ventralde % 6.07, C20:4 n-6 dorsalde % 1.08, ventralde % 0.79, C22:6 n-3 dorsalde % 14.8, ventralde ise % 11.6 oranlarıyla kantitatif farklılıkların en belirgin gözleendiği yağ asitleri olduğu bulunmuştur (Testi ve ark., 2006).

Bayır ve ark. (2006), ülkemiz sularında yaşayan bazı deniz balıklarının kas dokusu yağ asiti bileşimlerini incelemişlerdir. Buna göre, C16:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C20:4 n-6 ve C22:6 n-3'ün çalışılan tüm örneklerde en fazla miktarlarda bulunan yağ asitleri olduğunu belirtmişlerdir.

Mnari ve ark. (2007) yabani ve kültüre edilmiş *Sparus aurata*'nın karaciğer ve kas dokusu yağ asiti bileşimlerini belirlemeye çalışmışlardır. Çalışılan her iki balık grubunda da C16:0 ve C18:1 n-9 en fazla bulunan doymuş ve tek çift bağ içeren

doymamış yağ asitleri olarak belirlenmiştir. Kültüre edilmiş balıklar daha fazla n-3 formu ADmYA'lerini içerirken, yabani balıkların ise n-6 formu ADmYA'lerini fazla miktarda içerdiği saptanmıştır.

Balıklarda eşeyler arasında da yağ asiti kompozisyonunda farklılık olmakla birlikte, ergin ve ergin olmayan balıklarda da farklılıkların olduğu bildirilmektedir. Örneğin, Görgün ve Akpınar (2007) farklı iki yemle beslenen ergin ve ergin olmayan *O. mykiss*'in karaciğer ve kas dokusunu eşeye bağlı olarak araştırmışlardır. Her iki eşeyin karaciğer ve kas dokusunda bulunan yağ asitlerinin genel olarak C16:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6 ve C22:6 n-3 olduğu ve önemli kantitatif farkların bulunduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, C22:6 n-3 miktarlarının ergin olmayan eşeylerin karaciğer ve kas dokusunda ergin eşeylerinkinden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Akpınar ve ark. (2009), *Salmo trutta macrostigma* eşeylerinin karaciğer ve kas dokusu yağ asiti bileşimlerini incelemişler ve eşeyler arasında kantitatif farklılıkların olduğunu belirlemişlerdir. Buna göre, eşeylerde en fazla bulunan yağ asitlerinin C16:0, C18:0, C18:1 n-7, C18:1 n-9, C20:5 n-3 ve C22:6 n-3 olduğunu rapor etmişlerdir.

Su tuzluluğu ve iklim gibi ekolojik faktörlerin balıkların yağ asiti bileşimleri üzerinde önemli değişimlere yol açtığı bilinmektedir. Özellikle su tuzluluğunun balıklarda ADmYA seviyelerini etkilediği ve n-3/n-6 oranının tatlı su balıklarında, deniz balıklarından daha düşük olduğu bildirilmektedir (Steffens, 1997). Bununla birlikte, araştırmalar tatlı su balıklarında yağ asitlerinin zincir uzatılması ve doyurulmasındaki süreçlerin deniz balıklarından daha hızlı olduğunu ortaya koymuştur (Jankowska ve ark., 2010).

Haliloğlu ve ark. (2004), deniz ve tatlısında yaşayan *O. mykiss*'in karaciğer, gonad, kas ve adipöz dokularının yağ asiti bileşimlerini belirlemişlerdir. Buna göre, tuzluluğa bağlı olarak deneysel grupların dokularındaki yağ asitleri seviyelerinde meydana gelen en belirgin değişimler değerlendirilecek olursa, kas dokusunda DYA'da C14:0 denizde yaşayan balıkta % 4.04 oranında, tatlısında yaşayanda ise % 2.38 oranında olduğu belirlenmiştir. Karaciğerde önemli istatistiksel fark gösteren yağ asiti C18:1 n-9 olup, bu asitin seviyesi tatlısında yaşayan balıklarda daha yüksek ve % 22.3 seviyesinde bulunmuştur. C20:5 n-3 seviyeleri denizde yaşayan deneysel grupların karaciğer (% 6.16) ve kas dokusunda (% 6.02), tatlı suda yaşayanlardan neredeyse üç kat daha yüksek oranlarda belirlenmiştir. Gonadlarda deneysel gruplar arasında farklılık

gösteren yağ asitlerinden C18:1 n-9, tatlı suda yaşayan balıklarda % 27.3, denizde yaşayanlarda ise % 18.6 oranında belirlenirken, C20:5 n-3'ün denizde yaşayan deneysel gruplarda (% 7.08) tatlı sudakilerden (% 2.35) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En belirgin değişimlerin gözlemlendiği adipöz dokuda C14:0 (% 7.12), C16:1 n-7 (% 9.36), C20:5 n-3 (% 5.38) ve C22:6 n-3 (% 12.4)'ün denizde yaşayan *O. mykiss*'te daha yüksek miktarlarda bulunurken, tatlı suda yaşayan deneysel grupta C18:1 n-9 (% 36) ve C18:2 n-6 (% 16.9)'nın daha yüksek oranlarda olduğu belirlenmiştir. Tüm dokularda en yüksek n-3/n-6 oranları deniz suyundaki deneysel gruplarda belirlenmiştir.

Özoğul ve ark. (2007), ülkemizde ticari açıdan önem arz eden tatlı su ve deniz balıklarının yağ asiti bileşimlerini belirlemişlerdir. Buna göre, deniz balıklarının yağ asiti bileşimlerine bağlı olarak, DYA miktarları % 25.5 - 39.4, TÇDmYA miktarları % 13.2 - 29.0 ve ADmYA miktarları ise % 25.2 - 48.2 aralığında olduğu belirlenmiştir. Seyhan gölünde yaşayan tatlı su balıklarında bu yağ asiti sınıflarının seviyelerinin DYA'nde % 28.0 - 34.6, TÇDmYA'nde % 10.7 - 22.7 ve ADmYA'nde ise % 23.2 - 43.7 oranları arasında olduğu tespit edilmiştir.

İncelediğimiz balıklarda karaciğerde DYA miktarları mevsime göre *C. chalcoides*'te % 28.59±0.26 - 38.59±0.30, *L. cephalus*'ta % 28.80±0.24 - 43.38±0.29, *C. carpio*'da ise % 26.20±0.02 - 38.42±0.22 olarak belirlenmiştir. TÇDmYA miktarları *C. chalcoides*'te % 27.21±0.32 - 51.79±0.24, *L. cephalus*'ta % 23.39±0.21 - 54.64±0.37, *C. carpio*'da % 24.57±0.31 - 37.38±0.26 bulunmuştur. Toplam ADmYA miktarları *C. chalcoides*'te % 17.44±0.14 - 34.23±0.28, *L. cephalus*'ta % 16.58±0.15 - 44.47±0.26, *C. carpio*'da ise % 27.33±0.21 - 43.56±0.41 olarak saptanmıştır. Kas dokusundaki toplam yağ asitlerinin mevsimsel değişimleri değerlendirilecek olursa, DYA'nın *C. chalcoides*'te % 27.58±0.22 - 41.65±0.37, *L. cephalus*'ta % 29.75±0.13 - 39.06±0.22, *C. carpio*'da % 30.77±0.11 - 54.34±1.10 arasında olduğu bulunmuştur. TÇDmYA *C. chalcoides*'te % 21.12±0.26 - 40.04±0.22, *L. cephalus*'ta % 21.32±0.10 - 33.74±0.12, *C. carpio*'da % 22.32±0.15 - 31.01±0.19 olarak belirlenmiştir. Toplam ADmYA miktarlarının *C. chalcoides*'te % 27.96±0.33 - 37.25±0.21, *L. cephalus*'ta % 36.51±0.13 - 40.99±0.10, *C. carpio*'da ise % 14.67±0.16 - 39.12±0.19 aralığında mevsimsel değişim gösterdiği görülmüştür (Tablo 9 - 10). Bu veriler değerlendirildiğinde, *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'un karaciğerleri daha yüksek DYA ve TÇDmYA miktarlarına sahipken, bu yağ asitlerinin *C. carpio*'da daha az olduğu



görülmüştür. Kas dokusunda DYA miktarlarının *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'ta *C. carpio*'ya göre daha düşük oranlarda bulunması, bu yağ asitlerinin *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'ta karaciğerde depo edildiklerini, buna karşın *C. carpio*'da daha çok kas dokusuna transfer edildiği öngörüsünü akla getirmektedir. Ayrıca *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'ta TÇDmYA'nin gerek karaciğer gerekse kas dokusunda yüksek olması, bu türlerin besin yoluyla aldıkları yağ asitlerini önemli derecede depo edebildikleri kanısını uyandırmaktadır. Toplam ADmYA miktarları açısından düşünüldüğünde, *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'un, *C. carpio*'dan daha yüksek seviyede doymamış yağ asitlerine sahip oldukları görülmektedir. Bu bulgular birleştirildiğinde, *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'un lipit metabolizması (yağ asitlerinin depolanması, transferleri ve sentezleri gibi) açısından daha iyi bir performansla sahip olabileceklerini düşündürmektedir. Bununla birlikte, her üç türün de, sonbahar periyodu (eylül ayı) dışındaki aylarda insan sağlığı açısından önemli fizyolojik etkilere sahip olan ADmYA'ni kayda değer miktarlarda içerdikleri anlaşılmaktadır.

Farklı iklim koşullarına sahip Eğirdir ve Seyhan göllerinde yaşayan *Sander lucioperca*'nın ham protein (% 18.8 – 18.1), kül miktarı (% 1.37 – 0.75) ve kuru madde miktarlarının (% 20.67 – 20.09) farklı olduğu belirlenmiştir. Her iki bölgede yaşayan türün, kas dokusu yağ asiti bileşiminin genel olarak C16:0 (% 19.6 – 20.8), C18:0 (% 9.23 – 6.77), C18:1 n-9 (% 19.2 – 13.4), C18:2 n-6 (% 4.12 – 9.08) ve C22:6 n-3 (% 7.37 – 12.41)'dan oluştuğu belirlenmiştir. Yağ asit bileşimindeki bu kantitatif farklılıklara paralel olarak Seyhan gölünde yaşayan türün, Eğirdir gölünde yaşayanlardan daha yüksek DYA ve TÇDmYA seviyelerine sahip olduğu rapor edilmiştir (Çelik ve ark., 2005).

Besinsel lipitler hayvansal dokularda enerji ve yapısal madde olarak kullanımlarının yanısıra, yağ içermeyen besin maddelerinin özellikle de yağda çözünen vitaminlerin taşınmasında da önemli rol oynamaktadırlar. Balıkların enerji gereksinimleri ile ilgili yapılan araştırmalarda, karnivor balıkların enerji kaynağı olarak karbonhidratları sınırlı bir şekilde kullandıkları ve besinsel lipitleri daha çok tercih ettikleri belirlenmiştir (Akpınar, 1999). *Cyprinus carpio*'nun kas dokusunda yapılan çalışmalardan, balık beslenmesinde kullanılan yemlerin yağ asit bileşimlerinin balık dokularına aynen yansıtıldığı görülmüştür (Fajmanova ve ark., 2003). Bununla birlikte, besinsel lipitlerin vücut lipitlerinin yağ asiti bileşimine etkisi, trigliserit ve fosfolipitler

arasında farklılık göstermektedir. Fosfolipitlerin yağ asit bileşimlerinin trigliseritlerden daha büyük derecelerde etkilendiği bildirilmektedir (Akpınar, 1999).

Rueda ve ark. (1997) *Pagrus pagrus*'un yabancı ve kültüre edilmiş bireylerinin kas dokusu yağ asiti bileşimlerini beslenme açısından değerlendirmişlerdir. Buna göre, yağ oranı beslenmiş bireylerde (% 3.03) yabancı balıklardakinden (% 0.65) daha yüksek bulunmuştur. Bu türün toplam lipit yağ asiti bileşiminin besininkini yansıttığını bildirilmiştir. Ayrıca, toplam ADmYA seviyeleri yabancı balıklarda daha yüksek bulunmakla birlikte, bu yağ asiti sınıfının oranları, toplam lipit içerisinde beslenen balıklarda % 36.9, yabancı balıklarda % 51.2, fosfolipit sınıfı içerisinde yabancı balıklarda % 60.7, beslenen balıklarda % 56.3 ve triaçilgliserol sınıfı içerisinde yabancı balıklarda % 47.0, beslenen balıklarda ise % 16.7 seviyelerinde olduğu rapor edilmiştir.

Balık dokularındaki fosfolipit ve nötral lipitlerin yağ asit bileşimlerinin besinsel yağ asitleriyle etkilenmekle birlikte, doku yağ asit bileşimlerinin termal adaptasyon esnasında da değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir. Bu amaçla, 2 ve 8 °C'ta yetiştirilen Atlantik *Salmo salar* bireylerinin kas, visera ve karkas yağ asitleri analizlenmiştir. Elde edilen verilere göre, her üç dokuda da besinsel yağların yağ asit bileşimlerinin nötral ve fosfolipitlere yansıdığı görülmüştür. Sıcaklığın etkileri fosfolipitlerde nötral lipitlerden daha fazla görülmüş ve düşük sıcaklıklarda daha yüksek ADmYA/DYA oranları belirlenmiştir. Sebze yağıyla beslenen balıklarda da daha yüksek ADmYA/DYA oranlarına rastlanmıştır (Jobling ve Bendiksen, 2003).

Tocher ve ark. (2004) tarafından *O. mykiss* enterosit ve hepatositlerinde yapılan su sıcaklığı ve değişik seviyeli palmiye yağı (P besini) ve balık yağı içeren (P0, P25, P50, P75 ve P100) diyetel yemlerin etkileri araştırılmıştır. Sıcaklık ve palmiye yağının karaciğer toplam lipitlerine önemli bir şekilde etki etmediğini ve tamamen balık yağı içeren ve palmiye yağı içermeyen yemle beslenen (P0 besini) grupların karaciğerlerinde en yüksek miktarda bulunan yağ asitinin C22:6 n-3 olduğu saptanmıştır. Tamamen palmiye yağı içerip balık yağı içermeyen yemle (P100 besini) beslenen gruplarda ise C 22:6 n-3 miktarının önemli bir şekilde düştüğü görülmüştür.

Başka bir beslenme deneyinde, Fonseca-Madrigal ve ark. (2005) başlangıç ağırlıkları yaklaşık 27 g olan *O. mykiss*'leri yine P0, P25, P50, P75 ve P100 diyetleriyle beslemişler ve kas, karaciğer ve incebağırsak yağ asit bileşimine etkilerini araştırmışlardır. P0 diyetiyle beslenen grupların çalışılan tüm dokularda en yüksek

C22:6 n-3 miktarlarını göstermesine karşın, balık yağının azaltıldığı ve yerine palmiye yağının ilave edildiği, P50, P75 ve özellikle P100 diyetiyle beslenen gruplarda ise C22:6 n-3 miktarlarının çalışılan tüm dokularda önemli bir şekilde düştüğü saptanmıştır.

Konar ve Köprücü (2002), besinsel bir yem kullanarak *O. mykiss* etinin yağ asit bileşimindeki en yüksek yüzdeli yağ asitlerinin C16:0, C18:1, C18:3, C20:1 ve C22:6'dan oluştuğunu tespit etmişlerdir.

*Perca fluviatilis* L.'nin beslenen ve yabani bireylerinin karaciğer, mezenterik yağ ve kas dokusunun yağ asiti bileşimleri araştırılmıştır. Buna göre, her iki balık grubunda araştırılan tüm dokularda en fazla bulunan yağ asitlerinin C16:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C20:5 n-3 ve C22:6 n-3 olduğunu belirlenmiştir (Jankowska ve ark., 2010).

Chen ve ark. (2011), başlangıç ağırlığı 2.69 g olan *Carassius auratus gibelio*'nun gelişim performansı ve doku yağ asit bileşimine n-3 ADmYA'nın değişik miktarlarını içeren besinlerin etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla, deneysel gruplar, balık yağının (FO) beş farklı miktarını içeren besinlerle (FO<sub>0</sub>, FO<sub>25</sub>, FO<sub>50</sub>, FO<sub>75</sub>, FO<sub>100</sub>) beslenmişlerdir. Elde edilen verilere göre, FO<sub>25</sub> ve FO<sub>50</sub> besinleriyle beslenen balıklar en yüksek gelişim hızını elde ederken, en düşük FO<sub>0</sub> besiniyle beslenen gruplar elde etmişlerdir. Yine besin etkinliği en fazla FO<sub>100</sub> besiniyle sağlanırken, en az FO<sub>0</sub> ile sağlanmıştır. Karaciğer ve kas dokusunun yağ asit bileşimleri besinsel yağ asitlerini yansıtmıştır. Buna göre, karaciğerde en yüksek C16:0, C18:1 n-9 ve C22:6 n-3 oranları FO<sub>100</sub> besiniyle beslenen gruplarda görülmüştür. Kas dokusunda ise C16:0 ve C22:6 n-3 seviyelerinin en yüksek miktarları FO<sub>100</sub> besiniyle beslenen gruplarda belirlenirken, C18:1 n-9'un en yüksek oranı FO<sub>0</sub> besiniyle beslenen gruplarda saptanmıştır.

Ortamdaki O<sub>2</sub> ve sıcaklığın değişken olmasının balıkların metabolizması üzerine doğrudan etkili olabileceği bilinmektedir. Bunun altındaki etken sebep ise, balıkların soğukkanlı (poikiloterm) hayvanlar olmaları ve değişen sıcaklık koşullarına bağlı olarak yağ asit metabolizmalarını değiştirebilmelerinde yatmaktadır (Farkas ve Csengeri, 1976; Henderson ve Sargent, 1981; Akpınar ve Aksoylar, 1988).

Membranlarda fosfolipitlerin, kolesterolün ve özellikle doymamış yağ asitlerinin bulunmasının membran akışkanlığının kontrol edilmesinde oldukça önemli olduğu kabul edilmektedir. Membran yapısına giren bu bileşiklerin miktarları ve yapıdaki yağ asitlerinin doymamışlık derecesi, membrana bağlı enzimlerin aktiviteleri ile

permeabilededeki değişimlere uygun olarak düşük sıcaklıklarda artış gösterir (Giese, 1968; Wodtke, 1978; Van den Thillart ve Bruin, 1981). Sıcaklığın da balıklarda beslenme, büyüme ve üreme gibi faaliyetler üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Sıcaklık arttığında doymamış yağ asitleri miktarında azalma, doymuş yağ asitlerinde ise artış gözleendiği iyi bilinen bir gerçektir (Farkas, 1984; Akpınar ve Aksoylar, 1988).

35 °C'ta doğal olarak yaşama yeteneğine sahip olan *Garra rufa*'nın kas dokusu yağ asit bileşimine sıcaklığın, besinsel yağ asitlerinin ve açlığın etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, 35 °C'ta 20 ve 22 karbonlu doymamış yağ asitlerinin azaldığı, 24 °C'ta ise bu yağ asitlerinin arttığı gözlenmiştir (Akpınar ve Aksoylar, 1988). Sivas Kangal Balıklı Kaplıcası'nda 35 °C'ta doğal olarak yaşayan diğer bir balık türü olan *Cyprinion macrostomus* bireyleri, doğal yaşama ortam sıcaklığı olan 35 °C'ta ve adapte oldukları sıcaklıktan daha düşük olan 24 °C'ta beslenip aç bırakılarak sıcaklığın kas dokusu yağ asit bileşimine etkisi araştırılmıştır. 35 °C sıcaklıkta beslenen ve aç bırakılan balıkların yağ asit bileşiminde kalitatif olarak bir değişiklik gözlenmemesine rağmen, 24 °C'ta beslenen ve aç bırakılan balıklarda ise besinde bulunmayan C22:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün sentezlenebildiği, C18:2 n-6 yüzdesinin çok azaldığı saptanmış olup, 35 ve 24 °C sıcaklıkta beslenen ve aç bırakılan balıklarda en fazla değişime uğrayan yağ asitlerinin uzun zincirli AD<sub>m</sub>YA'lerinin olduğu sonucuna varılmıştır (Akpınar, 1999).

Kheriji ve ark.(2003) denizel kıyılardan avlanan ve tatlısulara transferi sağlanan *Mugil cephalus*'un yağ asitlerinde meydana gelen değişimleri (fry evresinde) sıcaklık ve tuzluluğa bağlı olarak belirlemişlerdir. Buna göre, tuz oranında düşmenin C20:4 n-6, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 gibi aşırı doymamış uzun zincirli yağ asitlerinin sentezlerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, sıcaklığın 26 °C'tan 14 °C'a düşürüldüğünde dört haftalık bir adaptasyon süreci sonunda toplam yağ asit seviyelerinde % 215 kadar bir artış olduğu gözlenmekle birlikte, düşük tuz oranında sıcaklığın düşürülmesinden dolayı, aşırı doymamış yağ asitlerinin sentezinde artışlar meydana gelmiştir. Bu çalışmada sonuç olarak sıcaklık ve tuz parametrelerinin düşmesiyle, çalışılan balık türünde 18 karbonlu doymamış yağ asiti öncüllerinden aşırı doymamış yağ asitlerinin sentezlenmesinin arttığı rapor edilmiştir.

*Barbus plebejus escherichi*, *Capoeta capoeta capoeta* ve *Rutilus rutilus*'in temmuz ayı ve ocak ayı koşullarında yaşayan bireyelerinin kas dokusu yağ asiti

bileşimleri, su sıcaklığının etkisine bağlı olarak meydana gelen değişimleri belirlemek amacıyla araştırılmıştır. Tüm türlerin kas dokusundaki en fazla bulunan yağ asitlerinin C16:0, C18:1 n-9, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 olduğu belirlenmiştir. *B. plebejus escherichi* ve *C. capoeta capoeta*'nın kas dokusunda n-3 ve n-6 formu ADmYA ve EPA+DHA seviyeleri su sıcaklığının oldukça düşük olduğu ocak ayında temmuz ayında belirlenen seviyelerden önemli derecede yüksek olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Uysal ve ark., 2008).

Brodte ve ark. (2008) farklı sıcaklık alışkanlığına sahip *Pachycara brachycephalum* (0 – 6 °C) ve *Zoarces viviparus* (4 – 18 °C)'un yağ asiti bileşimlerini belirlemiştir. *P. brachycephalum*'un kas dokusunda ADmYA seviyesi 0 °C'de % 32.4 seviyesindeyken, 6 °C'de bu oran % 23.2 olarak belirlenmiştir. DYA seviyesinde de sıcaklığın artmasıyla düşüş kaydedilmesine karşın, 0 °C'de % 77 olan TÇDmYA seviyelerinin 6 °C'de artarak % 80.5 olduğu bulunmuştur. *Z. viviparus*'un kas dokusunda 4 °C'de ADmYA miktarı % 55.9, DYA miktarı % 22.9 oranında bulunurken, sıcaklığın 12 °C'ye çıkarılmasıyla ADmYA miktarı % 42.1, DYA miktarı ise % 26.5 olarak bildirilmiştir.

Sıcaklık ve sıcaklığa bağlı besin kompozisyonunu ortaya koyan en önemli etmen mevsimdir. Balıkların doğal ortamları ve çeşitli besinlerle beslenmelerine bağlı olarak farklı balık doku ve türlerinde yağ asiti bileşimini değerlendiren birçok çalışma bulunmasına rağmen, mevsime bağlı değişimlere odaklanan çalışmaların sayısı o derece fazla değildir.

Sıcaklık konusuyla ilgili olarak anlatılanlar doğrultusunda balıkların değişen sıcaklıkta yağ asit metabolizmalarını düzenleyerek çevreye uyum sağladıkları anlaşılmaktadır. Ayrıca sıcaklık, beslenmeye de etki eden bir faktördür. Çünkü düşük çevresel sıcaklıklarda besin alınımı azalır ve sindirim süreci yavaşlamaktadır (Akpınar, 1986, Bogevek ve ark., 2011).

Çalışmamızda da su sıcaklığındaki değişimlerin yağ asitleri üzerinde farklı etkiler oluşturduğu görülmektedir (Tablo 3 – 8). Buna göre, su sıcaklığının yüksek olduğu yaz mevsiminde (24 °C) DYA seviyelerinin karaciğerde *C. chalcoides*'te ilkbahardan (% 38.59±0.30) kışa doğru (6 °C) düştüğü belirlenmiştir (% 28.59±0.26) (Tablo 3). *L. cephalus*'ta ilkbahar (12 °C)ve yaz sezonunda farksız olduğu görülen DYA'nin sonbaharda en yüksek seviyesine rastlanmış (% 43.38±0.29) ve kış

periyodunda % 28.80±0.24 oranına kadar düşmüştür (Tablo 4). *C. carpio*'da tüm mevsimlerde farklılık gösteren DYA miktarlarının sonbaharda (19 °C) en düşük yüzde de olduğu (% 26.20±0.11) belirlenmiştir (Tablo 5). İncelenen tüm türlerde kas dokusunda DYA'nin en düşük miktarlarına kış periyodunda rastlanmış ve *C. chalcoides*'te % 28.97±0.19, *L. cephalus*'ta % 29.75±0.13 ve *C. carpio*'da ise % 30.77±0.11 olduğu belirlenmiştir (Tablo 6-8).

Karaciğer ve kas dokusundan elde edilen verilere göre (Tablo 3-8), toplam ADmYA miktarlarının üreme faaliyetiyle en fazla etkilenen yağ asiti sınıfı olduğu söylenebilir. Ayrıca bu yağ asitlerinin buna rağmen kış periyoduyla birlikte seviyelerini artırdığı da görülmektedir. Buna göre, karaciğerdeki toplam ADmYA miktarları *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'ta sonbahar periyodunda en düşük seviyesinde (sırasıyla % 17.44±0.14 ve % 23.01±0.22) (Tablo 3, 4) bulunurken, *C. carpio*'da yaz sezonunu temsil eden temmuz ayında (% 27.33±0.21) düşüş göstermiştir (Tablo 5). Kas dokusu toplam ADmYA miktarları da karaciğerdekine benzer paralel bir değişim profili sergilemiştir. Bu yağ asiti sınıfının en düşük oranlarının *C. chalcoides*'te sonbaharda (% 27.96±0.33), *L. cephalus*'ta kış sezonunda (% 36.51±0.13), *C. carpio*'da ise sonbahar periyodunda (% 14.67±0.16) olduğu tespit edilmiştir.

Çalıştığımız türlerin karaciğer ve kas dokusu DYA miktarlarının su sıcaklığındaki düşüşe bağlı olarak seviyelerinde azalma kaydedilirken, ADmYA miktarlarının arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, ADmYA'nin üreme periyotlarında önemli derecede azaldığı da anlaşılmaktadır. Tüm bu veriler literatür bilgileriyle desteklenmektedir (Akpınar ve Aksoylar, 1988; Akpınar, 1999; Brodte ve ark., 2008; Bogevek ve ark., 2011). Ayrıca *L. cephalus*'un kas dokusunda kışın ADmYA miktarının en düşük seviyede olması, kış periyodunda besin ile bu yağ asitlerinin az miktarda alınmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (Bogevek ve ark. 2011).

Akpınar (1986 ve 1987) Mogan gölünde yaşayan *Cyprinus carpio*'nun karaciğer ve kas dokusu yağ asiti bileşimlerini mevsime ve eşeye bağlı olarak araştırmıştır. Her iki dokunun eşey ve mevsime göre kalitatif farklar göstermediği ancak kantitatif farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Karaciğer yağ asiti bileşiminin yüzde olarak büyük bir kısmının C14:0, C 15:0, C16:0, C18:0, C16:1, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C18:3 n-3'ten oluştuğu bulunmuştur. Kas dokusunda en fazla bulunan yağ asitlerinin ise C14:0, C16:0, C18:0, C16:1, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:3 n-3, C20:5 n-3 ve C22:6

n-3 olduğu saptanmıştır. Üreme periyotlarında uzun zincirli yağ asitlerinin (C20:3, C20:5, C22:5 ve C22:6) karaciğerde daha belirgin olmak üzere, azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, balıkların değişen sıcaklıklarda yağ asiti metabolizmalarını düzenlemelerine bağlı olarak, sıcaklığın düşmesinin doymamış yağ asitlerinde artışa, doymuş yağ asitlerinde ise düşüşe neden olacağı vurgulanmıştır. Sıcaklıkla birlikte, ortamdaki besinin az veya çok oluşunun da balıkların olgunlaşma yaşı ve üreme periyotlarında da değişime neden olacağı belirtilmiştir.

*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis macrochir* ve *Tilapia rendalli*'nin kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimleri bir çalışmada belirlenmiştir. Buna göre, her üç türünde C16:0, C18:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün tüm mevsimlerde en yüksek yüzdelerde bulunan yağ asitleri olduğu belirlenmiştir (Rasoarahone ve ark., 2005).

Beyşehir gölünde yaşayan *Sander lucioperca*'nın kas dokusu yağ asiti bileşimleri mevsime göre araştırılmıştır. Bütün mevsimlerde saptanan ADmYA miktarlarının (% 50.2 – 57.0), DYA (% 24.4 – 27.9) ve TÇDmYA (14.3 – 23.6) miktarlarından fazla olduğu bulunmuştur. C16:0 (% 14.2 – 17.9), C18:0 (% 4.08 – 6.21), C16:1 n-7 (% 2.31 – 7.18), C18:1 n-9 (% 8.30 – 11.9), C18:2 n-6 (% 5.40 – 15.40), C20:4 n-6 (% 6.72 – 9.94), C22:6 n-3 (% 17.10 – 23.30)'ün tüm mevsimlerde en fazla bulunan yağ asitleri olduğu saptanmıştır (Güler ve ark., 2007).

Selmi ve Sadok (2010), *Euthynnus alletteratus*'un kafa, visera, karaciğer ve kas dokusu yağ asiti bileşimlerini mevsimsel olarak çalışmışlardır. Çalışılan dokulardan elde edilen veriler, dokuların lipit içeriğinin mevsime göre bir hayli değişken olduklarını ve karaciğerde en fazla lipit miktarının kış mevsiminde olduğu yönündedir. Tüm mevsimlerde ve özellikle yumurtlama döneminde türün yağ asiti bileşiminde önemli değişimlerin gözlemlendiği kaydedilmiştir.

Kalyoncu ve ark (2010), İvriz baraj gölünde yaşayan *O. mykiss*'in kas dokusu yağ asiti bileşimindeki mevsimsel değişimleri araştırmışlardır. Bu türde de tıpkı Güler ve ark (2007)'nin çalışmasında olduğu gibi ADmYA miktarlarının (% 41.24 – 46.04) tüm mevsimlerde, DYA (% 19.48 – 24.95) ve TÇDmYA (% 31.70 – 39.28) miktarlarından fazla olduğu görülmüştür. Tüm mevsimlerde en yüksek yüzdelerde temsil edilen yağ asitlerinin C14:0 (% 2.28 – 3.37), C16:0 (% 12.72 – 16.41), C18:0 (% 3.28 – 3.87), C16:1 n-7 (% 3.43 – 5.24), C18:1 n-9 (% 23.65 – 34.06), C18:2 n-6 (%

14.03 – 23.56), C20:5 n-3 (% 3.11 – 5.52) ve C22:6 n-3 (% 6.98 – 17.57) olduğu tespit edilmiştir. C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C24:0, C22:1 n-9 ve C24:1 n-9'un mevsime göre kalitatif farklar gösterdiği belirlenmiştir.

Bu alanda yapılan son çalışmalar değerlendirildiğinde, Mendez (1997), *Merluccius hubbsi*'nin karaciğerini, Hazra ve ark. (1998), Hindistan kıyı sularında yaşayan *Chelonodon patoca*, *Sphaeroides oblongus*, *Lagocephalus lunaris* ve *Lagocephalus inermis* türlerinin karaciğerlerini, Grigorakis ve ark. (2002) *Sparus aurata*'nın yabani ve kültüre edilen bireylerinin kas dokusunu, Gökçe ve ark. (2004) *Solea solea*'nın kas dokusunu, Sushchik ve ark. (2007), *Thymallus arcticus*'un kas dokusunu, Zlatanov ve Laskaridis (2007), *Sardina pilchardus*, *Engraulis encrasicolus* ve *Spicara smaris*'in kas dokusu yağ asiti bileşimini mevsimsel olarak araştırmışlardır.

Yaptığımız bu çalışmada, *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğer ve kas dokusunun yağ asiti bileşimleri mevsime bağlı kalitatif bir farklılık göstermemiştir. Bununla birlikte, karaciğer ve kas dokusunda C14:0, C16:0, C18:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C18:2 n-6, C18:3 n-6, C20:4 n-6, C18:3 n-3, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün önemli kantitatif farklar gösterdiği görülmüştür (Tablo 3-8). Akpınar (1986) ve (1987)'nin *C. carpio*'nun kas ve karaciğer ile ilgili bulguları çalışmamızla uyumludur. Beslenen yada doğal ortamlarından yakalanmış türlerin karaciğer ve kas dokusunda yapılan mevsimsel olmayan çalışmalarda da kalitatif farklılıklar gözlenmemiştir (Aras ve ark. 2003 a; Görgün ve Akpınar, 2007; Mnari ve ark., 2007). Çalıştığımız türlerle aynı familyadan olan *Capoeta trutta* ve *Barbus rajanorum mystaceus*'ta üreme dönemi gibi kritik peryotlarda dahi eşeylerin kas dokusu yağ asiti bileşimlerinde kalitatif farklılıklar saptanmamıştır (Konar ve ark., 1999). Bununla birlikte, Güler ve ark. (2007)'nin çalışmasında C10:0, C19:0, C20:0, C24:1 n-9, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C20:3 n-3, C22:3 n-3 asitlerinin bazı mevsimlerde kas dokusu yağ asiti bileşiminde bulunmadıkları tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalardan, balık dokularında kalitatif fark gösteren yağ asitlerinin daha çok DYA yada TÇDmYA sınıfına ait yağ asitlerinin olduğu anlaşılmaktadır. Balıklarda açlık ve beslenmeyi değerlendiren çalışmalarda kalitatif farklılıkların görülmesi (Akpınar ve Aksoylar, 1988; Akpınar 1999) durumunun, mevsime bağlı olarak değişen besin kompozisyonundan kaynaklanabileceğini göstermektedir.



Çalışmamızda, türlerin karaciğer ve kas dokularında C16:0, C18:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C18:2 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün tüm mevsimlerde yüksek yüzdelerde bulunan yağ asitleri olduğu bulunmuştur. Elde ettiğimiz verilerin bu konuda yapılan çalışmalarla büyük oranda örtüştüğü görülmektedir (Mendez, 1997; Grigorakis ve ark., 2002; Gökçe ve ark., 2004; Rasoarahone ve ark., 2005; Güler ve ark., 2007; Kalyoncu ve ark., 2010).

C14:0, C16:0, C18:0, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:2 n-6 ve C18:3 n-3 gibi yağ asitlerinin besin ile alınmaları sonrasında balık dokularında doğrudan depo edildiğini bilinmektedir (Ackman ve Burger, 1964; Jangaard ve ark., 1967; Akpınar, 1987). Su kompozisyonu ile diğer habitat şartlarındaki değişimlerin balıkların yiyecek ağındaki birçok yiyeceği değiştirebileceği (Gomes ve ark., 2010) göz önünde bulundurularak, DYA kompozisyonunun sıcaklık değişimleriyle birlikte belirgin bir şekilde dalgalanma göstermesinin de kaçınılmaz olduğu düşünülmelidir. Bununla birlikte, özellikle C16:0'ın balık dokularında DYA'nın anahtar bir bileşeni olduğu ve beslenmeyle seviyesinin pek değişmediği de ifade edilmiştir (Ackman ve ark., 1975).

Çalışmamızda, kas dokularında DYA'de C14:0, ilkbahar ve sonbahar periyotları arasında *C. chalcoides*'te % 2.16±0.12 - 5.63±0.14, *L. cephalus*'ta 1.76±0.02 - 2.97±0.28 ve *C. carpio*'da ise % 0.84±0.07 - 2.59±0.11 seviyeleri arasında olduğu belirlenmiş ve kış periyoduyla birlikte bu miktarların önemli derecede düştüğü görülmüştür (Tablo 6 - 8). Benzer olarak C21:0'ın ilkbahar ve sonbahar periyotları arasında *C. chalcoides*'te % 1.22±0.13 - 3.32±0.18, *L. cephalus*'ta % 0.61±0.06 - 1.53±0.007, *C. carpio*'da ise % 0.30±0.03 - 1.01±0.06 oranları arasında değişim gösterdiği ve en düşük seviyelerinin kış periyoduna rastladığı bulunmuştur. Bu iki yağ asitinin kış mevsimi dışındaki aylarda yüksek oranlarına rastlanması, bunun kas dokuya özgü bir bulgu olduğunu akla getirmektedir. Ayrıca bahar ve yaz aylarındaki yüksek seviyeleri, bu mevsimlerde artmış olan beslenme aktivitesiyle açıklanabilir.

Mevcut çalışmada karaciğer ve kas dokusunda tüm mevsimlerde C16:0'ın DYA içerisindeki en yüksek yüzdede bulunan yağ asiti olduğu, C18:0'ın ise ikinci derecede yüksek seviyeye sahip olan yağ asiti olduğu görülmüştür. Tablo 3, 4 ve 5'den görülebileceği gibi, karaciğerde C16:0, *C. chalcoides*'te % 16.76±0.21 - 20.57±0.29, *L. cephalus*'ta % 17.46±0.27 - 25.93±0.53, *C. carpio*'da % 15.66±0.38 - 21.96±0.32 oranları arasında değişim göstermiştir. Kas dokusunda ise bu oranlar *C. chalcoides*'te %

15.75±0.19 – 19.48±0.27, *L. cephalus*'ta % 17.09±0.11 – 22.56±0.28, *C. carpio*'da ise % 17.12±0.50 – 27.96±1.19 arasında olduğu tespit edilmiştir. C18:0'm karaciğerdeki en yüksek seviyelerine tüm türlerde ilkbaharda rastlanmakla birlikte, türlerdeki oranlarının *C. chalcoides*'te % 12.30±0.30, *L. cephalus*'ta % 8.48±0.27, ve *C. carpio*'da ise % 8.65±0.11 olduğu belirlenmiştir. Kas dokusunda ise bu asitin en yüksek seviyeleri *C. chalcaburnus*'ta yaz (% 8.40±0.23), *L. cephalus*'ta ilkbahar (% 7.97±0.56) ve *C. carpio*'da ise sonbahar sezonunda (% 14.76±0.30) en yüksek seviyelerde bulunduğu görülmüştür (Tablo 3-8).

Balık dokularında C16:0 ve C18:0'm DYA'nın kararlı bileşenleri olduğu bildirilmiştir (Görgün ve Akpınar, 2007; Güler ve ark., 2007; Akpınar ve ark., 2009). C17:0, C20:0 ve C21:0'm seviyelerinde mevsime göre dalgalanmalar görülmüştür. Bu yağ asitlerinin seviyeleri, DYA'nın anahtar yağ asitleri olan C16:0 ve C18:0'da mevsime bağlı görülen artma ve azalmalarla birebir örtüşmektedir. Bu bulgu, belirtilen yağ asitlerinin özellikle C16:0 ve C18:0 üzerinden sentezlenebildiğinin bir göstergesidir.

Çalışmamızda *C. carpio*'nun karaciğer yağ asiti bileşimi hariç, diğer türlerde DYA miktarları ile birlikte, C16:0 ve C18:0'de genel olarak sonbaharda görülen azalma kış periyodunda da devam etmiştir. Bu olay, sonbaharda 19 °C olan su sıcaklığının kış periyoduyla birlikte 6 °C'ye kadar düşmesi sonucu, doymuş yağ asitlerinin sentezinin azaltılmasından kaynaklanabileceği gibi, bu yağ asitlerinin enerji elde edilmesi ve üreme dönemlerindeki yapısal olaylarda kullanılmış olabileceğini de akla getirmektedir. Elde etmiş olduğumuz bu veriler, bu yağ asitlerinin sentezlerinde sıcaklığın etkili olduğu görüşlerini desteklemektedir (Akpınar, 1986; Akpınar ve Aksoylar, 1988; Akpınar, 1999; Brodte ve ark., 2008; Bogevek ve ark., 2011).

Gökçe ve ark. (2004) *Solea solea*'nın kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimini incelemişler ve C16:0 (% 15.30 – 19.0) ile C 18:0 (% 5.82 – 6.91)'in kas dokusunun en fazla bulunan DYA olduğunu bildirmişlerdir.

Beyşehir gölünde yaşayan *C. carpio*'nun kas dokusu mevsimsel yağ asiti bileşiminin incelendiği bir çalışmada, C16:0'm en düşük miktarına ilkbahar periyodunda (% 14.60) rastlanırken, yaz ve kış periyotları arasındaki belirlenen miktarlarının farksız oldukları görülmüştür (% 15.70 – 16.60). Ayrıca DYA'nın diğer

yüksek seviyeli yağ asiti olan C18:0, bu türün kas dokusunda % 4.0 – 5.20 oranları arasında mevsimsel değişim göstermiştir (Güler ve ark., 2008).

C16:0 ve C18:0'ın balıklardaki miktarları ile ilgili olarak, daha önce değinilen diğer çalışmalarla birlikte, gerek Gökçe ve ark. (2004) gerekse Güler ve ark. (2008)'nin çalışmalarında elde edilen veriler, incelediğimiz balık türlerinin kas dokusunda elde edilenlerle paralellik göstermekte ve bu iki yağ asitinin balık dokularında tüm mevsimlerde en baskın DYA olduklarını ortaya koymuştur. Ancak türe, beslenme alışkanlığına ve ekolojik faktörlere bağlı olarak, C16:0 ve C18:0'ın farklı balık türlerinde farklı mevsimlerde daha fazla miktarlarda bulunduğu anlaşılmaktadır.

Steffens (1997), balık dokularının temel karakteristik TÇDmYA'sının C18:1 n-9 olduğunu belirtmiştir. Ayrıca C18:1 n-9 ve C16:1 n-7'nin yüksek seviyelerinin tatlı su balıklarının yağ asit bileşimlerinin temel bir karakteristiği olduğu bilinmektedir (Ackman, 1967; Osman ve ark., 2001).

Alabalık türlerinden *Oncorhynchus mykiss*'in karaciğer ve kas dokusu ile yapılan iki çalışmada (Görgün ve Akpınar, 2007; Haliloğlu ve ark., 2004) ve *Salmo trutta macrostigma*'nın erkek ve dişi eşyelerinin karaciğer ve kas dokusu yağ asiti bileşimini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada (Akpınar ve ark., 2009), C18:1 n-9'un TÇDmYA'lerinde en fazla temsil edilen yağ asiti olduğu belirlenmiştir.

Aynı şartlar altında yetiştirilen üç farklı sazan türünün (*Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala* ve *Catla catla*) kas dokusu yağ asiti bileşimleri araştırılmıştır. Her üç türde de TÇDmYA miktarlarının DYA miktarlarından fazla olduğu ve C18:1 n-9'un TÇDmYA içerisindeki en fazla bulunan bireysel yağ asiti olduğu bildirilmiştir. Bu asit *C. mrigala*'da % 25.08 oranında bulunurken, *L. rohita*'da daha düşük oranda (% 22.01) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada C20:1 (gadoleik asit) ve C22:1 (örisik asit)'in düşük miktarlarda da olsa üç türünde kas dokusunda bulunduğu ve besin kökenli oldukları belirtilmiştir (Memon ve ark., 2011).

Ülkemiz Karadeniz kıyılarından avlanan *Engraulis encrasicolus*'un karaciğer, kas ve gonadlarının yağ asitleri bileşiminden elde edilen bilgilere göre, TÇDmYA miktarları mevsimsel olarak karaciğerde % 18.50 – 24.88, kas dokusunda % 18.82 – 22.49 arasında değişim gösterirken, en yüksek miktar mart ayında (kas dokusunda % 16.15, karaciğerde % 16.24) bulunmuştur. C18:1 n-9'un, karaciğer (% 10.72 – 16.24) ve kas dokusundaki en yüksek miktara (% 11.31 – 16.15) sahip olan TÇDmYA olduğu

bildirilmiş ve en yüksek seviyesine karaciğerde mart, kas dokusunda ise kasım ayında rastlandığı bulunmuştur. Bu türün karaciğer ve kas dokusunda C18:1 n-9'dan sonra en fazla bulunan TÇDmYA'nın C16:1 n-9 olduğu belirlenmiş ve miktarlarının mevsime göre karaciğerde % 3.59 – 6.70, kas dokusunda ise % 4.39 – 5.85 oranları arasında değiştiği saptanmıştır. TÇDmYA içerisinde C14:1 n-5, C15:1 n-5, C17:1 n-8 C20:1 n-9 ve C24:1 n-9'un % 1'in altında buldukları rapor edilmiştir (Tufan ve ark., 2011).

*C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer ve kas dokusunun TÇDmYA'ı arasında C14:1 n-5, C15:1 n-5, C22:1 n-9 ve C24:1 n-9 düşük miktarlarda temsil edilmekle birlikte, dalgalanmalar gösterdikleri belirlenmiştir. Bu veriler Tufan ve ark. (2011)' in elde etmiş oldukları veriler ile desteklenmektedir. Yine düşük miktarlarda rastlanan C17:1 n-8 ve C20:1 n-9, mevsimlere göre ve balık türlerinde farklılıklar göstermiş ve miktarları genel olarak yaz aylarında birazda olsa artmıştır (Tablo 3 – 8). Memon ve ark. (2011), C20:1 ve C22:1'in besin kökenli olduğunu vurgulamıştır. Bu verileri doğrular nitelikte, *Merluccius hubbsi* karaciğerinin yağ asiti bileşimini mevsimsel olarak değerlendiren bir çalışmada, C20:1 n-9'un oldukça yüksek miktarlarına rastlanmış ve eksojen kökenli olduğu belirtilmiştir (Mendez, 1997). Çalışmamızda, bu yağ asitinin yaz periyodunda gösterdiği artışın beslenmeyle ilgili olabileceği söylenebilir. Ayrıca, karaciğerde bu asite daha yüksek seviyelerde rastlanması (Tablo 3 – 5), besinin karaciğere daha etkin bir şekilde yansıtıldığının bir göstergesi olabilir (Fajmonova ve ark., 2003).

Çalışmamızda karaciğer ve kas dokusunun tüm mevsimlerdeki en baskın TÇDmYA'nın C18:1 n-9 olduğu belirlenmiştir. Bu asitin en yüksek seviyeleri karaciğerde, *C. chalcoides* ve *C. carpio*'da sonbahar periyodunda (sırasıyla % 32.96±0.76 ve % 12.93±0.28), *L. cephalus*'ta ise kış periyodunda (% 18.79±0.74) belirlenmiştir (Tablo 3-5). Kas dokusunda ise her üç türde de kış periyodunda en yüksek seviyelere sahip olan C18:1 n-9 seviyelerinin *C. chalcoides*'te % 22.68±0.33, *L. cephalus*'ta 13.33±0.12 ve *C. carpio*'da % 13.59±0.28 olduğu saptanmıştır. İki farklı sazan türünün (silver carp ve bighead carp) kas dokusuyla yapılan bir çalışmada C18:1 n-9'un her iki türde de sonbahar mevsiminde artış gösterdiği belirlenmiştir (Vujkovic ve ark., 1999). Yine Kalyoncu ve ark. (2009) tarafından, *Vimba vimba tenella*'nın kas dokusu yağ asitleri mevsimsel olarak çalışılmış ve C18:1 n-9'un sonbahar (% 26.20) ve kış periyotlarında (% 28.40) artış gösterdiği saptanmıştır. Bu veriler, bizim verilerimizi

destekler niteliktedir. Ayrıca bu yağ asitinin karaciğer ve kas dokusunda tüm mevsimlerde belli bir seviyenin altına düşmemesi, anahtar bir metabolit olduğunu ve balık dokularında önemli fizyolojik fonksiyonlarının olabileceğini yansıtmaktadır. C18:1 n-9'un balık lipidlerinde birikimi de novo yağ asiti biyosentezi ile bağdaştırılmaktadır. Memelilerde yağ asit sintaz kompleksi, palmitil-KoA'nın zincir uzatılması ve stearil-KoA'nın desaturasyonunun beslenmeye bağlı olduğu bildirilmiştir (Farkas ve ark., 1978).

Özellikle  $\beta$ -oksidasyonu araştıran bazı araştırmacılar, doymuş ve tek çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin balıklarda enerji üretiminde aşırı doymamış yağ asitlerinden daha fazla tercih edildiğini bildirmektedirler (Henderson, 1996). Bu durum dokular arasında farklılık göstermiştir. Örneğin, *O. mykiss*'te karaciğerde mitokondrial  $\beta$ -oksidasyonda C16:0 ve C22:1 n-11'in en iyi substratlar olduğu gözlenirken, kas dokusunda C16:0, C16:1, C18:1 n-9 ve C18:2 n-6'nın en fazla tercih edilen substratlar olduğu belirlenmiştir (Henderson ve Sargent, 1985; Kiessling ve Kiessling, 1993; Fonseca-Madrigalve ark., 2005).

TÇDmYA'nın yüksek miktarlarda bulunan diğer asitleri C16:1 n-7 ve C18:1 n-7 olmuştur. Bu yağ asitlerinin miktarları mevsime bağlı olarak karaciğer ve kas dokularında düzensiz dalgalanmalar göstermiştir. Bunun nedeni, bu bileşenlerin yağ asitleri biyosentezinde ara metabolitler olmalarından kaynaklanabilir. Bununla birlikte, karaciğer ve kas dokusunda toplam TÇDmYA miktarlarının ve özellikle C18:1 n-9 başta olmak üzere, C16:1 n-7 ve C18:1 n-7'nin sonbahar veya kış periyotlarında miktarlarını artırdıkları görülmektedir (Tablo 3 – 8). Bu durum, su sıcaklığındaki düşmeye bağlı olarak bu asitlerin sentezinde bir artış olabileceği gibi, beslenme aktivitesiyle de ilgili olabileceği kanısını uyandırmaktadır.

Balık dokularında yağ asiti kompozisyonuna etki eden en önemli faktörlerden birinin de üreme olduğu bilinmektedir. Balıklar bu evre öncesinde bol besine ihtiyaç duyarlar ve besin almada bir azalma olduğunda gonat gelişimi yavaşlar veya bazı türlerde eşeyssel olgunluğa erişme gecikebilir. Üremede görülen mevsimsel ritim, kullanılan besin ile ilişkilidir. Üreme esnasında fizyolojik dengenin sağlanması için besinle birlikte su sıcaklığı, gün uzunluğu ve hormonal etki gibi faktörlerde önemli rol oynamaktadır (Akpınar, 1986; 1987; Konar ve ark., 1999; Metin ve Akpınar, 2000 a; Uysal ve ark., 2006).

Ünver ve Saraydın (2004) Tödürge gölündeki *C. chalcoides*'in dişi bireylerinin ovaryum gelişimini histolojik olarak incelemişlerdir. Buna göre türün ovulasyon periyodunun mayıs ayının sonlarında başladığını ve temmuz ayında sonlandığını ifade etmişlerdir. *L. cephalus*'un üreme biyolojisi farklı çalışmalarda değerlendirilmiştir. Buna göre, Türkmen ve ark. (1999), Aras nehrinde yaşayan *L. cephalus*'un üreme periyodunun mayıs ve temmuz ayları arasında olduğunu bildirmiştir. Örnekleme alanımız olan Tödürge gölünde de yaşayan bu türün üreme periyodunun mayıs ve temmuz ayları arasında olduğu belirlenirken (Ünver, 1998), Topçam baraj gölünde yaşayan *L. cephalus*'un üreme periyodunun mart-nisan ayları arasında olduğu bulunmuştur (Şaşı, 2004).

*C. chalcoides* ve *L. cephalus*'un yağ asitlerine ait elde ettiğimiz önemli değişimler, yaz aylarını temsil eden temmuz ayından başlamak üzere, daha yoğunluklu olarak ağustos ve eylül ayları arasındaki üreme periyoduna denk gelmektedir. Her iki türde de gerek karaciğer gerekse kas dokusunda özellikle uzun zincirli yağ asitleri olan C20:4 n-6, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün seviyelerinde önemli değişimler olmuştur. Bu asitlerin miktarları temmuz ayından itibaren düşmeye başlamış ve sonbahar dönemini temsil eden eylül ayında ise en düşük seviyeye inmiştir. Kış periyoduyla birlikte miktarlarında artışlar olduğu gözlenmiştir (Tablo 3-4 ve Tablo 6-7).

Karataş (2000), Kazova (Tokat) Kaz gölünde yaşayan *C. carpio* popülasyonlarının üreme dönemlerini iki yıl gözlemlemiştir. Buna göre, ilk yıl mart ayında üremeye başlayan popülasyonun ikinci yılda nisan ayında üremeye başladığı saptanmıştır. Yapılan bir araştırmada, *C. carpio*'nun üreme mevsiminin Tödürge gölünde haziran ayında başlayıp ağustosa kadar sürdüğü rapor edilmiştir (Erdem, 1988). Buna paralel olarak, çalışmamızda elde edilen yağ asiti bulguları, *C. carpio*'nun üreme periyodunun yaz mevsiminin hemen başında başladığı ve temmuz-eylül ayları arasına rastladığı anlaşılmaktadır. Bu verilere göre, *C. carpio*'da da karaciğer ve kas dokusunda en fazla değişime uğrayan yağ asitlerinin C20:4 n-6, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 olduğu görülmektedir (Tablo 5 ve 8). Türlerin üreme periyodu hakkında elde ettiğimiz bulgulardan örnekleme alanımızda yaşayan türlerin üreme periyotlarının da su sıcaklığı, beslenme ve gölün ekolojisi gibi faktörler nedeniyle bir miktar sapmalar gösterebileceği anlaşılmaktadır. Yinede, Konar ve ark (1999), Fırat-Dicle su sisteminde yaşayan

Cyprinidae ailesinin üyelerinin üreme mevsimlerinin nisan ayında başlamak suretiyle, temmuz sonu veya ağustos başına kadar devam ettiğini bildirmişlerdir.

Özellikle balıklarda uzun zincirli yağ asitlerinin, normal büyüme ve gelişimde olduğu kadar üremede de etkin rol üstlendikleri bildirilmektedir (Sargent ve ark., 1999). C18:2 n-6 ve C18:3 n-3 esansiyel yağ asitleri olup, balık dokularının  $\Delta$ -12 ve  $\Delta$ -15 desaturaz aktivitelerinden yoksun olmalarından dolayı sentezlenemezler. Bu yağ asitleri, besin yoluyla alınıp vücudun diğer kısımlarına gönderilirler. Diğer aşırı doymamış yağ asitleri olan C20:3 n-3, C20:5 n-3, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 gibi yağ asitleri, C18:2 n-6 ve C18:3 n-3 üzerinden  $\Delta$ -6,  $\Delta$ -5 ve  $\Delta$ -4 desaturaz enzimleri vasıtasıyla sentezlenirler. Balık türleri bu yağ asitlerini aynı zamanda besin zincirinin ilk halkasını oluşturan fitoplanktonlardan sağlayabilir. Bu aşırı doymamış yağ asitleri, depo lipitlerinde bulunan yağ asitlerinin aksine, vücudun en küçük yapı taşı olan hücrelerin yapısal elemanları olarak bilinirler (Gurr ve Harwood, 1991; Konar ve ark., 1999).

Balıklarda karaciğer ve kas dokusunun diğer fizyolojik fonksiyonlarda oldukları kadar yağ depoları olarakta işlev yaptıkları bilinmektedir (Kozlova, 1998). Karaciğer, gonad gelişimi ve olgun gametlerin oluşturulmasında kullanılacak lipitin büyük bir kısmını depo ederek, bunları gonadlara iletir. Ancak üreme için gerekli enerji daha çok kas dokusundaki lipitlerden sağlanmaktadır. Bu nedenle üreme evresinde, karaciğer ve kas dokusu lipitleri ve yağ asitlerinin miktarında önemli derecede azalmanın meydana geldiği bilinmektedir (Medford ve Mackay, 1978; Dabrowski, 1982; Akpınar, 1986).

Herhangi bir hayvanın hayatındaki en önemli süreç enerjinin biriktirilmesidir ve vücut gelişimi, üreme ve diğer aktivitelerde bu enerjinin kullanımınıdır. Gonad gelişimi ve olgunlaşma için gereksinilen enerji miktarında eşeyler arasında büyük farklılıklar var olabilir. Çünkü ovaryum dokusu testikular dokudan çok daha fazla enerji gerektirir (Diana ve Mackay, 1979). Bir kural olarak, balık ovaryumları yavru için enerji sağlanması nedeniyle testislerden çok daha fazla depo lipitlerini (özellikle triaçilgliseroller) biriktirir ve bu, yaşam tarzlarına, beslenme seviyesine ve bilhassa her bir türün üreme ekolojisine bağlıdır. Örneğin, turna balığı, roach, karagöz gibi balıklarda ovaryum lipit içeriği % 3 - 5 iken, salmonidlerde % 9 - 10 olduğu bildirilmiştir (Kozlova, 1998).

Damızlık gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*)'nın yumurta ve spermlerinin yağ asit kompozisyonu karşılaştırılmıştır. Buna göre, balıklardan sağlanan yumurta ve spermlere ait yağ asit profilleri gerek toplam DYA, TÇDmYA, n-3 formu ADmYA, n-6 formu ADmYA gerekse bireysel yağ asitleri arasındaki farklar çok önemli çıkmıştır. Toplam DYA'leri içerisinde verilen besine bağlı olarak, miristik asit (C14:0), stearik asit (C18:0) bulunmasına karşın, palmitik asit (C16:0) spermde % 76, yumurtada ise % 71 oranlarıyla en yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde içeriğinde C16:1 n-9, C16:1 n-7, C17:1 n-8, C18:1 n-9, C20:1 n-9 bulunmasına karşın toplam TÇDmYA'nin önemli bir kısmı C18:1 n-9'dan oluşmakta olduğu görülmüştür. C18:1 n-9 yumurtada % 66, spermde ise % 71 oranlarında bulunmuştur. Yine verilen besine bağlı olarak, besinde oranı % 18 olan n-3 formu ADmYA, yumurtada % 26'ya, spermde ise % 37.9'a yükseldiği görülmüştür (Aras ve ark., 2003 c).

Yapılan çalışmalar, balıklarda dişi bireylerin gonad olgunlaşmasını sağlamak için daha çok doymuş yağ asitlerini kullanırken, erkeklerde bu enerjinin daha çok tek çift bağ içeren yağ asitlerinden karşılandığını belirtmektedir. Bununla birlikte, vitellojenez esnasında, gonad olgunlaşması için n-6 ve n-3 formu yağ asitlerinin öncüleri olan C18:2 n-6 ve C18:3 n-3 gibi yağ asitlerinin depo edilmiş öncüleri de kullanılabilir (Medford ve Mackay, 1978; Cesaj ve ark., 2003; Uysal ve ark., 2006).

Bir başka çalışma *Sander lucioperca*'nın erkek ve dişi bireylerinin kas dokusu yağ asiti bileşiminin mevsimsel değişimini araştırmıştır. Bu çalışmada C16:0, C18:1 n-9, C20:4 n-6, C20:5 n-3 ve C22:6 n-3' ün tüm mevsimlerde kas dokusunun en fazla bulunan yağ asitleri olduğu belirlenmiştir. Üreme periyodunda özellikle uzun zincirli ADmYA'lerinde düşüşler gözlemlendiği belirtilmiştir (Uysal ve Aksoylar; 2005). Gonad olgunlaşmasına bağlı olarak *Sander lucioperca*'nın karaciğer yağ asiti bileşiminde meydana gelen varyasyonlar araştırılmış ve mevsime bağlı olarak büyük değişimlerin görüldüğü belirtilmiştir. Her iki eşeyin yağ asiti bileşiminde C16:0, C18:1 n-9, C20:4 n-6, C20:5 n-3 ve C22:6 n-3'ün en fazla bulunan yağ asitleri olduğu bulunmuştur. Türün üreme periyodunun mart ayından başlamak üzere mayıs ayına kadar devam ettiği bildirilmiştir. Bu dönem esnasında en belirgin değişimler C20:5 n-3 ve C22:6 n-3'te belirlenmiştir. Kış periyoduyla birlikte su sıcaklığındaki ani düşüşün özellikle bu iki asitin seviyelerini bir hayli arttırdığı bildirilmiştir (Uysal ve ark., 2006). Bu veriler



çalıştığımız türlerin karaciğer ve kas dokusundan elde etmiş olduğumuz verileri desteklemektedir.

Çalışmamızın konusu olan türlerin karaciğer ve kas dokusu ADmYA'lerinden tüm mevsimlerde en fazla bulunanların C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 olduğu belirlenmiştir. Bu asitlerin seviyeleri, tüm türlerde gerek karaciğer gerekse kas dokusunda üreme periyotlarına denk gelen temmuz – eylül ayları arasında düşmüştür (Tablo 3 – 8). Bu yağ asitlerinde saptanan mevsimsel değişimler diğer balık türlerinin karaciğer ve kas dokusuyla yapılan çalışma verileriyle paralellik göstermektedir. Ayrıca balıklar tarafından sentezlenemeyen ve besin yoluyla alınması gereken EYA'leri olarak bilinen C18:2 n-6 ve C18:3 n-3'ün diğer ADmYA'lerinden daha düşük miktarlarda oldukları belirlenmiştir. Bu durum, bu yağ asitlerinin diğer uzun zincirli türevlerinin sentezlerinde etkin bir şekilde kullanılmalarından kaynaklandığının bir göstergesidir.

Çalışmamızda, karaciğerdeki C20:4 n-6 miktarları *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'ta en düşük sonbahar periyodunda sırasıyla % 0.97±0.01 ve % 3.33±0.21, *C. carpio*'da ise yazın % 3.09±0.06 olduğu belirlenmiştir. Kas dokusunda tüm türlerde sonbahar periyodunda saptanan C20:4 n-6'nın en düşük oranları, *C. chalcoides*'te % 1.06±0.11, *L. cephalus*'ta % 3.30±0.08, *C. carpio*'da ise % 2.98±0.11 olduğu bulunmuştur. C20:5 n-3, tüm mevsimlerde incelenen dokularda yüksek miktarlarda olmasına karşın, çok belirgin değişim göstermemiştir. Karaciğerde C22:5 n-3'ün *C. chalcoides* (% 1.74±0.19) ve *L. cephalus*'ta (% 2.35±0.20) en düşük miktarlarına sonbahar, *C. carpio*'da ise yaz periyodunda (% 2.94±0.09) rastlanmıştır. Kas dokusunda ise tüm türlerde sonbaharda en düşük miktara sahip olan C22:5 n-3 miktarları *C. chalcoides*'te % 2.51±0.17, *L. cephalus*'ta % 2.88±0.11 ve *C. carpio*'da ise % 1.25±0.06 olarak belirlenmiştir. Gerek mevsim gerekse üreme periyoduna bağlı olarak en belirgin değişimlerin gözlemlendiği yağ asiti olan C22:6 n-3 te diğer yağ asitlerine benzer bir değişim profili sergilemiştir. Buna göre, *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'un karaciğerinde en düşük miktarları sonbahar periyodunda (sırasıyla % 5.27±0.21 ve % 6.13±0.18), *C. carpio*'da ise yaz döneminde (% 5.50±0.14) bulunmuştur. Kas dokusunda ise tüm türlerde sonbahar periyodunda oldukça önemli derecede düşüş gösteren C22:6 n-3 *C. chalcoides*'te % 7.18±0.88, *L. cephalus*'ta % 15.16±0.19 (bu değer kış periyodundan fark göstermemiştir, % 15.10±0.12), *C. carpio*'da ise % 1.33±0.14 olarak tespit edilmiştir (Tablo 6 – 8).

Uzun zincirli doymamış yağ asitlerine ait elde edilen bu verilerden, yukarıda belirtilen düşüşlerin nedeninin üreme periyodunda gonat gereksinimlerine bağlı olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle C20:4 n-6, C22:5 n-3 ve C22:6 n-3 asitlerinde karaciğer ve kasta, temmuz ayından itibaren düşüş meydana gelmiş ve kış döneminin başlamasıyla birlikte oluşan artış bunun kanıtıdır (Tablo 3 – 8). Bu durum, üreme periyodu sonrasında su sıcaklığının 19 °C'den kış periyodunda 6 °C'ye düşmesinin de uzun zincirli yağ asitlerinin sentezinde hızlı bir artışın meydana getirebildiğini kanıtlamaktadır (Akpınar, 1987; 1988; Konar ve ark., 1999; Uysal ve Aksoylar, 2005; Uysal ve ark., 2006). *C. carpio* ve *L. cephalus*'ta karaciğerde C 18:2 n-6 ve C18:3 n-6'nın kış periyodunda düşüş göstermesi (Tablo 4 ve 5), türlerin besin yetersizliğine bağlı olarak bu asiti yüksek miktarlarda depo edemediği yada daha uzun zincirli yağ asiti türevlerini sentezlemek amacıyla bu yağ asitini hızlı bir şekilde kullanmış olabileceğini düşündürmektedir.

C20:4 n-6'nın biyolojik olarak aktif moleküller olan eikozanoidlerin öncüsü olduğu daha önce açıklanmıştı. Bununla birlikte, bu yağ asitinin birçok türün olgunlaşması esnasında yumurta ve spermde toplandığı ve bu sürece katılan en etkin ADmYA olduğu bildirilmektedir (Blanchard ve ark., 2005; Gomes ve ark., 2010). Çalışmamızda, tüm türlerin karaciğer ve kas dokularında temmuz – eylül ayları arasına denk gelen üreme periyotlarında ADmYA içerisinde en belirgin düşüşler, C20:4 n-6 ve C22:6 n-3'te görülmüştür. Bu bulgu C20:4 n-6 ile birlikte, C22:6 n-3'ünde gonadal gelişim süreçlerinde oldukça aktif rol alabileceği izlenimini vermektedir.

Sorbera ve ark. (2001) *Dicentrarchus labrax*'la yapmış oldukları çalışmanın sonucunda, C20:4 n-6'nın gonadotropin uyarımlı oosit olgunlaşmasına katıldığına dair kanıt elde etmişlerdir. Ayrıca, diğer ADmYA'nin ve prostaglandinlerin de bu süreçte önemli roller oynadıkları bildirilmiştir. *Clupea harengus membras*'ın kas dokusunda yapılan mevsimsel bir çalışmada, ADmYA'lerinden özellikle C20:5 n-3 ve C 22:6 n-3'ün bu türün eşeyssel olgunlaşmasında hayati önem taşıdıkları belirtilmiştir (Szlinder-Richert ve ark., 2010).

Çalışmamızda, üreme periyotlarıyla birlikte n-3 ve n-6 ADmYA miktarları *L. cephalus* ve *C. chalcoides*'te sonbahar, *C. carpio*'da ise yaz mevsiminde düşüş göstermiş ve kış mevsimiyle birlikte tüm türlerde ADmYA miktarlarının arttığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar, DYA ve TÇDmYA miktarlarının, sıcak mevsimlerde

ve sıcak bölgelerde yaşayan balıklarda yüksek olduğunu vurgularken, ADmYA miktarlarının soğuk bölge ve soğuk mevsimlerde yüksek seviyelerde bulunduğunu bildirmektedir. Ayrıca toplam DYA ve ADmYA'nin miktarları arasında mevsimlere göre ters bir ilişki olduğu görülmektedir (Jobling ve Bendiksen, 2003; Kheriji ve ark., 2003; Uysal ve Aksoylar, 2005; Uysal ve ark., 2008).

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre, DYA'nın, yüksek su sıcaklığı ve gün uzunluğu nedeniyle beslenmenin yoğun olduğunu düşündüğümüz yaz periyodu boyunca yüksek ve ADmYA'nin ise düşük oranlarda olduğu görülmektedir. Kışın su sıcaklığındaki düşüş ile birlikte, incelediğimiz türlerin karaciğer ve kas dokusunda DYA miktarlarının azalması ve ADmYA miktarlarının artması literatür bilgileriyle paralellik taşımaktadır.

Bu çalışmayla, sonuç olarak *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğer ve kas dokusu yağ asiti bileşimlerinin mevsime göre kantitatif farklılıklar gösterdikleri belirlenmiştir. DYA miktarları genel olarak su sıcaklığının düşmesi ile kış periyodu itibariyle düşüş göstermiştir. Türlerin karaciğer ve kas dokularındaki TÇDmYA'nin sonbahar veya kış periyotlarında en yüksek düzeylerde olduğu belirlenmiştir. Üreme periyotlarıyla TÇDmYA miktarları önemli derecelerde etkilenmemiştir. Gerek n-6 gerekse n-3 formu ADmYA sınıfının en düşük miktarları üreme periyotlarını kapsayan temmuz – eylül aylarında görülmüştür. Her iki yağ asiti sınıfı ve dolayısıyla da toplam ADmYA sınıfının miktarları kış periyoduyla birlikte tekrardan artış göstermiştir. Bu veriler, karaciğer ve kas dokusu yağ asitlerinin, türlerin yaşamsal ve fizyolojik süreçlerinde yapısal ve enerji kaynağı olarak kullanıldığı görüşünü desteklemektedir (Konar ve ark., 1999). Tödürge gölünde yaşayan her üç türün de, özellikle insan sağlığı açısından büyük öneme sahip olan EPA ve DHA gibi, n-3 formu doymamış yağ asitlerini bütün mevsimlerde önemli ölçülerde içerdikleri saptanmıştır (Tablo 3 - 8). Bu türlerden *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'un bölgede insanlar tarafından besin kaynağı olarak pek değerlendirilmediği bilinmektedir. Karaciğer ve özellikle balıklardan sağladığımız besin kaynağı olan kas dokusuna ait yağ asit verileri, bu gölde yaşayan balık türleri için elde edilen ilk verilerdir. Bu verilerden, bu balık türlerinin korunarak ve üretimi artırılarak bölge insanları için önemli bir besin kaynağı oluşturacağı, özellikle n-3 formu yağ asitleri açısından önem arz etmektedir.

Çalışmamızda *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğer lipaz enzimleri materyal ve metod bahsinde belirtilen yöntemler kullanılarak saflaştırılmaya ve bazı özellikleri karakterize edilmeye çalışılmıştır. Ön denemelerde karaciğer dokusundaki proteaz aktiviteleri değerlendirilmiş ve bu açıdan kayda değer bir aktivite görülmemiştir. Bu nedenle homojenat ortamında proteaz inhibitörlerinden sadece Na<sub>4</sub>EDTA ve organel bütünlüğünü sağlamaya yarayan D-mannit (0.25 mM)'in bulunmasına özen gösterilmiştir.

Bazı böcek türlerinde lipaz enziminin saflaştırılmasına odaklanan çalışmalarda, enzim stabilitesini korumak için homojenat ortamında sukroz, benzamidin, leupeptin, aprotinin ve 2-merkaptoetanol gibi proteaz inhibitörlerinin uygun miktarları kullanılmıştır (Arrese ve ark., 1994; Arrese ve ark., 2006). Bununla birlikte, son zamanlarda sucül ortamlarda yaşayan canlılarda lipaz enziminin saflaştırılmasında homojenat ortamına katılan proteaz inhibitörlerinin sınırlı olduğu da görülmektedir (Cherif ve ark., 2007). Ayrıca bitkisel dokularda yapılan bazı saflaştırma çalışmaları proteaz inhibitörü olarak sadece DTT içermektedir (Fahmy ve ark., 2008). Bunun başlıca nedeni, çalışmamızın giriş kısmında belirtildiği üzere lipaz enzimi serin proteazlarla benzer bir aktif merkezi paylaşmakta ve serin proteaz inhibitörlerinin kullanımı sonucunda inhibisyona neden olabilmektedirler.

Enzim saflaştırma çalışmalarında homojenat ortamının hücrenin fizyolojik şartlarını yansıtması gerektiği vurgulanmaktadır (Telefoncu, 1996). Çalışmamızda karaciğerin homojenize edildiği ortamın pH'ı 7.40 ve iyonik gücün ise 60 mM olması sağlanmıştır. Bu pH değeri fizyolojik pH'yı yansıtması açısından seçilmiştir. Ortamın iyonik gücünün seçilmesi ise biraz farklılık arz etmiştir. Yapılan diferansiyel santrifüjleme işlemleri esnasında bazı durumlarda çökelti ortamında bulunan aktivitenin oldukça fazla olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, iyonik gücü 20 mM gibi düşük olan homojenat ortamlarında daha fazla sergilendiği görülmektedir. Buna etken neden Telefoncu (1996)'da tartışılmıştır. Buna göre, homojenizasyon ortamının seyreltik olması durumunda hücredeki yüklü partiküller iyon değiştiriciler gibi davranmakta ve özellikle bazik yapıdaki proteinleri adsorbe etmektedirler. Bu fiziksel etkiden dolayı, proteinler sitosolik faz yerine çökelti fazlarında bulunmaktadırlar.

Saflaştırılması arzulanan lipaz enziminin sitosolik lokalizasyon gösterdiğine dair birçok kanıt bulunmaktadır. Bununla ilgili başta alabalık adipöz dokusu olmak üzere,

homoiterm ve poikilotherm canlılardan değişik türlerde benzer sonuçlar elde edilmiştir (Sheridan ve Allen, 1984; Horman ve ark., 1991; Metin, 1997; Değerli, 1999). Ayrıca Akpınar ve ark. (2009), ergin ve ergin olmayan *Oncorhynchus mykiss*'in karaciğerinden lipaz enzimini saflaştırması amacıyla yapmış oldukları çalışmada da enzimin sitosolde çözünür formda olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca böcek yağ dokudan lipaz enzimini saflaştırmayı amaçlayan çalışmalarında bu yönde olduğu görülmektedir (Arrese ve ark., 1994; Arrese ve ark., 2006). Çalışmamızda da 60.000xg'de tek kademe santrifüjleme sonucunda elde edilen yaklaşık 38 mL'lik üst sıvılarda *C. chalcoides*'te 854.7 µmol/dk, *L. cephalus*'ta 974 µmol/dk ve *C. carpio*'da ise 1010 µmol/dk'lık toplam aktivite olduğu bulunmuştur. Çökeltideki (1 – 2 mL arasında) aktivitenin kayda değer olmadığı belirlenmiştir. Bu konudaki bulgularımız yapılan çalışmalarla uyumludur.

Genellikle protein saflaştırma çalışmalarında özellikle ön saflaştırma adımlarında proteinlerin çöktürülmesi ve konsantrasyonunun artırılması gerekir. Bu amaçla balık dokularında en fazla uygulanan yöntem ilgili protein çözeltisini amonyum sülfat [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] ile muamele etmektir. Bir çalışmada Pabai ve ark. (1995), % 20 ve % 40'lık amonyum sülfat doygunluğunda 19 katlık bir saflaştırma katsayısı belirlemişlerdir. Bu amaçla kullanılan bir diğer kimyasal ise, çalışmamızda da kullanılan PEG çöktürmesidir. PEG, iyonik olmayan ve suda kolayca çözünebilen bir unsurdur ve çok az protein denaturasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Bollag ve ark., 1996). Çalışmamız dışında literatürde balık lipazlarının PEG ile çöktürülmesi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (Değerli, 1999; Kurtovic ve ark., 2010). Bunun dışında Arrese ve ark. (1994)'da böcek yağ doku lipazının saflaştırılması amacıyla % 20 (w/v) PEG çöktürmesini kullanmışlardır.

Yapılan PEG çöktürme denemelerinde, lipaz aktivitesinin ve protein miktarının en yüksek olduğu PEG konsantrasyonunun % 30 (w/v) uygulamasıyla elde edildiği görülmüştür. Bu değer üzerindeki uygulamalarda aktivitede düşüşler meydana geldiği görülmektedir (Şekil 1). Bu durum, aşırı PEG miktarlarının çalışılan proteinin izoelektrik noktasına bağlı olarak, proteinlerde çözünürlüğü istenmeyecek derecelerde azaltması sonucunda protein yapısında sıkı kümeleşmeler meydana getirmesiyle açıklanabilir. PEG çöktürmesi sonucunda karaciğer lipazlarının, *C. Chalcoides*'te 1.062 kat, *L. cephalus*'ta 1.149 kat ve *C. carpio*'da ise 1.01 kat saflaştırıldığı görülmektedir (Tablo 11 - 13). Elde ettiğimiz bu sonuçlar PEG'nin herhangi bir saflaştırma adımı

sunmadığını göstermektedir. Ancak, burada hatırlanması gereken bir gerçek, PEG'nin çözeltideki proteinleri etkin bir şekilde konsantre edebildiği ve herhangi bir aktivite kaybına neden olmayıp, sonraki saflaştırma adımlarına uygun bir preparat sunduğudur. Bu yöntemin bir diğer avantajı ise diyaliz gibi bir yöntem gerektirmeksizin iyon değişim kromatografisinin ilk saflaştırma basamağı olarak kullanıldığı çalışmalarda, ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilirliği (Bollag ve ark., 1996). Çalışmamız bu yönde ilerlemiş ve ilk saflaştırma basamağında bir anyon değişim kromatografisi (Q sefaroz) kullanılmıştır.

Protein saflaştırma çalışmalarında, ön saflaştırma adımları sonrasında daha fazla saflaştırmanın sağlanması amacıyla çeşitli kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Genel olarak, sadece bir kromatografik adım, gereksinilen saflığı elde etmek için yetersizdir. Saflaştırma parametreleri düşünüldüğünde lipazların saflaştırılması için en az dört kromatografik adımın gerekli olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, yüksek bitki ve hayvansal kaynaklardan, mikrobiyal kaynaklardan elde edilen saflığı elde etmek için daha fazla adımı gerektiren kromatografik yaklaşımlara gereksinim duyulduğu belirtilmiştir (Palekar ve ark., 2000).

Saflaştırma çalışmalarının en fazla yürütüldüğü grup olan mikrobiyal lipaz saflaştırma çalışmalarına bakıldığında, Gilbert ve ark (1991), *Pseudomonas aeruginosa* lipazını saflaştırmak amacıyla, Mono Q sefaroz, DEAE sefaroz CL-6B ve son basamakta jel filtrasyon kromatografisi olan sefakril S 200 HR'den oluşan üç adımlı bir saflaştırma prosedürü izlemişlerdir. İyon değişim basamağında % 64'lük bir verim ve 5.7 katlık bir saflaştırma, son basamaktaki jel filtrasyon kolonunda ise enzim % 18'lik verim ve 31 kat saflıkta elde edilebilmiştir.

*Penicillium simplicissimum*'da yapılan lipaz saflaştırma çalışmasında elde edilen parametrelerin saflaştırmada izlenen farklılığa göre çok daha değişik olduğu görülmektedir. Bu çalışmada ultrafiltrasyon sonrasında % 85 verim ve 4 katlık saflaştırma elde edilmiştir. Bu adım sonrasında amonyum sülfat çöktürme basamağında verim % 60 ve saflaştırma katsayısı ise 11 olmuştur. Kromatografik adımlar olarak uygulanan fenil sefaroz CL-4B, Ultrigel AcA-54 ve hidroksiapatit kolonları sonrasında % 20 verim ve 790 katlık bir saflaştırmayla elde edilmiştir (Sztajer ve ark., 1992).

Sugihara ve ark. (1991) *Bacillus sp.*'den lipaz saflaştırma çalışmasında amonyum sülfat çöktürmesi ve akrinol uygulaması sonrasında % 23 verim ve 42 katlık

bir saflaştırma elde etmişlerdir. Bu basamaktan sonraki DEAE sefadeks A-50 kolon kromatografisi sonucunda verim % 20 olurken, saflaştırma katsayısının 840 olduğu görülmüştür. Toyopearl HW-55F jel filtrasyon ve butil toyopearl 650 M kromatografileri sonrasında elde edilen enzimin 1152 U/mg protein spesifik aktivite, % 10 verim ve 7760 kat saflıkta olduğu görülmüştür.

Funguslarda gerçekleştirilen iki çalışma, lipaz saflaştırmada kullanılan yöntemler açısından önemli örnek teşkil etmektedir. Bunlardan Hoshino ve ark (1992), *Fusarium oxysporum* lipazını saflaştırmışlar ve amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında % 58 verim ile birlikte 2.4 kat saflaştırma elde etmişlerdir. Sonraki adımda uygulanan anyon değişim kromatografisi (Q sefaroze) basamağında elde edilen verim (% 57) ve saflaştırma kat sayısının (2.4) farklı olmadığı görülmüştür. Son basamakta kullanılan fenil sefaroze hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda enzim % 32 verim ve 38.1 kat saflaştırma ile elde edilebilmiştir. Shimada ve ark. (1993) tarafından yapılan çalışmada ise *Fusarium heterosporum* lipazı, yine amonyum sülfat çöktürmesine maruz bırakılmış ve bu aşamada % 93 verim ve 14 katlık bir saflaştırma görülmüştür. Enzim SP sefadeks C-50 ve sefadeks G 75 kolon kromatografileriyle % 69 verim, 1040 katlık bir saflaştırma katsayısı vermiştir. Son adımda izoelektrik fokuslamayla aktivite kazanımının % 38, saflaştırma katsayısının ise 2120 kat olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalar farklı saflaştırma prosedürlerine bağlı olarak elde edilen saflaştırma parametrelerindeki farklılığı iyi bir şekilde sergilemektedir.

Yüksek bitkilerden lipaz enzimi saflaştırma çalışmaları mikrobiyal organizmalara nazaran daha zor olmuştur. *Ricinus communis cv. zanzibarensis*'in (castor bitkisi) tohum lipazının saflaştırılması esnasında protein kararsızlığı bildirilmiş ve bu nedenle lipazın çözümlenmesinde deterjan olarak CHAPS (3-chlamidopropyl-dimethylammonio-1-propanesulfate) kullanılmıştır. Enzim daha sonra anyon değişim, jel filtrasyon ve adsorbsiyon kromatografileri ile saflaştırılabilmektedir. Ancak bildirilen saflaştırma parametreleri oldukça düşük olup, 6 katlık bir saflaştırma rapor edilmiştir. Bunun nedeninin protein kararsızlığından kaynaklandığı düşünülmüştür (Fuchs ve ark., 1996).

*Pinus edulis*'in yağ doku lipazının saflaştırılmasında da benzer bir problem bildirilmiştir. Bu çalışmada, elektroforetik yöntemle saflaştırma amaçlanmış ancak başarısız olunmuştur (Hammer ve Murphy, 1993). Benzer bir çalışma *Pachira*

*aquatica*'nın tohumlarında yürütülmüştür. Bu çalışmada da elektroforetik saflaştırma metodu doğrudan ham dokuda uygulanmış ve % 7'lik verim ve 9.6 katlık saflaştırma elde edilebilmiştir. Ham dokuda 64.2 U/mg protein olan spesifik aktivitenin elektroforetik saflaştırmayla neredeyse on kat artarak 614.3 U/mg proteine çıktığı görülmüştür (Polizelli ve ark., 2008).

Ncube ve ark. (1993) tarafından *Brassica napus* bitkisinin tohum lipazı saflaştırılmıştır. Bu çalışmada aseton çöktürmesiyle % 80 verim ve 7.1 saflaştırma katsayısı elde edilmiştir. Kromatografik adımlarda DEAE sefadeks iyon değişimiyle % 78 verim, 14.2 kat saflık, oktil sefaroze ile % 31 verim, 283 kat saflık ve son basamakta sefakril S 300 jel filtrasyon kromatografisiyle de, 2140 U/mg proteinlik spesifik aktiviteyle birlikte, % 16 verim ve 321 kat saflık elde edilmiştir. *Jatropha curcas* L.'nin tohumlarından da bir lipaz saflaştırılmıştır. Buna göre % 60 ve % 80 amonyum sülfat uygulaması sonrasında aktiviteyi sırasıyla 11.60 ve 28 olduğu bulunmuştur. Ultrafiltrasyon ile saflaştırma sonucunda aktivitenin 80 olduğu belirlenmiştir (Abigor ve ark., 2002).

Böceklerdeki az sayıda olan lipaz saflaştırma çalışmalarından birisi Arrese ve Wells (1994) tarafından *Manduca sexta*'nin yağ dokusunda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadaki saflaştırma prosedürü, homojenatın PEG ile çöktürülmesi sonrasında DEAE selüloz, fenil sefaroze, Q sefaroze ve hidroksiapatit kolon kromatografilerini kapsamıştır. PEG suspansiyonunda verim % 70, saflaştırma katsayısı ise 2.3 olarak bulunmuştur. Fenilsefaroze ile saflaştırma sonucunda verim % 11.7 ve saflaştırma katsayısı 939 olmuştur. Q sefaroze ve hidroksiapatit kolon kromatografilerinin verimleri de fenil sefaroze ile aynı bulunurken, saflaştırma katsayısı sırasıyla 3757 ve 8016 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmaya paralel olarak, çalışmamızın PEG bahsinde belirtildiği üzere proteinlerin PEG ile çöktürme işlemi etkin bir saflaştırma basamağı olmadığı anlaşılmaktadır. Arrese ve ark. (2006) yine *M. sexta*'nin yağ dokusundan trigliserit lipazını saflaştırmışlardır. Bu çalışmada sitosoldan alınan enzim kaynağı peşpeşe iki DEAE iyon değişim kromatografilerine uygulanmıştır. Sonraki saflaştırma basamaklarını fenil sefaroze, hidroksiapatit, Q sefaroze ve ikinci bir fenil sefaroze kolon kromatografileri izlemiştir. Bu kromatografik adımlarla, sitosolde 0.27 U/mg protein'lik spesifik aktiviteye sahip olan enzim, son basamaktaki saflaştırma ile 1086 U/mg proteinlik bir spesifik aktiviteyle elde edilmiştir.



Omurgasızlarda yapılan diğer lipaz saflaştırma çalışmalarına bakıldığında, Cherif ve ark. (2007) yengeç sindirim lipazını saflaştırmışlardır. Bu çalışmada sindirim lipazı özütü 10 dakika 60 °C sıcaklığa maruz bırakılmış ve % 80 verim ile 4 katlık saflaştırma elde edilmiştir. Buradan elde edilen çökeltinin DEAE selüloz kromatografisine uygulanmasıyla % 54 verim, 27.3 kat saflaştırma sağlanmıştır. Bu aşama sonrasında amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda saflığın 34.6 olduğu belirlenmiştir. Daha sonraki adımlar sefakril S-200, Mono-Q sefaroze ve ikincil bir sefakril S-200 kolon kromatografilerini kapsamış ve enzim % 10 verim ile birlikte, 165 katlık bir saflaştırma katsayısıyla elde edilmiştir.

Bir diğer omurgasız olan salyongoz hepatopankreas lipazı da saflaştırılmıştır. Bu çalışmada ilk saflaştırma basamağını teşkil eden DEAE selüloz kromatografisinin önemli bir saflaştırma sağlamadığı görülmüştür (% 70 verim ve 2.4 saflaştırma katsayısı). Bu kolondan alınan aktif fraksiyonların sefakril S 200 kolonuna uygulanmasıyla % 27 verim ve 69 katlık saflık sağlanmıştır. Sonraki adımı oluşturan Mono-Q ve Mono-S sefaroze kolon kromatografileri sonucunda enzim % 12 verim ve 345 kat saflaştırma katsayısıyla elde edilmiştir (Amara ve ark., 2010).

Omurgalılarda yapılan lipaz saflaştırma çalışmaları incelendiğinde, Matsumura ve ark. (1976), domuz adipöz lipazını % 60 amonyum sülfat çöktürme, heparin sefaroze 4B, DEAE selüloz ve Sefadex G 150 kolon kromatografileri ile 230 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir.

Wang (1980), insan sütünün safra tuz aktiviteli lipazını saflaştırmak için konkanavalin A sefaroze 4B ve kolat sefaroze 4B afinite tekniklerini kullanmıştır. Enzim, konkanavalin A sefaroze 4B tarafından tutulmamış ancak bir sonraki afinite kromatografisinde tutularak, % 2 sodyum kolat ile kolondan alınabilmiştir. Bu saflaştırma prosedürü ile enzim 150 kat saflaştırılmıştır.

Imanaka ve ark. (1984) tavşan karaciğerinden asit lizozomal lipazını saflaştırmışlardır. Bu çalışmada lipazın solubilize edilmesi için ortama dijitonin eklenmiş ve bu adımda verimin % 170, saflığın ise 45.9 kat olduğu görülmüştür. Daha sonraki saflaştırma adımları Bio-Gel A (1 M), DEAE Bio-Gel A, fenil sefaroze, jel elektroforezi ve Affi-Gel Blue afinite kromatografilerinden oluşmuş ve son basamakta elde edilen enzim preparatının spesifik aktivitesi 216 U/mg protein, verim % 14.5 ve saflığın 25.000 kat olduğu bildirilmiştir.

Sıçan karaciğer mitokondrilerinden bir lipaz Triton X-100 ile solubilize edilmesinden sonra, Sefadeks G 50 ve Sefadeks G 200 jel filtrasyon kromatografileri ile saflaştırılmıştır (Claycomb ve ark., 1971). Yine sıçan lingual lipazı 100.000xg üst sıvıdan % 30 ve 60 amonyum sülfat fraksiyonlama sonrasında, aseton ile çöktürme ve hidrofobik kromatografi sonucunda 230 U/mg protein spesifik aktivite ve % 22 verim ile saflaştırılmıştır (Field & Scow,1983).

Steiner ve Williams (2002), köpek pankreasından klasik pankreatik lipazı saflaştırmışlardır ve pankreatik homojenat ortamına benzamidin ve fenilmetilsulfonyl florid (PMSF) olmak üzere iki proteaz inhibitörünün ilave edildiğini bildirmişlerdir. Saflaştırmada kullanılan kromatografik basamaklar anyon değişim, jel filtrasyon ve katyon değişim kromatografilerini kapsamış ve sonuçta elde edilen enzim preparatının 6288 U/mg protein spesifik aktivite, verimin ise % 23.4 olduğu görülmüştür. Deve kuşu pankreatik lipazının saflaştırılmasında % 60 amonyum sülfat çöktürmesi, Sefadeks G 75, Sefadeks G 100 ve CM Sefadeks kromatografileri sonucunda sindirim lipazının, 5000 U/mg protein spesifik aktivite, % 34 verim ve 13.39 katlık bir saflaştırma ile elde edildiği görülmüştür (Bacha ve ark., 2005).

Yukarıda bahsedilen çalışmalar dışında kuzu pregastrik lipazı (De Caro ve ark., 1995), köpek gastrik lipazı (Carriere ve ark., 1991), inek aortasından diaçilgliserol lipazı (Lee ve Severson, 1994), sıçan incebarsak asit lipazı (Rao ve Mansbach, 1990) ve sığır pankreatik lipazı (Tanaka ve ark., 1999) saflaştırılmıştır. Omurgalılarından lipaz enziminin saflaştırılmasının daha çok saflaştırma adımı gerektirdiği görülmektedir. Ancak mikrobiyal ve bitkisel kökenli lipaz saflaştırma çalışmalarıyla karşılaştırıldığında, oldukça yüksek saflık bildiren çalışmaların da mevcut olduğu görülmektedir (Matsumura ve ark., 1976; Imanaka ve ark., 1984).

Yukarıda belirtilen mikrobiyal, bitki ve omurgalılar üzerinde birçok çalışma mevcut olduğu açıktır. Bununla birlikte, balıklarda mide pilorik çeka, pankreas ve bağırsak gibi organların eşsiz karaktere sahip olabileceği ve keşfedilmemiş lipolitik enzim kaynakları olabilecekleri bildirilmektedir (Kurtoviç ve ark., 2009). Bu nedenle son zamanlarda özellikle balıklarda sindirim kanalından lipaz enziminin saflaştırılması üzerine yoğun çaba bulunmaktadır. Ancak karaciğer gibi sindirim dışı organlardan yapılan çalışmaların neredeyse yok denecek kadar az olduğu görülmektedir (Değerli ve Akpınar, 1995; 1997; 2002). Bu amaçla, Metin (1997), *Oncorhynchus mykiss*'in

karaciğer ve incebağırsak lipazını, Değerli (1999) ise *C. carpio*'nun pankreas, karaciğer ve incebağırsak lipazını saflaştırmışlar ve bazı biyokimyasal özelliklerini belirlemişlerdir. Çalışmamızda da *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğer lipazlarının PEG çöktürmesi sonrasında Q sefaroza, sefakril S 200 HR ve fenil sefaroza CL-4B'den oluşan üç kromatografik adım ile saflaştırılması amaçlanmıştır.

*C. chalcoides* ve *L. cephalus*'un Q sefaroza uygulanan PEG çöktürmesi sonrasında yedi, *C. carpio*'da ise sekiz protein pikinin bulunduğu gözlenmiştir. Her üç türde de bu kromatografik adımda sadece bir protein pikinde lipaz aktivitesi görülmüş ve 300 mM NaCl yıkaması sonucunda kolondan alınmıştır. Q sefaroza *C. chalcoides*'te 32.96 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite, % 16.98 verim, 30.49 katlık saflaştırma, *L. cephalus*'ta 30.99 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite, % 21.23 verim ve 33.05 katlık saflaştırma, *C. carpio*'da ise 29.72 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite, % 14.911 verim ve 24.83 katlık bir saflaştırma sağlamıştır. Bu veriler değerlendirildiğinde bu kromatografik adımın, balık doku lipazlarının saflaştırılmasında oldukça etkin ve her üç türün karaciğerinde neredeyse 100 katlık bir kontaminant protein miktarını uzaklaştırdığı görülmüştür. Çalışmamızda kullanılan örneklerin karaciğer lipazları benzer saflaştırma parametreleriyle elde edilmiştir (Tablo 11-13).

Çalışmamızın ikinci kromatografik adımını oluşturan sefakril S 200 HR kromatografisinde kullanılan karaciğer örneklerinde türlere göre farklı saflaştırma sonuçları elde edilmiştir. *C. carpio*'da oldukça etkin bir saflaştırma basamağı sunan bu kromatografik adım sonucunda, spesifik aktivite 52.99 µmol/dk.mg protein, % 9.14 verim ve saflaştırma katsayısı ise 44.26 olarak hesaplanmıştır. Sefakril S 200 HR, *C. chalcoides*'te pek etkin olmamakla birlikte, 36.81 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite, % 5.72 verim ve 34.06 katlık bir saflaştırma sağlarken, *L. cephalus*'ta daha yüksek saflaştırma sağlanamamıştır (27.82 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite, % 8.41 verim ve 29.68 kat saflık).

Son saflaştırma basamağı olan fenil sefaroza CL-4B'nin, karaciğer lipazının saflaştırılmasında oldukça etkin olduğu belirlenmiştir. Bu kromatografik teknikte tüm türlerde üç protein pikinin bulunduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, kolondan doğrudan tamponla yıkama sonucunda alınan çok küçük bir kesitte önemsiz bir aktivitenin varlığı gözlenmiştir. Asıl aktiviteyi gösteren kesitin kolona bağlandığı ve propanol serileriyle yıkama sonucunda kolondan alınabildiği belirlenmiştir. Buna göre,

bu adım sonrasında *C. chalcoides* karaciğer lipazı 52.84 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite, % 0.47 verim ve 48.88 katlık saflaştırma, *L. cephalus* karaciğer lipazı 51.41 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite, % 0.475 verim ve 54.84 kat saflık, *C. carpio* lipazı ise 90.38 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite, % 0.54 verim ve 75.50 kat saflıkla elde edilmiştir. Bu verilerden en etkin saflaştırmanın *C. carpio*'da gerçekleştirildiği söylenebilir.

Farklı ya da benzer kromatografik tekniklere bağlı olarak saflaştırılan balık doku lipazları çalışmamızla karşılaştırıldığında oldukça farklı sonuçların elde edildiği görülmektedir. Buna göre, *Oncorhynchus mykiss*'den karaciğer lipazının saflaştırıldığı bir çalışmada herhangi bir saflaştırma parametresi belirtilmemiştir (Metin ve Akpınar, 2000 b). Bununla birlikte, Harmon ve ark. (1991), *O. mykiss*'in karaciğer lipazını % 20 amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında uygulanan Sefaroz (Bio-Gel A 0.5 M) kromatografisiyle 27000 katlık bir saflaştırma rapor etmişlerdir. Bu kromatografik teknikle saflaştırılan diğer omurgalı lipaz enzimleri de benzer bir saflaştırma katsayısını bildirmişlerdir (Imanaka ve ark., 1984).

*Pagrus major*'ün safra tuz aktiviteli lipazının saflaştırılmasında, beş kromatografik işlem sonrasında oldukça yüksek saflıkta bir lipazın elde edildiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan amonyum sülfat çöktürmesi bir saflaştırma basamağı sunmamış (0.6 kat) ve verim % 41.7 olarak belirlenmiştir. Kromatografik adımlardan Q sefaroz ile saflaştırma sonucunda verim % 21 bulunurken, 3.8 katlık bir saflaştırma kaydedilmiştir. Çalışmamızda Q sefaroz kromatografisi sonucunda, verim *C. chalcoides*'te % 16.98, *L. cephalus*'ta % 21.23 ve *C. carpio*'da % 14.91 olarak bulunmuş ve elde ettiğimiz parametrelerin bu çalışmada elde edilen sonuçlardan daha etkin olduğu söylenebilir. Aynı araştırmacılar daha sonra Toyopearl-HW65F, Super Q-Toyopearl ve Asahipak GF510HQ kromatografileri uygulamışlar ve verimi % 2.3, saflığı 338.9 kat olarak belirlemişlerdir. Son basamakta uygulanan TSK gel DEAE-5PW ile toplam 2.5 ünite aktivite ve verim % 0.2 bulunurken, elde ettikleri protein miktarının saptanamayacak kadar az olması nedeniyle, diğer saflaştırma parametrelerini belirleyememişlerdir (Iijima ve ark., 1998). Bununla birlikte, *Labeo rohita*'nın ince bağırsak lipazının saflaştırıldığı başka bir çalışmada, tuzdan arındırma (desalting) sonucunda % 43.5 verim ve 1.35 katlık saflaştırma katsayısıyla elde edilen enzim preparatı, sadece tek kromatografik adım olarak Sefadex G 100'ün kullanılmasıyla %

15.16 verim ve 3.61 kat saflıkta elde edilebilmiştir. Ancak bu çalışma % 80 amonyum sülfatla proteinleri çöktürmede daha yüksek lipaz aktivitelerini elde etmesi bakımından önem arz etmektedir (Nayak ve ark., 2004).

*Mugil cephalus*'un viserasında bir lipaz fraksiyonunun varlığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, amonyum sülfat ile fraksiyonlamada verim % 103, saflaştırma katsayısı ise 1.2 olarak bildirilmiştir. Bu adım sonrasında uygulanan ultrafiltrasyonla enzimde % 46.5 ve 4.2 katlık saflık elde edilmiştir. Son adımda uygulanan kolat-sefaroza afinite tekniği sonrasında toplam 7.8 ünitelik aktivite ve % 2.5 verim kaydedilmesine rağmen, protein miktarı ve diğer saflaştırma parametreleri saptanamamıştır (Aryee ve ark., 2007). Bununla birlikte, *Sardinops sagax caerulea*'nın viserasından % 30 ve 60 amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında uygulanan ultrafiltrat fraksiyonlama teknikleri sonucunda 156.58 U/mg protein spesifik aktiviteye sahip lipaz enzimini 47 katlık saflıkta elde etmişlerdir (Noriega-Rodriguez ve ark., 2009). *Cirrhinus reba*'nın dorsal kas kısmından lipaz saflaştırmayı başaran bir çalışmada, % 85 amonyum sülfat çöktürmesiyle de verim % 130 bulunurken, sadece 2 katlık bir saflaştırma kaydedilmiştir. Uygulanan Sefadex G 50 jel filtrasyon kromatografisi ( % 52.65 verim ve 15.5 kat saflık) ve DEAE selüloz anyon değişim kromatografileri sonucunda % 42 verim, 6.21 U/mg protein spesifik aktivite ve 34.5 kat saflığa sahip bir enzim elde edilmiştir (Islam ve ark., 2009).

Kurtovic ve ark. (2010) *Oncorhynchus tshawytscha* ve *Macruronus novaezelandiae*'nin sindirim lipazlarını saflaştırmışlardır. Sadece *O. tshawytscha* için verilen saflaştırma parametrelerine göre, PEG-1000 ile fraksiyonlama sonucunda % 75 verim ve 0.9 katlık bir saflaştırma sağlanmıştır. Çalışmamızda kullanılan % 30 (w/v) PEG-6000 ile, *C. chalcoides*'te saflık 1.06 ve verim % 67.58, *L. cephalus*'ta saflık 1.14 kat ve verim % 73.39, *C. carpio*'da ise 1.01 kat saflık ve verim % 61.36 olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlardan *L. cephalus* için bulduğumuz parametreler bu çalışmayla büyük oranda paralellik göstermektedir. Bu adım sonrasında kolat-Affi-Gel 102 afinite kromatografisinin ardı ardına iki kez uygulanması sonucunda verimin % 25, saflığın ise 9.6 kat olduğu görülmüştür. Son saflaştırma basamağında kullanılan sefakril S 300 HR jel filtrasyon kromatografisi sonucunda verimde değişme olmamakla birlikte, saflığın 14 kat olduğu kaydedilmiştir. Çalışmamızda elde edilen saflaştırma parametreleriyle karşılaştırıldığında, afinite kromatografilerinin kullanılmasına karşın,

bu çalışmada elde edilen saflaştırma parametrelerinin bizim verilerimize göre oldukça düşük olduğu görülmektedir. Çalışmamızda *C. chalcoides* ve *L. cephalus*'a benzer olarak, bu çalışmada da sefakril türünden kromatografik bir yaklaşımın etkin bir saflaştırma yöntemi olmadığı görülmektedir.

Ayrıca araştırmacıların kullandığı kolat-Affi-Gel 102 afinite tekniğiyle balık dokularından lipaz saflaştırılmasının iyi sonuç vermediği de bildirilmiştir. Gjellesvik ve ark. (1992), bu kromatografik teknikle % 2 ve 2.5'lik sodyum taurokolat ile lipaz elüsyonunu başarısız olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle, bu araştırmacılar kolat-Affi-Gel 102 yerine kolat-sefaroze'u kullandıklarını rapor etmişlerdir.

Smichi ve ark. (2010), *Sardinella aurita*'nın pilorik çekasından asidik bir lipazı saflaştırmışlardır. Amonyum sülfat çöktürmesinde saflaştırma kaydedemeyen (1.3 kat saflık ve % 88.3 verim) bu çalışmada kullanılan sefakril S 200 HR kromatografisi sonuçları (% 43.3 ve 10.5 kat saflık), Kurtovic ve ark. (2010) ve çalışmamızda elde ettiğimiz sefakril S 200 HR ile saflaştırma sonuçlarından (*C. chalcoides*'te % 5.72 verim ve 34.06 kat saflık, *L. cephalus*'ta % 8.41 verim ve 29.68 kat saflık, *C. carpio*'da % 9.14 verim ve 44.26 kat saflık) daha düşük saflaştırma parametrelerini bildirmiştir. Daha sonra uygulanan FPLC Mono-Q ve Mono-S kromatografileri sonucunda % 13.3 verimle birlikte, spesifik aktivitenin 180 U/mg protein olduğu 94.7 kat saflıkta bir lipaz elde edilmiştir.

Rivera-Perez ve ark. (2010), *Panaenus vannamei* sindirim lipazını, Superdex 200 jel filtrasyon ve Resource Q anyon değişim kromatografisinden oluşan iki adımlı bir saflaştırma prosedürüyle saflaştırmışlardır. Jel filtrasyon basamağında % 0.16 verim ve 17.46 katlık bir saflaştırma elde edilmiştir. Bu saflaştırma adımının, çalışmamızda kullanılan sefakril S 200 HR'den daha etkin bir saflaştırma sağladığı görülmektedir. Bununla birlikte, son basamakta uygulanan kromatografik yöntemle bu türün lipazı, % 0.12 verim ve 48.12 katlık bir saflaştırmayla elde edilmiştir. Bu saflaştırma çalışması parametreleri *C. chalcoides* (52.84 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite, % 0.47 verim ve 48.88 kat saflık) ve *L. cephalus*'un (51.41 µmol/dk.mg protein spesifik aktivite, % 0.47 verim ve 54.84 kat saflık) karaciğer lipazı için elde ettiğimiz saflaştırma parametreleriyle benzerlik göstermektedir.

Balık lipazlarının saflaştırılmasında kullanılan kromatografik teknikler oldukça farklıdır. Bu nedenle elde edilen saflaştırma parametrelerinin de farklı olacağı

olağandır. Kullanılan aktivite yöntemine bağlı olarak ta elde edilen kinetik parametrelerde farklılıkların görülebileceği düşünülmelidir. Buna göre çalışmamızda, kullanılan *C. chalcoides*, *L. cephalus*, *C. carpio* karaciğer lipazları 5 °C'ta oldukça düşük aktivite sergilemişlerdir. Sıcaklığın 30 °C'a çıkarılmasıyla birlikte aktivitede neredeyse üç katlık bir artış gözlenmiştir. 37 °C'ta pNPB'nin hidrolizinde optimum aktivite elde edilmiştir (Tablo 15). Sıcaklığın 40 °C'a çıkarılmasıyla enzim aktivitesinde hızlı bir düşüş gözlenmiştir. 50 °C'ta karaciğer lipazlarının aktivite göstermedikleri belirlenmiştir. Bu verilerden incelediğimiz her üç balık türü karaciğer lipazlarının optimum sıcaklık derecesinin 37 °C olduğu söylenebilir.

Balık lipazlarının optimum sıcaklığını bildiren diğer çalışmalarda değişik sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, Harmon ve ark. (1991), *O. mykiss* karaciğer lipazının optimum sıcaklığını <sup>14</sup>C-triolein substratı ile 15 °C olarak belirlemişlerdir. Substrat olarak 4-nitrofenil asetat (pNPA) kullanan Metin ve Akpınar (2000 b), aynı türün karaciğer triaçil gliserol lipazının optimum sıcaklığını 32 °C olarak belirlemişlerdir. Gjellesvik ve ark. (1992) substrat olarak 4-nitrofenil miristat kullanıldığında, *Gadus morhua* için optimum sıcaklık aralığının 25-35 °C arasında olduğunu ve 40 °C'ın üzerindeki sıcaklık değerlerinin enzimde hızlı bir inaktivasyona neden olduğunu göstermişlerdir. Değerli (1999), *C. carpio* pankreas, incebağırsak ve karaciğer lipazları için optimum sıcaklığı 28 °C olarak belirlemiştir.

Substrat olarak 4-nitrofenil kaprilat (pNPC) kullanılan bir çalışmada, sıcaklığın aktivite üzerine etkisinde ilginç sonuçlar bulunmuştur. Saflaştırılan *O. tshawytscha* sindirim lipazlarından, birisi 35-40 °C, diğeri ise 50 °C olmak üzere iki farklı optimum sıcaklık değeri göstermiştir. Yine aynı çalışmada *M. novaezealandiae*'den saflaştırılan sindirim lipazının optimum sıcaklığı 35 °C olarak belirlenmiştir (Kurtovic ve ark., 2010). *Panaeus vannamei*'den saflaştırılan lipazın tributirin substratı ile yapılan aktivite ölçümlerinde 30 °C'ta optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Rivera-Perez ve ark., 2010). *Cirrhinus reba*'nın dorsal kısmından saflaştırılan lipazın zeytin yağının substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda 30-60 °C aralarında yüksek aktivite kaydedilmiştir. Ancak en yüksek aktivitenin 35 °C'ta olduğu görülmüştür.

*Sardinella aurita* sindirim lipazında 35-45 °C arasında yüksek aktivite kaydedilmesine rağmen, en yüksek aktivitenin belirlendiği optimum sıcaklık değerinin 37 °C olduğu belirlenmiştir (Smichi ve ark., 2010). Bu çalışmada sıcaklığın lipaz

aktivitesi üzerine etkisiyle ilgili veriler bulgularımızla uyum içerisinde. *Sardinops sagax caerulea*'dan saflaştırılan lipolitik enzimin optimum sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiş ve 40 °C üzerindeki sıcaklık uygulamalarında enzimin hızlı bir aktivite kaybına uğradığı görülmüştür (Noriega-Rodriguez ve ark., 2009). Bununla birlikte, *Mugil cephalus*'un viserasından saflaştırılan lipazın 4-nitrofenol palmitat (pNPP) ile yapılan aktivite ölçümlerinde optimum aktiviteyi 50 °C gibi yüksek bir sıcaklıkta sergilediği belirlenmiştir (Aryee ve ark., 2007).

Çalışmamızda *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'dan saflaştırılan karaciğer lipazlarının optimum pH değerleri de belirlenmiş ve 6 - 9.5 pH aralığında aktivite değerleri ilgili pH'da 30 dakika inkübasyon sonrasında ölçülmüştür. Buna göre, pH 6'da karaciğer lipazlarının oldukça düşük aktivite sergiledikleri belirlenmiştir. pH'nın 7.5 - 8.5 olduğu aralıkta yüksek aktivite değerleri elde edilmiştir. Üç balık türünde de, en yüksek lipaz aktivite değerleri pH 8'de görülmüştür (Tablo 16). Yapmış olduğumuz bu çalışmada, 4 ile 5.5 arasındaki pH değerlerinde herhangi bir lipaz aktivitesi kaydedilememiştir. Gjellesvik ve ark. (1992), özellikle pH 6'ya kadar olan asidik pH değerlerinde paranitrofenol gruplarının absorpsiyonunu bildirmişlerdir.

Diğer balık türlerinde elde edilen optimum pH değerleri incelenecek olursa, *Cyprinion macrostomus*'un karaciğer ve incebağırsak lipazlarıyla yapılan çalışmalarda her iki doku lipazı için 7.5 (Değerli ve Akpınar, 1995; 1997), *C. carpio* karaciğer lipazı için 8.10 (Değerli, 1999), *O. mykiss* karaciğer lipazının 7 ile 8 arasında (Harmon ve ark., 1991; Metin ve Akpınar, 2000 b), *P. major*'ün safra tuz aktiviteli lipazının 7 - 9 arasında (Iijima ve ark., 1998), *M. cephalus* viserasından saflaştırılan lipazın 8 (Aryee ve ark., 2007), *S. sagax caerulea* viserasından elde edilen lipolitik enzimin 7 (Noriega-Rodriguez ve ark., 2009), *C. reba*'dan elde edilen lipazın 5.5 (Islam ve ark., 2009), *S. aurita* pilorik çeka lipazının 9 (Smichi ve ark., 2010), *P. vannamei* sindirim lipazının 8 (Rivera-Perez ve ark., 2010), *O. tshawytscha* ve *M. novozelandiae* sindirim lipazlarının 8 - 8.5 arasında olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen optimum pH değerlerinin bu çalışmalarda elde edilen pH değerleriyle uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Elde edilen optimum pH değerlerinden, genel olarak balıklardaki sindirim ve doku lipazlarının nötral pH'nın biraz üzerindeki pH değerlerinde ve genellikle pH'nın 7 ila 9 aralığındaki değerlerinde yüksek aktivite sergiledikleri anlaşılmaktadır.



Mikrobiyal organizmalardan saflaştırılan lipazların optimum sıcaklık ve pH değerlerinin oldukça değişken olduğu görülmektedir. Örneğin, *Geotrichum* sp. SYBC WU-3'ten saflaştırılan iki soğuk uyumlu lipazın optimum sıcaklık değeri birisi için 15 °C, diğeri için ise 20 °C olarak belirlenirken, optimum pH her iki lipaz için 9.5 olarak belirlenmiştir (Cai ve ark., 2009). Buna karşın, *Anoxybacillus gonensis* A4'ten saflaştırılan bir esterazın optimum sıcaklık değerinin 60-80 °C aralığında, pH'nın ise 5.5 olduğu bulunmuştur (Faiz ve ark., 2007). Hayvansal organizmalardaki lipaz saflaştırma çalışmalarından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, domuz adipöz doku lipazının optimum pH'ı 7 (Matsumura ve ark., 1976), hindi pankreatik lipazı için optimum sıcaklık 37 °C, pH 8.5 (Sayari ve ark., 2000), yengeç sindirim lipazının optimum pH'ı 8, sıcaklığı 60 °C (Cherif ve ark., 2007), hindi farinks dokusundan saflaştırılan esterazın optimum pH'ı 8.5 ve sıcaklık 50 °C (Cherif ve Gargouri, 2010), deve kuşu pankreatik lipazının optimum pH'ı 8.5 ve sıcaklığı 37 °C olarak belirlenmiştir. Bu verilerden saflaştırılan lipazların genel olarak nötral pH'nın üzerinde ve optimum sıcaklığın ise bir miktar değişkenlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, tavşan karaciğer lipazı gibi asit ortamda optimum aktivite gösteren lipazlarında saflaştırıldığı rapor edilmiştir (Imanaka ve ark., 1984).

Mevcut çalışmada pNPB substratının 0.16 – 2 mM aralığındaki derişimlerinde elde edilen başlangıç hızları kullanılarak, Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{max}$ ) parametreleri, saflaştırdığımız karaciğer lipazları için belirlenmiştir (Tablo 17 – 17). Buna göre, *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer lipaz aktiviteleri 0.16 ile 1.33 mM pNPB derişimlerinde farklılık gösterdikleri ve artan substrat miktarına bağlı olarak aktivitelerde artış gösterdikleri belirlenmiştir. 1.33 mM ve daha yüksek derişimlerde elde edilen aktivite değerlerinin maksimuma ulaşmasına rağmen, veriler arasında fark görülmemiştir. Bu sonuçlardan *C. chalcoides*'in  $K_m$  değeri 0.77 mM ve  $V_{max}$  değeri 2.8  $\mu\text{mol/mL.dk}$ , *L. cephalus* için  $K_m$  değeri 0.58 mM ve  $V_{max}$  değeri 2.8  $\mu\text{mol/mL.dk}$ , *C. carpio* için ise  $K_m$  değeri 0.17 mM ve  $V_{max}$  değeri 2.6  $\mu\text{mol/mL.dk}$  olarak belirlenmiştir. Aslında her üç tür için elde edilen  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerinin neredeyse aynı olduğu görülmektedir.

Farklı substratlar kullanılarak, balıkların değişik dokularından saflaştırılan lipazların  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin farklılık gösterdikleri anlaşılmaktadır. Buna göre, Harmon ve ark. (1991), *O. mykiss* karaciğer lipazında  $K_m$ 'i 0.28 mM tributirin,  $V_{max}$ 'ı

ise 0.016 nmol/h/mg protein olarak belirlemişlerdir. Substratın pNPA olduğu başka bir çalışmada *O. mykiss* karaciğer lipazının  $K_m$  değeri 0.12 mM pNPA ve  $V_{max}$  ise 0.40 U/mg protein olarak belirlenmiştir (Metin ve Akpınar, 2000 b). Değerli (1999), *C. carpio*'da pankreas, incebağırsak ve karaciğer lipazı için  $K_m$  değerlerini sırasıyla  $5.3 \times 10^{-4}$ ,  $2.0 \times 10^{-4}$ ,  $0.62 \times 10^{-4}$  M bulurken,  $V_{max}$  değerlerini ise bu dokular için sırasıyla 2.03, 0.324 ve 0.223  $\mu\text{mol/dk}$  olarak belirlemiştir.

Aryee ve ark. (2007), 10 ve 16 karbon zincir uzunluğuna sahip olan orta ve uzun zincirli p-nitrofenol substratların, *M. cephalus* viserasından saflaştırılan lipaz için kullanışlı substratlar olduklarını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada pNPP kullanılarak elde edilen  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0.22 mM ve  $20 \mu\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. *P. vannamei* sindirim lipazının  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin, trioleinin substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda 3.22 mM ve 3404 U/mg protein, floresan bir substrat olan MUF-butirat'ın kullanıldığı çalışmalarda ise  $K_m$  0.24 mM,  $V_{max}$  ise 3042 U/mg protein olarak bulunmuştur (Rivera-Perez ve ark, 2010).

Lipazların emülsifiye olmuş veya misellar substratların üzerinde etkili olmalarından dolayı en ilginç enzimler olduğu bildirilmektedir (Bondhakar ve ark., 1998). Özellikle bazı bitkisel kökenli lipazların saflaştırılmasında protein kararsızlığı rapor edilmiş (Hammer ve Murphy, 1993; Fuchs ve ark., 1996) ve bu problemi aşmak için homojenat ortamına çeşitli yüzey aktif maddelerin eklendiği belirtilmiştir. Ayrıca pNPP gibi uzun zincirli bazı substratların kullanıldığı aktivite tayin metotlarında da Triton X-100,  $\text{CaCl}_2$  gibi bazı maddelerin eklendiği bilinmektedir.

Çalışmamızda SDS, sodyum taurokolik asit ve Triton X-100'ün saflaştırılan karaciğer lipazları üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Buna göre, karaciğer lipazlarının SDS ile inkübasyonu sonrasında kararlılıklarını 1 saat içerisinde yitirdikleri belirlenmiştir. Sodyum taurokolik asitle inkübasyonda karaciğer lipazlarının 3 ve 4. saatlerde düşen aktiviteleri 24 saat süreye kadar kararlılığını korumuş, çok az bir değişim (düşüş) görülmüştür (Tablo 20). Triton X-100'de sodyum taurokolik asit'e benzer bir etki göstermiştir (Tablo 21).

Saflaştırılan lipazlarda yüzey aktif maddelerin etkisini değerlendiren az sayıdaki çalışmada, bu maddelerin aktivitede artış meydana getirebileceği de belirtilmektedir. Örneğin, *Penicillium aurantiogriseum* lipazının üzerine 28 °C sıcaklıkta ve bir saat inkübasyon sonunda % 0.01 SDS uygulamasında aktivitede herhangi bir değişim

saptanmamıştır. Bu bilgi aktivitenin bu süre zarfında korunduğunu göstermektedir. Ayrıca aynı süre zarfında, Triton X-100 uygulamasında ise neredeyse aktivitenin yarısının yitirildiği kaydedilmiştir (Lima ve ark., 2004).

Aktivite ölçümlerinde substrat olarak pNPB kullanan Mogensen ve ark. (2005), *Thermomyces lanuginosus* lipazı üzerine non-iyonik, iyonik ve zwitter iyonik deterjanların etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Buna göre, düşük konsantrasyonlarda tüm deterjanlar lipaz aktivitesinde artış meydana getirirken, yüksek konsantrasyonların aktivite kaybına neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca deterjanlar tarafından *T. lanuginosus* lipazının aktivasyonunun, birçok bağımsız seviyede meydana geldiği ve klasik arayüzey aktivasyonunu gerektirmediğini bildirmişlerdir. Buradan, aktivitede artış meydana getiren deterjan konsantrasyonlarının aslında lipazın aktif merkez konformasyonunu substrata daha ulaşılabilir kıldığı düşünülebilir. Bu çalışmada yüksek dozlarla elde edilen verilerden, yüzey aktif maddelerin saflaştırdığımız karaciğer lipazları üzerine etkilerini desteklediğini söyleyebiliriz. Ayrıca balık karaciğerinden saflaştırdığımız lipazların yapısal farklılıkları ve deterjan gibi yüzey aktif maddelerin arayüzey bağlanmasından farklı moleküler mekanizmalarla etkilerini sergiledikleri göz önüne alınırsa, farklı türlerden saflaştırılmış lipazların bu maddelere karşı vereceği tepkinde farklı olabileceği söylenebilir.

Mevcut çalışmamızda SDS-PAGE yöntemi kullanılarak *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio* karaciğer lipazının moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 74 kDa olduğu belirlenmiştir. Diğer balık türlerinde lipazların moleküler ağırlıklarının *Cyprinion macrostomus* karaciğerinde 53 kDa (Değerli ve Akpınar, 1995), *C. carpio* karaciğerinde 62.7 kDa (Değerli, 1999), *C. macrostomus* incebağırsağında 51 kDa (Değerli ve Akpınar, 2002), *O. mykiss* karaciğerinde 40-43 kDa arasında (Harmon ve ark., 1991), *P. majör* hepatopankreasında 64 kDa (Iijima ve ark., 1998), *C. reba* dorsal kısmında 84 kDa (Islam ve ark., 2009), *S. aurita*'da 43 kDa (Smichi ve ark., 2010) ve *P. vannamei*'de ise 44.8 kDa (Rivera-Perez ve ark., 2010) olduğu belirlenmiştir.

Omurgalı ve omurgasız türlerden saflaştırılan lipazların moleküler ağırlıkları değerlendirildiğinde, domuz adipöz doku lipazı 43 kDa (Matsumura ve ark., 1976), insan safra tuz aktiviteli süt lipazı 125 kDa (Wang, 1980), sıçan lingual lipazı 51 kDa (Field ve Scow, 1983), böcek yağ doku lipazı 76 kDa (Arrese ve Wells, 1994), hindi pankreatik lipazı 45 kDa (Sayari ve ark., 2000), köpek klasik pankreatik lipazı 50.7 kDa

(Steiner ve Williams, 2002), deve kuşu pankreatik lipazı ise 45 kDa (Bacha ve ark., 2005), yengeç sindirim lipazı 65 kDa (Cherif ve ark., 2007) olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızın bu bölümünde, Tödürge gölünde yaşayan *C. chalcoides*, *L. cephalus* ve *C. carpio*'nun karaciğer lipazının saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Metin içinde belirtildiği üzere, memeli ve mikrobiyal lipazlar uzun yıllardan beri çalışılmaktadır. Günümüzde de devam eden bu çalışmalara balık sindirim lipazlarının saflaştırılmasının da dahil edildiği görülmektedir. Bununla birlikte, karaciğer ve kas gibi balık dokularından lipaz enzimi saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar yeterli düzeyde bulunmamaktadır. Ayrıca bu enzimlerin kısmi olarak saflaştırıldıkları görülmektedir. Son zamanlarda, sucul kökenli organizmalardan elde edilen enzimlerin biyoteknolojik açıdan önemli olmalarının yanı sıra, özellikle lipazların bu uygulamalarda büyük bir yer teşkil ettiğinin farkına varılmıştır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda, bu türlerin karaciğer lipazlarının amino asit dizilerinin belirlenmesi ve klonlama çalışmalarının yapılması mümkün olabilecektir. Böylelikle, rekombinant DNA teknolojisinin gücüyle çok değişik fonksiyonlara sahip lipolitik enzimler geliştirilebilecektir.

## 5. KAYNAKLAR

- Abi-Ayad, S.-M. E.-A., Kestemont, P., Melard, C.** 2000. Dynamics of total lipids and fatty acids during embryogenesis and larval development of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). **Fish Physiology and Biochemistry**. 23, 233-243.
- Abigor, R. D., Uadia, P. O., Foglia, T. A., Haas, M. J., Scott, K. & Savary, B. J.** 2002. Partial purification and properties of lipase from germinating seeds of *Jatropha curcas* L. **JAOCs**. 79, 11, 1123-1126
- Abouakil, N., Mas, E., Bruneau, N., Benajiba, A. & Lombardo, D.** 1993. Bile salt-dependent lipase biosynthesis in rat pancreatic AR 4-2 J cells. **The Journal of Biological Chemistry**. 268, 34, 5, 25755-25763.
- Ackman, R. G. & Burgher, R. D.** 1964. Cod flesh: Component fatty acids as determined by Gas-Liquid chromatography. **Journal of Fish Research Board of Canada**. 21, 2, 367-371.
- Ackman, R. G.** 1967. Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some freshwater fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 22: 907-922.
- Ackman, R. G., Eaton, C. A., & Linne, B. A.** 1975. Differentiation of freshwater characteristics of fatty acids in marine specimens of the Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*). **Fishery Bulletin**. 73, 838-845.
- Akpınar, M. A.** 1986. *Cyprinus carpio* L. (Osteichthyes: Cyprinidae)'nin karaciğer yağ asitlerinin mevsimsel değişimi. **DOĞA TU. Biyoloji**. 10, 3, 232-239.
- Akpınar, M. A.** 1987. *Cyprinus carpio* L. (Osteichthyes: Cyprinidae)'nın kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi. **DOĞA TU Biyoloji**. 11, 1-9.
- Akpınar, M. A.** 1999. Besinsel yağ asitlerinin ve açlığın *Cyprinion macrostomus* Heckel, 1843'un kas dokusu yağ asidi bileşimine etkisi. **Turkish Journal of Biology**. 23, 309-317.
- Akpınar, M. A., Aksoylar, M. Y.** 1988. *Garra rufa* HECKEL, 1843'nin yağ asidi bileşimine sıcaklığın, besinsel yağ asitlerinin ve açlığın etkileri. **DOĞA TU Biyoloji**. 12, 1-8.
- 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.

- Akpınar, M. A., Görgün, S., Dağ, Ş.** 2009. Ergin ve ergin olmayan gökkuşağı alabalığı *Oncorhynchus mykiss*'in (Osteichthyes: Salmonidae) karaciğer lipaz enzimi (E.C. 3.1.1.3) aktivitesinin belirlenmesi. **Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Dergisi.** 34, 101-106.
- Amara, S., Fendri, A., Salem, N. B., Gargouri, Y., Miled, N.** 2010. Snail hepatopancreatic lipase: A new member of invertebrates lipases' group. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 162, 942-952
- Aras, N. M., Kocaman, E. M., Aras, M. S.** 2000. General fisheries and fundamental principals of aquaculture (in Turkish). **Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No:216, Erzurum.**
- Aras, N. M., Haliloğlu, H. İ., Ayık, Ö. & Yetim, H.** 2003 a. 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.
- Aras, N. M., Haliloğlu, H. İ., Bayır, A., Atamanalp, M., Sirkecioğlu, A. N.** 2003 b. Karasu havzası Yeşildere çayı olgun dere alabalıkları (*Salmo trutta macrostigma*, Dumeril, 1858)'nda farklı dokuların yağ asidi kompozisyonlarının karşılaştırılması. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.** 27, 887-892.
- Aras, N. M., Haliloğlu, H. İ., Atamanalp, M., Kocaman, E. M.** 2003 c. Damızlık gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) yumurta ve spermelerinin yağ asidi kompozisyonlarının karşılaştırılması. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.** 27, 833-837.
- Aravindan, R., Anbumathi, P. & Viruthagiri, T.** 2007. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology.** 6, 141-158
- Arrese, E. L. & Wells, M. A.** 1994. Purification and properties of a phosphorylatable triacylglycerol lipase from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. **Journal of Lipid Research.** 35, 1652-1660
- Arrese, E. L., Patel, R. T. & Soulages, J. L.** 2006. The main triglyceride-lipase from insect fat body is an active phospholipase A<sub>1</sub>: identification and characterization. **Journal of Lipid Research.** 2656-2667

- Aryee, A. N. A., Simpson, B. K., Villalonga, R.** 2007. Lipase fraction from viscera of grey mullet (*Mugil cephalus*) Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. **Enzyme and Microbial Technology**. 40, 394-402
- Arzel, J., Martinez Lopez, F. J., Metailler, R., Stephan, G., Viau, M., Gandemer, G. & Guillaume, J.** 1994. Effect of dietary lipid on growth performance and body composition of brown trout (*Salmo salar*) reared in seawater. **Aquaculture**. 123, 361-375.
- Atchison, G. J.** 1975. Fatty acid levels in developing brook trout (*Salvelinus fontinalis*) eggs and fry. **Journal of Fish Research Board of Canada**. 32, 2513-2515.
- Ayvazian, L., Kerfelec, B., Granon, S., Foglizzo, E., Crenon, I., Dubois, C. & Chapus, C.** 2001. The lipase C-Terminal domain, a novel unusual inhibitor of pancreatic lipase activity. **The Journal of Biological Chemistry**. 276, 17, 27, 14014-14018.
- Bacha, A. B., Gargouri, Y., Ali, Y. B., Miled, N., Reinbolt, J., Mejdoub, H.** 2005. Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase. **Enzyme and Microbial Technology**. 37, 309-317.
- Bayır, A., Haliloğlu, H. I., Sirkecioğlu, A. N., Aras, N. M.** 2006. Fatty acid composition in some selected marine fish species living in Turkish waters. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 86, 1, 163-168.
- 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**. 133-153.
- Bell, J. G., Dick, J. R., MC Vicar, A.H., Sargent, J. R. & Thompson, K. D.** 1993. Dietary sunflower, linseed and fish oils affect phospholipid fatty acid composition, development of cardiac lesions, phospholipase activity and eicosanoid production in Atlantic salmon. **Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids**. 49, 665-673.
- Bell, J. G.** 1998. Current aspects of lipid nutrition in fish farming In Biology of farmed fish. Pp.114-145. Edited by K. D. Black and A. D. Pickering. **Sheffield Academic Pres, England**.
- Bell, J. G., Tocher, D. R., Farndale, B. M., McVicar, A. H. And Sargent, J. R.** 1999. Effects of essential fatty acid-deficient diets on growth, mortality, tissue

- histopathology and fatty acid compositions in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Fish Physiology and Biochemistry**. 20, 263-277.
- Bell, J. G., McEvoy, J., Tochre, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., Sargent, J. R.** 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. **Journal of Nutrition**. 131, 1535-1543.
- Bell, J. G., Henderson, R. J., Tocher, D. R., McGhee, F., Dick, J. R., Porter, A., Smullen, R. & Sargent, J. R.** 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue fatty acid compositions and hepatic fatty acid metabolism. **Journal of Nutrition**. 132, 222-230.
- Blanchard, G, Druart, X. & Kestemont, P.** 2005. Lipid content and fatty acid composition of target tissues in wild *Perca fluviatilis* females in relation to hepatic status and gonad maturation. **Journal of Fish Biology**. 66, 73-85.
- Blight, E. G. & Dyer, J. W.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. 37, 911-917.
- Bogevik, A. S., Henderson, R. J., Mundheim, H., Olsen, R. E. & Tocher, D. R.** 2011. The effect of temperature and dietary fat level on tissue lipid composition in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed wax ester-rich oil from *Calanus finmarchicus*. **Aquaculture Nutrition**. 17; e781-e788.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., Edelstein, S. J.** 1996. Protein Methods. Second Edition. A **John Wiley & Sons, Inc., Publication**. 57-106.
- Bondhakar, S. S., Rajamani, V. & Gaikar, V. G.** 1998. Lipase purification by various techniques and its thermostabilization in presence of surface active additives. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 71, 155-161.
- Brodte, E., Graeve, M., Jacob, U., Knust, R., Pörtner, H.-Ö.** 2008. Temperature-dependent lipid levels and components in polar and temperate eelpout (Zoarcidae). **Fish Physiology and Biochemistry**. 34: 261-274.
- Bülow, L. & Mosbach, K.** 1987. The expression in *E. coli* of a polymeric gene encoding for an esterase mimic catalyzing the hydrolysis of p-nitrophenyl esters. **FEBS**. 210, 2, 147-152.



- Cahu, C., L., Zambonino Infante, J. L., Corraze, G., Coves, D.** 2000. Dietary lipid level affects fatty acid composition and hydrolase activities of intestinal brush border membrane in seabass. **Fish Physiology and Biochemistry.** 23, 165-172.
- Cai, Y., Wang, L., Liao, X., Ding, Y., Sun, J.** 2009. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum sp.* SYBC WU-3. **Process Biochemistry.** 44, 786-780
- Cantwell, M. M.** 2000. Assessment of the individual fatty acid intake. **Proceedings of the Nutrition Society.** 59, 187-191.
- Carriere, F., Moreau, H., Raphel, V., Laugier, R., Benicourt, C., Junien, J.-L., Verger, R.** 1991. Purification and characterization of dog gastric lipase. **European Journal of Biochemistry.** 202, 75-83.
- Castro-Ochoa, L. D., Rodriguez-Gomez, C., Valerio-Alfaro, G., Ros, R. O.** 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology.** 37, 648-654
- Cesaj, J. R., Almansa, E., Villamandos, J. E., Badia, P., Balanos, A. & Lorenzo, A.** 2003. Lipid and fatty acid composition of ovaries and eggs from captive fish of white sea bream (*Diplodus sargus*). **Aquaculture.** 216: 299-313.
- Chakrabarti, R., Rathore, R. M., Mittal, P., Kumar, S.** 2006 a. Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp (♂) and bighead carp (♀) hybrid, during early ontogeny. **Aquaculture.** 253, 694-702
- Chakrabarti, R., Rathore, R. M. & Kumar, S.** 2006 b. Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. **Aquaculture Nutrition.** 12, 35-43.
- Chen, J., Zhu, X., Hn, D., Yang, Y., Lei, W. & Xie, S.** 2011. Effect of dietary n-3 HUFA on growth performance and tissue fatty acid composition of gibel carp *Carassius auratus gibelio*. **Aquaculture Nutrition.** 17, e476-e485.
- Cherif, S., Fendri, A., Miled, N., Trabelsi, H., Mejdoub, H., Gargouri, Y.** 2007. Crab digestive lipase acting 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

- Choi, S. Y., Hirata, K.-I., Ishida, T., Quertermous, T. & Cooper, A. D.** 2002. Endothelial lipase: a new lipase on the block. **Journal of Lipid Research.** 43, 1763-1769.
- Clarke, A., Doherty, N., DeVries, A. L., Eastman, J. T.** 1984. Lipid content and composition of three species of Antarctic fish in relation to buoyancy. **Polar Biology.** 3, 77-83.
- Claycomb, W. C. & Kilsheimer, G. S.** 1971. Purification and properties of a lipase from rat liver mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry.** 246, 23, 10, 7139-7143
- Çelik, M.** 2000. Su sirkülasyonunun gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) filetolarında omega-3 yağ asitleri miktarına etkisi. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.** 24, 605-607.
- Çelik, M., Diler, A., Küçükgülmez, A.** 2005. A comparison of the proximate composition and fatty acid profiles of zander (*Sander lucioperca*) from two different regions and climatic conditions. **Food Chemistry.** 92, 637-641.
- Dabrowski, K., R.** 1982. Reproductive cycle of vendace (*Coregonus albula* L) in relation to some chemical and biochemical changes in the body. **Hydrobiologia.** 94, 3-15.
- Darias, M. J., Murray, H. M., Gallant, J. W., Douglas, S. E., Yufera, M., Martinez-Rodriguez, G.** 2007. The spatiotemporal expression pattern of trypsinogen and bile salt-activated lipase during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*, Pisces, Sparidae). **Marine Biology.** 152, 109-118
- Das, U. N.** 2006. Essential fatty acids-a review. **Current Pharmaceutical Biotechnology.** 7, 467-482.
- Davranov, K.** 1994. Microbial lipases in biotechnology, review. **Applied Biochemistry and Microbiology.** 30, 527-534.
- De Caro, J., Ferrato, F., Verger, R. & De Caro, A.** 1995. Purification and molecular characterization of lamb pregastric lipase. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1252, 321-329.
- de la Para, A. M., Rosas, A., Lazo, J. P., Viana, M. T.** 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. **Fish Physiology and Biochemistry.** 33, 223-231.

- Değerli, N. & Akpınar, M. A.** 1995. *Cyprinion macrostomus* HECKEL, 1843'den karaciğer lipazının saflaştırılması ve pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi. **S. D. Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi.** 4, 1-10.
- Değerli, N. & Akpınar, M. A.** 1997. *Cyprinion macrostomus* HECKEL, 1843'den incebarsak lipazının saflaştırılması ve pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi. **XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi. İstanbul Üniversitesi. Cilt IV.** 20-28.
- Değerli, N.** 1999. *Cyprinus carpio* L. 1758 (Osteichthyes: Cyprinidae)'nun pankreas, karaciğer ve incebağırsak lipaz enzimlerinin saflaştırılması ve bazı biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması. **Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.** 252 sayfa.
- Değerli, N. & Akpınar, M. A.** 2002. Partial purification of intestinal triglyceride lipase from *Cyprinion macrostomus* Heckel, 1843 and effect of pH on enzyme activity. **Turkish Journal of Biology.** 26, 133-143.
- Desvilettes, C., Bourdier, G., & Breton, J. C.** 1997. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in pike (*Esox lucius* L) eggs and larvae. **Fish Physiology and Biochemistry.** 16, 381-393.
- Diana, J. S. and Mackay, W. C.** 1979. Timing and magnitude of energy deposition and loss in the body, liver and gonads of northern pike (*Esox lucius*). **Journal of Fish Research Board of Canada.** 36, 5, 481-487
- Dörücü, M.** 2000. Changes in the protein and lipid content of muscle, liver and ovaries in relation to *Diphyllbothrium spp.* (Cestoda) infection in Powan (*Coregonus lavaretus*) from Loch Lomond, Scotland. **Turkish Journal of Zoology.** 24, 211-218.
- Dudley, M. A., Wang, H., Hachey, D. L., Shulman, R. J., Perkinson, J. S., Rosenberg, J. and Mersmann, H. J.** 1994. Jejunal brush border hydrolase activity is higher in tallow-fed pigs than in corn oil-fed pigs. **Journal of Nutrition.** 124, 1996-2005.
- Dugi, K. A., Dichek, H. L. & Santamarina-Fojo, S.** 1995. Human hepatic and lipoprotein lipase: The loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. **The Journal of Biological Chemistry.** 270, 43, 25396-25401
- Duncan, D. B.** 1955. Multiple range and multiple F tests. **Biometrics.** 11, 1-41

- Eastman, J. T., DeVries, A. L.** 1982. Buoyancy studies of notothenoid fishes of McMurdo Sound, Antarctica. **Copeia**. 2, 385-393.
- Erdem, Ü.** 1988. Tödürge gölündeki sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758) populasyonlarının bazı biyolojik özelliklerinin incelenmesi. **DOĞA TU Zooloji Dergisi**. 12, 1, 32-47.
- 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
- Faiz, Ö., Çolak, A., Sağlam, N., Çanakçı, S. & Beldüz, 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, 4, 588-594.
- Fajmonova, E., Zelenka, J., Komprda, T., Kladroba, D., Sarmanova, I.** 2003. Effect of sex, growth intensity and heat treatment on fatty acid composition of common carp (*Cyprinus carpio*) filets. **Czech Journal of Animal Sciences**. 2, 85-92.
- Farkas, T., Csengeri, I.** 1976. Biosynthesis of fatty acids by the Carp, *Cyprinus carpio* L., in relation to environmental temperature. **Lipids**. 11, 5, 401-407.
- Farkas, T., Csengeri, I., Majoros, F., Olah, J.** 1978. Metabolism of fatty acids in fish II. Biosynthesis of fatty acids in relation to diet in the carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758. **Aquaculture**. 14, 57-65.
- Farkas, T.** 1984. Adaptation of fatty acid composition to temperature. A study of carp (*Cyprinus carpio* L) liver slices. **Comparative Biochemistry and Physiology** 79B.4.531-535.
- Field, R. B. & Scow, R. O.** 1983. Purification and characterization of rat lingual lipase. **The Journal of Biological Chemistry**. 258, 23, 10, 14563-14569
- Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., Petersen, S. B.** 2000. What distinguish an esterase from a lipase: A novel structural approach. **Biochimie**. 82, 1033-1041.
- Folch, J., Lees, M. and Sldane-Stanley, G. U.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**. 226, 497-509

- Fonseca-Madrigal, J., Karalazos, V., Campbell, P. J., Bell, . G. & Tocher, D. R.** 2005. Influence of dietary palm oil on growth, tissue fatty acid compositions, and fatty acid metabolism in liver and intestine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**. 11, 241-250.
- Fuchs, C., Vine, N. & Hills, M. J.** 1996. Purification and characterization of the acid lipase from the endosperm of castor oil seeds. **Journal of Plant Physiology**. 149, 23-29.
- Gessesse, A., Dueholm, T., Petersen, S. B., Nielsen, Per H.** 2003. Lipase and protease extraction from activated sludge. **Water Research**. 37, 3652-3657
- Giese, A. C.** 1968. Cell physiology. **Saunders Co. London**.
- Gilbert, E. J., Cornish, A. & Jones, C. W.** 1991. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. **Journal of General Microbiology**. 137, 2223-2229.
- Gilham, D. & Lehner, R.** 2005. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. **Methods**. 36, 139-147.
- Gjellesvik, D. R., Raae, A. J. & Walther, B. T.** 1989. Partial purification and characterization of a triglyceride lipase from cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**. 79, 177-184
- Gjellesvik, D. R., Lombardo, D. Walthers, B. T.** 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. **Biochimica Biophysica Acta**. 1124, 123-134
- Goda, T., Takase, S.** 1994. Dietary carbohydrate and fat independently modulate disaccharidase activities in rat jejunum. **Journal of Nutrition**. 124, 2233-2239.
- Gomes, A. D., Correia, T.G., Moreira, R. G.** 2010. Fatty acids as trophic biomarkers in vitellogenic females in an impounded tropical river. **Fish Physiology and Biochemistry**. 36: 699-718.
- Gökçe, M. A., Taşbozan, O., Çelik, M., Surhan Tabakoğlu, Ş.** 2004. Seasonal variations in proximate and fatty acid compositions of female common sole (*Solea solea*). **Food Chemistry**. 88, 419-423.
- 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 Bratislava, Section Zoology**. 62, 3, 351-355.

- Grigorakis, K., Alexis, M. N., Anthony Taylor, K. D. & Hole, M.** 2002. Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. **International Journal of Food Science and Technology**. 37, 477-484.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N. & Bradoo, S.** 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 37, 63-71.
- Gupta, R. Gupta, N., Rathi, P.** 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 64, 763-781
- Gupta, N., Rathi, P., Singh, R., Goswami, V. K., Gupta, R.** 2005. Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 67, 648-653.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L.** 1991. Lipid biochemistry an introduction. **Chapman and Hall, London**, pp. 15-87.
- Gutierrez-Ayesta, C, Carelli, A. A., Ferreira, M. L.** 2007. Relation between lipase structure and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. **Enzyme and Microbial Technology**. 41, 35-43.
- Güler, G. O., Aktümsek, A., Çitil, O. B., Arslan, A., Torlak, E.** 2007. Seasonal variations on total fatty acid composition of fillets of zander (*Sander lucioperca*) in Beyşehir Lake (Turkey). **Food Chemistry**. 103, 1241-1246.
- Güler, G. O., Kiztanir, B., Aktümsek, A., Çitil, O. B., Özparlak, H.** 2008. Determination of the seasonal changes on total fatty acid composition and  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 ratios of carp (*Cyprinus carpio* L.) muscle lipids in Beyşehir Lake (Turkey). **Food Chemistry**. 108, 689-694.
- Hallier, A., Serot, T., Prost, C.** 2007. Influence of rearing conditions and feed on the biochemical composition of fillets of the European catfish (*Silurus glanis*). **Food Chemistry**. 103, 808-815.
- Haliloğlu, H.İ., Aras, N.M., Yetim, H.** 2002. Comparison of muscle fatty acids of three trout species (*Salvelinus alpinus*, *Salmo trutta fario*, *Oncorhynchus mykiss*) raised under the same Conditions. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. 26, 1097-1102.

- Haliloğlu, H. İ., Aras, N. M., Yanık, T., Atamanalp, M., Kocaman, E. M.** 2003. Investigation of changes in fatty acid composition at early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. 27, 1105-1109.
- Haliloğlu, H. İ., Bayır, A., Sirkecioğlu, A. N., Aras, N. M., Atamanalp, M.** 2004. Comparison of fatty acid composition in some tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) living in seawater and freshwater. **Food Chemistry**. 86, 55-59.
- Hammer, M. F. & Murphy, J. B.** 1993. Properties of the lipid body lipase of *Pinus edulis* and electrophoretic purification of its 64 kDa subunit. **Physiologia Plantarum**. 87, 39-44.
- Harmon, J. S., Michelsen, K. G. & Sheridan, M. A.** 1991. Purification and characterization of hepatic triacylglycerol lipase isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**. 9, 4, 361-368
- Harris, W. S., Poston, W. C., Haddock, C. K.** 2007. Tissue n-3 and n-6 fatty acids and risk for coronary heart disease events. **Atherosclerosis**. 193: 1-10.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A.** 2006. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. 39, 235-251.
- Hassing, G. S.** 1971. Partial purification and some properties of a lipase from *Corynebacterium acne*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 242, 381-394.
- Hazel, J. R. & Sidell, B. D.** 2004. The substrate specificity of hormone-sensitive lipase from adipose tissue of the Antarctic fish *Trematomus newnesi*. **The Journal of Experimental Biology**. 207, 897-903.
- Hazra, A. K., Ghosh, S., Banerjee, S. & Mukherjee, B.** 1998. Studies on lipid and fatty acid compositions of puffer livers from Indian coastal waters with seasonal variation. **JAOCS**. 75, 11, 1673-1678.
- Henderson, R. J. & Sargent, J. R.** 1985. Chain length specificities of mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation of fatty acids in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. 82B, 79-85.
- Henderson, R. J.** 1996. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. **Archives of Animal Nutrition**. 49, 5-22.

- Henderson, R. J. & Sargent, J. R.** 1981. Lipid biosynthesis in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, fed diets of differing lipid content. **Comparative Biochemistry and Physiology.** 69C, 31-37.
- 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 monoethyl ether complex. **The Journal of Biological Chemistry.** 271, 30, 26, 18007-18016.
- Hidalgo, M.C., Urea, E. and Sanz, A.** 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture.** 170, 267–283.
- Hoehne-Reitan, K., Kjorsvik, E. & Gjellesvik, D. R.** 2001 a. Development of bile salt-dependent lipase in larval turbot. **Journal of Fish Biology.** 58, 737-745
- Hoehne-Reitan, K., Kjorsvik, E. & Reitan, I.** 2001 b. Bile salt-dependent lipase in larval turbot, as influenced by density and lipid content of fed prey. **Journal of Fish Biology.** 58, 746-754
- Hoehne- Reitan, K., Kjorsvik, E. & Reitan, I.** 2003. Lipolytic activities in developing turbot larvae as influenced by diet. **Aquaculture International.** 11, 47-489
- Holub, D. J., Holub, B. J.** 2004. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. **Molecular and Cellular Biochemistry.** 263: 217-225.
- Horman, J. S., Michelsen, K. G. & Sheridan, M. A.** 1991. Purification and characterization of hepatic triacylglycerol lipase isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry.** 9, 4, 360-368.
- Hoshino, T., Sasaki, T., Watanabe, Y., Nagasawa, T. & Yamane, T.** 1992. Purification and some characteristic of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** 56, 660-664.
- Hoşsu, B., Korkut, A. Y., Fırat, A.** 2001. Fish nutrition and food technology I (in Turkish). **Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları. No:50, İzmir**
- Hui, D. Y., Kissel, J. A.** 1990. Sequence identity between human pancreatic cholesterol esterase and bile salt-stimulated milk lipase. **FEBS Letters.** 276, 131-134



- Hui, D. Y., Howles, P. N.** 2002. Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**. 43, 2017-2030
- Huynh, M. D., Kitts, D. D., Hu, C., Trites, A. W.** 2007. Comparison of fatty acid profiles of spawning and non-spawning Pacific herring, *Clupea harengus pallasi*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. 146, 504-511.
- Iijima, N., Tanaka, S. & Ota, Y.** 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. **Fish Physiology and Biochemistry**. 18, 59-69
- Imanaka, T., Amanuma-Muto, K., Ohkuma, S. & Takano, T.** 1984. Characterization of lysosomal acid lipase purified from rabbit liver. **Journal of Biochemistry**. 96, 1089-1101
- Islam, M. A., Parveen, F., Hossain, K., Khatun, S., Karim, Md. R., Kim, G. S., Absar, N. & Haque, Md. S.** 2009. Purification and biochemical characterization of lipase from the dorsal part of *Cirrhinus reba*. **Thai Journal of Agricultural Science**. 42, 2, 71-80
- Izquierdo, M. S. & Henderson, R. J.** 1998. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays. **Fish Physiology and Biochemistry**. 19, 153-162
- İşbilir, S. S., Özcan, H. M., Yağar, H.** 2008. Some biochemical properties of lipase from Bay Laurel (*Laurus nobilis* L.) Seeds. **Journal of American Oil and Chemist Society**. 85, 227-233
- Jacobsen, T., Olsen, J., Allermann, K., Poulsen, O. M., Hau, J.** 1989. Production, partial purification, and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum*. **Enzyme Microbiology and Technology**. 11, 90-95
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel M van., Misset, O.** 1994. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**. 15, 29-63.
- Jangaard, P. M., Brockerhoff, H. Burgher, R. D. ve ark.** 1967. Seasonal changes in general condition and lipid content of cod from inshore waters. **Journal of Fish Research Board of Canada**. 24, 3, 607-612.

- Jankowska, B., Zakes, Z., Zmijewski, T., & Szczepkowski, M.** 2003. A comparison of selected quality features of the tissue and slaughter yield of wild and cultivated pikeperch *Sander lucioperca* (L). **European Food Research and Tecnology.** 217, 401-405.
- Jankowska, B., Zakes, Z., Zmijewski, T. Szczepkowski, M.** 2010. Fatty acid profile of muscle, liver and mesenteric fat in wild and reared perch (*Perca fluviatilis* L.). **Food Chemistry.** 118, 764-768.
- Jensen, G. L. & Bensadoun, A.** 1981. Purification, stabilization, and characterization of rat hepatic triglyceride lipase. **Analytical Biochemistry.** 113, 246-252.
- Jobling, M. & Bendiksen, E. A.** 2003. Dietary lipids and temperature interact to influence tissue fatty acid compositions of Atlantic salmon *Salmo salar* L., parr. **Aquaculture International.** 34, 1423-1441.
- Kalyoncu, L., Kissal, S., Aktümsek, A.** 2009. Seasonal changes in the total fatty acid composition of Vimba, *Vimba vimba tenella* (Nordmann, 1840) in Eğirdir lake, Turkey. **Food Chemistry.** 116, 728-730.
- Kalyoncu, L., Yaman, Y., Aktümsek, A.** 2010. Determination of the seasonal changes on total fatty acid composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* in Ivriz Dam Lake, Turkey. **African Journal of Biotechnology.** 9 (30), 4783-4787.
- Kara, C., Çelik, M.** 2000. Fatty acid composition of gonad tissue in female and male *Chondrostoma regium* (Heckel, 1843) living in Ceyhan river, Kahramanmaraş-Turkey. **Fen ve Mühendislik Dergisi.** 3,1, 160-166.
- Kara, C.** 2001. Sır baraj gölü (Kahramanmaraş)'nde yaşayan *Chondrostoma regium* (Heckel, 1843)'un dişi ve erkek bireylerinin kas dokusu yağ asitlerinin değişimi. **Fen ve Mühendislik Dergisi.** 4, 1, 74-78.
- Karabulut, H. A., Yandı, İ.** 2006. Su ürünlerindeki Omega-3 yağ asitlerinin önemi ve sağlık üzerine etkisi. **E. Ü. Su Ürünleri Dergisi.** 23, Ek 1/3, 339-342.
- Karataş, M.** 2000. Kazova (Tokat) Kaz gölü Sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758) populasyonu'nun üreme özelliklerinin incelenmesi. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.** 24, 261-265.
- Kheriji, S., El Cafsi, M., Masmoudi, W., Castell, J. D. & Romdhane, M. S.** 2003. Salinity and temperature effects on the lipid composition of mullet sea fry (*Mugil cephalus*, Linne, 1758). **Aquaculture International.** 11: 571-582.

- Kiessling, K-H. & Kiessling, A.** 1993. Selective utilisation of fatty acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) red muscle mitochondria. **Canadian Journal of Zoology.** 71, 248-251.
- Kim, H. Y.** 2007. Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. **Journal of Biological Chemistry.** 282: 18661-18665.
- Konar, V., Canpolat, A., Yılmaz, Ö., Gürsu, F.** 1999. *Capoeta trutta* ve *Barbus rajanorum mystaceus*' un kas dokularında ki total lipid ve yağ asidi miktar ve bileşimlerinin üreme periyodu süresince değişimi. **Turkish Journal of Biology.** 23, 319-330.
- Konar, V., Köprücü, K.** 2002. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) etindeki yağ asidi miktarlarının araştırılması. **Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi.** 14 (1), 73-78.
- Koven, W. M., Henderson, R. J. & Sargent, J. R.** 1997. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*): in-vivo and in-vitro studies of the lipolytic activity in various segments of the digestive tract. **Aquaculture.** 151, 155-171
- Kozlova, T. A.** 1998. Lipid class composition of benthic-pelagic fishes (Cottocomephorus, Cottoidei) from Lake Baikal. **Fish Physiology and Biochemistry.** 19, 211-216.
- Kozlova, T. A., Khotimchenko, S. V.** 2000. Lipids and fatty acids of two pelagic cottoid fishes (*Comephorus* spp.) endemic to Lake Baikal. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B.** 126, 477-485.
- Kroghdal, A., Hemre, G-I., Mommsen, T. P.** 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorbtion in postlarval stages. **Aquaculture Nutrition.** 11, 103-122.
- Kurtovic, I., Marshall, S. N., Zhao, X., Simpson, B. K.** 2009. Lipases from mammals and fishes. **Reviews in Fisheries Science.** 17,1, 18-40.
- Kurtovic, I., Marshall, S. N., Zhao, X., Simpson, B. K.** 2010. Purification and properties of digestive lipases from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and New Zealand hoki (*Macruronus novaezelandiae*). **Fish Physiology and Biochemistry.** DOI 10.1007/s10695-010-9382-y

- Lanser, A. C., Manthey, L. K., Hou, C. T.** 2002. Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein. **Current Microbiology**. 44, 5, 336-340
- Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G. and Lazdunski, M.** 2000. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. **The EMBO Journal**. 19, 8, 1784-1793
- Lazo, J. P., Mendoza, R., Hlt, G. J., Aguilera, C., Arnold, C. R.** 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**. 265, 194-205
- Lee, H. D., Meisel, J. A., de Meijer, V. E., Gura, K. M., Puder, M.** 2009. The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. 81: 165-170.
- Leaver, M. J., Bautista, J. M., Björnsson, B. T., Jönsson, E., Krey, G., Tocher, D. R. & Torstensen, B. E.** 2008. Towards fish lipid nutrigenomics: Current state and prospects for fin-fish aquaculture. **Reviews in Fisheries Science**. 16 (S1): 73-94.
- Lee, S.-M., Lee, J. Y., Kang, J. Y. & Hur, S. B.** 1993. Effect of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and biochemical changes in the Korean rockfish *Sebastes schlegeli* II. Changes of blood chemistry and properties of liver cells. **Journal of Aquaculture**. 6, 107-123.
- Lee, M. W. & Severson, D. L.** 1994. Partial purification of a diacylglycerol lipase from bovine aorta. **Biochemical Journal**. 298, 213-219.
- Lee, S-M.** 2001. Review of the lipid and essential fatty acid requirements of rockfish (*Sebastes schlegeli*). **Aquaculture Research**. 32 (Suppl. 1), 8-17.
- Lima, V. M. G., Krieger, N., Mitchell, D. A., & Fontana, J. D.** 2004. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**. 18, 1, 65-71.
- Lindberg, A. & Olivecrona, G.** 1995. Lipase evolution: trout, *Xenopus* and chicken have lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II-like activity but hepatic lipase-like activity. **Biochimica et Biophysica Acta- Lipid and Lipid Metabolism**. 1255, 2, 205-211.

- Lombardo, Y. B., Hein, G., Chicco, A.** 2007. Metabolic syndrome: Effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. **Lipids.** 42: 427-437.
- Lopes, M. de F., S., Leitao, A. L., Regalla, M., Marques, J. J. F., Carrondo, M. J. T., Crespo, M. T. B.** 2002. Characterization of a highly thermostable extracellular liase from *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology.** 76, 107-115
- Lopez-Lopez, S., Nolasco, H., Vega-Villasante., F.** 2003. Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B.** 135, 337-347
- Lowe, M. E.** 2002. The triglyceride lipases of pancreas. **Journal of Lipid Research.** 43, 2007-2016.
- Magalhaes, B. S., Fiamoncini, J., Deschamps, F. C., Curi, R., Silva, L. P.** 2010. Comparison of fatty acid composition in nine organs of the sympatric Antarctic teleost fish species *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.** 155, 132-137.
- Matsumura, S., Matsuo, M. & Nishizuka, Y.** 1976. Partial purification and characterization of a triglyceride lipase from pig adipose tissue. **The Journal of Biological Chemistry.** 251, 20, 25, 6267-6273
- McKenzie, D. J., Higgs, D. A., Dosanjh, B. S., Deacon, G. & Randall, D. J.** 1998. Dietary fatty acid composition influences swimming performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in sea water. **Fish Physiology and Biochemistry.** 19, 111-122.
- Medford, B. A. and Mackay, W. C.** 1978. Protein and lipid content of gonad, liver and muscle of Northern pike (*Esox lucius* L.) in relation to gonad growth. **Journal of Fish Research Board of Canada.** 35, 213-219.
- Memon, N. N., Talpur, F. N., Bhangar, M. I., Balouch, A.** 2011. Changes in fatty acid composition in muscle of three farmed carp fish species (*Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala*, *Catla catla*) raised under the same conditions. **Food Chemistry.** 126, 405-410.

- Mendez, E.** 1997. Seasonal changes in the lipid classes and fatty acid compositions of Hake (*Merluccius hubbsi*) liver oil. **JAOCS**. 74, 9, 1173-1175.
- Metin, K.** 1997. *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 (Osteichthyes:Salmonidae)'nin karaciğer ve incebağırsak lipaz enziminin purifikasyonu ve bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi. **Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.** 93 sayfa.
- Metin, K., Akpınar, M. A.** 2000 a. *Cyprinion macrostomus* (HECKEL, 1843)' un gonatlarında total lipit ve yağ asidi miktarının mevsimsel değişimi. **Turkish Journal of Biology**. 24, 627-634.
- Metin, K. & Akpınar, M. A.** 2000 b. *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 karaciğer lipaz enziminin bazı kinetik özellikleri. **Turkish Journal of Biology**. 24, 489-502.
- Miret, S., Saiz, M. P. and Mitjavila, M. T.** 2003. Effects of fish oil- and olive oil-rich diets on iron metabolism and oxidative stress in the rat. **British Journal of Nutrition**. 89, 11-18.
- Mnari, A., Bouhleb, I., Chraief, I., Hammami, M., Romdhane, M. S., El Cafsi, M., Chaouch, A.** 2007. Fatty acids in muscles and liver of Tunisian wild and farmed gilthead sea bream, *Sparus aurata*. **Food Chemistry**. 100, 1393-1397.
- Mogensen, J. E., Sehgal, P. & Otzen, D. E.** 2005. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. **Biochemistry**. 44, 5, 1719-1730.
- Moss, C. W., Lambert, M. A. & Mervin, W. H.** 1974. Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. **Applied Microbiology**. 28, 80-85.
- Murray, H. M., Gallant, J. W., Perez-Casanova, J. C., Johnson, S. C. & Douglas, S. E.** 2003. Ontogeny of lipase expression in winter flounder. **Journal of Fish Biology**. 62, 816-833
- Nanton, D. A., Lall, S. P. & McNiven, M. A.** 2001. Effects of dietary lipid level on liver and muscle lipid deposition in juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. **Aquaculture Research**. 32, supp. 1, 225-234.
- Nayak, J., Nair, P. G. V., Ammu, K. & Mathew, S.** 2003. Lipase activity in different tissues of four species of fish: rohu (*Labeo rohita* Hamilton), oil sardine (*Sardinella longiceps* Linnaeus), mullet (*Liza subviridis* Valenciennes) and

- Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta* Cuvier). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 83, 1139-1142
- Nayak, J., Nair, P. G. V., Mathew, S. & Ammu, K.** 2004. A study on the intestinal lipase of Indian major carp *Labeo rohita*. **Asian Fisheries Science**. 17, 333-340.
- Ncube, I., Adlercreutz, P., Read, J. & Matiasson, B.** 1993. Purification of rape (*Brassica napus*) seedling lipase and its use in organic media. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 17, 327-336.
- Noriega-Rodriguez, J. A., Gamez-Meza, N., Alanis-Villa, A., Medina-Juarez, L. A., Tejada-Mansir, A., Angulo-Guerrero, O. & Garcia, H. S.** 2009. Extraction and fractionation of lipolytic enzyme from viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). **International Journal of Food Science and Technology**. 44, 1223-1228
- Oliva-Teles, A.** 2000. Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. **Aquaculture Nutrition**. 8, 477-492
- Osman, H., Suriah, A. R. & Law, E. C.** 2001. Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian waters. **Food Chemistry**. 73: 55-60.
- Osterlund, T.** 2001. Structure-function relationships of hormone-sensitive lipase. **European Journal of Biochemistry**. 1899-1907
- Oterholm, A., Ordal, Z. J. & Witter, L. D.** 1970. Purification and properties of a glycerol ester hydrolase (Lipase) from *Propionibacterium shermanii*. **Applied Microbiology**. 16-22.
- Özoğul, Y., Özoğul, F., Alagöz, S.** 2007. Fatty acid profiles and fat contents of commercially important seawater and freshwater fish species of Turkey: A comparative study. **Food Chemistry**. 103, 217-223.
- Pabai, F., Kermasha, S. & Morin, A.** 1995. Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: Partial purification, characterization and interesterification of butter fat. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 43, 42-51.
- Paiva, A. L., Balcao, V. M., Malcata, F. X.** 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. 27, 187-204.

- Palekar, A. A., Vasudevan, P. T., Yan, S.** 2000. Purification of lipase: a review. **Biocatalysis and Bioinformatics.** 18, 177-200.
- Patton, J. S., Warner, T. G. & Benson, A. A.** 1977. Partial characterization of the bile-salt-dependent triacylglycerol lipase from the leopard shark pancreas. **Biochimica Biophysica Acta.** 486, 322-330
- Perret, B., Mabile, L., Martinez, L., Terce, F., Barbaras, R. & Collet, X.** 2002. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. **Journal of Lipid Research.** 43, 1163-1169
- 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
- Pettersson, A., Pickova, J., Brannas, E.** 2009. Effects of crude rapeseed oil on lipid composition in Arctic charr *Salvelinus alpinus*. **Journal of Fish Biology.** 75, 1446-1458.
- Pignol, D., Hermoso, J., Kerfelec, B., Crenon, I., Chapus, C., Fontecilla-Camps, J. C.** 1998. The lipase/colipase complex is activated by a micelle: neutron crystallographic evidence. **Chemistry and Physics of Lipids.** 93, 123-129
- Pleiss, J., Fisher, M., Schmid, R. D.** 1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids.** 93, 67-80.
- Polizelli, P. P., Facchini, F. D. A., Cabral, H., Bonilla-Rodriguez, G. O.** 2008. A new lipase isolated from oleaginous seeds from *Pachira aquatica* (Bombacaceae). **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 150, 233-242
- Prim, N., Saez, M., Ruiz, C., Pastor, F. I. J., Diaz, P.** 2003. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates or lipase activity characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** 22, 339-346.
- Rao, H. R. & Mansbach II, C. M.** 1990. Purification and partial characterization of intestinal ascid lipase. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1046, 19-26.
- Rasoarahona, J. R. E., Barnathan, G., Bianchini, J-P., Gaydou, E. M.** 2005. Influence of season on the lipid content and fatty acid profiles of three tilapia species (*Oreochromis niloticus*, *O. Macrochir* and *Tilapia rendalli*) from Madagascar. **Food Chemistry.** 91, 683-694.



- Raul, F., Noriega, R., Doffoel, M., Grenier, J. F., Haffen, K.** 1982. Modifications of brush border enzyme activities during starvation in the jejunum and ileum of adult rats. **Enzyme**. 28, 328-335.
- Rivera-Perez, C., Garcia-Carreno, F. L., Saborowski, R.** 2010. Purification and biochemical characterization of digestive lipase in white shrimp. **Marine Biotechnology**. DOI 10.1007/s10126-010-9298-7.
- Rodriguez, C., Acosta, C., Badia, P., Cejas, J. R., Santamaria, F. J. & Lorenzo, A.** 2004. Assessment of lipid and essential fatty acids requirements of black sea bream (*Spondyliosoma cantharus*) by comparison of lipid composition in muscle and liver of wild and captive adult fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 139B: 619-629.
- Rueda, F. M., Lopez, J. A., Martinez, F. J. & Zamora, S.** 1997. Fatty acids in muscle of wild and farmed red porgy, *Pagrus pagrus*. **Aquaculture Nutrition**. 3, 161-165.
- Rueda, F. M., Hernandez, M. D., Egea, M. A., Aguado, F., Garcia, B. & Martinez, F. J.** 2001. Differences of tissue fatty acid composition between reared and wild sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). **British Journal of Nutrition**. 86, 617-622.
- Russo, G. L.** 2009. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical Pharmacology**. 77: 937-946.
- Ruyter, B., Rosjo, C., Masoval, K., Einen, O. & Thomassen, M. S.** 2000. Influence of dietary n-3 fatty acids on the desaturation and elongation of [1-<sup>14</sup>C] 18:2 n-6 and [1-<sup>14</sup>C] 18:3 n-3 in Atlantic salmon hepatocytes. **Fish Physiology and Biochemistry**. 23, 151-58.
- Saele, O., Nordgreen, A., Olsvik, P. A., Hamre, K.** 2010. Characterization and expression of digestive neutral lipases during ontogeny of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. 157, 252-259
- Sağlık, S., Alpaslan, M., Gezgin, T., Çetintürk, K., Tekinay, A., Güven, K. C.** 2003. Fatty acid composition of wild and cultivated gilthead seabream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **European Journal of Lipid Science and Technology**. 105, 104-107.

- Sağlık Aslan, S., Güven, K. C., Gezgin, T. Alpaslan, M. & Tekinay, A.** 2007. Comparison of fatty acid contents of wild and cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Turkey. **Fisheries Science**. 73, 1195-1198.
- Sargent, J. R., Bell, J. G., Bell, M. V., Henderson, R. J. and Tocher, D. R.** 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. **Journal of Applied Ichthyology**. 11, 183-198.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Toher, D., Estevez, A.** 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. **Aquaculture**. 177: 191-199.
- Sayari, A., Mejdoub, H., Gargouri, Y.** 2000. Characterization of turkey pancreatic lipase. **Biochimie**. 82, 153-159
- Schmidt, M., Bornscheuer, U. T.** 2005. High-throughput assays for lipase and esterases. **Biomolecular Engineering**. 22, 51-56.
- Schrag, J. D., Cygler, M.** 1997. Lipases and  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. **Methods in Enzymology**. 284, 85-107.
- Selmi, S. & Sadok, S.** 2010. The influence of season on lipid content and fatty acid profile of *Euthynnus alletterus* fillets and by-products. **Journal of Muscle Foods**. 21, 365-378.
- Sharma, S. & Gupta, M. N.** 2001. Alginate as a macroaffinity ligand and additive for enhanced activity and thermostability of lipases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 33, 161-165.
- Sheridan, M. A. & Allen, W. V.** 1984. Partial purification of a triacylglycerol lipase isolated from steelhead trout (*Salmo gairdneri*) adipose tissue. **Lipids**. 19, 5, 347-352.
- Sheridan, M. A.** 1988. Lipid dynamics in fish: aspect of absorption, transportation, deposition and mobilization. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 90B: 697-690.
- Shimada, Y., Koga, C., Sugihara, A., Nagao, T., Tadaka, N., Tsunasawa, S. & Tominaga, Y.** 1993. Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 75, 349-352.
- Sidell, B. D. & Hazel, J. R.** 2002. Triacylglycerol lipase activities in tissues of Antarctic fishes. **Polar Biology**. 25, 517-522

- Simopoulos, A. P.** 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinic Nutrition.** 70 (Supp. 1): 560S-9S
- Smichi, N., Fendri, A., Chaabouni, R., Rebah, F. B., Gargouri, Y., Miled, N.** 2010. Purification and biochemical characterization of an acid-stable lipase from the pyloric caeca of sardine (*Sardinella aurita*). **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 162, 1483-1496.
- Sorbera, L. A., Asturiano, J. F., Carrillo, M. & Zanuy, S.** 2001. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Biology of Reproduction.** 64, 382-389.
- Steffens, W.** 1997. Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. **Aquaculture.** 151, 97-119.
- Steiner, J. M., Williams, D. A.** 2002. Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. **Biochimie.** 84, 1243-1251.
- Su, K-P., Huang, S-Y., Chiu, C-C., Shen, W. W.** 2003. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo controlled trial. **European Neuropsychopharmacology.** 13: 267-271.
- Sugihara, A., Tani, T., Tominaga, Y.** 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.* **Journal of Biochemistry.** 109, 211-216.
- Sushchik N. N., Gladyshev, M. I., Kalachva, G. S.** 2007. Seasonal dynamics of fatty acid content of a common food fish from Yenise river, Siberian grayling, *Thymallus arcticus*. **Food Chemistry.** 104, 1353-1358.
- Szlinder-Richert, J., Usydus, Z., Wyszynski, M., Adamczyk, M.** 2010. Variation in fat content and fatty-acid composition of the Baltic herring *Clupea harengus membras*. **Journal of Fish Biology.** 77, 585-599.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. & Wieczorek, J.** 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. **Enzyme Microbiology and Technology.** 10, 492-497.
- Sztajer, H., Lünsdorf, H., Erdmann, H., Menge, U. & Schmid, R.** 1992. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1124, 253-261.

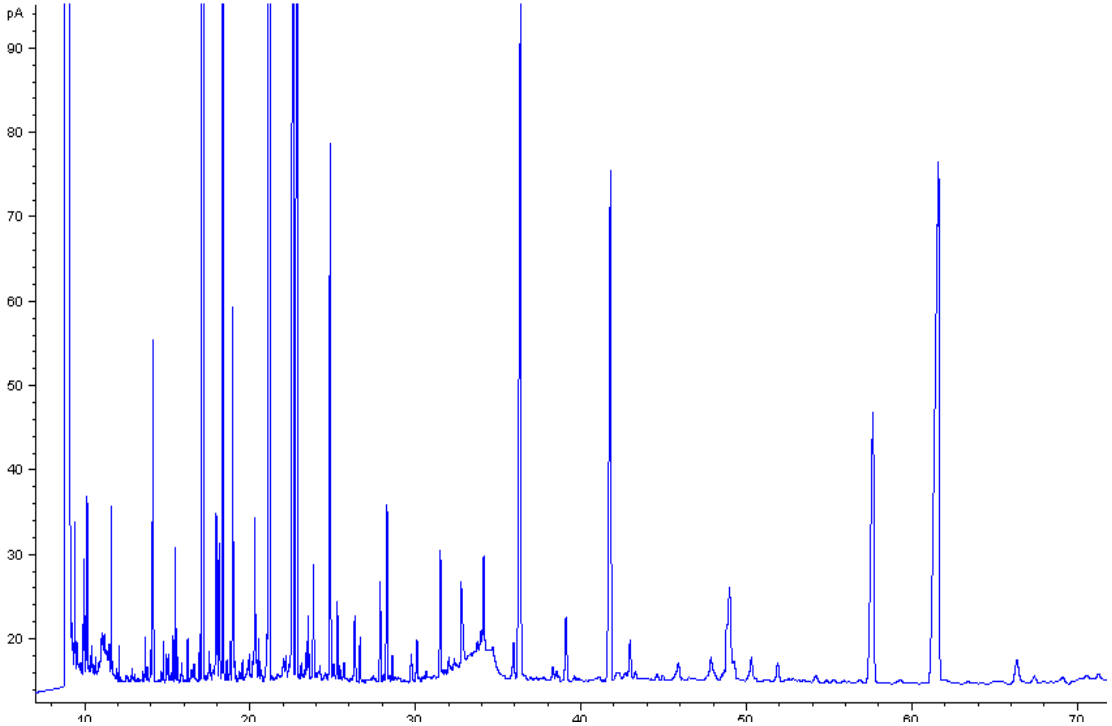
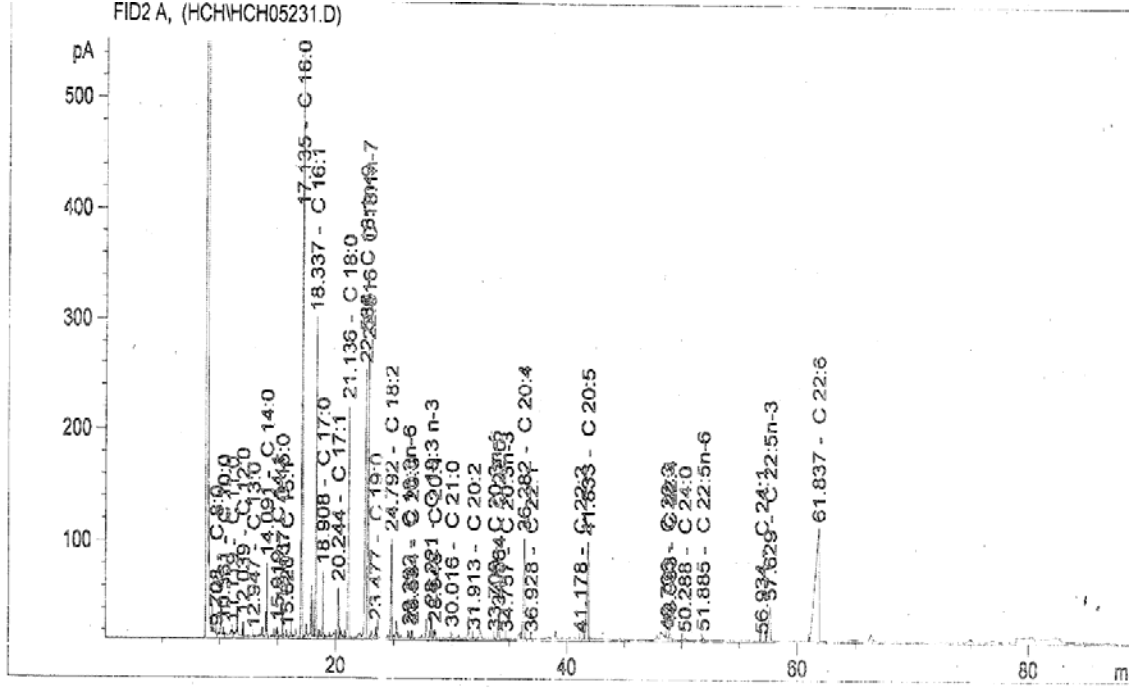
- Şaşı, H.** 2004. The reproduction biology of chub (*Leuciscus cephalus* L. 1758) in Topçam Dam Lake (Aydın, Turkey). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.** 28, 693-699.
- Şener, E., Yıldız, M., Savaş, E.** 2003. Effects of dietary lipids on growth and fatty acid composition in russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) juveniles. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.** 29, 1101-1107.
- Tanaka, H., Mierau, I. & Ito, F.** 1999. Purification and characterization of bovine pancreatic bile salt-activated lipase. **The Journal of Biochemistry.** 125, 883-890.
- Telefoncu, A.** 1996. Protein saflaştırılması ve karakterizasyonu. **Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. 14-20 Eylül Kuşadası, Aydın, Türkiye.** 1-285.
- Temizkan, G., Arda, N.** 1999. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. **Istanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEN) Yayın No:1.** 162-177.
- Testi, S., Bonaldo, A., Gatta, P. P., Badiani, A.** 2006. Nutritional traits of dorsal and ventral fillets from three farmed fish species. **Food Chemistry.** 98, 104-111.
- Thomas, A., Allouche, M., Basyn, F., Brasseur, R. & Kerfelec, B.** 2005. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. **The Journal of Biological Chemistry.** 280, 48, 40074-40083.
- Tocher, D. R.** 2003. Metabolism and function of lipids and fatty acids in teleost fish. **Reviews in Fisheries Science.** 11, 107-184.
- Tocher, D. R., Fonseca-Madrugal, J., Dick, J. R., Ng, W-K., Bell, J. G., Campbell, P. J.** 2004. Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology.** 137B, 49-63.
- Tocher, D. R.** 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. **Aquaculture Research.** 41, 717-732.
- Torossian, K. & Bell, A. W.** 1991. Purification and characterization of an acid-resistant triacylglycerol lipase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology and Applied Biochemistry.** 13, 205-211.

- Tufan, B., Koral, S. & Köse, S.** 2011. Changes during fishing season in the fat content and fatty acid profile of edible muscle, liver and gonads of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) caught in the Turkish Black Sea. **International Journal of Food Science & Technology.** 46, 800-810.
- Turchini, G. M. & Francis, D. S.** 2009. Fatty acid metabolism (desaturation, elongation and beta-oxidation) in rainbow trout fed fish oil- or linseed oil-based diets. **British Journal of Nutrition.** 102, 69-81.
- Türkmen, M., Haliloğlu, H. İ., Erdoğan, O., Yıldırım, A.** 1999. The growth and reproduction characteristics of Chub *Leuciscus cephalus orientalis* (Nordmann, 1840) living in the river Aras. **Turkish Journal of Zoology.** 23, 355-364.
- Uysal, İ., Çaklı, Ş., Çelik, U.** 2002. Kültür şartlarında ekstruder pelet yemle beslenen Abant Alabalığı (*Salmo trutta abanticus* T., 1954) ile Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792)'nın biyokimyasal kompozisyonları. **Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi.** 19, 3-4, 447-454.
- Uysal, K., Aksoylar, M. Y.** 2005. Seasonal variations in fatty acid composition and the n-6/n-3 fatty acid ratio of pikeperch (*Sander lucioperca*) muscle lipids. **Ecology of Food and Nutrition.** 44: 23-35.
- Uysal, K., Yerlikaya, A., Aksoylar, M. Y., Yöntem, M., Ulupinar, M.** 2006. Variations in fatty acids composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) liver with respect to gonad maturation. **Ecology of Freshwater Fish.** 15: 441-445.
- Uysal, K., Bülbül, M., Dönmez, M., Seçkin, A. K.** 2008. Changes in some components of the muscle lipids of three freshwater fish species under natural extreme cold and temperature conditions. **Fish Physiology and Biochemistry.** 34: 455-463.
- Ünver, B.** 1998. An investigation on the reproduction properties of Chub (*Leuciscus cephalus* L., 1758) in Lake Tödürge (Zara/Sivas). **Turkish Journal of Zoology.** 22, 141-147.
- Ünver, B. & Saraydın, S. Ü.** 2004. Histological examination of ovarium development of shemaya *Chalcalburnus chalcoides* living in Lake Tödürge (Sivas/Turkey). **Folia Zoologica.** 53(1): 99-106.

- van Tilbeurgh, H., Egloff, M.-P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. & Cambillau, C.** 1993. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. **Nature**. 362, 814-820.
- van Tilbeurgh, H., Bezzine, S., Cambillau, C., Verger, R., Carriere, F.** 1999. Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1441, 173-184.
- van den Thillart, G. and Bruin, G.** 1981. Influence of environmental temperature on mitochondrial membranes. **Biochimica Biophysica Acta**. 640, 439-497
- van den Thillart, G., Vianen, G. and Zaagsma, J.** 2002. Adrenergic regulation of lipid mobilization in fishes; a possible role in hypoxia survival. **Fish Physiology and Biochemistry**. 27: 189-204.
- Vujkovic, G., Karlovic, D., Vujkovic, I., Vörösbaranyi, I., & Jovanovic, B.** 1999. composition of muscle tissue lipids of silver carp and bighead carp. **Journal of the American Oil Chemist's Society**. 76, 4, 475-480.
- Wang, C-H.** 1980. Purification of human milk bile salt-activated lipase by cholic acid-coupled sepharose 4B affinity chromatography. **Analytical Biochemistry**. 105, 398-402.
- Wang, H, Dudley, A. W., Dupont, J., Reeds, P. J., Hachey, D. L., Dudley, M.** 1996. The duration of medium chain triglyceride feeding determines brush border membrane lipid composition and hydrolase activity in newly weaned rats. **Journal of Nutrition**. 126,1455-1462.
- Watanabe, T.** 1982. Lipid nutrition in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 73 (B), 1, 3-15.
- Watkins, B. A., Li, Y., Lippman, H. E., Feng, S.** 2003. Modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on osteoblast function and bone metabolism. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. 68: 387-398.
- Wodtke, E.** 1978. Lipid adaptation in liver mitochondrial membranes of carp acclimated to different environmental temperatures. **Biochimica Biophysica Acta**. 529, 280-291.
- Wong, H. & Schotz, M. C.** 2002. The lipase gene family. **Journal of Lipid Research**. 43, 993-999.

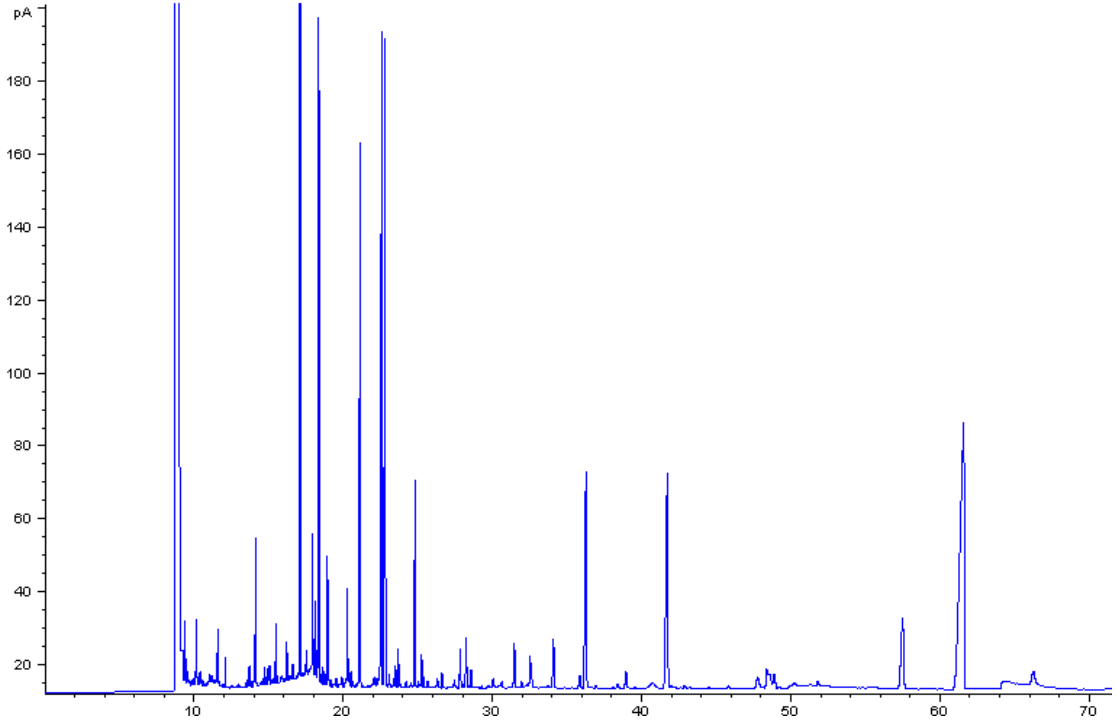
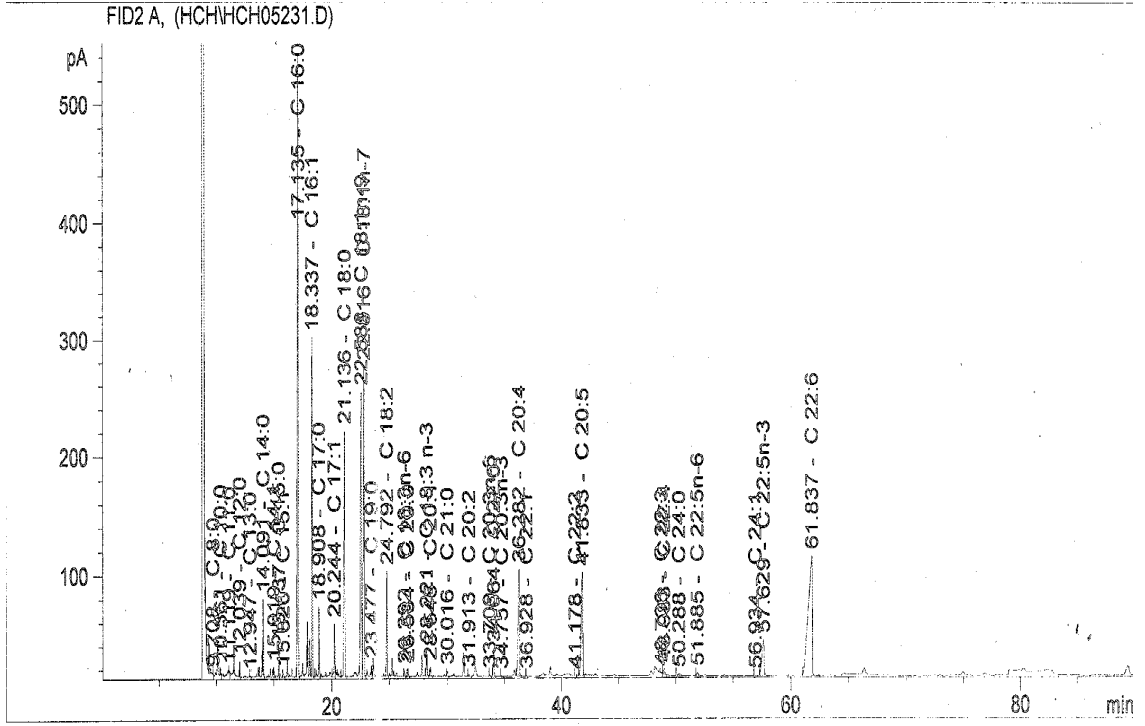
- Yaqoob, P.** 2004. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications. **Proceedings of the Nutrition Society.** 63, 89-104.
- Yılmaz, Ö., Konar, V., Çelik, S.** 1995. Elazığ Hazar gölündeki *Capoeta capoeta* umbla'nın dişi ve erkek bireylerinde bazı dokularının total lipid ve total yağ asidi bileşimleri. **Biyokimya Dergisi.** 20, 31-42.
- Zengin, H. & Akpınar, M. A.** 2006. Fatty acid composition of *Oncorhynchus mykiss* during embryogenesis and other developmental stages. **Biologia Bratislava.** 61,3, 305-311.
- Zlatanov, S., Laskaridis, K.** 2007. Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish-sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*). **Food Chemistry.** 103, 725-728.
- Zouari, N., Miled, N., Rouis, S., Gargouri, Y.** 2007. Scorpion digestive lipase: A member of a new invertebrate's lipase group presenting novel characteristics. **Biochimie.** 89, 403-409.

6. Yağ asiti bileşimi incelenen dokuların gaz kromatografisi metil esterlerine ait kromatogram örnekleri

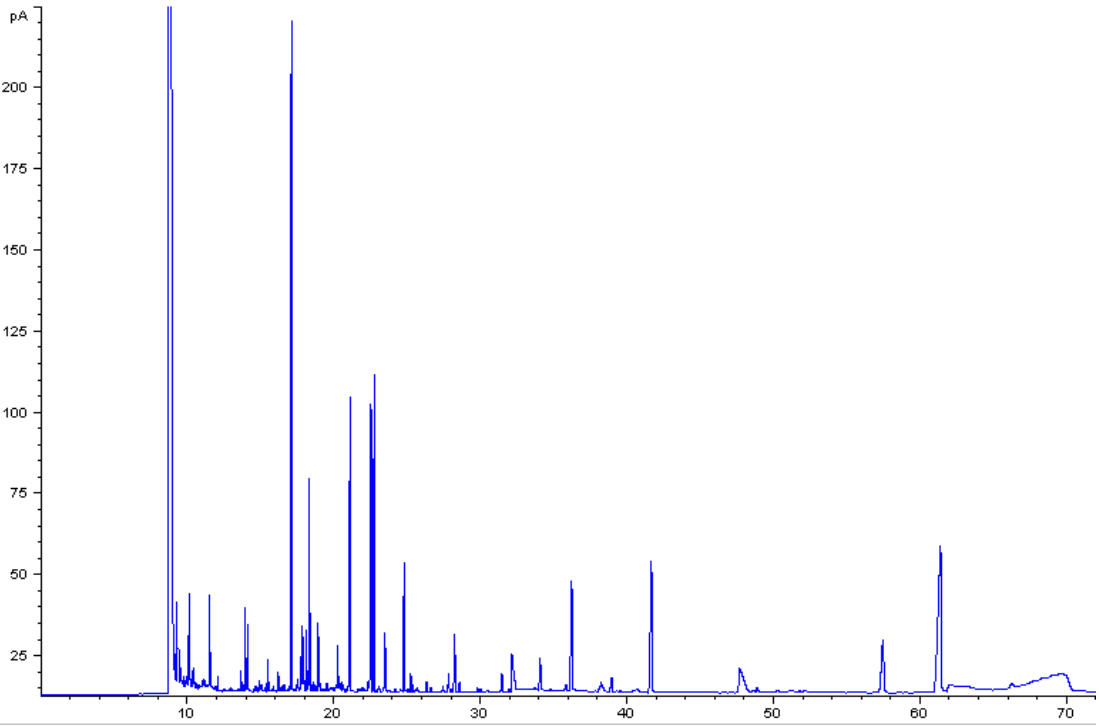
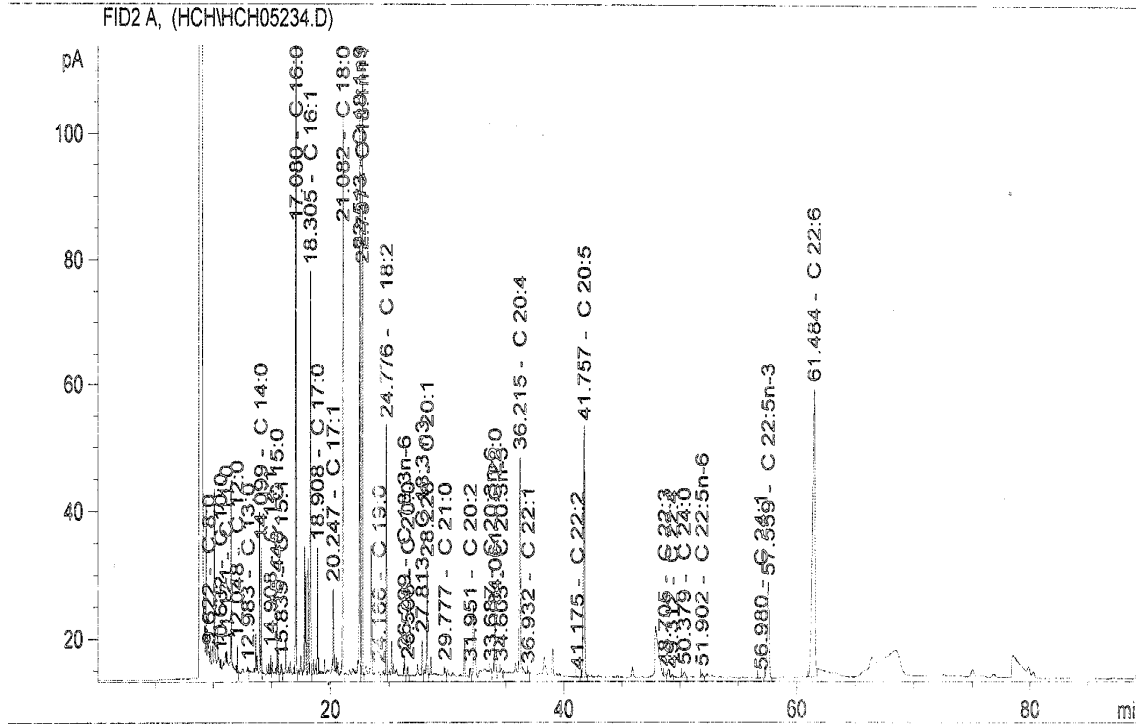


Şekil 26. *C. chalcoides*'in Mayıs ayı (ilkbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.

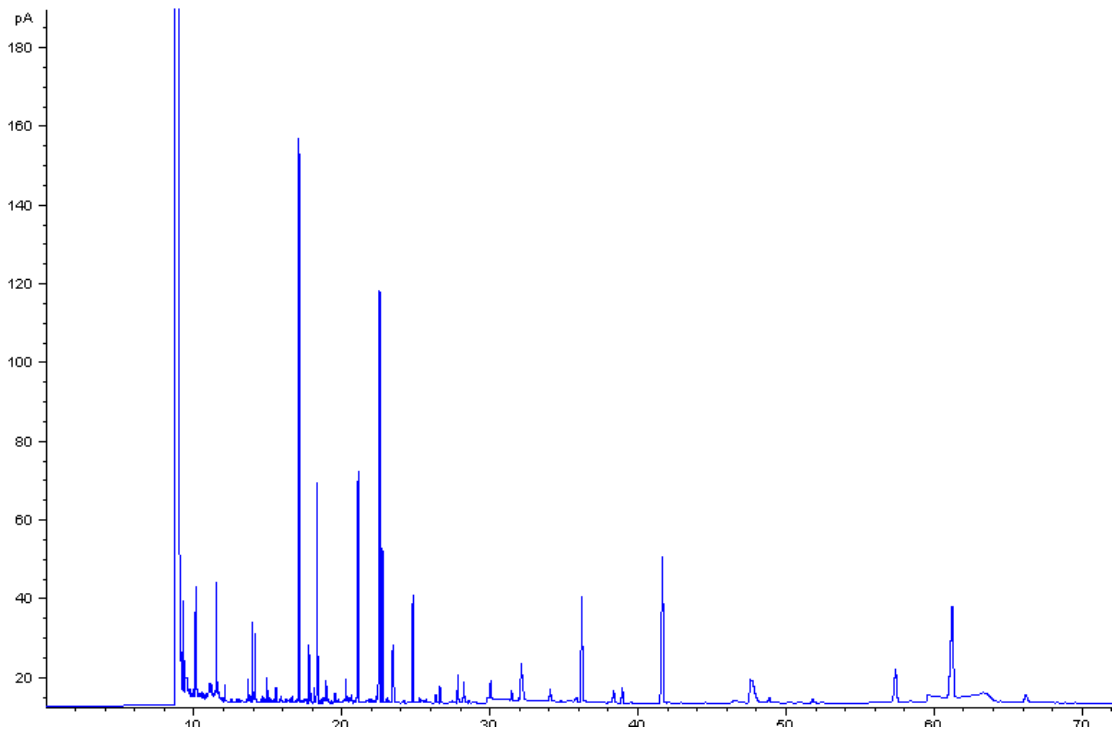
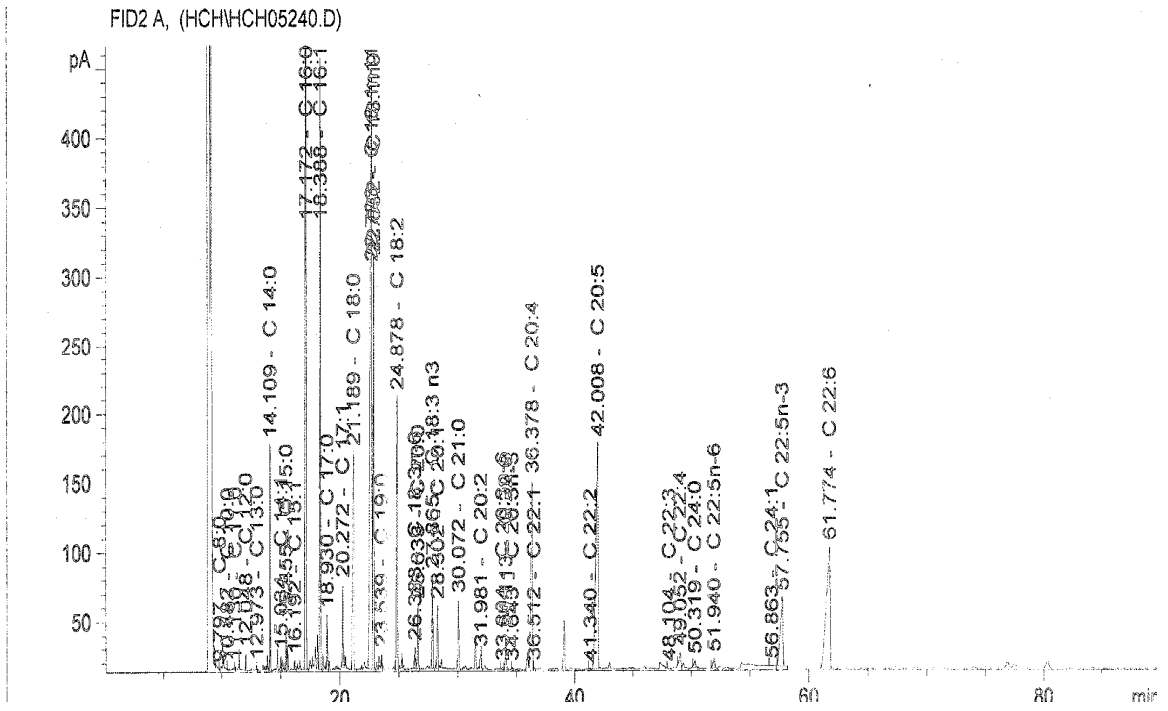




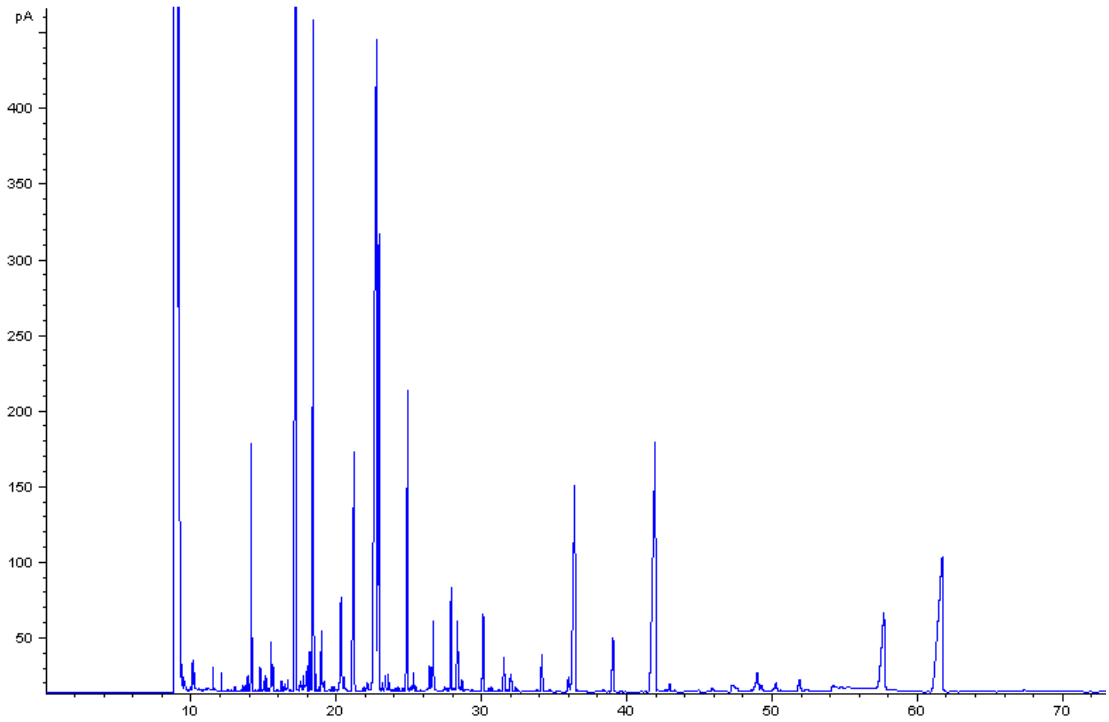
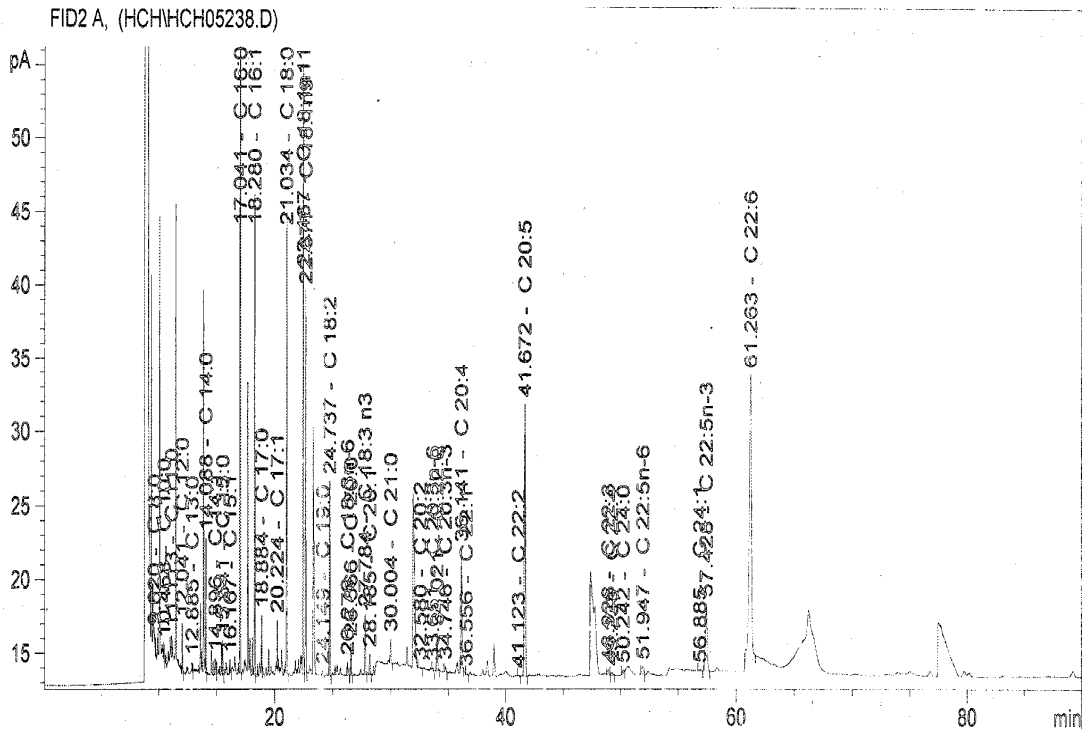
Şekil 27. *L. cephalus*'un mayıs ayı (ilkbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



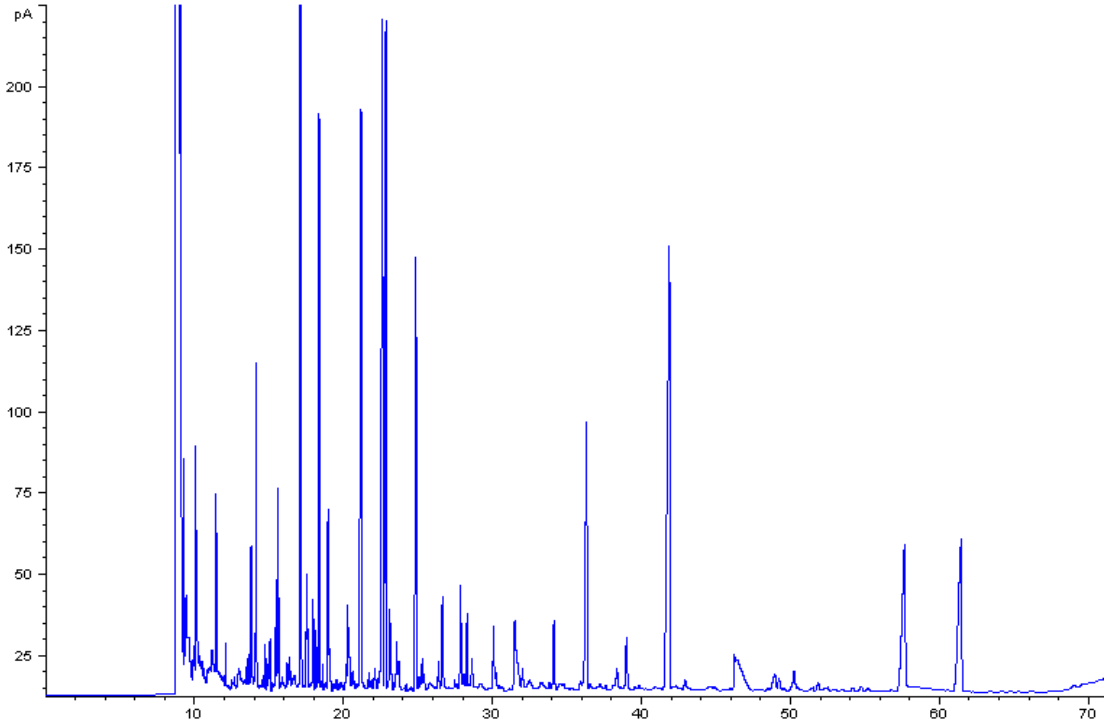
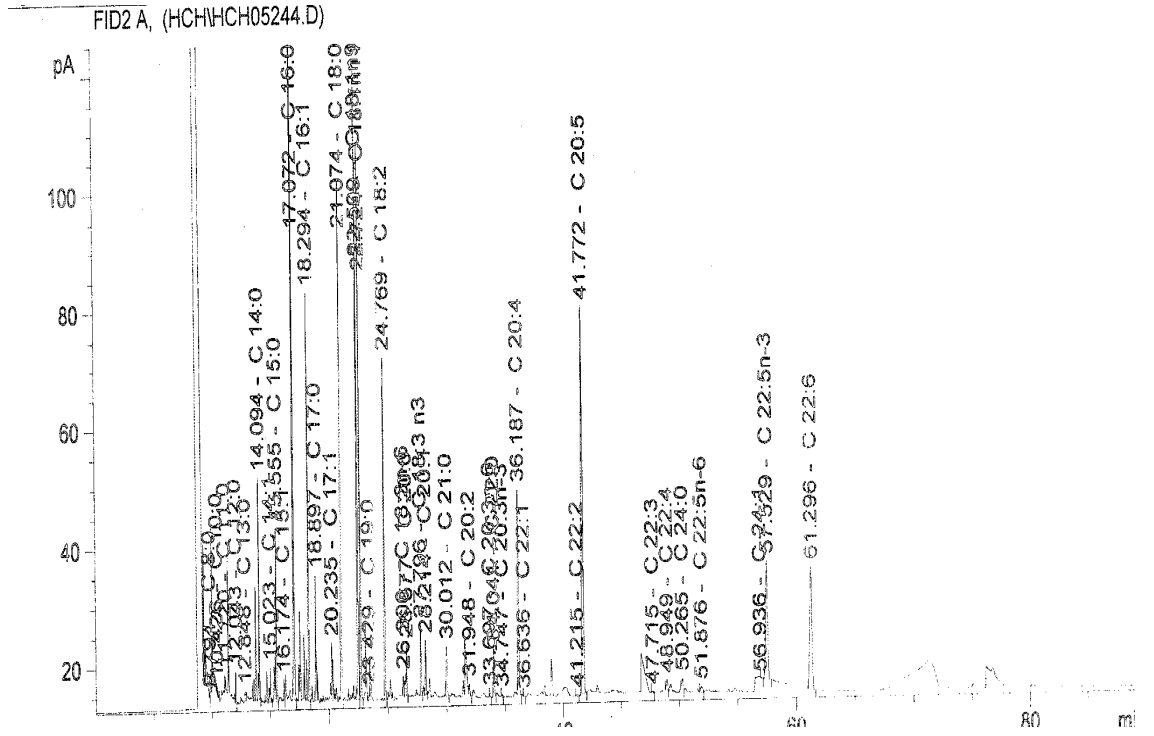
Şekil 28. *C. carpio*'nun mayıs ayı (ilkbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



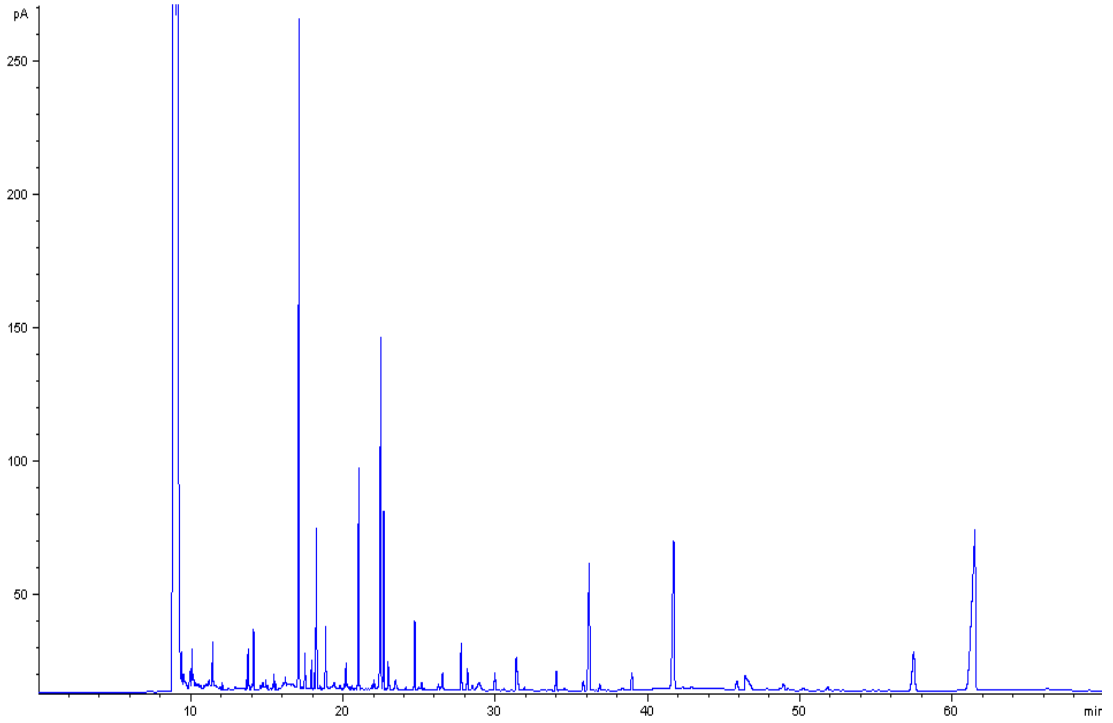
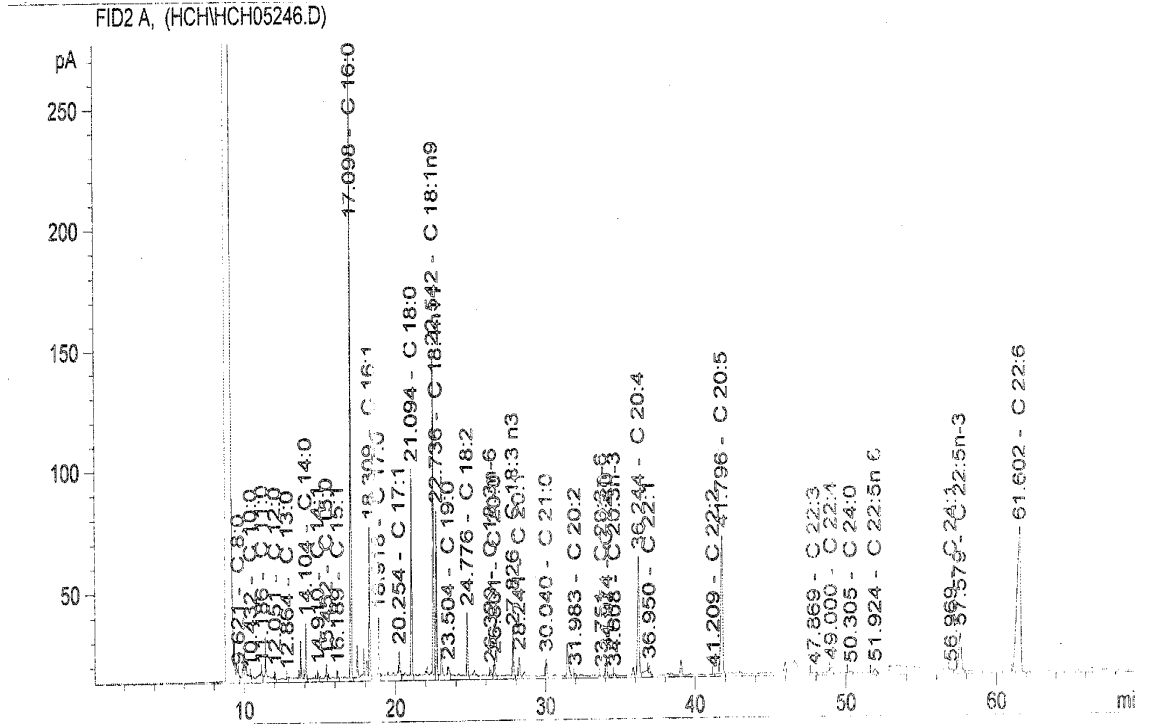
Şekil 29. *C. chalcoides*'in Mayıs ayı (ilkbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



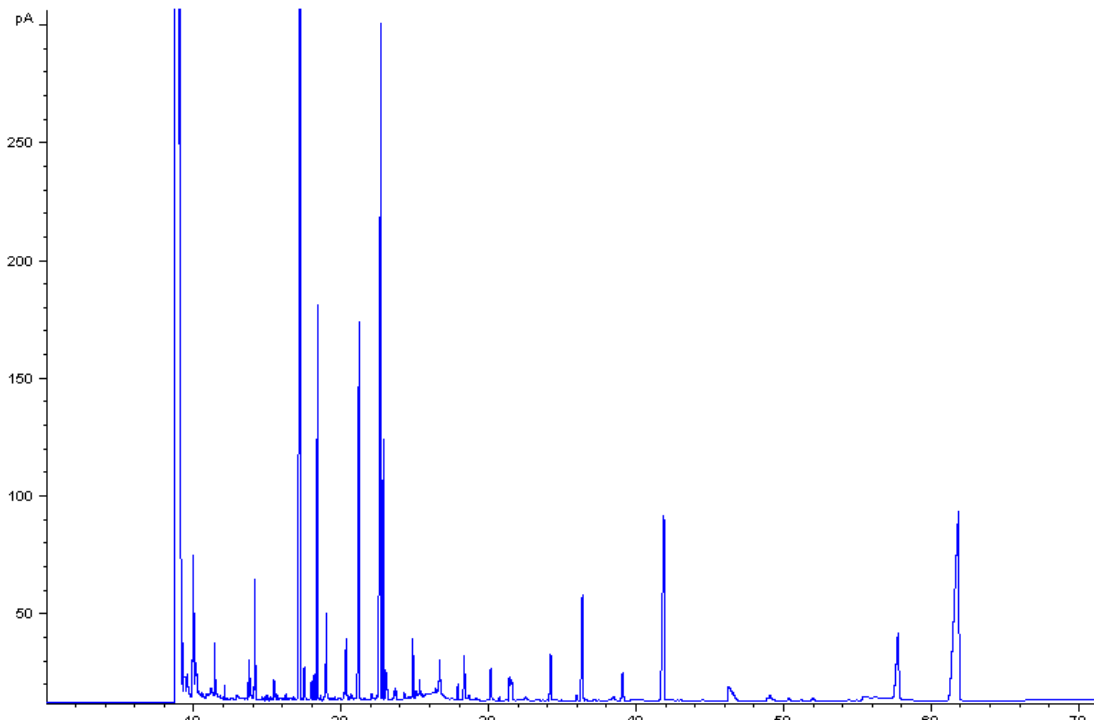
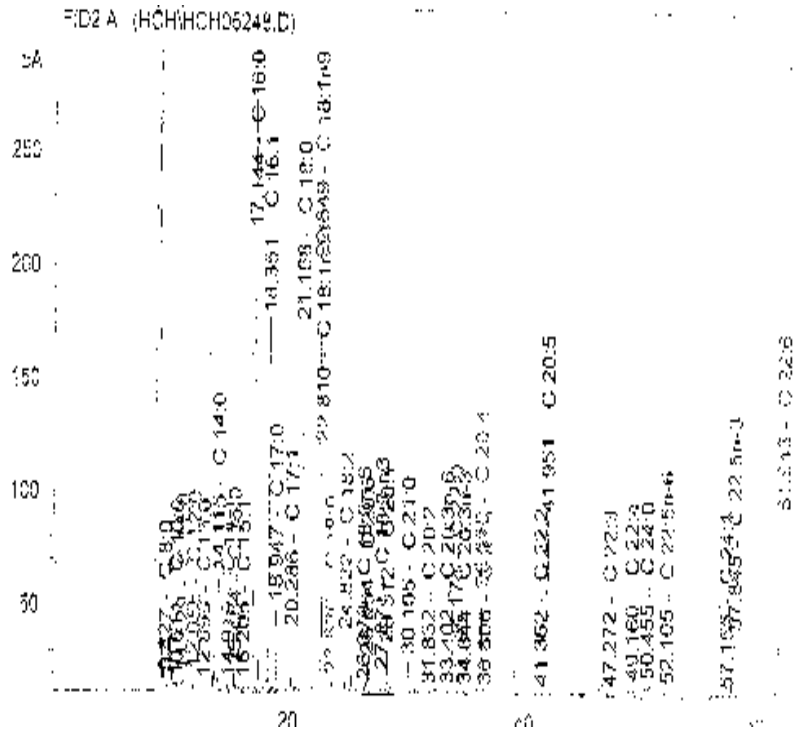
Şekil 30. *L. cephalus*'un mayıs ayı (ilkbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



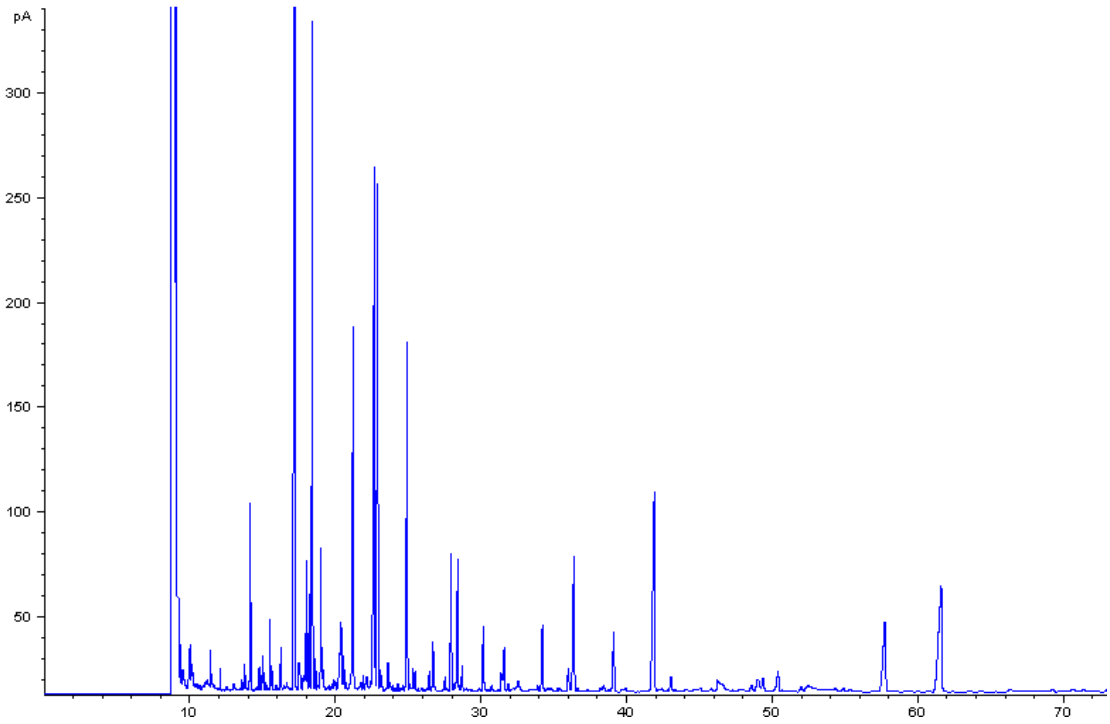
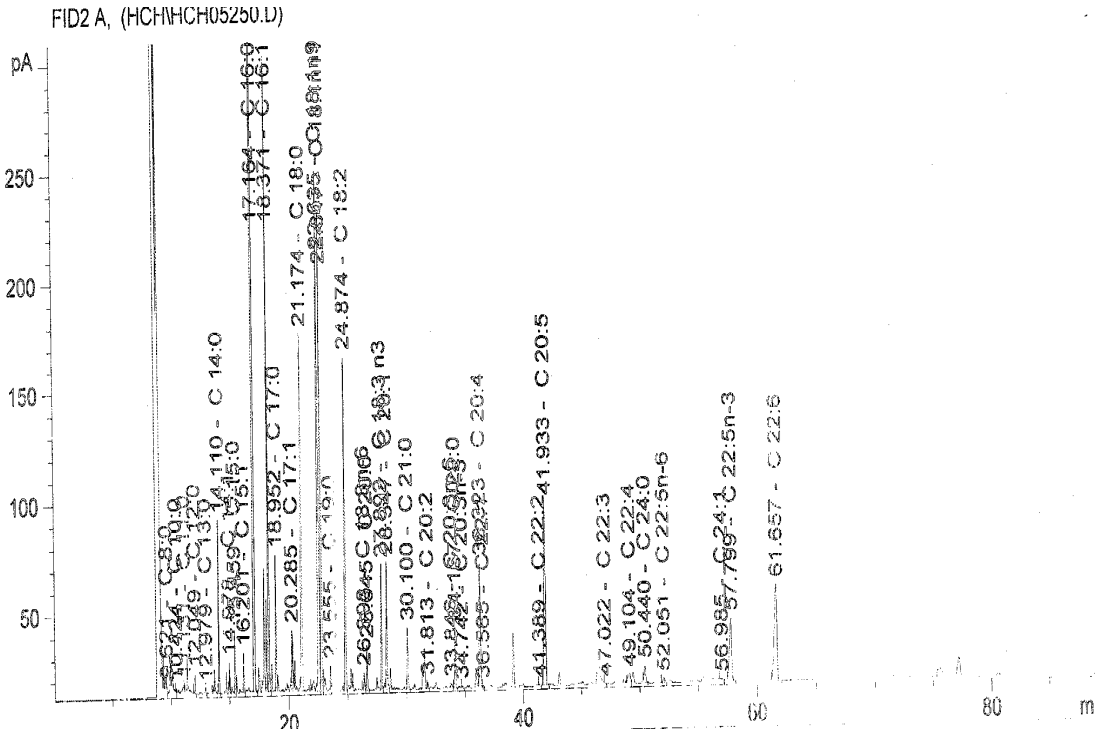
Şekil 31. *C. carpio*'nun mayıs ayı (ilkbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



Şekil 32. *L. cephalus*'un temmuz ayı (yaz) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.

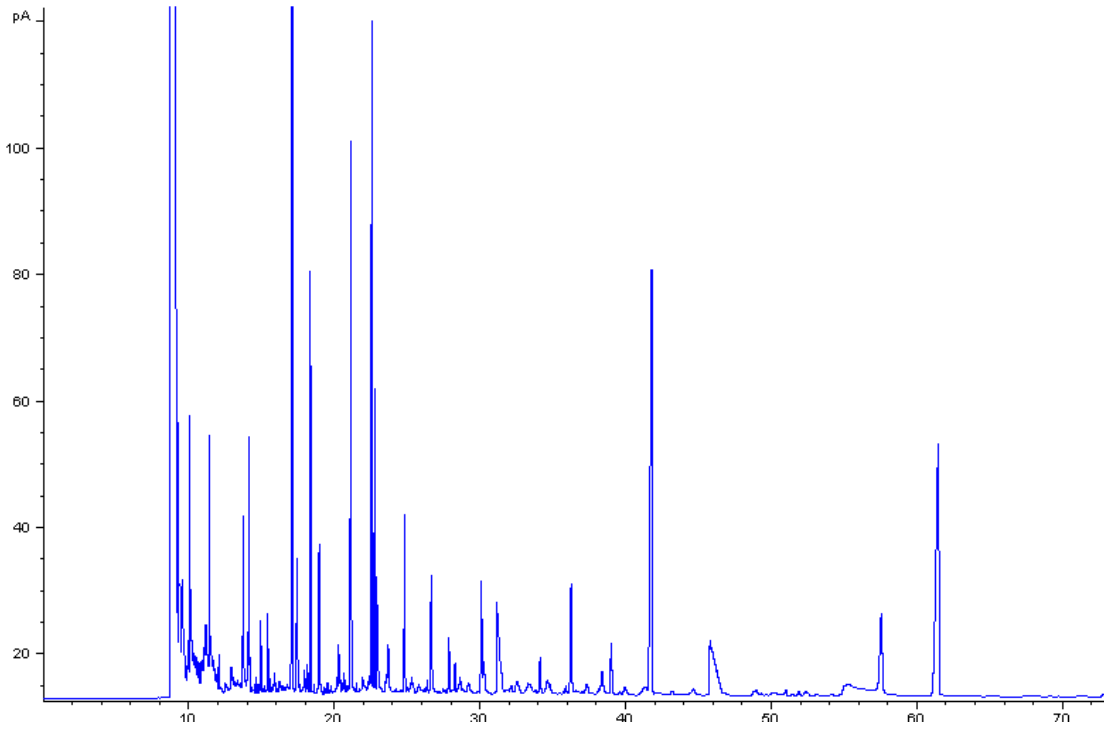
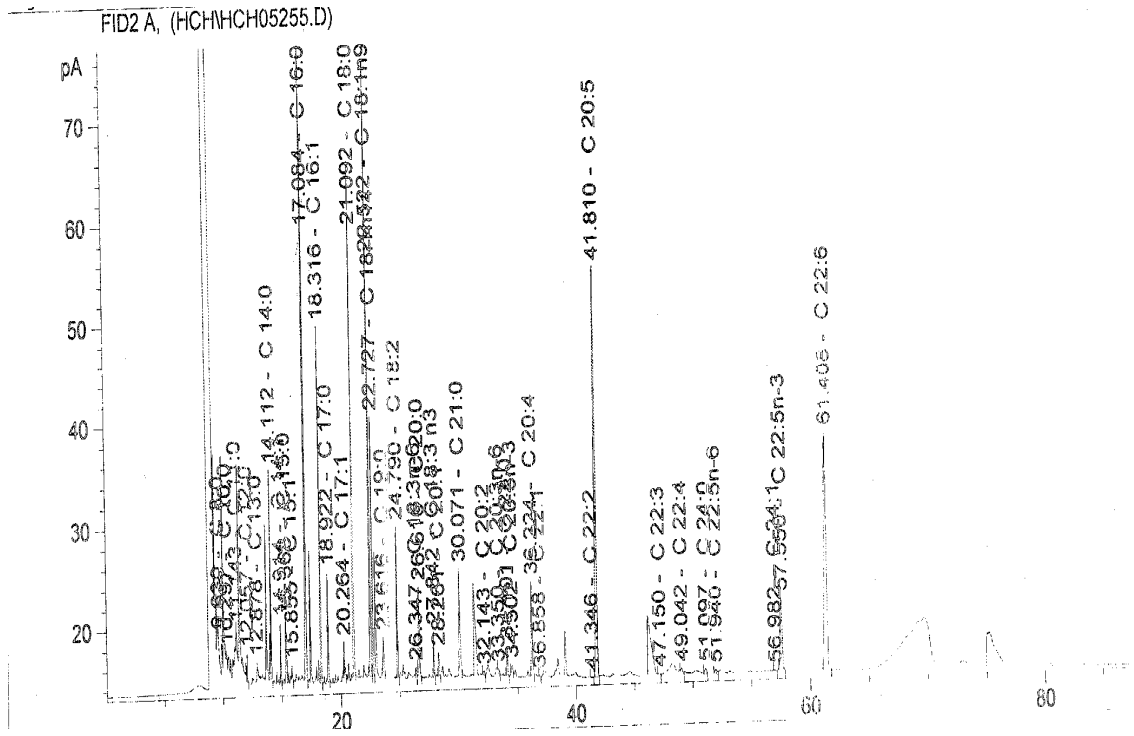


Şekil 33. *C. chalcoides*'in temmuz ayı (karaciğer) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.

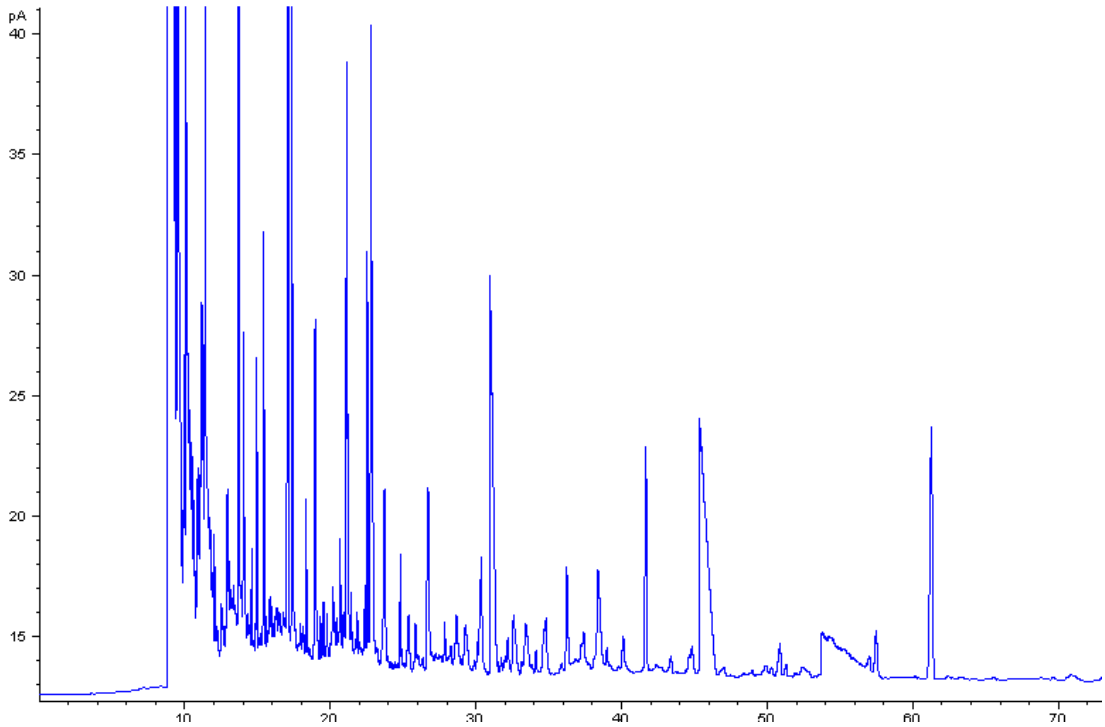
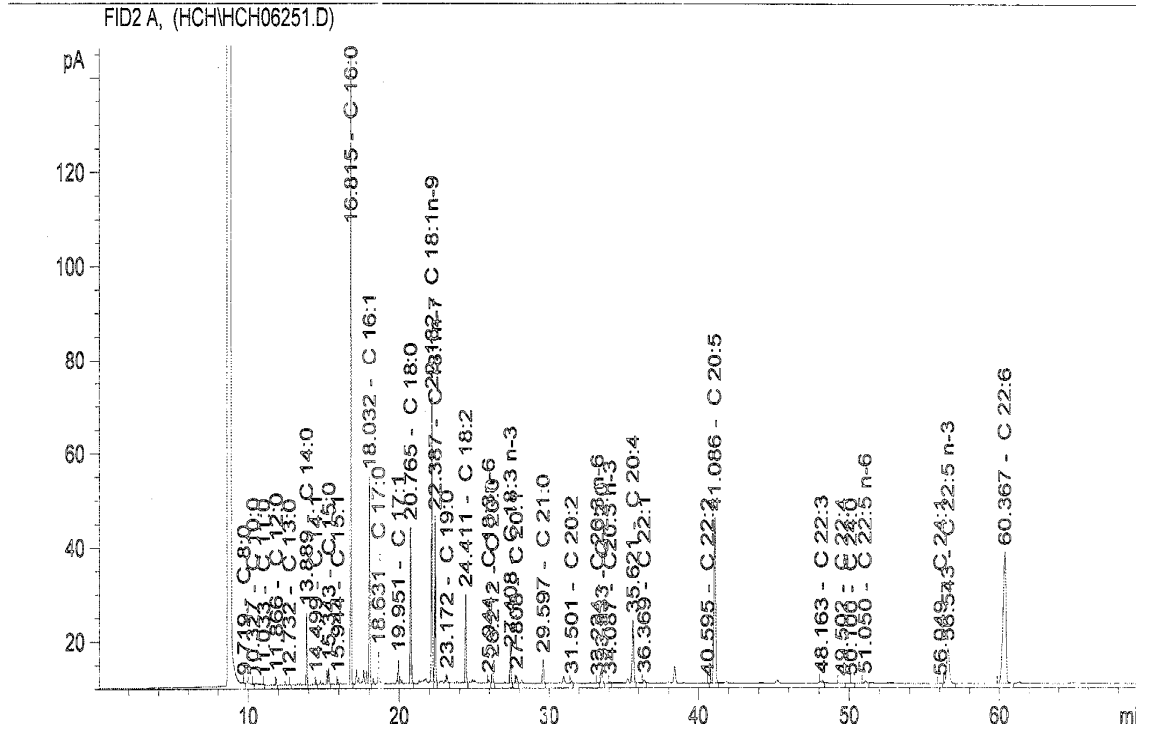


Şekil 34. *C. carpio*'nun temmuz ayı (yaz) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.

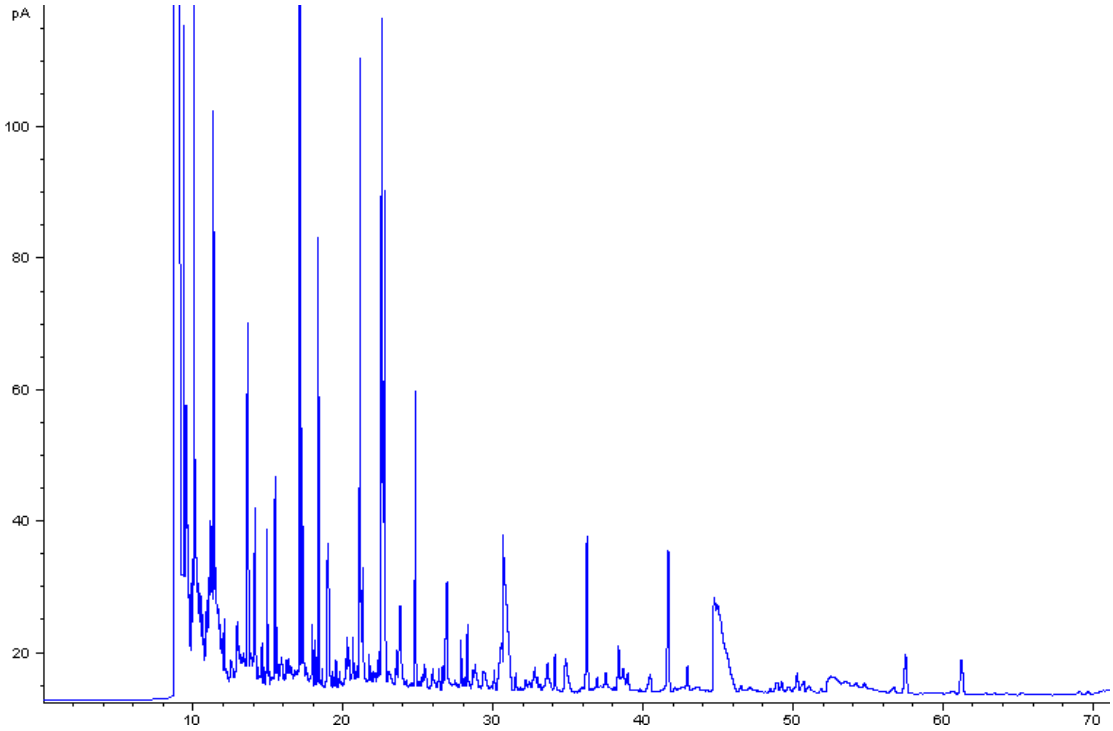
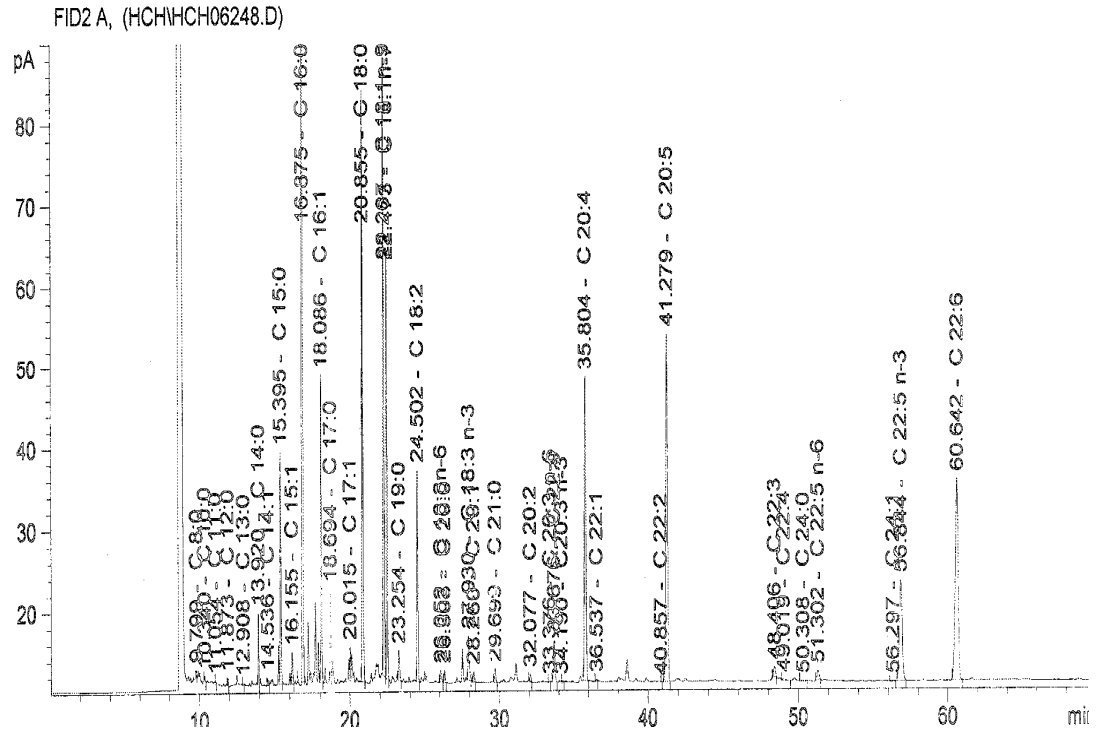




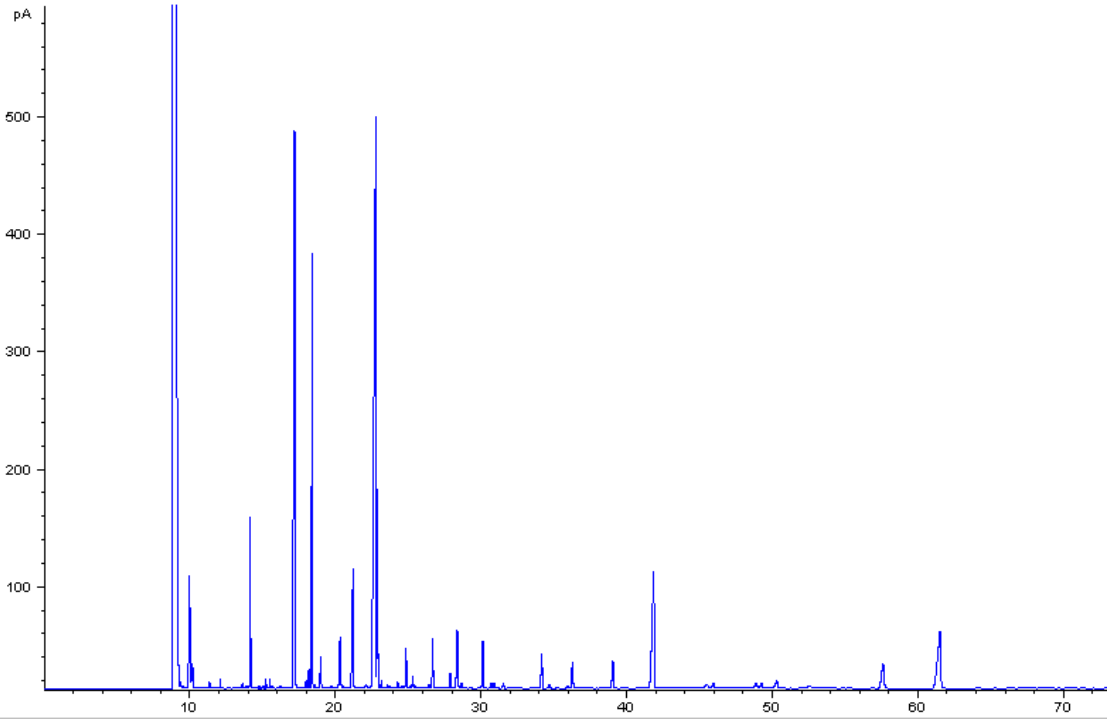
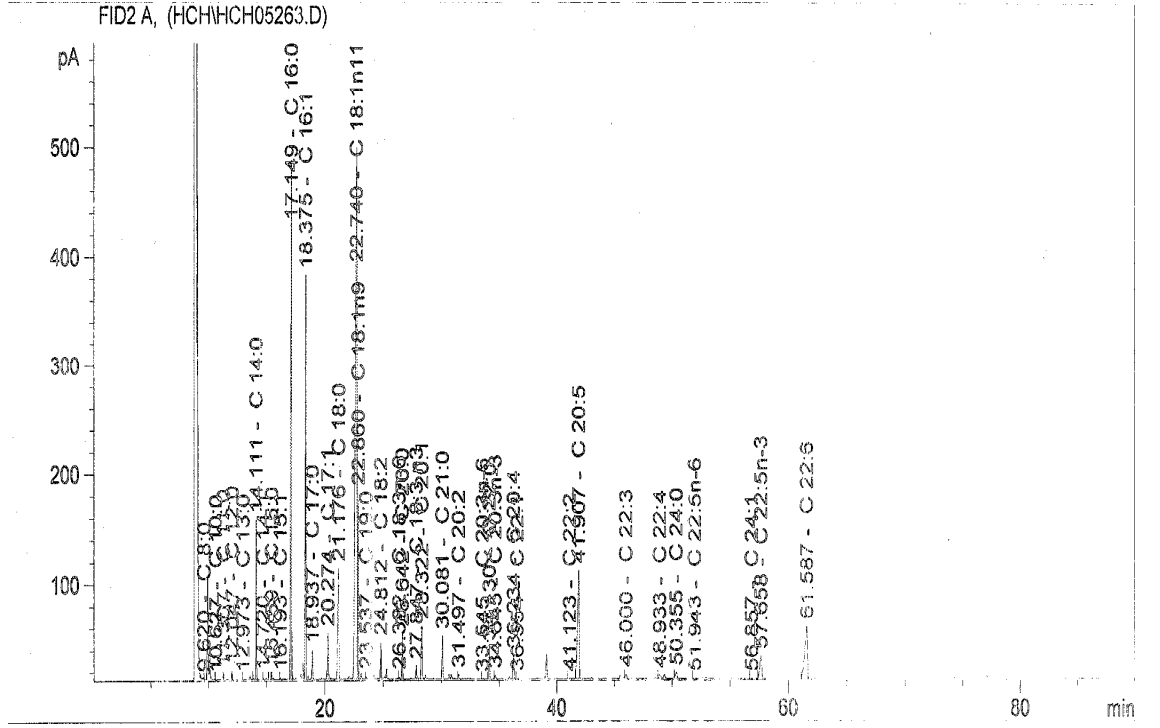
Şekil 35. *C. chalcoides*'in temmuz ayı (yaz) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



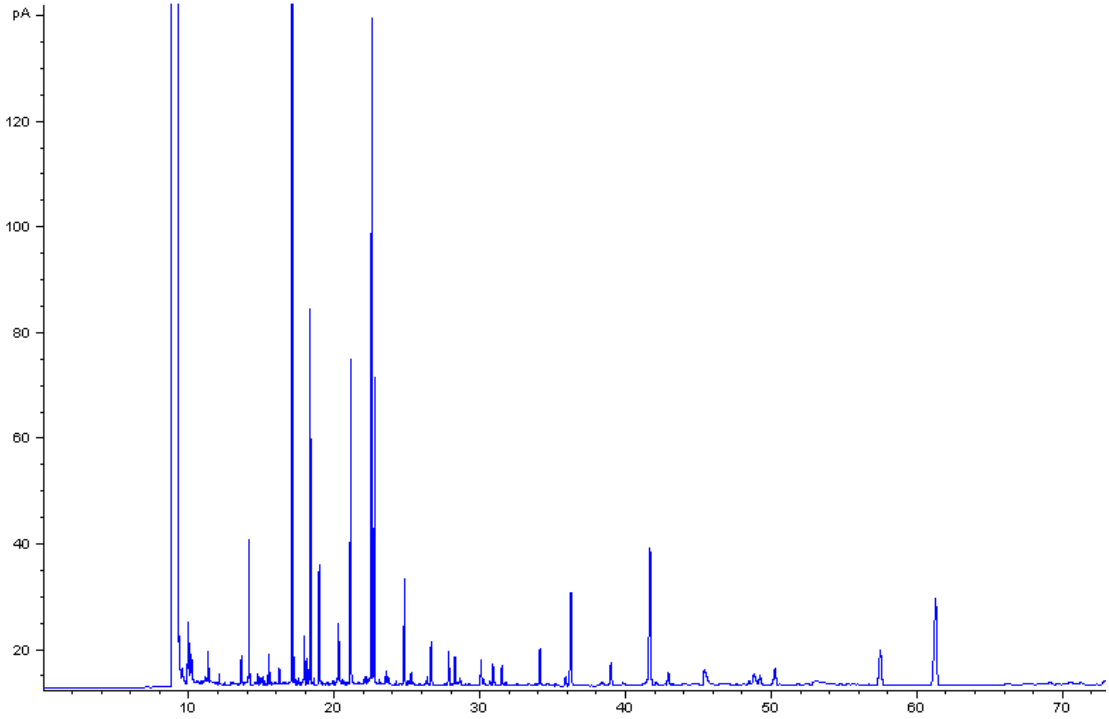
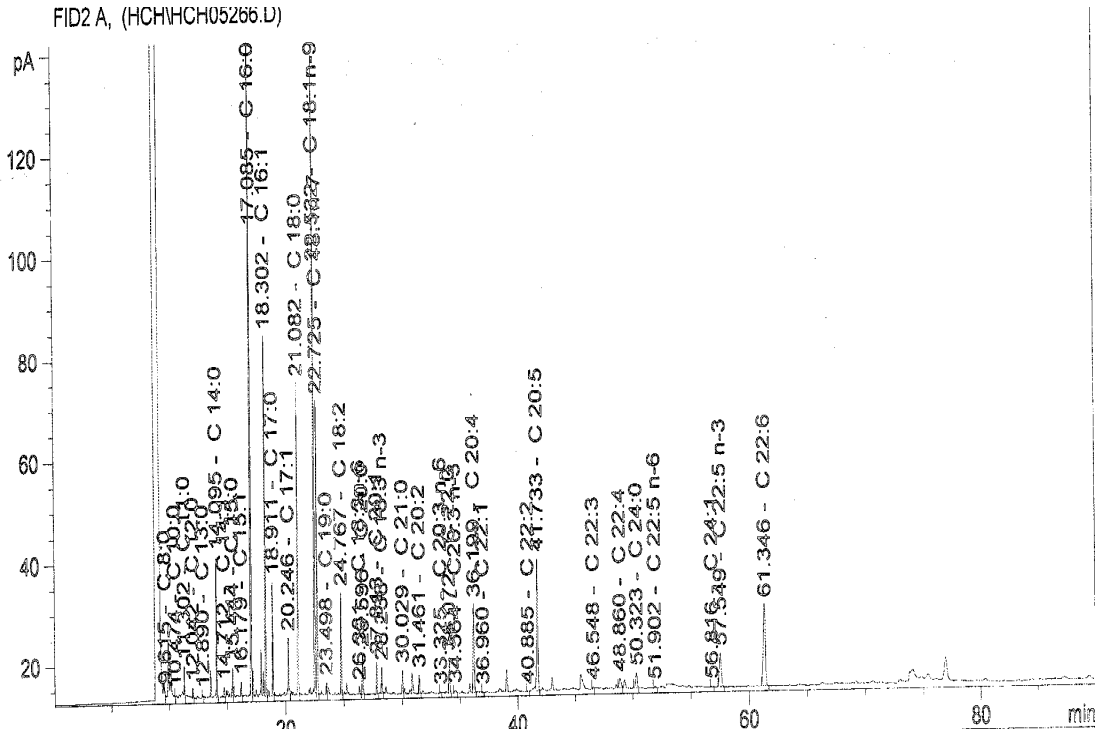
Şekil 36. *L. cephalus*'un temmuz ayı (yaz) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



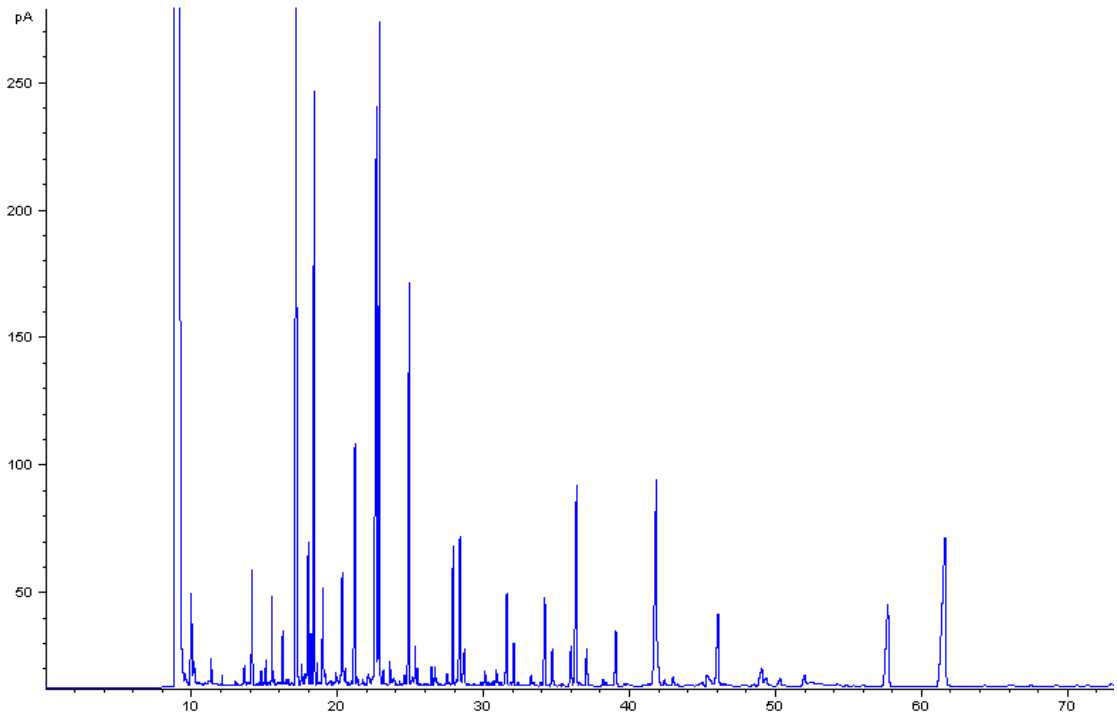
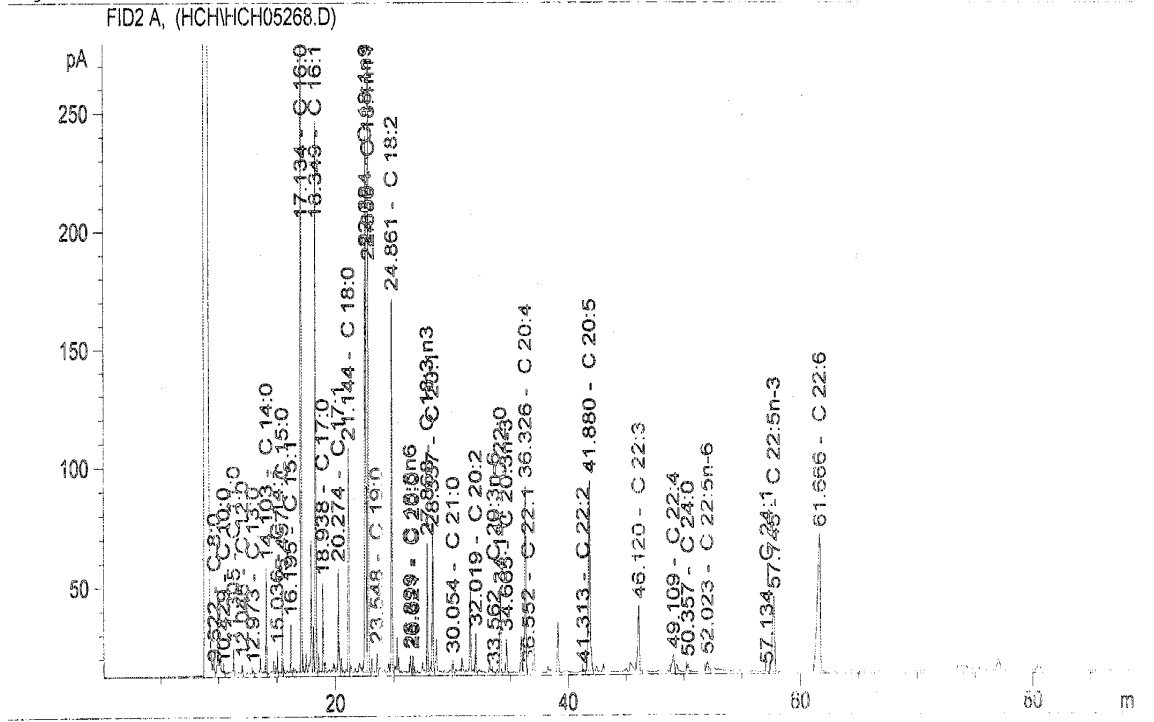
Şekil 37. *C. carpio*'nun Temmuz ayı (yaz) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



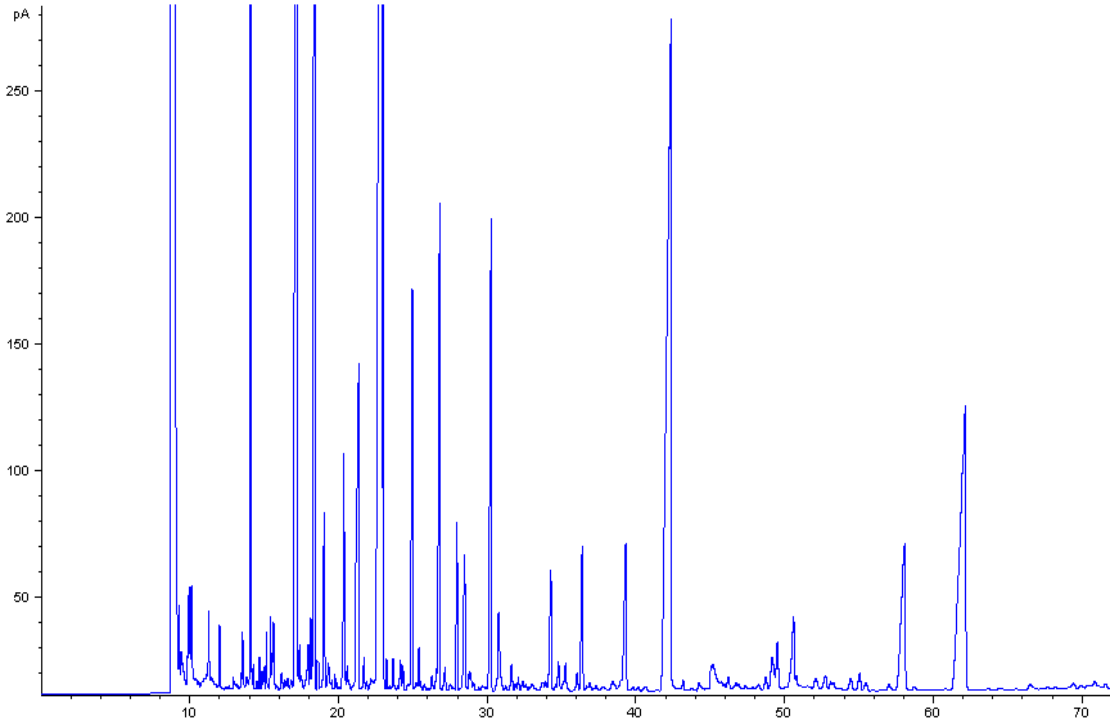
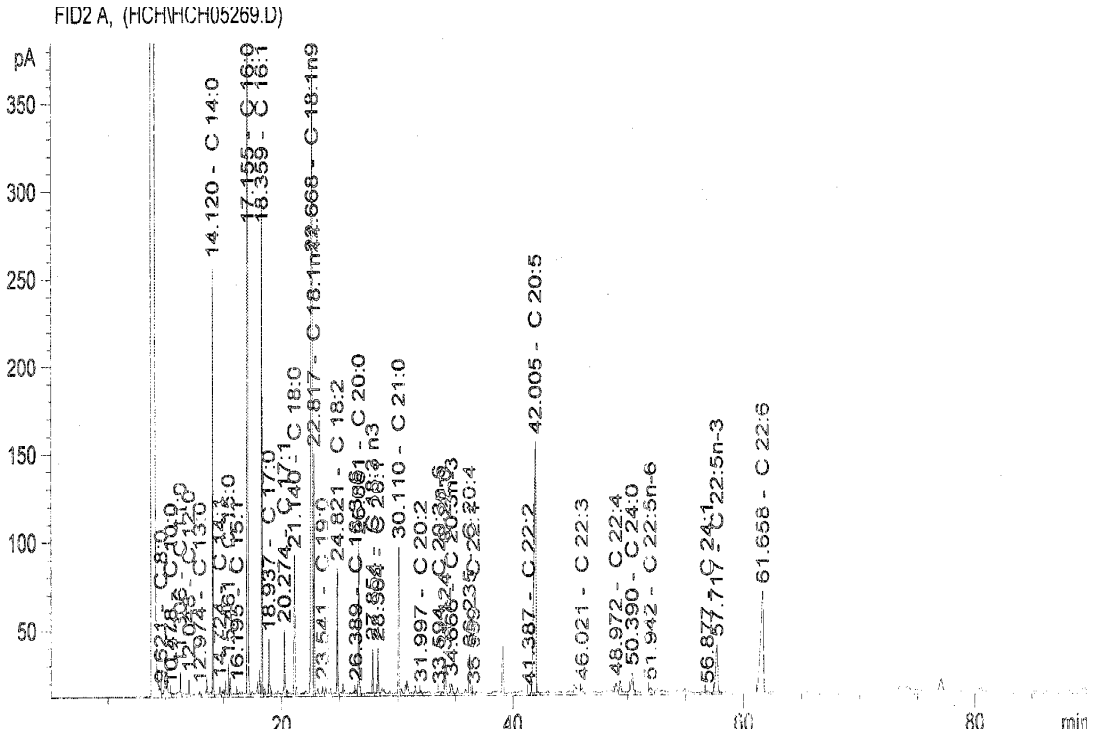
Şekil 38. *C. chalcoides*'in eylül ayı (sonbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



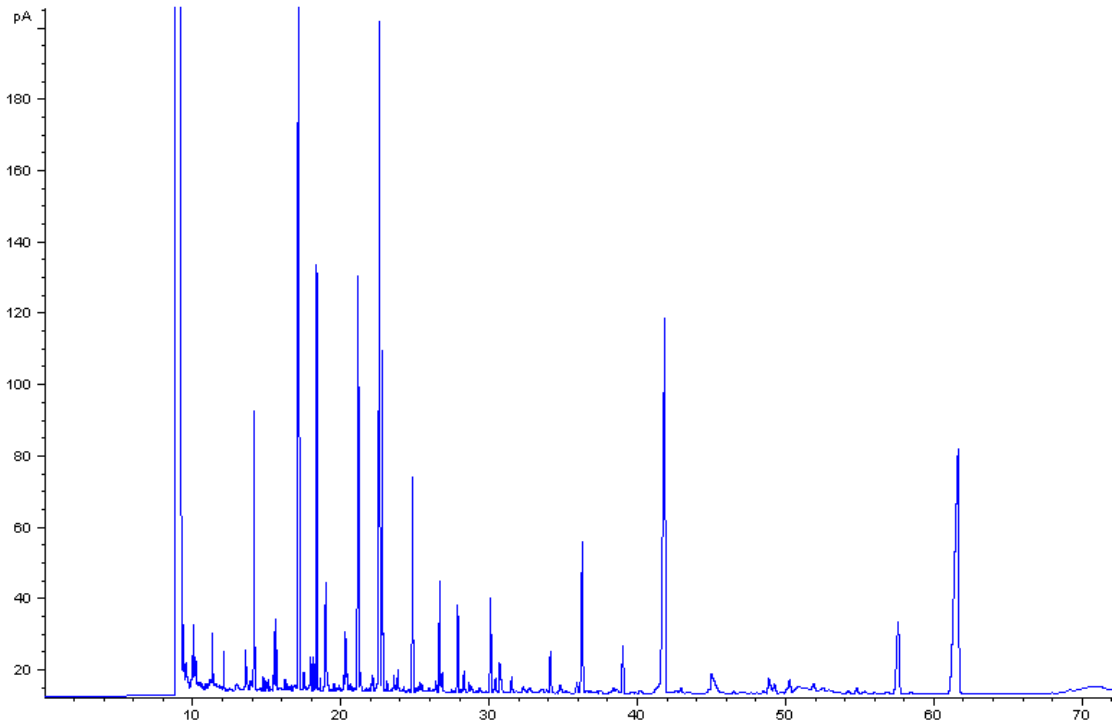
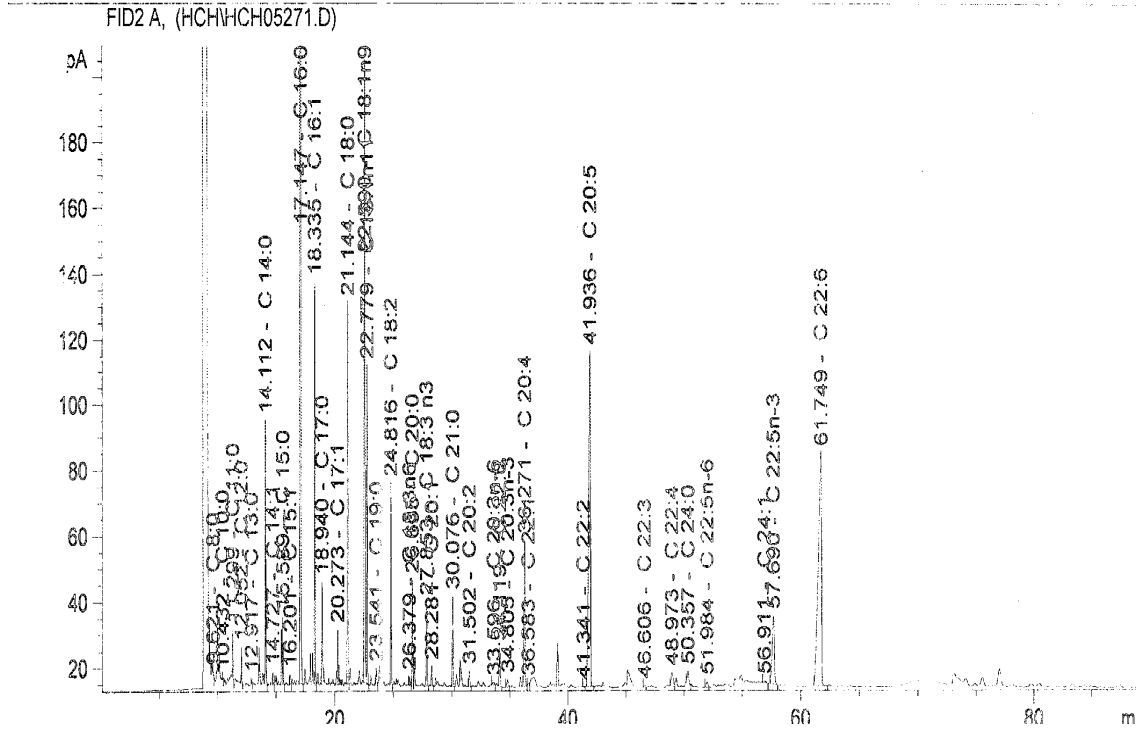
Şekil 39. *L. cephalus*'un eylül ayı (sonbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



Şekil 40. C. carpio'nun eylül ayı (sonbahar) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.

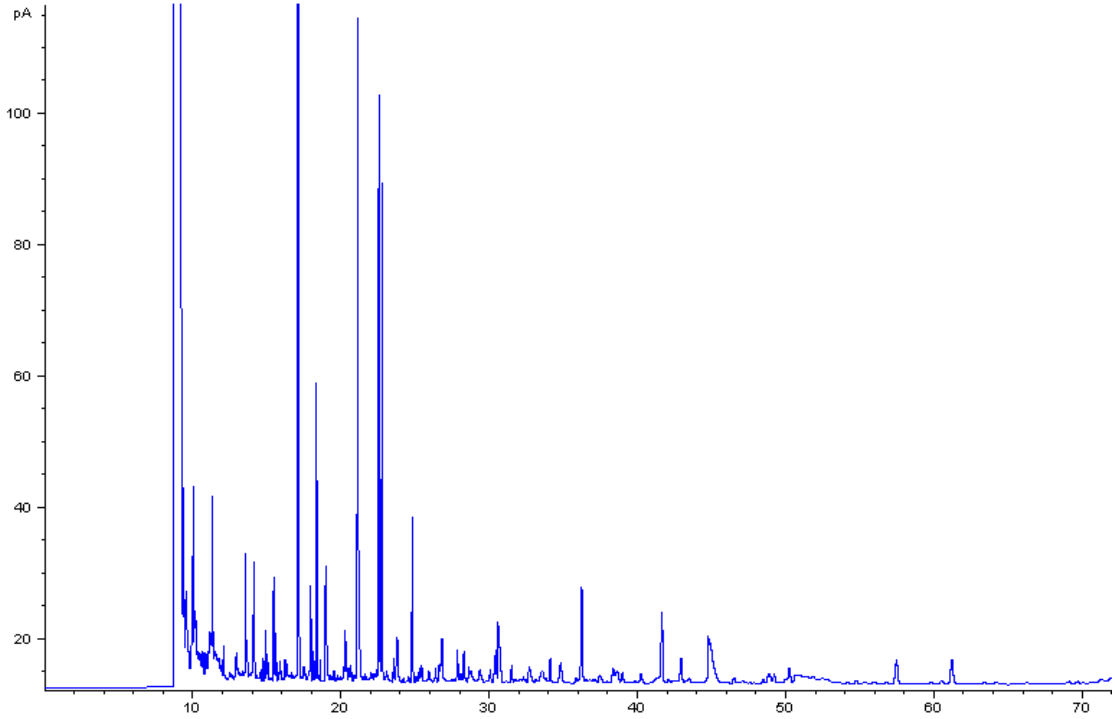
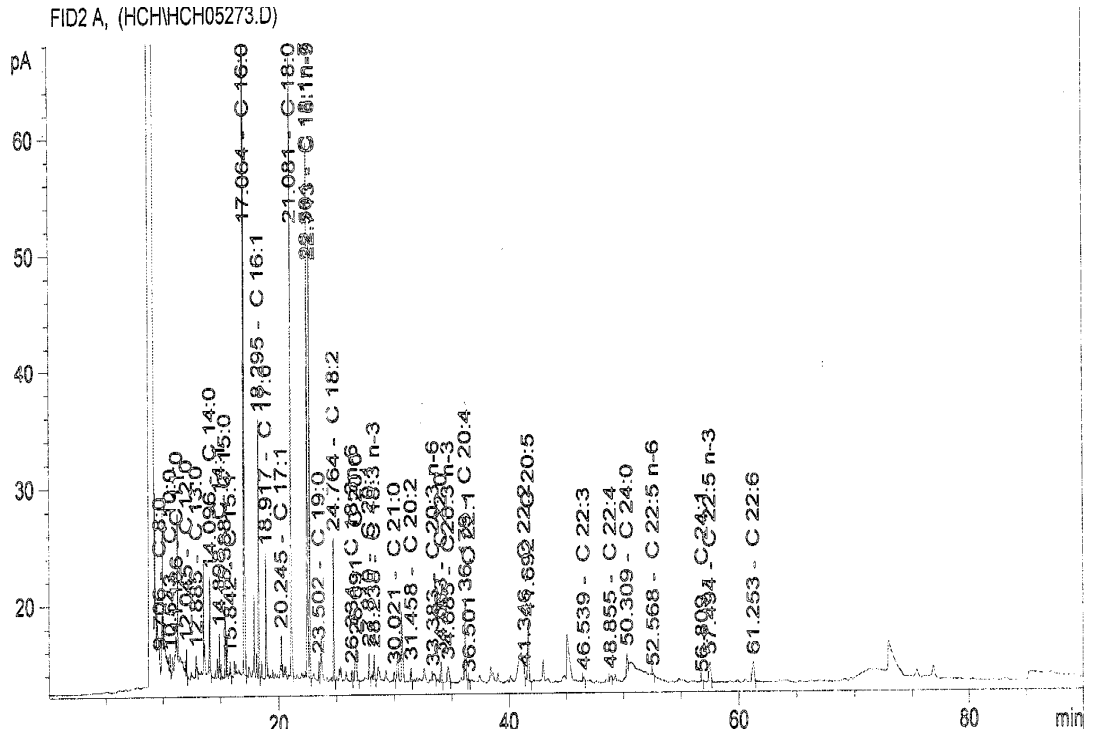


Şekil 41. *C. chalcoides*'in eylül ayı (sonbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı.

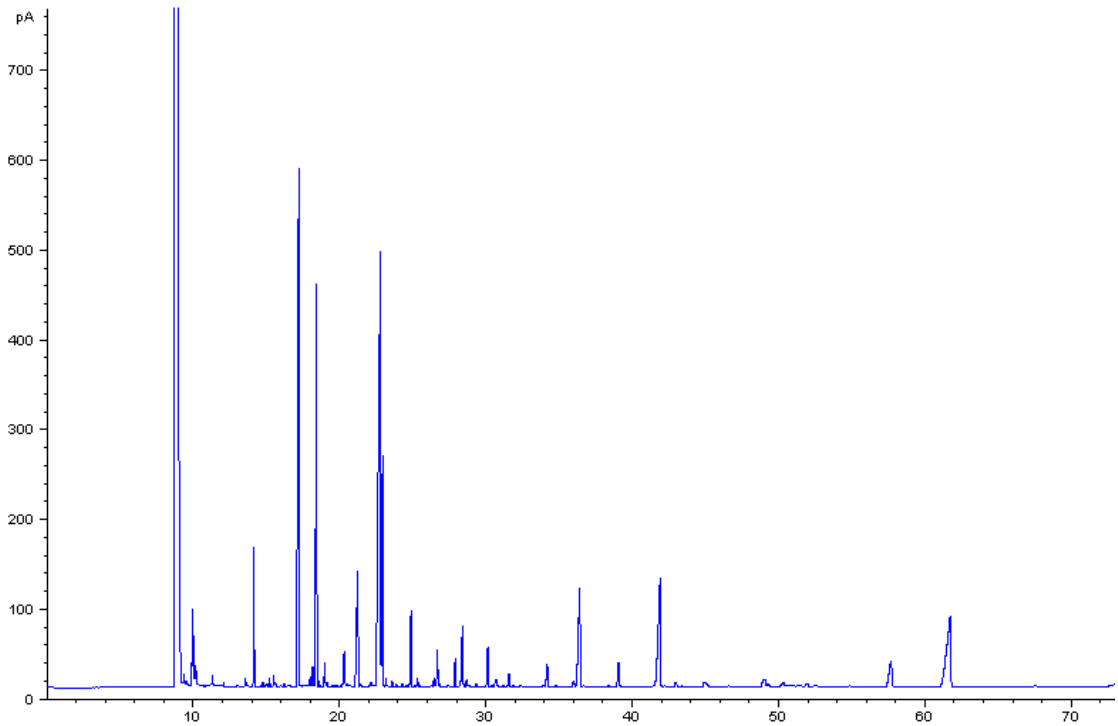
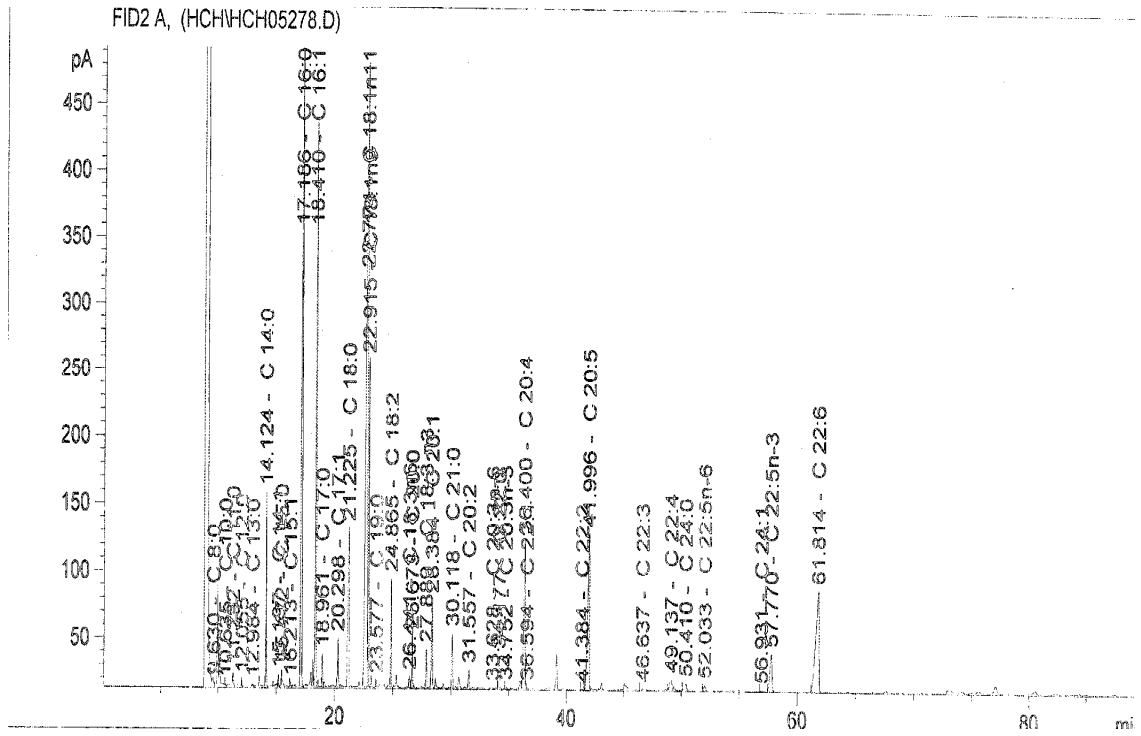


Şekil 42. *L. cephalus*'un eylül ayı (sonbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı

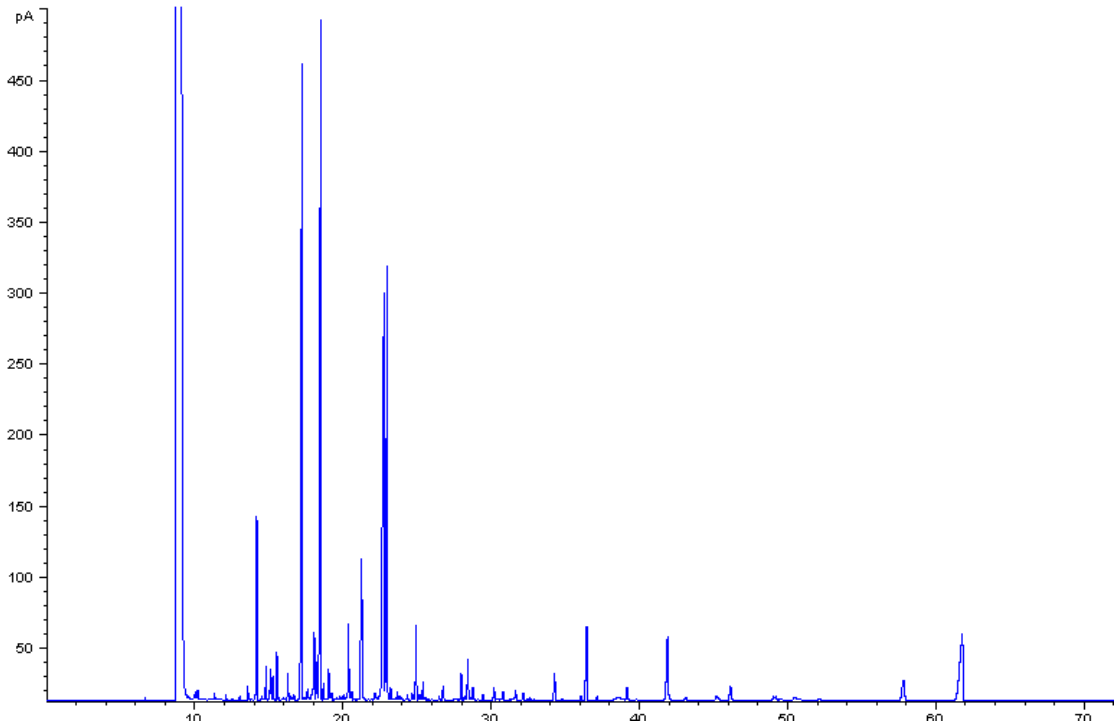
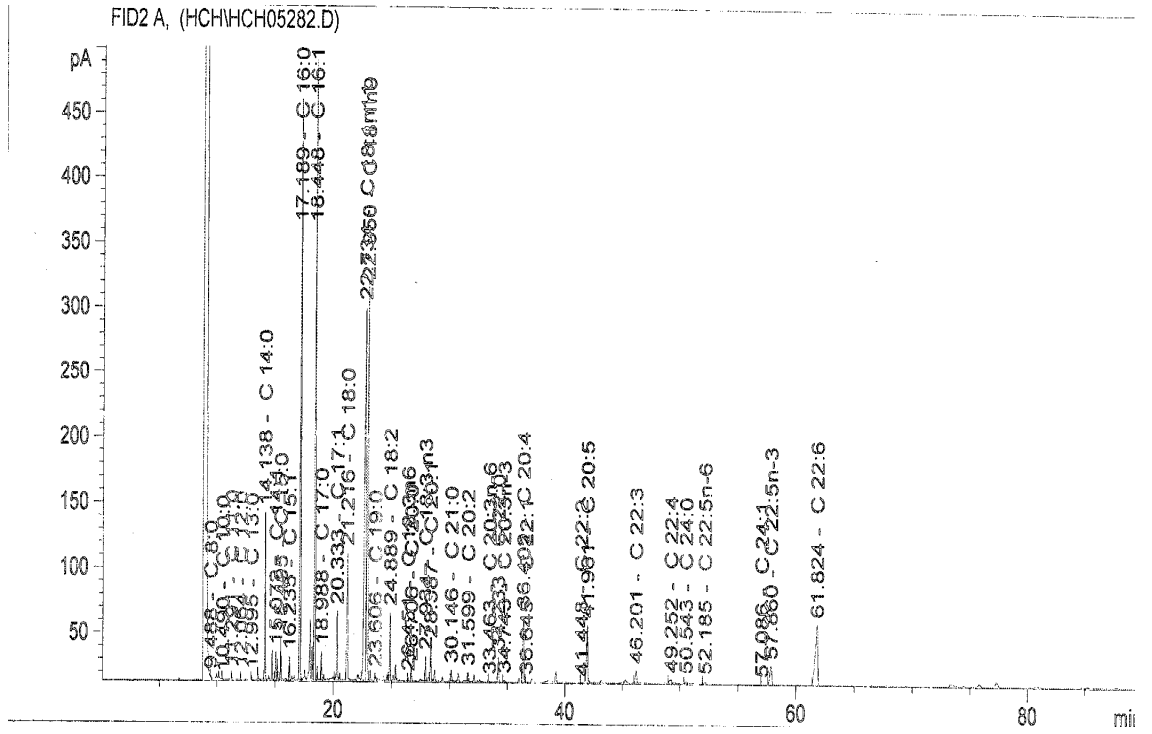




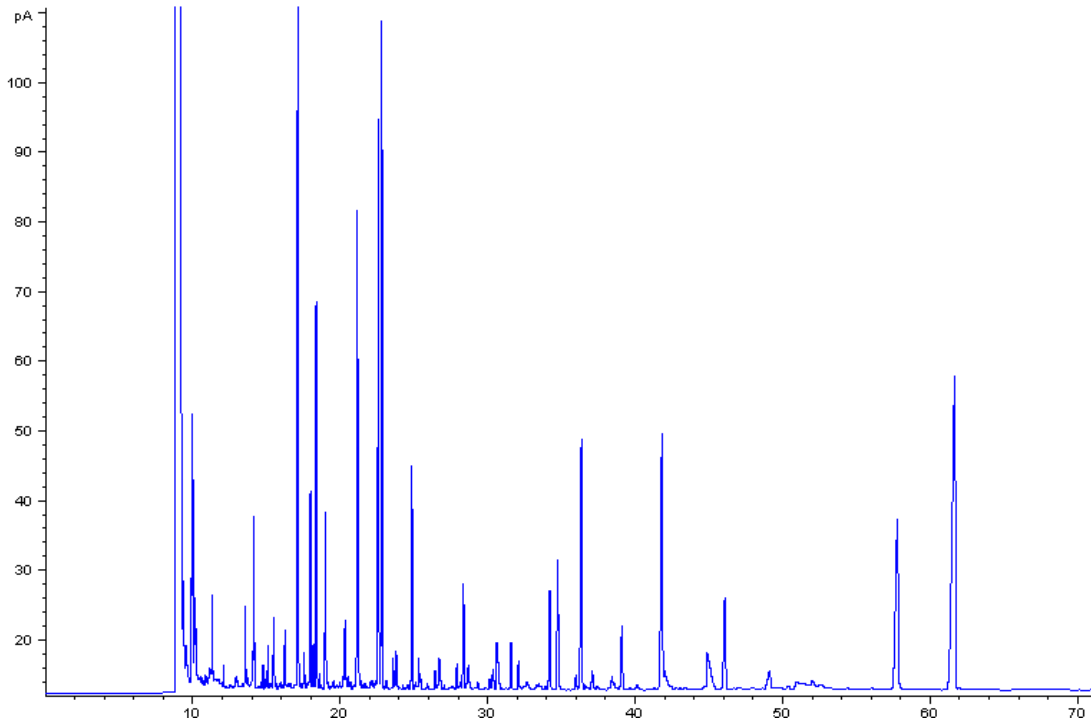
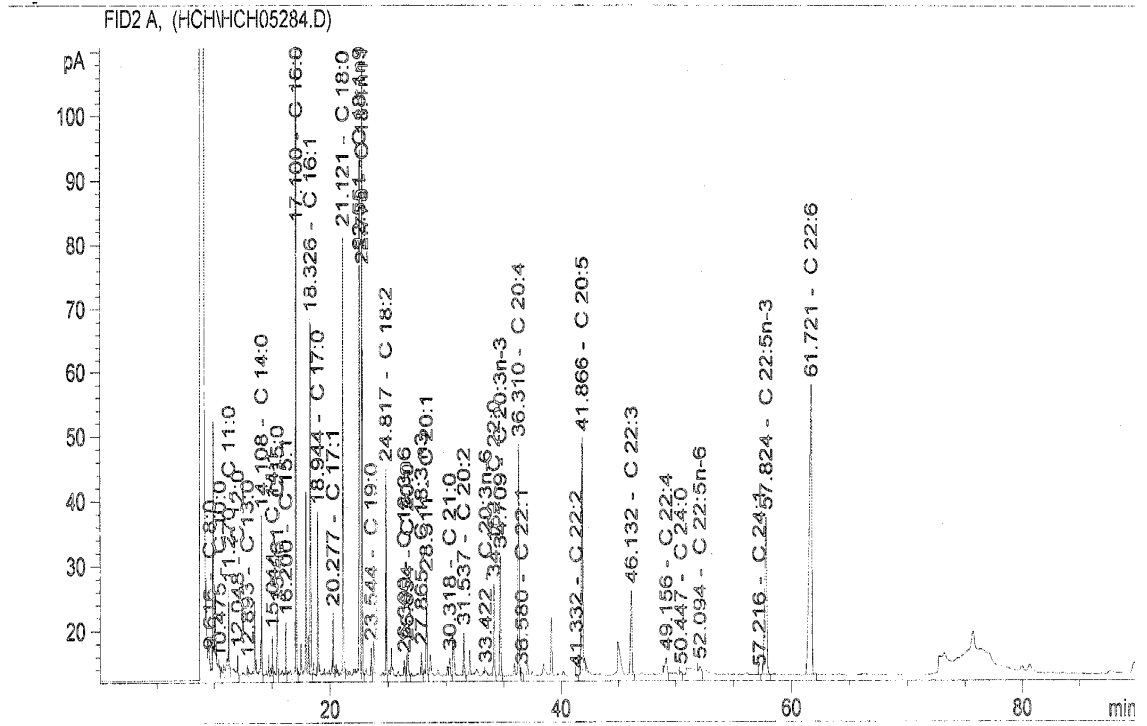
Şekil 43. *C. carpio*'nun eylül ayı (sonbahar) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



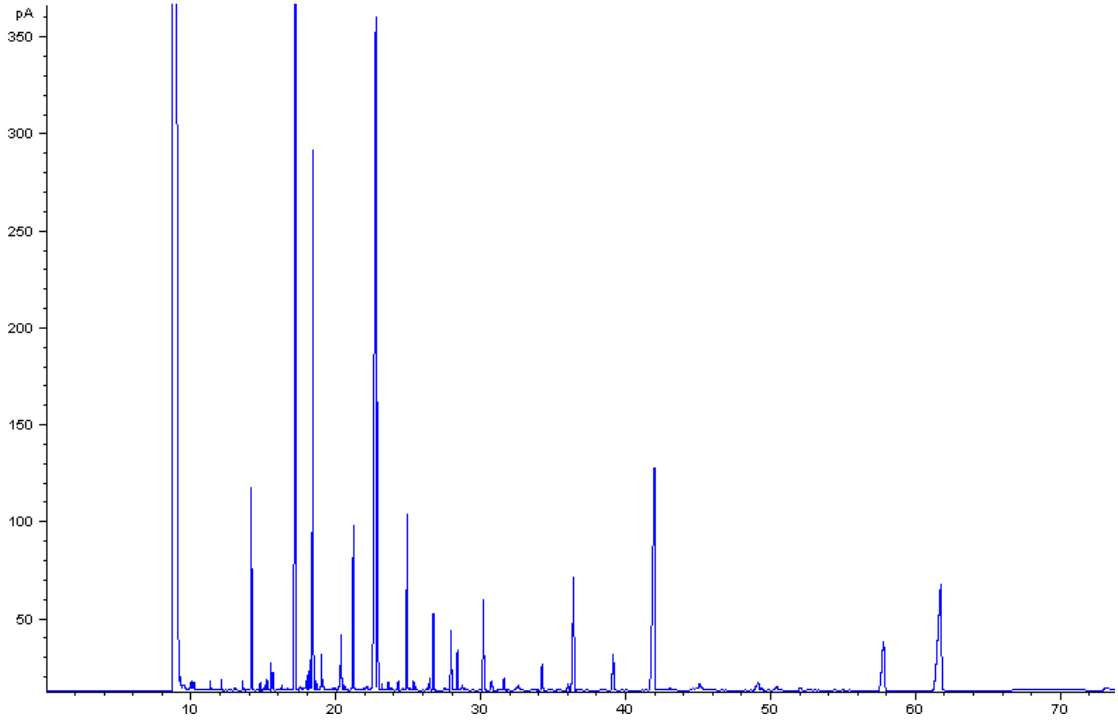
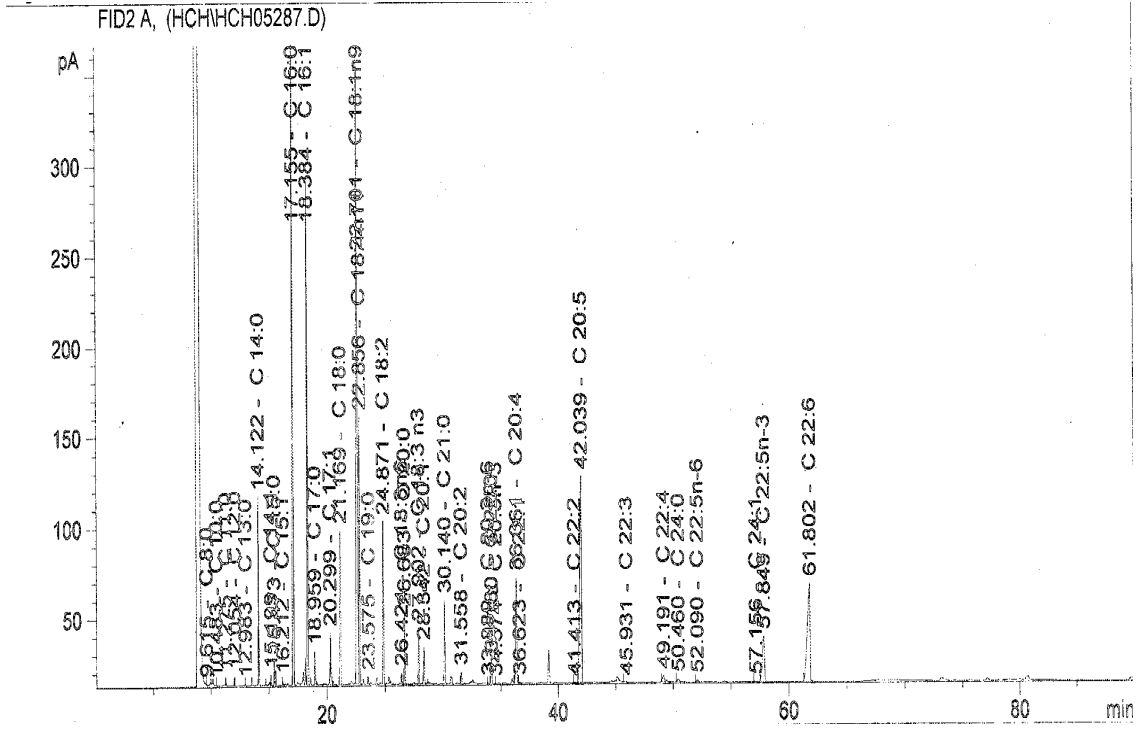
Şekil 44. *C. chalcoides*'in kasım ayı (kış) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



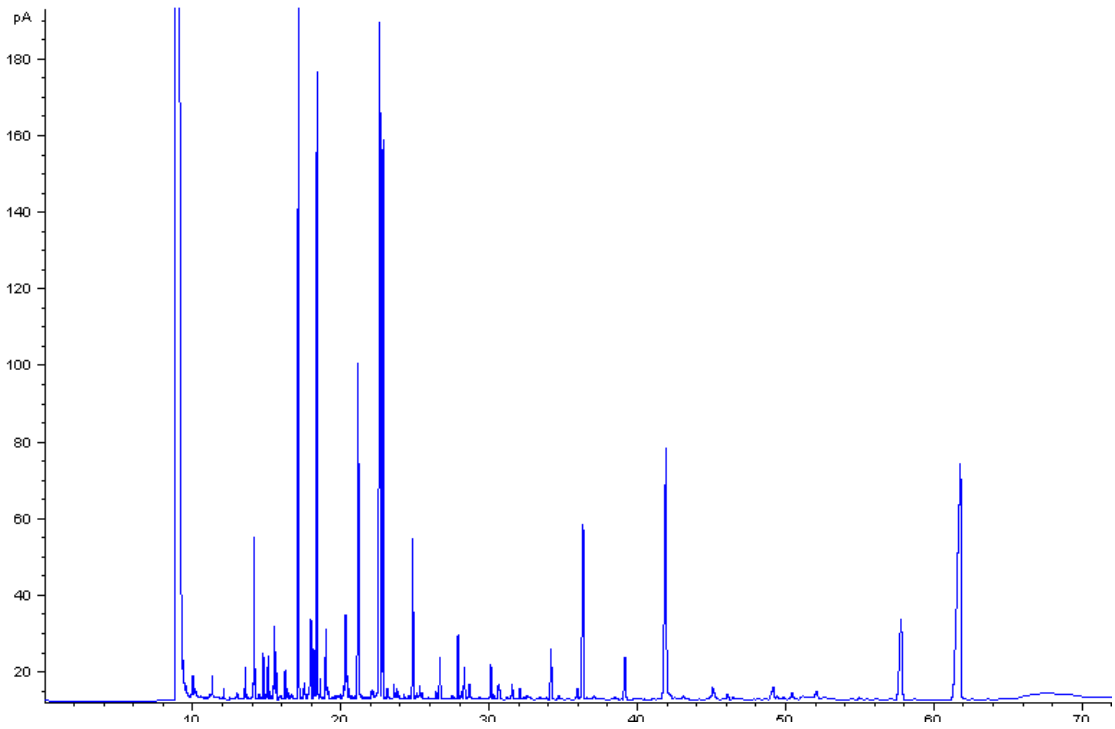
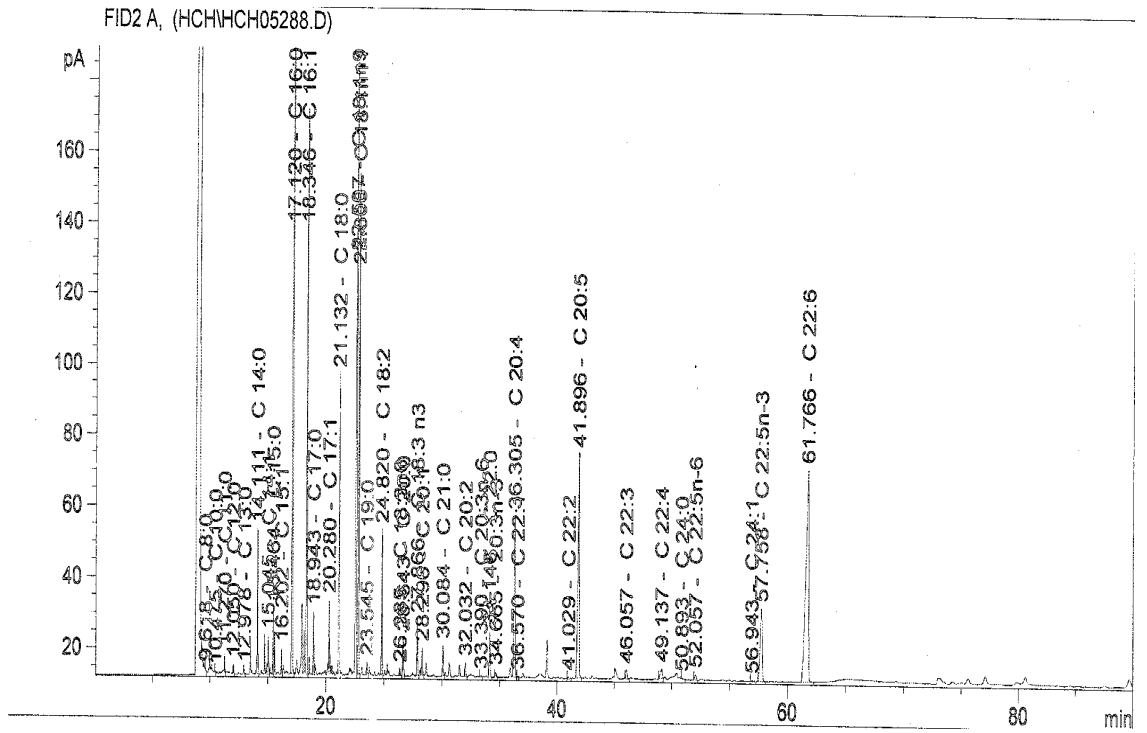
Şekil 45. *L. cephalus*'un kasım ayı (kış) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



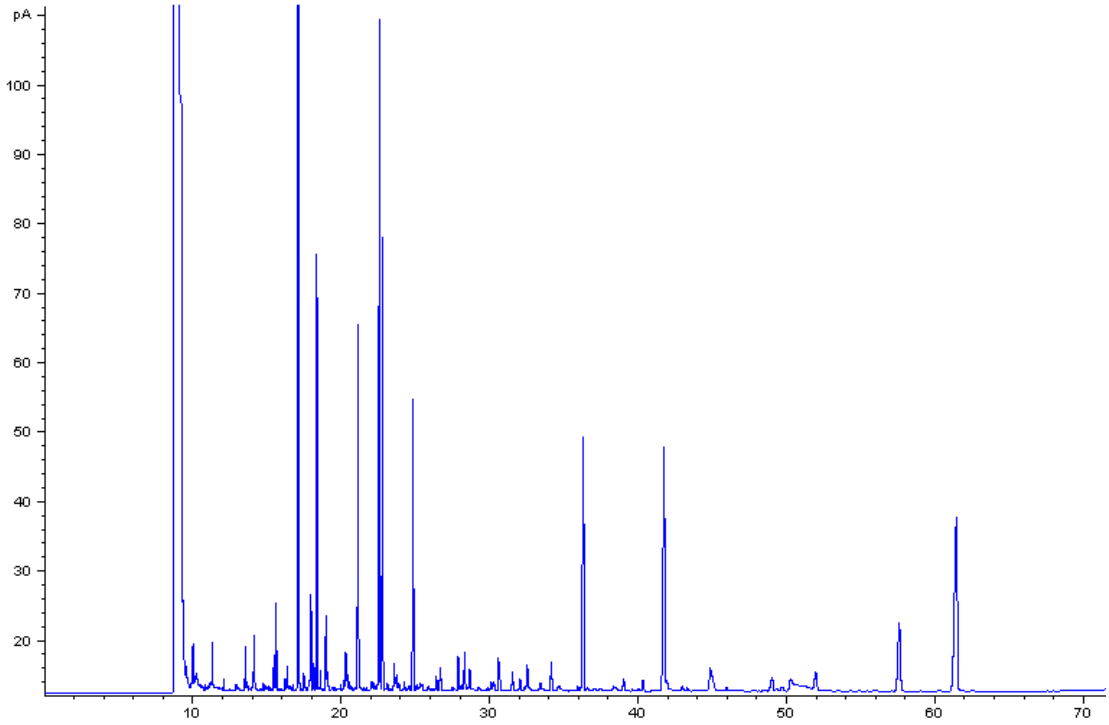
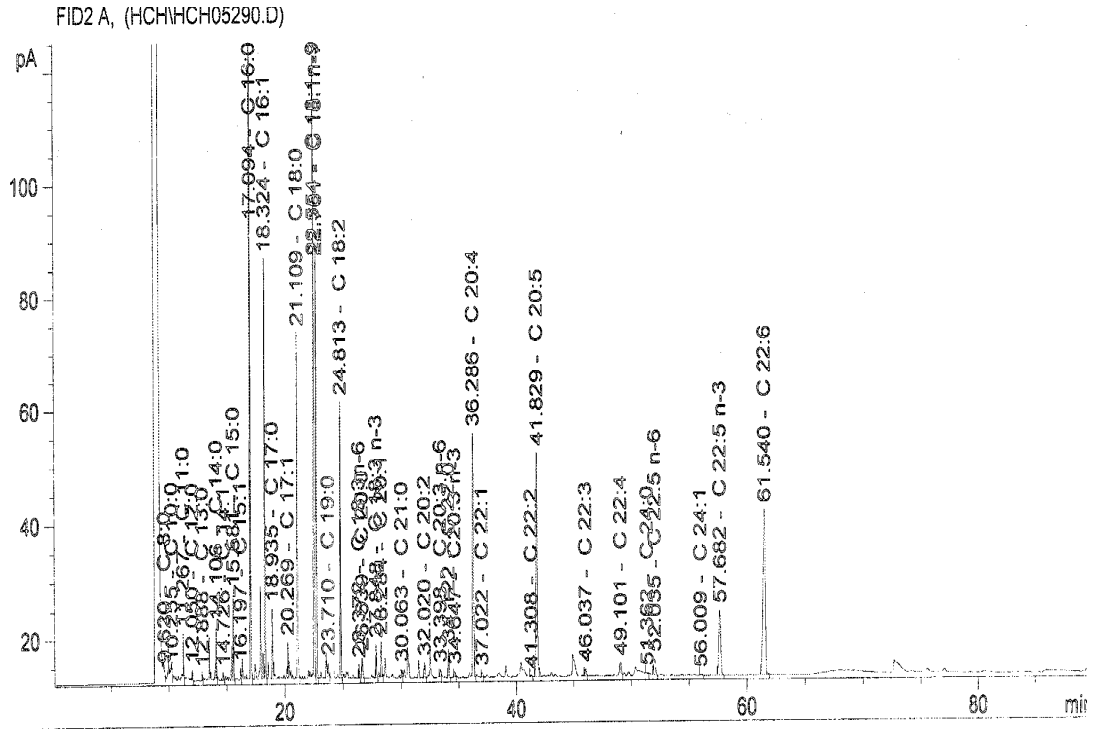
Şekil 46. *C. carpio*'nun kasım ayı (kış) karaciğer yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



Şekil 47. *C. chalcoides*'in kasım ayı (kış) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



Şekil 48. *L. cephalus*'un kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı.



Şekil 49. *C. carpio*'nun kasım ayı (kış) kas dokusu yağ asiti metil esterleri kromatogramı.

## 7. EK

### Ek 1: *C. chalcoides* karaciğer lipazının saflaştırma profili

Q sefaroz anyon değiştiricisi ile		
Uygulanan basamak	Protein miktarı mg/mL Ort±S.H.	Enzim aktivitesi μmol/mL.dk Ort±S.H.
<b>Bağlanmamış protein</b>		
1	0.004±0.01	0
2	0.005±0.00	0
3	0.005±0.01	0
4	0.112±0.03	0
5	0.634±0.09	0
6	1.974±0.10	0
7	2.80±0.08	0
8	2.91±0.18	0
9	1.30±0.07	0
10	0.534±0.04	0
<b>100 mM NaCl yıkaması</b>		
11	0.470±0.13	0
12	0.648±0.07	0
13	1.18±0.11	0
14	1.965±0.05	0
15	1.09±0.02	0
16	0.665±0.03	0
17	0.504±0.10	0
<b>200 mM NaCl yıkaması</b>		
18	0.302±0.14	0
19	0.287±0.06	0
20	0.732±0.12	0
21	0.804±0.05	0
22	0.641±0.07	0
23	0.418±0.03	0
24	0.30±0.01	0
<b>300 mM NaCl yıkaması</b>		
25	0.244±0.03	0
26	0.536±0.08	7.11±1.18
27	1.008±0.17	41.20±1.33
28	0.331±0.02	13.50±0.97
29	0.281±0.05	3.70±0.32
30	0.231±0.04	1.18±0.14
31	0.204±0.01	0.644±0.10
<b>400 mM NaCl yıkaması</b>		
32	0.196±0.06	0.317±0.06
33	0.440±0.08	0.102±0.07
34	0.386±0.04	0.075±0.01
35	0.274±0.01	0.010±0.01
36	0.228±0.02	0
37	0.202±0.01	0
38	0.168±0.00	0
<b>600 mM NaCl yıkaması</b>		
39	0.154±0.01	0



40	0.295±0.07	0
41	0.376±0.02	0
42	0.425±0.03	0
43	0.291±0.09	0
44	0.216±0.04	0
45	0.206±0.12	0
<b>800 mM NaCl yıkaması</b>		
46	0.142±0.00	0
47	0.647±0.05	0
48	1.936±0.15	0
49	1.533±0.19	0
50	0.902±0.04	0
51	0.693±0.01	0
52	0.675±0.14	0
<b>1000 mM NaCl yıkaması</b>		
53	0.414±0.06	0
54	0.632±0.02	0
55	0.322±0.03	0
56	0.210±0.10	0
57	0.185±0.00	0
58	0.161±0.00	0
59	0.121±0.01	0
60	0.106±0.01	0

<b>Q sefaroza sonrası sefakril S 200 HR ile karaciğer lipazının saflaştırılması</b>		
<b>Uygulanan basamak</b>	<b>Protein miktarı mg/mL</b>	<b>Enzim aktivitesi µmol/mL.dk</b>
	<b>Ort±S.H.</b>	<b>Ort±S.H.</b>
<b>20 mM denge tamponuyla yıkama</b>		
1	0.017±0.00	0
2	0.018±0.02	0
3	0.026±0.00	0
4	0.032±0.00	0
5	0.057±0.01	2.13±0.19
6	0.581±0.12	20.63±0.23
7	0.211±0.05	8.50±0.13
8	0.066±0.02	0.93±0.07
9	0.041±0.02	0
10	0.033±0.04	0
11	0.028±0.01	0
12	0.03±0.02	0
13	0.03±0.01	0
14	0.018±0.00	0
15	0.016±0.00	0
16	0.011±0.00	0
17	0.011±0.01	0
18	0.01±0.00	0
19	0.008±0.00	0
20	0.008±0.01	0

<b>Sefakril S 200 sonrası fenil sefaroza CL-4B ile karaciğer lipazının saflaştırılması</b>		
<b>Uygulanan basamak</b>	<b>Protein miktarı mg/mL Ort±S.H.</b>	<b>Enzim aktivitesi µmol/mL.dk Ort±S.H.</b>
<b>Bağlanmamış kesit (150 mM Amonyum sülfatla yıkama)</b>		
1	0.004±0.00	0
2	0.004±0.00	0
3	0.004±0.01	0
4	0.005±0.00	0
5	0.006±0.01	0
6	0.007±0.01	0
7	0.029±0.03	0.187±0.06
8	0.009±0.01	0
9	0.008±0.00	0
10	0.009±0.00	0
11	0.008±0.00	0
12	0.011±0.02	0
<b>% 10 izopropanol yıkaması</b>		
13	0.01±0.00	0
14	0.01±0.00	0
15	0.006±0.00	0
16	0.005±0.00	0
<b>% 20 izopropanol yıkaması</b>		
17	0.005±0.01	0
18	0.005±0.00	0
19	0.005±0.00	0
20	0.003±0.00	0
<b>% 50 izopropanol yıkaması</b>		
21	0.006±0.01	0
22	0.007±0.00	0.013±0.02
23	0.033±0.06	1.744±0.10
24	0.012±0.01	0.0371±0.07
25	0.007±0.01	0
26	0.007±0.00	0
27	0.008±0.00	0
28	0.006±0.00	0
29	0.004±0.00	0
30	0.041±0.03	0
31	0.075±0.01	0
32	0.034±0.03	0
33	0.027±0.01	0
34	0.019±0.01	0
35	0.011±0.00	0
36	0.01±0.00	0
37	0.01±0.00	0
38	0.009±0.00	0
39	0.006±0.01	0
40	0.007±0.00	0

**EK 2: *L. cephalus* karaciğer lipazının saflaştırma profili**

<b>Q sefaroz anyon değiştiricisi ile saflaştırma</b>		
<b>Uygulanan basamak</b>	<b>Protein miktarı mg/mL Ort±S.H.</b>	<b>Enzim aktivitesi μmol/mL.dk Ort±S.H.</b>
<b>Bağlanmamış kesit</b>		
1	0.007±0.00	0
2	0.008±0.00	0
3	0.013±0.01	0
4	0.253±0.04	0
5	0.724±0.16	0
6	0.984±0.13	0
7	0.875±0.08	0
8	0.613±0.03	0
9	0.370±0.05	0
10	0.304±0.09	0
<b>100 mM NaCl yıkaması</b>		
11	0.332±0.03	0
12	0.413±0.11	0
13	2.53±0.18	0
14	1.57±0.14	0
15	2.06±0.07	0
16	1.01±0.10	0
<b>200 mM NaCl yıkaması</b>		
17	0.493±0.06	0
18	0.410±0.01	0
19	0.367±0.12	0
20	0.797±0.07	0
21	0.818±0.16	0
22	0.574±0.13	0
<b>300 mM NaCl yıkaması</b>		
23	0.420±0.08	0
24	0.326±0.04	0
25	0.248±0.09	0
26	0.660±0.13	9.613±0.18
27	1.047±0.10	54.97±1.42
28	0.641±0.08	12.91±0.33
<b>400 mM NaCl yıkaması</b>		
29	0.318±0.04	5.13±0.15
30	0.219±0.02	4.92±0.10
31	0.218±0.03	2.39±0.17
32	0.458±0.08	1.84±0.22
33	0.515±0.10	0.447±0.13
34	0.361±0.14	0.034±0.08
<b>600 mM NaCl yıkaması</b>		
35	0.268±0.04	0
36	0.234±0.01	0
37	0.205±0.01	0
38	0.377±0.06	0
39	0.423±0.01	0
40	0.329±0.02	0

**800 mM NaCl yıkaması**

41	0.215±0.00	0
42	0.169±0.01	0
43	0.192±0.01	0
44	0.627±0.07	0
45	2.420±0.18	0
46	1.212±0.15	0

**1000 mM NaCl yıkaması**

47	0.391±0.06	0
48	0.205±0.02	0
49	0.212±0.05	0
50	0.150±0.00	0
51	0.170±0.06	0
52	0.142±0.05	0
53	0.140±0.02	0
54	0.136±0.00	0
55	0.130±0.01	0
56	0.101±0.00	0
57	0.092±0.02	0
58	0.063±0.02	0
59	0.060±0.01	0
60	0.055±0.00	0

**Q sefaroz sonrası sefakril S 200 HR ile karaciğer lipazının saflaştırılması**

Uygulanan basamak	Protein miktarı mg/mL	Enzim aktivitesi µmol/mL.dk
	Ort±S.H	Ort±S.H
<b>20 mM denge tamponuyla yıkama</b>		
1	0.029±0.03	0
2	0.027±0.01	0
3	0.014±0.01	0
4	0.014±0.02	0
5	0.012±0.00	0
6	0.012±0.03	0
7	0.808±0.19	16.38±0.72
8	0.702±0.07	28.699±2.46
9	0.255±0.04	4.038±0.64
10	0.109±0.08	0.865±0.27
11	0.056±0.03	0
12	0.036±0.05	0
13	0.027±0.01	0
14	0.023±0.01	0
15	0.016±0.01	0
16	0.011±0.02	0
17	0.010±0.00	0
18	0.011±0.01	0
19	0.011±0.02	0
20	0.010±0.01	0

<b>Sefakril S 200 sonrası fenil sefaroz CL-4B ile karaciğer lipazının saflaştırılması</b>		
<b>Uygulanan basamak</b>	<b>Protein miktarı mg/mL Ort±S.H</b>	<b>Enzim aktivitesi µmol/mL.dk Ort±S.H</b>
<b>Bağlanmamış kesit (150 mM amonyum sülfat uygulaması)</b>		
1	0.006±0.01	0
2	0.010±0.01	0
3	0.005±0.00	0
4	0.005±0.00	0
5	0.066±0.07	0.087±0.05
6	0.034±0.09	0
7	0.008±0.01	0
8	0.012±0.01	0
9	0.014±0.00	0
10	0.008±0.01	0
11	0.005±0.01	0
12	0.005±0.00	0
<b>% 10 izopropanol yıkaması</b>		
13	0.005±0.01	0
14	0.007±0.01	0
15	0.006±0.00	0
16	0.006±0.00	0
17	0.007±0.00	0
<b>% 20 izopropanol yıkaması</b>		
18	0.004±0.00	0
19	0.004±0.00	0
20	0.004±0.00	0
21	0.006±0.01	0
22	0.005±0.00	0
<b>% 50 izopropanol yıkaması</b>		
23	0.004±0.00	0
24	0.036±0.04	1.851±0.24
25	0.011±0.02	0.899±0.20
26	0.010±0.00	0
27	0.009±0.01	0
28	0.009±0.00	0
29	0.009±0.01	0
30	0.006±0.00	0
31	0.006±0.00	0
32	0.005±0.01	0
33	0.004±0.00	0
34	0.118±0.11	0
35	0.098±0.08	0
36	0.084±0.10	0
37	0.032±0.02	0
38	0.026±0.05	0
39	0.014±0.02	0
40	0.015±0.03	0

**EK 3: *C. carpio* karaciğer lipazının saflaştırma profili**

<b>Q sefaroza anyon değiştiricisi ile saflaştırma</b>		
<b>Uygulanan basamak</b>	<b>Protein miktarı mg/mL Ort±S.H</b>	<b>Enzim aktivitesi μmol/mL.dk Ort±S.H</b>
<b>Bağlanmamış kesit</b>		
1	0.02±0.00	0
2	0.03±0.00	0
3	0.04±0.00	0
4	0.023±0.03	0
5	0.548±0.08	0
6	2.660±0.21	0
7	2.940±0.18	0
8	2.850±0.14	0
9	1.119±0.20	0
10	0.692±0.08	0
<b>100 mM NaCl yıkaması</b>		
11	0.501±0.11	0
12	0.409±0.13	0
13	0.789±0.07	0
14	1.261±0.14	0
15	0.933±0.10	0
16	0.574±0.07	0
<b>200 mM NaCl yıkaması</b>		
17	0.451±0.11	0
18	0.396±0.16	0
19	0.661±0.12	0
20	1.101±0.09	0.118±0.10
21	0.833±0.07	1.45±0.14
22	0.779±0.23	0.745±0.05
<b>300 mM NaCl yıkaması</b>		
23	0.575±0.14	0.432±0.12
24	0.515±0.10	0.365±0.14
25	0.384±0.08	1.04±0.22
26	0.317±0.17	1.157±0.18
27	0.729±0.22	25.97±1.07
28	0.769±0.28	26.29±1.48
29	0.317±0.10	7.57±0.62
<b>400 mM NaCl yıkama</b>		
30	0.335±0.11	4.089±0.36
31	0.257±0.08	2.90±0.27
32	0.198±0.06	0.469±0.09
33	0.203±0.08	0.0121±0.02
34	0.40±0.16	0
35	0.393±0.20	0
<b>500 mM NaCl yıkaması</b>		
36	0.317±0.14	0
37	0.250±0.10	0
38	0.201±0.15	0
39	0.175±0.07	0

40	0.334±0.04	0
41	0.497±0.21	0
<b>600 mM NaCl yıkaması</b>		
42	0.406±0.06	0
43	0.318±0.04	0
44	0.253±0.10	0
45	0.214±0.04	0
46	0.197±0.02	0
47	0.351±0.09	0
48	0.802±0.22	0
<b>800 mM NaCl yıkaması</b>		
49	0.880±0.17	0
50	0.699±0.11	0
51	0.533±0.06	0
52	0.405±0.03	0
53	0.316±0.07	0
54	2.967±0.26	0
<b>1000 mM NaCl yıkaması</b>		
55	1.928±0.19	0
56	0.578±0.23	0
57	0.298±0.08	0
58	0.179±0.02	0
59	0.144±0.06	0
60	0.135±0.11	0

<b>Q sefaroz sonrası sefakril S 200 HR ile karaciğer lipazının saflaştırılması</b>		
<b>Uygulanan basamak</b>	<b>Protein miktarı</b>	<b>Enzim aktivitesi</b>
<b>20 mM denge tamponuyla</b>	<b>mg/mL</b>	<b>µmol/mL.dk</b>
<b>yıkama</b>	<b>Ort.±S.H</b>	<b>Ort.±S.H</b>
1	0.024±0.05	0
2	0.024±0.03	0
3	0.033±0.06	0
4	0.046±0.04	0.021±0.01
5	0.599±0.16	39.18±1.93
6	0.383±0.08	18.00±1.04
7	0.043±0.03	1.560±0.61
8	0.038±0.07	0.014±0.01
9	0.034±0.01	0
10	0.030±0.03	0
11	0.026±0.01	0
12	0.025±0.00	0
13	0.030±0.02	0
14	0.024±0.01	0
15	0.020±0.01	0
16	0.011±0.01	0
17	0.05±0.00	0
18	0.05±0.01	0
19	0.04±0.00	0
20	0.04±0.00	0

<b>Sefakril S 200 sonrası fenil sefaroz CL-4B ile karaciğer lipazının saflaştırılması</b>		
<b>Uygulanan basamak</b>	<b>Protein miktarı mg/mL Ort.±S.H.</b>	<b>Enzim aktivitesi µmol/mL.dk Ort.±S.H.</b>
<b>Bağlanmamış kesit (150 mM amonyum sülfat yıkaması)</b>		
1	0.004±0.00	0
2	0.005±0.01	0
3	0.008±0.01	0
4	0.016±0.03	0
5	0.052±0.08	0
6	0.047±0.06	0.356±0.13
7	0.024±0.03	0
8	0.018±0.02	0
9	0.014±0.01	0
10	0.014±0.00	0
11	0.011±0.01	0
12	0.010±0.01	0
<b>% 10 izopropanol yıkaması</b>		
13	0.011±0.01	0
14	0.010±0.00	0
15	0.014±0.02	0
16	0.006±0.00	0
17	0.005±0.00	0
18	0.007±0.01	0
19	0.007±0.00	0
<b>% 20 izopropanol yıkaması</b>		
20	0.005±0.01	0
21	0.005±0.00	0
22	0.003±0.00	0
23	0.005±0.00	0
24	0.006±0.01	0
<b>% 50 izopropanol yıkaması</b>		
25	0.009±0.00	0.049±0.02
26	0.026±0.03	2.35±0.24
27	0.015±0.01	0.949±0.11
28	0.004±0.00	0
29	0.004±0.00	0
30	0.003±0.00	0
31	0.022±0.02	0
32	0.088±0.05	0
33	0.031±0.09	0
34	0.020±0.00	0
35	0.014±0.01	0
36	0.010±0.01	0
37	0.010±0.00	0
38	0.009±0.01	0
39	0.008±0.01	0
40	0.008±0.00	0



## ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel Bilgiler**

Adı Soyadı	Salih Görgün
Doğum Yeri ve Yılı	Sivas, 1981
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 58140 Sivas, TÜRKİYE
E-posta Adresi	sgorgun@cumhuriyet.edu.tr

### **Akademik ve Eğitim Durumu**

Lise	Sivas Atatürk Lisesi (1998)
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2003)
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (2006)
Doktora	Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (2011)

### **İş Tecrübesi**

Cumhuriyet Üniversitesi Biyoloji Bölümü	Araştırma Görevlisi, 2004-
---	----------------------------

### **Ödüller, Teşvikler ve Üyelikler**

Yükseköğretim Kurumu	Yurtdışı Doktora Tezi Araştırma Bursu
TUBİTAK	Yurtdışı Bilimsel Yayınları Teşvik