



**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNI ANABİLİM DALI**

**FARKLI AMİNOASİTLERLE ZENGİNLESTİRİLMİŞ
ARTEMIA NAUPLI'LERİ İLE BESLENEN ÇİPURA BALIĞI
(*Sparus auratus*, Linneaus1758)'NİN SİNDİRİM HORMONLARI
VE ENZİMLERİNDEKİ DEĞİŞİMLER**

MEHMET NAZ

DOKTORA TEZİ

**ANTAKYA
SUBAT-2007**

ÖZET

**FARKLI AMİNOASİTLERLE ZENGİNLESTİRİLMİŞ
ARTEMIA NAUPLİ'LERİ İLE BESLENEN ÇİPURA BALIĞI
(*Sparus auratus*, Linneaus1758)'NİN SİNDİRİM HORMONLARI VE
ENZİMLERİNDEKİ DEĞİŞİMLER**

Bu çalışmada, çipura(*Sparus auratus*) larvalarının 28. günden 40. güne kadar sindirim hormonları ve enzimleri üzerine serbest aminoasitlerin etkileri her biri 4 günlük 4 periyotta incelenmiştir. Aynı zamanda çipura larvalarının 24. güne kadar olan enzimsel aktiviteleri de standart besleme protokolü ile gözlenmiştir. Ayrıca sindirim kapasitesinin iyi bir indikatörü olmasından dolayı aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranları hesaplanmıştır. Deneme başlamadan önce, yumurtadan çıkan keseli larvalar 300 litrelik 9 adet tanka tesadüfi olarak dağıtılmış ve 15. güne kadar rotifer, 24. güne kadar *Artemia* naupli ve daha sonra balık larvaları için esansiyel olarak bilinen farklı bireysel aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenmişlerdir. Deneme grupları histidin, lösin, isolösin, lisin, metiyonin, fenilalanin, treonin, valin ve kontrol(serbest aminoasit zenginleştirmesiz) grubudur.

IV. periyotta, en iyi larval ağırlık ve boy sırasıyla isolösin ve fenilalanin serbest aminoasit gruplarından elde edilmiştir($P<0.05$). Enterosistlerin sitozolünde bulunan lösin-alanin peptidaz aktivitesi tüm gruplarda çalışma boyunca yüksek bulunmuştur. IV. periyotta kontrol grubunda gözlenen lösin-alanin peptidaz aktivitesi, serbest aminoasit gruplarınıninkinden daha yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). Muamele gruplarının ortalamaları açısından en düşük lösin-alanin peptidaz aktivitesini kontrol grubu göstermiştir. IV. periyotta lösin, fenilalanin, isolösin, lisin ve valin grupları aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranı bakımından iyi bir sindirim kapasitesi göstermiştir. Buna karşılık muamele gruplarının ortalamaları açısından en iyi sindirim kapasitesinin kontrol grubunda olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Tripsin enzim aktivitesinin larvanın yaşına bağlı olarak I. periyot'a kadar arttığı gözlenmiştir. Tripsin'in besinsel adaptasyonunu kontrol eden mekanizmanın III. periyot'a kadar etkin olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, farklı serbest aminoasitlerle zenginleştirilmiş canlı yemlerle larval besleme, bombesin (GRP) ve kolesistokinin (CCK)'in hormonal aktivitelerine katkıda bulunmuştur ($P<0.05$).

2007, 97 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Sparus auratus*, bombesin, kolesistokinin, lösin-alanin peptidaz, alkalın fosfataz , aminopeptidaz N, tripsin, *Artemia* naupli

ABSTRACT

THE CHANGES IN DIGESTIVE ENZYMES AND HORMONES OF GILTHEAD SEA BREAM LARVAE (*Sparus auratus*, L 1758) FED ON ARTEMIA NAUPLI ENRICHED WITH DIFFERENT AMINO ACIDS

The effects of free amino acids on the digestive hormones and enzymes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) from day 28th to day 40th were investigated in 4 periods, 4 days each. Enzymatic activities of gilthead seabream larvae were also observed by applying a standard feeding protocol until day 24th. Moreover, the ratios of leucine-alanine peptidase (lap/leu-ala) were calculated because it is a good indicator of the digestive capacity. Prior to initiation of the experiment, newly hatched yolk-sac larvae were randomly distributed into each of nine 300-liter tanks and fed with rotifer until day 15th after then with *Artemia* nauplii until day 24th. After day 24th, seabream larvae were fed on *Artemia* nauplii enriched with the different individual amino acids that known as the indispensable for fish larvae. Experimental groups were histidine, leucine, isoleucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, valine and control (without free amino acid enriched).

In period IV, the best larval weight and length were obtained in isoleucine and phenylalanine free amino acid groups, respectively ($P < 0.05$). The activities of the leu-ala peptidase located in the cytosol of enterocytes were high in all groups through the entire study. Leu-ala peptidase level observed in the control group was higher than that of free amino acid enriched groups, especially, in IV. period ($P < 0.05$). The control group showed the lowest leu-ala peptidase activities comparing the average of treatment groups. Leucine, phenylalanine, isoleucine, lysine and valine groups showed good digestive capacity in IV. period with respect to lap/leu-ala peptidase ratios. However, control group showed the best digestive capacity compared to averages of the treatment groups ($P < 0.05$). An increase in tryptic enzyme activity was observed as a function of the larval age from the beginning until I. period. The results revealed that the mechanism controlling the adaptation of trypsin activity depending on the amount of free amino acids were inactive until III. period. It might be concluded according to the results of the present study that the larval feeding on live prey enriched with different essential amino acids stimulate the hormonal activity of bombesin (GRP) and cholecystokinin (CCK) ($P < 0.05$).

2007, 97 pages

Key words: *Sparus auratus*, bombesin, cholecystokinin, leucine-alanine peptidase, alkaline phosphatase, aminopeptidase N, trypsin, *Artemia* naupli

ÖNSÖZ

Doktora tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın danışman hocam Doç.Dr. Mustafa TÜRKMEN'e, bilgi ve deneyimlerini bizden esirgemeyen Sayın hocam Prof.Dr. Ihsan AKYURT'a, istatistik konularında tecrübelerini her zaman bizlerle paylasan Doç.Dr. Suat SAHINLER'e, çalışmalarımın deneysel aşamalarında katkılarını esirgemeyen Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü Müdürü Dr.Yılmaz EMRE ve üretim personeline, tez savunmamda görüş ve önerilerini bizlerle paylasan Prof.Dr.Abdurrahman POLAT ve Doç.Dr.Ahmet SAHIN'e, laboratuvar çalışmalarını yürütmemde yardımlarını ve tecrübelerini bizlerle paylasan GATA Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.M.Kemal ERBİL ve çalışma arkadaşlarına ve değerli aileme tesekkürü bir borç bilirim.

SIMGELER VE KISALTMALAR DIZINI

| | |
|---------|------------------------|
| EPA | :Eikosapentaenoik asit |
| LAP | :aminopeptidaz N |
| LEU-ALA | :Lösin-alanin peptidaz |
| AN | :Aminopeptidaz N |
| AP | :Alkalin fosfataz |
| HIS | :Histidin |
| ILE | :Isolösin |
| LEU | :Lösin |
| LYS | :Lisin |
| MET | :Metiyonin |
| PHE | :Fenilalanin |
| THR | :Treonin |
| VAL | :Valin |
| CCK | :Kolesistokinin |
| KO | :Kareler ortalamasi |
| KT | :Kareler toplami |
| P | :Önem seviyesi |
| SD | :Serbestlik derecesi |
| VK | :Varyasyon kaynaklari |
| PPT | :gram/litre |
| PPM | :miligram/litre |
| PG | :pikogram |
| PMOL | :pikomol |
| FMOL | :fikomol |

ÇİZELGELER DIZINI

| | |
|---|----|
| Çizelge 2.1. Çipura Baliginin (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Sistematigi..... | 5 |
| Çizelge 4.1. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait canlı ağırlık ortalamaları (ortalama±standart hata)(mg)..... | 40 |
| Çizelge 4.2. Canlı ağırlık ortalamalarına ait varyans analiz tablosu..... | 40 |
| Çizelge 4.3. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait boy ortalamaları (ortalama±standart hata)(mm)..... | 41 |
| Çizelge 4.4. Boy ortalamalarına ait varyans analiz tablosu..... | 42 |
| Çizelge 4.5. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait protein ortalama değerleri (ortalama±standart hata) (µg protein/larva)..... | 44 |
| Çizelge 4.6. Protein ortalama değerlerine ait varyans analiz tablosu..... | 45 |
| Çizelge 4.7. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait amilaz enzim aktivitesi ortalama değerleri (ortalama±standart hata) (U/mg protein)..... | 48 |
| Çizelge 4.8. Amilaz enzim aktivitesine ait varyans analiz tablosu..... | 48 |
| Çizelge 4.9. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait lösin-alanin peptidaz enzim aktivitesi (ortalama±standart hata) (mU//mg protein)..... | 53 |
| Çizelge 4.10. Lösin-alanin peptida enzim aktivitesine ait varyans analiz tablosu..... | 53 |
| Çizelge 4.11. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait aminopeptidaz N enzim aktivitesi ortalama değerleri (ortalama±standart hata) (mU/mg protein)..... | 59 |
| Çizelge 4.12. Aminopeptidaz enzim aktivitesine ait varyans analiz tablosu..... | 59 |

| | | |
|---------------|--|----|
| Çizelge 4.13. | Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait alkalın fosfataz enzim aktivitesi ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (mU/mg protein)..... | 63 |
| Çizelge 4.14. | Alkalın fosfataz enzim aktivitesine ait varyans analiz tablosu | 63 |
| Çizelge 4.15. | Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait tripsin enzim aktivitesi ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (mU/mg protein)..... | 67 |
| Çizelge 4.16. | Tripsin enzim aktivitesine ait varyans analiz tablosu | 67 |
| Çizelge 4.17. | Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlarının ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (mU/mg protein)..... | 73 |
| Çizelge 4.18. | Aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlarına ait varyans analiz tablosu..... | 73 |
| Çizelge 4.19. | Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait bombesin hormonu(5.dakika) ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (pg/mg protein)..... | 76 |
| Çizelge 4.20. | Bombesin hormonuna(5.dakika) ait varyans analiz tablosu | 76 |
| Çizelge 4.21. | Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait bombesin hormonu(15.dakika) ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (pg/mg protein)..... | 77 |
| Çizelge 4.22. | Bombesin hormonuna(15.dakika) ait varyans analiz tablosu | 77 |
| Çizelge 4.23. | Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait CCK hormonu ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (fmol/mg kuru agirlik)..... | 81 |
| Çizelge 4.24. | CCK hormonuna ait varyans analiz tablosu..... | 81 |

SEKILLER DIZINI

| | | |
|-------------|--|----|
| Sekil 1.1. | Akdeniz ülkelerinde çipura balığı üretimi..... | 2 |
| Sekil 3.1. | Çipura larvalarının beslenmesinde kullanılan protokol..... | 30 |
| Sekil 4.1. | Muamele gruplarında canlı ağırlık ortalamalarının periyotlara bağlı değişimi..... | 41 |
| Sekil 4.2. | Muamele gruplarında boy ortalamalarının periyotlara bağlı değişimi | 42 |
| Sekil 4.3. | Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki protein kompozisyonlarındaki değişimler..... | 44 |
| Sekil 4.4. | Muamele gruplarında protein ortalamalarının periyotlara bağlı değişimi | 45 |
| Sekil 4.5. | Farklı aminoasitler ile zenginleştirilmiş <i>Artemia</i> metanaupli'lerinin esansiyel aminoasit kompozisyonlarında gözlenen değişimler..... | 46 |
| Sekil 4.6. | Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki amilaz enzim aktivitelerindeki değişimler..... | 47 |
| Sekil 4.7. | Muamele gruplarında amilaz enzim aktivitesinin periyotlara bağlı değişimi..... | 49 |
| Sekil 4.8. | Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki lösin-alanin peptidaz enzim aktivitelerindeki değişimler..... | 52 |
| Sekil 4.9. | Muamele gruplarında lösin-alanin peptidaz aktivitesinin periyotlara bağlı değişimi..... | 54 |
| Sekil 4.10. | Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki aminopeptidaz N enzim aktivitelerindeki değişimler..... | 58 |
| Sekil 4.11. | Muamele gruplarında aminopeptidaz N enzim aktivitesinin periyotlara bağlı değişimi..... | 60 |
| Sekil 4.12. | Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki alkalik fosfataz enzim aktivitelerindeki değişimler..... | 62 |

VIII

| | |
|--|----|
| Sekil 4.13. Muamele gruplarında alkalın fosfataz enzim aktivitesinin periyotlara bağlı değisimi..... | 64 |
| Sekil 4.14. Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen ıpara larvalarının 5.-40. günler arasındaki tripsin enzim aktivitelerindeki değisimler..... | 66 |
| Sekil 4.15. Muamele gruplarında tripsin enzim aktivitesinin periyotlara bağlı değisimi..... | 68 |
| Sekil 4.16. Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen ıpara larvalarının 5.-40. günler arasındaki aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranları..... | 72 |
| Sekil 4.17. Muamele gruplarında aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlarının periyotlara bağlı değisimi..... | 74 |
| Sekil 4.18. Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen ıpara larvalarının 20.-40. günler arasındaki bombesin hormonundaki değisimler(Besleme sonrasi 5. ve 15.dakikalarda yapılan rneklemelelerden elde edilen sonuçlar)..... | 78 |
| Sekil 4.19. Muamele gruplarında bombesin(5.dakika) hormonunun periyotlara bağlı değisimi..... | 78 |
| Sekil 4.20. Muamele gruplarında bombesin(15.dakika) hormonunun periyotlara bağlı değisim..... | 79 |
| Sekil 4.21. Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş <i>Artemia</i> metanaupli'leri ile beslenen ıpara larvalarının 20.-40. günler arasındaki CCK hormonundaki değisimler..... | 80 |
| Sekil 4.22. Muamele gruplarında CCK hormonunun periyotlara bağlı değisimi..... | 82 |

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| ÖZET | I |
| ABSTRACT | II |
| ÖNSÖZ | III |
| SIMGELER VE KISALTMALAR DIZINI | IV |
| ÇİZELGELER DIZINI | V |
| SEKİLLER DIZINI | VII |
| 1.GIRIS | 1 |
| 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR | 5 |
| 2.1.Çipura Baliginin (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Sistematigi | 5 |
| 2.2.Çipura Baliginin (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Biyolojisi | 5 |
| 2.3.Çipura Anaçlari ve Yumurta Alimi | 6 |
| 2.4.Çipura Yetistiriciliginde (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Kültür Sartlari | 7 |
| 2.5.Çipura Yetistiriciliginde (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Larval Dönem | 8 |
| 2.6.Çipura Larvalarında (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Sindirim Sistemi Gelisimi | 8 |
| 2.7.Çipura Larvalarında (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Beslenme | 10 |
| 2.8.Larvalarin Beslenmesinde Protein ve Esansiyel Aminoasitlerin Önemi | 11 |
| 2.9.Çipura Larvalarinin Beslenmesinde Mikrodiyet Yem Kullanimi | 11 |
| 2.10.Enzim Çalışmaları | 13 |
| 2.11.Canli Yemler ve Mikropartikül Yemler Üzerine Yapılan Çalışmalar | 19 |
| 2.12.Hormonlar Üzerine Yapılan Çalışmalar | 23 |
| 2.12.1.Bombesin Hormonu | 24 |
| 2.12.2.Kolesistokinin (CCK) | 25 |
| 3.MATERYAL VE YÖNTEM | 27 |
| 3.1.Materyal | 27 |
| 3.1.1.Arastirma Yeri | 27 |
| 3.1.2.Denemede Kullanilan Larvalar | 27 |
| 3.1.3.Denemede Kullanilan Tank Sistemi | 27 |
| 3.1.4.Denemede Kullanilan Canli Yemler | 27 |
| 3.1.4.1.Canli Yemler | 28 |
| 3.1.4.1.1.Alg Üretimi | 28 |
| 3.1.4.1.2.Rotifer Üretimi | 28 |
| 3.1.4.1.3.Artemia Üretimi | 29 |
| 3.2.Yöntem | 29 |
| 3.2.1.Deneme Gruplari | 29 |
| 3.2.2.Besleme Programi | 30 |
| 3.2.3.Denemedeki Ortam Sartlari | 30 |
| 3.2.4.Analizler | 31 |
| 3.2.4.1.Protein Analizi | 31 |
| 3.2.4.2.Aminoasit Analizi | 31 |
| 3.2.4.3.Enzim Analizleri | 32 |
| 3.2.4.3.1.Amilaz Enzim Aktivitesi | 32 |
| 3.2.4.3.2.Lösin-Alanin Peptidaz Enzim Aktivitesi | 33 |
| 3.2.4.3.3.Aminopeptidaz N Enzim Aktivitesi | 34 |

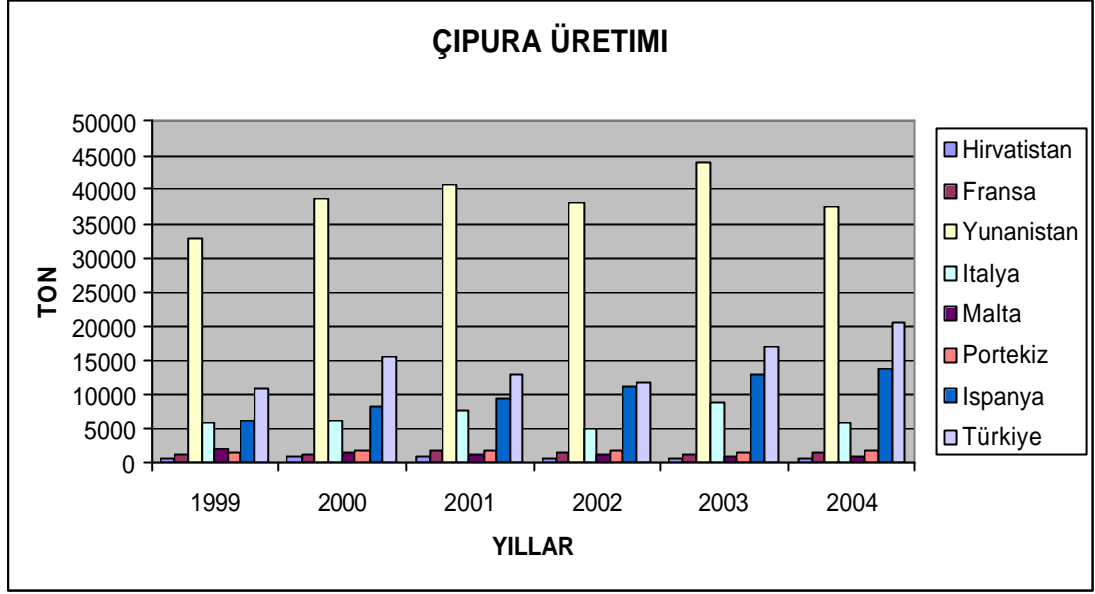
| | |
|--|----|
| 3.2.4.3.4.Alkalin Fosfataz Enzim Aktivitesi | 34 |
| 3.2.4.3.5.Tripsin | 35 |
| 3.2.4.4.Hormon Analizleri | 36 |
| 3.2.4.4.1.Bombesin | 36 |
| 3.2.4.4.2.Kolesistokinin(CCK) | 36 |
| 3.2.4.4.2.1.Sentetik CCK Standartları ve Örneklerinin Hazırlanması | 36 |
| 3.2.4.4.2.2.RIA Prosedürü | 36 |
| 3.2.5. Örneklem ve İstatistik Analizler | 37 |
| 4.ARASTIRMA BULGULARI VE TARTISMA | 39 |
| 4.1. Çipura Larvalarında Canlı Ağırlık ve Boy Değişimleri | 39 |
| 4.2. Protein Analizleri | 43 |
| 4.3.Aminoasit Analizleri | 45 |
| 4.4.Enzim Analizleri | 47 |
| 4.4.1.Amilaz Enzim Aktivitesi | 47 |
| 4.4.2.Lösin-Alanin Peptidaz Enzim Aktivitesi | 52 |
| 4.4.3.Aminopeptidaz N Enzim Aktivitesi | 57 |
| 4.4.4.Alkalin Fosfataz Enzim Aktivitesi | 61 |
| 4.4.5.Tripsin Enzim Aktivitesi | 66 |
| 4.4.6.Aminopeptidaz N/Lösin-alanin Peptidaz Oranları | 72 |
| 4.5.Hormon Analizleri | 75 |
| 4.5.1.Bombesin Hormon Analizi | 75 |
| 4.5.1.1.Bombesin Hormonu(5.dakika) | 75 |
| 4.5.1.2.Bombesin Hormonu(15.dakika) | 75 |
| 4.5.2.Kolesistokinin (CCK) Hormon Analizi | 80 |
| 5.SONUÇ VE ÖNERİLER | 84 |
| KAYNAKLAR | 88 |
| ÖZGEÇMİŞ | 97 |

1.GIRIS

Dünyada son 50 yıldan beri çeşitli deniz balıklarının ve karideslerin yetistirciliği yapılmaktadır. İç su ve deniz kaynakları bakımından yüksek bir potansiyele sahip ülkemizde ise uzun yıllardan beri balıkçılık avlama yoluyla yapılmaktadır. Balıkçı teknelerin sayısının ve gücünün artması ile birlikte bilinçsiz avcılık nedeni ile balık stoklarında meydana gelen azalmalar bu tür üretimin ekonomikliğini ortadan kalkmasına neden olmuştur (ÇELIKKALE ve ark.,1999a).

Ülkemizde ve dünyada yapılan yetistircilik sistemi yakın zamana kadar doğadan yavru toplama ve balıkların kuluçkahane ortamına adaptasyon aşamasının ardından tam kontrollü üretimine dayanmaktaydı. Son yıllarda bu üretim yöntemi, iklimsel olaylar sonucunda değişen doğa dengesi ve doğal balık popülasyonlarının daha etkin bir şekilde korunması amacıyla, kuluçkahanelerde anaç beslemeden itibaren tam kontrollü üretim şekline dönüşmüştür. Ancak, bu tarz bir üretim yöntemi ile sınırlı alanlardan milyonlarca yavru üretimi mümkün olabilmektedir.

Ülkemizde kültür balıkçılığı ile ilgili ilk uygulamalar iç sularda alabalık üretimi için 1970'li, deniz balıkları üretimi için ise 1985'li yıllarda başlamıştır (ÇELIKKALE ve ark., 1999b). Türkiye de kültür balıkçılığının diğer dünya ülkelerine göre geç başlamasının nedeni ilk yıllarda bilinçsiz ve teknolojik gelişmelerden habersiz olarak yapılmasından kaynaklanmaktadır. Özellikle 1980'li yıllarda bu konudaki eğitim ve öğretimin başlamasının yanı sıra özel işletmelerdeki AR-GE birimlerinin özveriyle çalışmaları sonucunda kısa sürede dünyadaki ülkeler arasında üretimde söz sahibi olacak seviyeye ulaşılmıştır. Kısa bir süre içerisinde gözlenen gelişmeler sonucunda 1999-2004 yılları arasında Akdeniz ülkeleri arasında Türkiye çipura üretimi açısından 2. sırada yer almaktadır (Şekil1.1).



Sekil 1.1.Akdeniz ülkelerinde çipura balığı üretimi (ANONYMOUS,2004)

Kuluçkahaneye dayalı tam olarak kontrollü deniz balıkları üretiminde yaşanan en büyük zorluklarla larval dönemde karşılaşmaktadır. Larva yetiştiriciliği genellikle tam kontrollü koşullar altında, yetiştiriciliği yapılan balık türüne bağlı olarak kendine özgü üretim sistemlerine gereksinim duyan bir yetiştiricilik aşamasıdır. Bu tür yetiştiricilikte dikkat edilmesi gereken konuların başında anaç balık yönetimi, yemleme programları ve yetiştiricilik ortamında sıkça gözlenen mikrobiyel kontrol gelmektedir. Yumurta kalitesi açısından anaç besleme oldukça önemlidir. Anaç yönetiminin ardından yemleme programı ve yem tipinin ve büyüklüğünün seçimi larvaların yaşayabilirliği açısından büyük önem taşımaktadır. Yem seçimi ve yemleme rejiminin belirlenmesine etki eden başlıca faktörler; larva ağız büyüklüğü, organ gelişimi ve sindirim sisteminin enzimsel durumudur. Larvanın dışarıdan ilk yem almaya başladığı dönemde canlı yem veya diğer yem partiküllerinin büyüklüğü yemlemenin etkinliği ve yaşayabilirlik açısından belirleyici olmaktadır. Larvanın ağız açıklığı; doğrudan doğruya yumurta çapı ve yumurta kesesinin tüketim süresinden etkilenebilen bir parametredir. Örneğin, Atlantik salmon yumurtaları, çipura yumurtalarından dört kez daha büyük olmasına rağmen besin kesesini tüketme süresi çipuradan daha uzundur ve bu nedenle çipuraya oranla daha ergin bir dönemde ve iyi gelişmiş bir sindirim enzim aktivitesi ile ilk beslenmeye başlamaktadır. Diğer taraftan besin kesesini tüketmiş ve ilk kez dışarıdan

yem almaya baslayacak olan larvanin sindirim sisteminin durumu ve buradaki mevcut enzimsel durum bize alinan yemin etkin bir sekilde sindirilip sindirilmeyecegi konusunda bir bilgi vermektedir. Örneğin salmon larvalarının sindirim sistemi uzun bir sürede ve iyi gelismis oldugundan ilk beslemede büyük problemler ortaya çıkmamaktadır. Buna karsilik çipura gibi besin kesesini çeşitli çevresel faktörlere bagli olarak kısa sürede tüketen deniz balıklarında ilk besleme döneminde büyük kayiplar ortaya çıkmaktadır. Belirtilen nedenlere bagli olarak larvaların ilk yem alimında dikkat edilmesi gereken bir takım özellikler vardır. Bilhassa yem kaynagının seçiminde dikkat edilmesi gereken noktalar asagida belirtilmiştir.

1-Yem kaynagının sindirimi kolay olmalıdır. Kompleks protein kaynakları yerine geniş miktarda serbest aminoasitleri ve oligopeptileri içermelidir. Çünkü serbest aminoasitler diğer protein moleküllerine oranla daha kolay parçalanabilmekte ve değerlendirilebilmektedir.

2-Yem kaynagının içindeki enzim sistemleri otoliz sağlayabilmelidir. Yani sindirim sistemi tam olarak gelismemis bir larvanın enzimatik aktivitesinden bagimsiz olarak kendi kendini parçalayabilmelidir.

3-Kullanılan yem larvanın ihtiyacı olan esansiyel besin maddelerini karşılayabilmelidir (ALTAN,1998).

Rotiferler (*Brachionus plicatilis*) ve *Artemia* naupli'leri, dünyada ticari bir potansiyele sahip deniz ve tatlı su balıklarının larval dönemlerinde canlı gıda kaynağı olarak yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu tür canlı yemlerin yoğun üretimleri için laboratuvar ve enerji yatırımlarının çok yüksek olması ve besinsel kompozisyonlarının sabit tutulmaması nedeniyle daha sabit bir kompozisyon ve ekonomikliğe sahip mikro partikül yemlerin formülasyonlarına doğru ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Bu karma yem formülasyonlarının hazırlanması esnasında canlı yem kaynaklarının besin kompozisyonlarından önemli ölçüde yararlanılmıştır. Mikro partikül yemler, larva beslenmesinde sabit bir besin kompozisyonu sunmasına ilaveten , canlı yemde mevcut olmayan bazı besinlerin de larvaya geçişini sağlayabilmektedir (ROSENLUND ve ark., 1997).

KOLLOWSKI ve ark. (1997a), çipura larvalarının canlı ve mikro partikül yemlerle beslemenin larvalardaki sindirim hormonları üzerine, özellikle bombesin hormonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Bombesin

hormonunun, mide duvarlarına kan sirkülasyonunu arttırmaya ilave olarak, HCl salınımı ve midenin peristaltik hareketini aktive etmesi gibi sindirimi çeşitli yollarla etkilediği bilinmektedir. Çalışmada, canlı yem *Artemia* ile beslenen grupta, mikro partikül yemle beslenen gruba göre yaklaşık %300 kadar daha yüksek bombesin hormonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Fakat çalışma sonunda, bu endokrin cevabının artışını açıklayabilecek *Artemia* da sorumlu olabilecek besin faktörleri hakkındaki bilgiler bir netlik kazanmamıştır. Diğer araştırmacılar tarafından yapılmış olan çalışmalar sonucunda elde edilen bilgilere göre, serbest aminoasitlerin bu endokrin cevabi tetikleyebileceği düşünülmektedir. Daha doğrusu larvaların canlı yemlerinde bulunan serbest aminoasitlerin, larval sindirim sistemi tam olarak fonksiyonel olmayan yada gelişmekte olan larvalarda sindirim işlemlerini tamamlamak için larvada bulunan endokrin faktörleri harekete geçirmiş olabileceği düşünülmektedir (KOVEN ve ark., 2001). Bunlara ilaveten, bazı balık larvalarında çözülebilir proteinlerin , serbest aminoasitlere göre sindirim hormonları üzerinde daha iyi bir tetikleyici olduğu bildirilirken (KOVEN ve ark., 2002), bazen tersi bir durumda gerçekleşebileceği belirtilmiştir (CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1995 a,b).

“Farklı Aminoasitlerle Zenginleştirilmiş *Artemia* naupli’leri ile beslenen Çipura balığı (*Sparus auratus*, Linneaus 1758)’in Sindirim hormonları ve Enzimlerindeki Değişimler” isimli ve doktora tezi olarak planlanan bu çalışmada, larvaların beslenmesinde esansiyel olarak bilinen serbest aminoasitlerin sindirim hormonları ve enzimleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu bölümde daha çok çipura balığının sistematigi,biyolojisi, beslenme özellikleri ve larvaların besin içeriklerinin yani sıra konuyla ilgili olduğunu düşündüğümüz çalışmalar özetlenmiştir.

2.1.Çipura Balığının (*Sparus aurata* L.1758) Sistematigi

Çipura balığının sistematikteki yeri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çipura Balığının (*Sparus aurata* L.1758) Sistematigi

| | |
|-----------|-----------------------------|
| Filum | Chordata |
| Alt Filum | Vertebrata |
| Sınıf | Osteichtyes |
| Takim | Perciformes |
| Alt Takim | Percoidei |
| Familya | Sparidae |
| Cins | Sparus |
| Tür | <i>Sparus aurata</i> L.1758 |

2.2.Çipura Balığının (*Sparus aurata* L.1758) Biyolojisi

Dünyada yoğun olarak üretimi yapılmakta olan çipura (*Sparus aurata* L. 1758) balıkları genellikle kumlu ya da çamurlu biyotoplarla nehir ağzlarında ve lagünlerde yoğun olarak bulunmaktadır. Genellikle iklimsel açıdan tropikal, subtropikal ve ılıman bölgeleri tercih eden çipura balığına Moritanya’dan İngiltere’ye kadar olan tüm Atlantik kıyılarıyla birlikte, ülkemizde daha çok Akdeniz ve Ege denizinde rastlanmaktadır. Karnivor olarak beslenen bu balıkların boyları genellikle 70 cm’ye ağırlıkları ise 4-8 kg’a kadar ulaşabilir. Beslenme özellikleri bakımından doğadaki balıkların mide muhteviyati üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre, bu türün daha önce belirtildiği gibi karnivor olduğu ve özellikle Crustacea ve Mollusca’larla beslendiği net bir şekilde ortaya konmuştur. Çipura balıkları sıcaklık ve tuzlulukta meydana gelen değişimlere karşı tolerans gösterebilmektedir. Su sıcaklığının

6-32 °C ve deniz tuzlulugunun ise ‰o 0,5-40 olduğu sularda bu tür yasayabilmektedir. Bu baliklarin istedigii optimum pH araligi ise 6,5-9 olarak bildirilmistir. Çipura baliklarinin en iyi gelisimi için sicaklik degeri de 22-25°C olup, ülkemizde üreme dönemi Ekim-Ocak aylaridir (ALPAZ, 1996:TUCKER, 2000).

Çipura baliklari, protondrik hermofrodit üreme özelligi göstermektedirler.Yani bu baliklar, yasamlarinin ilk dönemlerinde erkek, daha sonra ise disilik özelligi göstermeye baslarlar (FISHER ve ark., 1987: DEMIRSOY, 1997: TUCKER, 2000). Cinsiyet dönüşümleri üzerine yapılan çalismalarin sonuçlari, ortam sartlarina bagli olmak sarti ile 17-18.aylarda baslamakla birlikte, 2 yasindaki çipura baliklarinin % 80'ninin disi özellikte oldugunu göstermektedir (FISHER ve ark., 1987). Çipura baliklarinin üreme döneminde degisik ortam sartlarina bagli olarak 2,5-3 kg bir anaç baliktan 110-115 g yumurta alinabilmektedir (ALPAZ, 1996: TUCKER, 2000). Pelajik, küresel ve yari seffaf olarak tanimlanan çipura yumurtalarinin 1 g'inda yaklasik olarak 1200-1300 adet yumurta bulunabilir (ALPAZ,1996; TUCKER, 2000). Bu baliklar ülkemizde Ekim-Ocak aylarinda su sicakliginin 14-19 °C olduğu bölgelerde 5-25 m derinlikteki bölgelere yumurtalarini biraktadirlar. Çipura baliklarinda ovaryumun 12-13°C'nin altindaki su sicakliklarinda gelismedigii belirtilmistir(BARNABE, 1983).

2.3.Çipura Anaçlari ve Yumurta Alimi

Çipura anaçlarinda yumurtlama islemi bir defada gerçeklesmemektedir. Kontrollü sartlarinda bu islem 10-15 günlük dönemlerde tamamlanabilecegi gibi, dogada yaklasik olarak birkaç ay sürebilmektedir. Çesitli avcılık yöntemleri (Zoka, çapari, fanyali ag vb.) ile avlanan anaç baliklar isletmelere alinmadan önce dezenfekte edilirler. Dezenfekte edilen anaçlar, anaç tanklarina yerlestirilip, yumurta alimi için ortam sartlarina adaptasyon islemi gerçekleştirilir (ALPAZ, 1996). Adaptasyon islemi tamamlanan baliklar 2 disiye 1 erkek yada 1disi 1 erkek oraninda m³'e 1,5-5 kg olacak sekilde yumurta alim öncesi stoklanirlar (PILLAY, 1995: ALPAZ, 1996: TUCKER, 2000). Döllenmis yumurtalarin toplanmasi için tank suyu çikisina reküparatörler yada tank içine konan kollektörlerden yararlanilabilir (PILLAY, 1995: ALPAZ, 1996:TUCKER, 2000).

Çipuralardan 3 farklı yumurta alım yöntemi mevcuttur. Bunlar;

1. Fotoperiyot uygulaması
2. Hormon enjeksiyonu
3. Normal yolla

Çipura larvalarından elde edilen yumurtalar tek yağ damlacığı içermektedir. Özgül ağırlıkları deniz suyundan küçük olduğu için su yüzeyinin hemen altında yer alırlar. Yumurta çapları bölgelere göre değişmekle birlikte, genelde 0,9-1 mm arasında değişim göstermektedir. Ayrıca koryon seffaf ve ince olup mikrofil yaklaşık olarak 14µ çapındadır (MUHTAROĞLU, 1988; TUCKER, 2000).

Yumurta kalitesini etkileyen en önemli faktörlerin başında anaç besleme gelmektedir. Bu yüzden kültür şartlarında kaliteli ve yoğun yetistireciler için çipuranın besin gereksinimlerinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Çipura anaçlarında esansiyel yağ asitleri konusunda yapılan çalışmalara göre, anaçların beslenmeye başlamasından itibaren yaklaşık 3 hafta sonra etkilerinin yumurtalarda gözlemlendiği belirtilmiştir (FERNANDEZ ve ark., 1995). Çipura balıklarında yine anaç beslemede esansiyel yağ asitleri üzerine yapılan çalışmalarda eksik yağ asitleri ile yapılan anaç beslemesinden elde edilen yumurtaların yağ damlacıklarında küçülmeler olduğu gözlemlenmiştir (SERRANO ve ark., 1989). Çipuraların erkek anaçlarında da sperm içindeki EPA dağılımı besleme esnasında kullanılan yemlerin içeriğindeki yağ asitlerine göre değişmektedir. Bu durumun döllenme oranını artırıcı ya da azaltıcı yönde etkili olduğu bildirilmektedir (WATANABE ve ark., 1984).

2.4.Çipura Yetistireciliğinde (*Sparus aurata* L.1758) Kültür Şartları

Çipura larvaların larval dönemleri üzerine yapılan çalışmalar, ilk dönemlerinde en iyi yaşama oranının 16-22°C olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle, pek çok araştırmacı tarafından da kabul edildiği gibi, prelarval dönemde optimal gelişimin gözlemlendiği sıcaklık 16°C'dir (POLO ve ark.,1990; SÜZER, 1998). Pre ve postlarval aşamada ‰ 15-38'lik tuzluluk oranının yaşama oranını arttırdığı bildirilmektedir. Çipura larvalarında 100-150 lüks arasında ve 24 saat aydınlatma optimum gelişim için önemlidir. O₂ değeri larva besleme döneminde 5mg/l'nin altına düşürülmemelidir.

2.5.Çipura Yetistiriciliginde (*Sparus aurata* L.1758) Larval Dönem

Çipura larvalarında en kritik dönem yumurtadan çıktıktan sonra başlamaktadır. Çipura larvaları yumurtadan çıktığında yaklaşık olarak 2,6-3,0 mm boyda olup, besin kesesi ihtiva ederler. Besin kesesinin tüketildiği ve dışarıdan yem aliminin başladığı zamana kadar geçen dönem prelarval dönem olarak bilinmektedir (MUHTAROGLU,1988: ALPAZ, 1996). Bu dönemde rezervleri en iyi şekilde kullanılması larval yaşamayı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bu rezervlerin en iyi şekilde kullanımı üzerine yapılan bir çalışmada prelarval aşamada ortamın karanlık ve su sıcaklığının 16°C olması gerektiği belirtilmiştir. Bu şartlarda keseyi tüketen larvaların, aydınlık ortamlarda ve 16°C'den yüksek sıcaklıklarda tüketenlere göre besin kesesi rezervlerini daha iyi kullandığı ve bir sonraki asamadaki direncinin daha yüksek olacağı bildirilmiştir. Yani, boydaki artış ile vitellüsün tüketilmesi yakından ilişkili olup bilhassa sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir (MUHTAROGLU, 1988: ALPAZ, 1996: SÜZER, 1998).

Prelarvalarda 4.gün gözler pigmentlenip ağız açıldığı zaman dışardan yem alımı başlar ve postlarval dönem başlamış olur. Ağız açıldığında vitellüs kesesinin büyük bir kısmı tüketilmiş durumdadır. Postlarval aşama ise, besin kesesinin çekilmesi ve dışarıdan beslenmeyle birlikte başlar ve yaklaşık olarak 40. güne kadar devam eder (PILLAY, 1995: TUCKER, 2000). Postlarval aşamanın başlangıcında baş ve vücut yaklaşık aynı yükseklikte olup, genelde toplam boyun 1/3'ü kadardır. Postlarval aşama genelde 28-30 mm'de son bulur. Bu safha içinde larvada sindirim sistemi hava kesesi oluşumu başlamakta ve devam etmektedir (MUHTAROGLU,1988: ALPAZ, 1996).

2.6.Çipura Larvalarında (*Sparus aurata* L.1758) Sindirim Sistemi Gelişimi

Deniz balıklarında sindirim sisteminin gelişimi üzerine yapılan çalışmalar balık larvalarının küçük boylarda olmasının yarattığı zorluklara rağmen son zamanlarda hızlı ve yoğun bir şekilde devam etmektedir. Özellikle yeşil su tekniğine ilaveten yetistiricilikte kullanılan diğer tekniklerde de ortamda canlı yemlerin bulunmasının sonuçları önemli şekilde etkilediği bildirilmiştir (KOLKOVSKI ve ark. 1997a,b). Tüm deniz balıklarında larvalar erginlerine göre daha düşük sindirim fonksiyonuna, daha düşük enzim üretimine ve daha basit bir yapıya sahiptirler(DE SILVA, 1998: NAVARRO, 1998).

Embriyonal gelişimde muskular segmentasyon ile ön, orta ve son bağırsak meydana gelir. Çipura larvalarında sindirim sisteminin oluşumu ağzın açılması ve dışarıdan beslenmenin başlamasıyla birlikte hızlı bir şekilde gelişmeye başlar. Daha önce belirtildiği gibi embriyonal dönemdeki gelişme ortam şartlarından özellikle sıcaklık ve ısı gibi faktörlere bağlıdır. Ağzın açılması ve ilk beslenmenin başlaması ile gelişim büyük ölçüde verilen yemlere ve bunların larvanın gereksinimlerini hangi ölçüde karşılayıp karşılamamasına bağlıdır. Çipura larvalarında sindirim sisteminin gelişimini postlarval aşamada 3 kısımda incelemek uygun olacaktır.

Bunlardan birincisi ilk 4-10. günü kapsamaktadır. Bu dönemde farklılaşma başlamış olup, aynı zamanda ağız açılmış, farinks ve özefagus'un epitel oluşumu başlamıştır. Bu aşamada prelarva bir taraftan besin kesesini sindirmeye devam ederken, diğer taraftan ortamdan sindirebileceği besinleri almaya çalışır. Pankreas dış salgı salgılamaya başlar ve karaciğer de rezervler oluşur (DE SILVA, 1998). Ancak sindirim fonksiyonu hala tam olarak rayına oturmamıştır. Yani sekonder salgılar henüz oluşmamıştır (MUHTAROĞLU, 1988; DE SILVA, 1998). Karaciğer ve pankreas yumurtadan çıkış anında oluşmuştur ve besin kesesinin absorpsiyonundan sonra fonksiyonel hale gelir. Tat alma hücreleri çok sayıda olup, larva büyüdükçe fonksiyonellesmektedir (NAVARRO, 1998). Bu aşamada canlı yemler ön ve orta bağırsaktan hızla geçerler ve orta bağırsagın son kısmında ya da son bağırsakta sindirilene kadar kalırlar. Kas tabakaları tam olarak fonksiyonel olmadığı için sindirim kanalında bulunan silli hücreler gıdaların taşınmasında etkin bir rol oynarlar (DE SILVA, 1998). İlk dönemlere sindirim kanalı tam olarak fonksiyonel olmadığı için bağırsak boyunca gidanın geçiş hızı larvalarda erginlere oranla daha hızlıdır. Fakat absorpsiyon verimi oldukça düşüktür (NAVARRO, 1998).

İkinci safha ise larvaların 10-30 günlük olduğu dönemdir. Besin kesesi tamamen kaybolmuş, larva için önemli olan hava kesesi sisirilmistir. Larvanın safra kesesi ve pankreasi tam olarak fonksiyonel olmamakla birlikte, epitel mide hücreleri gastrit salgılamaya başlamıştır. İnce ve kalın bağırsagın arasında kapakçık belirlemeye başlamıştır. Bağırsak mukositleri bu safhanın başında görülebilse de bağırsak silleri ancak bu safhanın sonunda biçimlenir (DE SILVA, 1998). Ayrıca bu safhada mide ve ince bağırsak arasında bir kapakçık oluşur. Bağırsak yüzeyinde mukoza belirir ve çeper kıvrılmaya başlar. Larvanın sindirim enzimleri birinci safhaya göre iyidir fakat tam

olarak fonksiyonel değildir. Larval besleme ve zamana bağlı olarak sindirim enzim aktivitesinde artış görülmektedir (MUHTAROGLU,1988: DE SILVA, 1998).

Üçüncü safha, yani 30.günden sonra itibaren larvalar eksiksiz yapılarına ulaşır. İnce bağırsak ve mide arasında pilorik kapakçık tam olarak şekillenmiştir. Mide aktif olarak faaliyete geçmiş olup, sindirim ergin bireylerdekine benzer şekilde yapılanmaya başlamıştır (MUHTAROGLU,1988: DE SILVA, 1998).

2.7.Çipura Larvalarında (*Sparus aurata* L.1758) Beslenme

Agzın açılması ile prelarval dönemden postlarval döneme giren çipura larvalarının 4. ile 12-15.günler arasında 1. besleme periyodu başlar. Prelarvalar bu döneme girdikleri zaman tam olarak besin rezervlerini tüketmiş değildirler. Bir taraftan kalan besin rezervlerini tüketirken diğer taraftan ortamda bulunan canlı yemlerden almaya çalışmaktadırlar. Prelarvaların ağız açıklığı yaklaşık 100µ civarındadır. Bu nedenle bu dönemde besin olarak verilecek yemlerin boyutunun 60-100µ civarındaki S-tipi rotiferler olması gerekmektedir (ALPAZ, 1996: TUCKER, 2000). Bu dönemlerde larva üretim tanklarına alg verilmesi besleme açısından önemlidir. Deniz balıkları üretiminde alglerin ortama verilmesinde iki önemli avantaj vardır. Bunlardan birincisi, ortamın pH-O₂ dengesini sağlamak, ikincisi ise yem olarak verilen rotiferlerin uzun süre kaldıkları larva tankında besin kompozisyonlarında meydana gelen azalmayı minimize etmektir (ALPAZ, 1996: TUCKER, 2000). Bu dönemde verilen S-tipi rotiferlerin çok zayıf hareket etme yeteneğinde olması, hem larvaları cezp etmekte hem de larvalar tarafından kolayca yakalanmasına fırsat vermektedir (KOLKOVSKI ve ark., 1997a). Nitekim, larvaların bu dönemdeki avcılık yetenekleri çok gelişmemiştir. Larvalara verilen rotifer boyutu larval dönemin sonuna doğru 300µ'a kadar büyütülür (PILLAY, 1995: ALPAZ, 1996). Larvalar 15. günden itibaren asama asama *Artemia* naupli'ye alıştırılır. Tanklara verilen rotifer sayısı azaltılarak, *Artemia* naupli sayısı artırılarak geçiş kademeli olarak sağlanır. 30.güne kadar *Artemia* naupli ile beslemesi yapılan larvalara, 30-40.günler arasında *Artemia* metanaupli verilmektedir (ALPAZ, 1996: TUCKER, 2000).

2.8.Larvalarin Beslenmesinde Protein ve Esansiyel Aminoasitlerin Önemi

Embriyo dönemi boyunca ve prelarval dönemde besinler besin kesesinden sağlanmaktadır. Besin kompozisyonları türler arasında kalitatif ve kantitatif açıdan önemli farklılıklar göstermektedir. Embriyolojik ve larval dönemde proteinlerin kullanımı oldukça önemli olup, karbonhidratlar, serbest aminoasitler ve yağ asitleri enerji metabolizmasının en önemli elemanlarıdır (NAVARRO, 1998). Deniz balıkları yumurtaların biyokimyasal kompozisyonları incelendiğinde, önemli miktarlarda aminoasit içeriğine sahip oldukları görülmektedir. Yeni alınmış pelajik özelliğe sahip yumurtaların total aminoasit içeriklerinin %20-40'i arasında serbest aminoasitlere sahip oldukları bildirilmiştir (RONNESTAD ve FYNN, 1993; FINN, 1994; THORSEN, 1995; RONNESTAD ve ark., 1996). RONNESTAD ve ark. (1999), HCl ve pepsin salgısının yokluğunda alınan proteinlerin denatüre edilemediğini bildirmişlerdir. Bu nedenle serbest aminoasitlerin, proteinlerden daha kolay absorbe edildiğini bildirmişlerdir. Son zamanlarda çalışmalar, larvaların serbest aminoasit gereksinimleri üzerine yoğunlaşmış ve serbest aminoasitlerin larvaların erken safhalarında çok önemli enerji fonksiyonlarına sahip olduğu bildirilmiştir (MORRIS, 1997; NAVARRO, 1998).

Larvaların aminoasit gereksinimleri üzerine yapılan çalışmalar, larvaların 20 adet esansiyel nitelikteki aminoasitlerden en az 10 tanesine mutlak ihtiyacı olduğunu göstermiştir. Bunlar; arginin, histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valin'dir (DE SILVA, 1998). Serbest aminoasitlerin çipura larvalarının beslenmesinde proteinlerin parçalanmasında önemli bir görevinin olduğu belirlenmiştir (KOLKOVSKI, 1999).

2.9.Çipura Larvalarının Beslenmesinde Mikrodiyet Yem Kullanımı

Son yıllarda, canlı yem üretiminin pahalı olması nedeniyle canlı yemi ikame edebilecek yem formülasyonları üzerine çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (TANDLER ve KOLKOVSKI, 1992; KOVEN ve ark., 1993; YUFERA ve ark., 1995, 1996, 1999). Bununla birlikte, karma yemler (larval dönemin ilk aşamalarında kullanılan mikro diyetler) larvanın tüm ihtiyaçlarını karşılamamaktadır. Bu tür yemlerin ilk yemlemede kullanımı genellikle çipura gibi küçük larvaların yaşama oranına etki etmekte ve büyümeyle birlikte gelişmede birtakım bozuklukların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Deniz balıkları larvalarının formüle yemlerle beslenmesi ile ilgili problemler kısaca aşağıdaki gibidir.

1-Larvaların fonksiyonel duyu organlarının tam olarak gelişmemiş olması (ALTAN, 1998). Bilindiği üzere larvalar gelişimlerine bağlı olarak yemleri önce optik reseptörlerle(gözler), daha sonra kemoreseptörleri (tat duyusu) ve son olarak da mekanoreseptörleri (yanal çizgi-linea lateralis) ile algılamaktadırlar. Canlı yemler karma yemlere oranla daha iyi bir görünebilirlik sağlamaları nedeni ile larvaların dikkatini çekmektedir.

2-Formüle yemlerin sudaki besinsel değeri ve tüketilebilme cazibesi olarak küçük partiküller halinde hazırlanması ve verilmesinde zorluklarla karşılaşmaktadır.

3-Partiküllerin içeriğinde larvaların az gelişmiş sindirim sistemlerinin göz önünde bulundurulması ve partiküllere sindirim enzimi ilave edilmesidir.

4-Canlı yemlerin mikro diyetlere göre en önemli avantajı larval yetiştiricilik ortamında hareketli ve homojen yapıda dağılım gösterebilmesidir.

Larval yetiştiricilikte karma yeme bir an önce geçme konusundaki bu ısrarcı davranışın temelinde, kullanılan canlı yem kaynaklarının üretiminde ortaya çıkan çeşitli sorunlar yatmaktadır. Örneğin; çoğu deniz balığının ilk besini olan *Brachionus plicatilis* ve bunların beslenmesinde kullanılan fitoplanktonların üretimi esnasında optimum çevresel faktörlerin sağlanamaması ve bununla birlikte bu tür üretimin maliyetinin çok yüksek olması gibi sorunlar gözlenmektedir. Yine deniz balıkları üretimi için önemli bir zooplankton olan *Artemia* sp. içinde üretim alanlarındaki doğal populasyonların azalması ve buna bağlı olarak fiyatlarında gözlenen asiri yükselmeler bu geçişin akuakültürün devamlılığı açısından önemini göstermektedir.

Yukarıda bahsedilen verilerden hareketle, canlı yem üretiminde baste ekonomik zorluklar olmak üzere birçok olumsuz faktör bulunmakla birlikte bu durum larva yetiştiriciliği yapan işletmeleri ve yem sektörünü canlı yemi ikame edebilecek bir karma yem arayışı içine sokmuştur.

2.10.Enzim Çalışmaları

KOLKOVSKI ve ark. (1993a), çipura larvalarının gelişmesine mikro diyet yemlere ilave edilmiş sindirim enziminin etkisini araştırmışlardır. Bunun için 20-32 günlük çipura larvalarını, farklı konsantrasyonlarda ticari pankreatin enzimi içeren (% 0, %0,05, %0,1 g/100 g kuru yem) ¹⁴C atomuyla etiketlenmiş mikro diyet yemlerle beslemişlerdir. Mikro diyet yemin tüketim ve asimilasyon değerlerini ölçtükleri bu çalışmada, mikro diyet yemlere ilave edilen sindirim enzimlerinin, yemin larvalar tarafından asimilasyonunu % 30 oranında arttırdığını tespit etmişlerdir. Buna ilaveten mikro diyet yemlere ilave edilen enzim miktarlarının (% 0,1 ve % 0,05) larvaların gelişmesinde fark yaratmadığı gözlemlenmiştir (p<0,05).

PERSON LE RUYET (1989), balık larvalarının enzim aktiviteleri üzerine yaptığı çalışmada, karaciger ve pankreasın yumurta açılımında oluşmuş olduğunu, nisasta ve protein sindirimi için gereken enzimlerden tripsin, amilaz, kimotripsin ve amino peptidaz N'in ilk beslemeye geçildiği dönemde mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşılık lipaz ve pepsin aktivitesinin çok geç tespit edildiğini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, canlı yemlerin hücre dışı enzimlerinin, larva sindiriminin bu kritik döneminde oldukça önemli bir rol üstlendiğini belirtmişlerdir.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1997), levrek larvaları üzerinde yaptıkları çalışmada 15. ve 25. günden 40. güne kadar olan dönemde mikro diyetleri kullanmışlar ve larvaların pankreatik bölüm ve bağırsağın iki hücreli bölgesindeki sindirim kapasitelerini incelemişlerdir. Buna göre tripsin aktivitesi kontrol grubunda canlı yem grubuna göre aynı olmakla birlikte bazı gruplarda daha yüksek bulunmuştur. Pankreatik salgıların karma yem grubunda düşük olduğu, ancak lösin-alanin peptidaz enzimlerindeki belirgin düşüş ile alkalik fosfataz ve lösin aminopeptidaz enzimlerindeki artışların canlı yem grubu ile aynı olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonucunda karma yemle beslenen larvalardaki gelişmenin pankreatik enzim sentezi eksikliğinden olmadığı, zayıf gelişmenin geleneksel karma yemlerin larval sindirim özelliklerini karşılamakta yetersiz kaldığından kaynaklandığını bildirmiştir.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1994), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvaları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, yumurta açılımından sonraki 10,15,20 ve 25. günlerden sonra mikro partikül yemler kullanarak, larvaları karma yemle beslemeye geçmişler ve bu esnada larvaların enzim aktivitelerini tespit etmişlerdir. Bu çalışma

sonucunda karma yemle beslenen tüm gruplarda pankreatik kisimdaki amilaz aktivitesinin çok hizli bir sekilde arttigini, bunun da baliklarin yetersiz beslenmesinden kaynaklanabileceğini belirtmislerdir. Karma yemle beslenen gruplarda kontrol grubu olarak kullanılan *Artemia* grubundan düşük bir gelisme gözlemislerdir.

ZAMBONINO INFANTE ve CAHU (1994a), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarini 25. günden itibaren aminoasit karisimi ve protein ile zenginlestirilmis karma yeme adapte etmeye çalismislerdir. Karma yem grubundaki gelisme kontrol grubu olarak bilinen canli yem grubundaki gelismeden oldukça düşük bulunmustur. Tripsin aktivitesinin yeme aminoasit karisimi eklenmesi ile arttigi, 24. günde larvada tespit edilen pepsin enziminin karma yemle beslenen grupta, kontrol grubundan belirgin sekilde yüksek oldugu tespit edilmistir. Çalisma sonucunda pepsinin levrek larvalarinin sindirim islemlerinde önemli bir etken olmadigi sonucuna varilmistir.

PEREZ ve ark. (1996), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarini 15-35. günler arasinda farkli protein ve karbonhidrat içerikli yemlerle besleyerek, yasama, gelisme oranlari ile birlikte amilaz ve tripsin enzim aktivitesini tespit etmislerdir. En iyi gelisme ve yasama oranı %50 protein, %17 karbonhidrat içeren yemle beslenen grupta olduğunu bildirmislerdir. Amilaz aktivitesinin 18. günden sonra yemlerin karbonhidrat içeriğinin artisina paralel olarak arttigi, 35.günde ise yemlerin protein içeriğindeki artisa paralel olarak tripsin aktivitesinin de arttigini bildirmislerdir. Çalisma sonucunda amilaz aktivitesinin larval dönemde yeterli olduğunu, enzim aktivitesinin de yasa bagli olarak degistigi arastiricilar tarafından bildirilmistir.

ALARCON ve ark. (1999), *in vitro* analizler kullanarak mikro kapsüllerin içeriğindeki protein kaynaklarinin çipura larvalarinda proteaz enzim aktivitesi üzerine etkilerini çalismislerdir. 8 günlük çipura larvalarinda protein kaynagi olarak albumin kullanilmasinin %60 gibi önemli bir oranda proteaz aktivitesini düşürdüğünü, kazain ve kalamar unu gibi protein kaynaklarinin kullaniminin ise proteaz aktivitesinin degismesine neden olmadigini bildirmislerdir. Bu çalismanin sonucunda, larval balik beslemesinde kullanılacak mikro kapsüllerin yapiminda hammadde olarak kalamar ununun en iyi aday olduğunu belirtmislerdir.

CAHU ve ark. (1999), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarinin 10.günden 41.güne kadar farkli oranlarda balik hidrolisati içeren karma yemlerle beslenmesini çalismislerdir. En iyi gelisme oranı balik unu içeren yem ile balik ununun yerine %25

oranında balık hidrolisati içeren yemden alınmış olup, bu gruplarda 41.günde diğer gruplardan çok daha fazla bir tripsin salgısına rastlanmıştır. Çalışma sonunda, orta seviyedeki balık protein hidrolisatlarının kullanımının, balıkların sindirim fonksiyonlarının ergin hale gelmesinde kolaylaştırıcı bir faktör olduğunu bildirmişlerdir.

YUFERA ve ark. (2000), çalışmalarında çipura (*Sparus aurata*) larvalarının ilk beslenmesinde protein duvarlı farklı tipteki mikro kapsülleri kullanmışlardır. Kullanılan yemlerin hiçbiri kontrol grubu olan canlı yemlerden sağlanan gelişme ve yaşama oranını vermezken, sindirim sisteminde yemlerin kolayca parçalanabildiği, bazı dememe gruplarında histolojik incelemeler sonucunda bağırsak epitelyum yapısının çok iyi durumda olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda 4.günde proteaz aktivitesinin başladığı, larvanın yaşına bağlı olarak bu proteaz, amilaz ve alkalın fosfataz aktivitelerinin geliştiğini, fakat ilk bir ay proteaz enzim çeşitliliğinin artmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca; mikro diyetlerin gelişiminde dikkat edilmesi gereken en önemli konulardan birinin yem hammaddesinin seçimi olduğunu belirtmişlerdir.

CAHU ve ark. (1998), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarının üretimi aşamasında tanklarda mikroalg bulunup bulunmamasının sindirim enzimleri ve yaşama oranları üzerine etkisini belirlemek üzere yaptıkları çalışmada, larvaları 5-20.günlerde algli ve algsiz ortamda canlı yem ile beslemişlerdir. 20.günden sonra her besleme grubunu canlı yem ve karma yem olmak üzere iki alt gruba bölüp, 32.güne kadar beslemişlerdir. Deneme sonunda, mikroalg ilaveli canlı yem ve mikro diyet ile beslenen gruplarda, mikroalg ilavesi olmayan canlı yem ve mikro diyet ile beslenen gruplara göre daha iyi bir yaşama oranı elde etmişlerdir. Bu çalışmada, değerlendirmeye alınan 3 pankreatik enzimin spesifik aktivitelerinin larvanın yaşı ile ilişkili olduğu, tanklara mikroalg ilave edilip edilmemesinin çok büyük bir değişkenlik göstermediği bildirilmiştir. Bu enzimlerden, amilaz ve kimotripsin dışında, sadece tripsin aktivitesinde, 8-16. günler arasında alg ilaveli ortamda gelişen larvalarda bir artış gözlemlenmiştir. Pankreatik enzimlerin tersine, alkaline fosfataz, lösin-alanin peptidaz ve aminopeptidaz N gibi enzimlerin spesifik aktiviteleri larvanın yaşından ziyade, ortamda mikroalg bulunup bulunmamasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. 26.günde, mikroalgli ortamda bulunan larvalarda alkalın fosfataz ve maltaz aktivitelerinde, mikroalgsiz ortamda bulunanlara göre önemli bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Çalışma, alglerin, sindirim enzimlerinin üretiminde tetikleyici rol üstlendiklerini ortaya

koymuştur. Deniz balıkları larvalarında simdiye kadar yapılan çalışmalarda üretim tanklarına mikroalg ilavesinin tripsin aktivitesinde bir artışa neden olduğu gösterilmemiştir (LE VAY ve ark.,1993). Bu çalışmada gözlenen mikroalg ilavesinin tripsin'in spesifik aktivitesi üzerine olumlu etkisi, CCK(kolesistokinin) gibi sindirim hormonları tarafından, pankreatik hormonal tetikleme ile karıştırılmamalıdır. Gerçekte böyle bir etki, pankreatik enzimlerin birçoğunun tetiklenmesiyle sonuçlanır (SHEELE,1993). ZAMBONINO ve CAHU (1994a) tarafından yapılan bir çalışmada, tripsin'in spesifik aktivitesindeki bir hareket, karma yemlere serbest aminoasitlerin bir karışımı ilave edildiği zaman rapor edilmiştir. Daha açık bir ifade ile serbest aminoasitler tarafından tripsin'in aktivasyonu memelilerde ortaya konmuştur. (GRENDL ve ROTHMAN 1981). Algler serbest aminoasitlerin büyük bir kısmını bünyelerinde bulundurdukları için, salınan aminoasitler larvalardaki tripsin'in stimülasyonundan sorumlu tutulabileceği belirtilmiştir (ADMIRAL ve ark, 1986).

PATHAK ve ark.(1982), alkaline fosfataz ve aminopeptidaz N gibi membranik enzimlerin besinsel durumun göstergesi olduğunu bildirmişlerdir. Alkaline fosfataz enzim aktivitesinin düşük olduğu durumlarda, larvaların besinsel olarak yetersiz yemlerle beslenmiş olabileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1994), yaptıkları bir çalışmada, levrek larvalarını çıkıştan sonra farklı zamanlarda (10,15,20 ve 25. günler de) mikro partikül yemlerle beslemenin larvanın gelişimi ve sindirim enzimleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonunda, mikro partikül yeme erken geçişin düşük bir larval gelişmeye neden olduğu ve 20.günden önce mikro partikül yeme geçişin larvanın gelişimini erteleyeceği bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada, pankreatik enzimlerden amilazın spesifik aktivitesinde geçiş dönemlerinde artış olduğunu, bunun ise yemlerdeki %12'lik nişasta içeriğinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Alkaline fosfataz aktivitesindeki mikro partikül yemlerle beslenen gruplarda gözlenen düşüklüğü besin yetersizliğine bağlamışlardır.

TSENG ve ark. (1982), tripsin'in spesifik aktivitesinin, genellikle yemin protein içeriği ve aminoasit profili tarafından etkilendiğini bildirmişlerdir.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1995a), levrek larvalarının sindirim enzimleri üzerine farklı moleküler forma sahip nitrojen kaynaklarının etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, farklı nitrojen kaynaklarından bazal diyete sadece

%10'luk bir ilavenin etkisini incelemislerdir. Levrek larvalarının beslenmesinde kullanılan bu mikro diyetlerde balık unu, aminoasit karışımı ve kazein hidrolisati gibi nitrojen kaynaklarını kullanmışlardır. Kontrol grubunun canlı yem olarak kullanıldığı bu çalışmada larvalar 25.günde mikro diyet yemle beslenmeye başlamıştır. Mikro partikülle beslenen larvalar arasında gelişme açısından bir farklılık gözlenmezken, yaşama oranı kazein hidrolisati grubunda diğerlerine göre önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Buna karşılık bu mikro diyetin pankreatik salgılar üzerinde olumsuz bir etki yaptığı gözlenmiştir. Sitolitik bir peptidaz olan lösin-alanin peptidaz aktivitesi mikro partikül yemle beslenen gruplarda yüksek seviyelerde kalmıştır. Buna karşılık canlı yem grubunda gelişim dönemlerine göre membranik enzim aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi bu çalışmada da aminoasit karışımı içeren mikro diyetler tripsin'in spesifik aktivitesini arttırmışlardır. Bu tetiklemeye karşılık mikro diyetle beslenen gruplar arasında en düşük yaşama oranı aminoasit karışımına sahip yemlerden elde edilmiştir. Sonuç olarak, klasik mikro diyetlerle beslemenin larvaların sindirim özelliklerinin korunmasına ve buna bağlı olarak enterosist farklılaşmasını engellediği sonucuna varılmıştır. Buna karşılık hidrolize protein içeren bir karma yemin bu gecikmeyi az da olsa erteleyebileceği bildirilmiştir. Çalışmada, protein hidrolisatlarının larval gereksinimi karşılama serbest aminoasitlere oranla daha üstün olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada ayrıca, lap/leu-ala peptidaz oranının sindirim sisteminin olgunlaşma olgunlaşmadığının iyi bir göstergesi olduğunu bildirilmiştir.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1995b), tarafından yapılan bir çalışmada, levrek larvalarının üretimi esnasında farklı protein kaynaklarının sindirim fonksiyonlarının olgunlaşması üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, farklı protein kaynaklarına sahip mikro diyetlerle (%100 balık unu, %100 kazein karışımı,%50 balık unu+%50 kazein karışımı ve kontrol olarak sadece canlı yem) levrek larvalarını beslemişlerdir. Çalışma sonunda amilaz'ın spesifik aktivitesinin yemlerden bağımsız olarak yaş ile azaldığı bildirilmiştir. Buna karşılık tripsin'in spesifik aktivitesinde ise bir artış gözlemlenmiştir. Kazein karışımını içeren mikro diyet ile beslenen larvalarda amilaz ve tripsin aktivitesinde bir azalma olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonunda, mikro diyete geçiş aşamalarında yem içerisinde protein

hidrolisatları'nın bulunmasının enzimsel aktivite üzerine olumlu etki yaptığı bildirilmiştir.

GRENDALL ve ROTHMAN (1981), serbest aminoasitlerden bilhassa lizin'in, tripsin salgısını tetiklediği bildirilmiştir. Bu durum memelilerde rapor edildiği gibi, nitrojenin moleküler formunun, tripsin'in spesifik aktivitesi üzerindeki etkisini desteklediği görüşünü güçlendirmektedir (VALETTE ve ark.,1992).

OWYANG'S (1994), tripsin ve amilaz gibi iki enzimi etkileyen kazein karışımının etkisinin bir hormonal mekanizmanın sonucu olabileceği bildirmiştir. Bu araştırmacı aynı zamanda kazein hidrolisatı'nın tripsin'in spesifik aktivitesini inhibe ettiğini belirtmiştir.

WATANABE ve ark. (1983), alkaline fosfataz aktivitesinin fosfolipitler ve fosfoproteinler gibi fosforlu substratlar tarafından etkilendiği bildirilmiştir. Fosforun *Artemia* da %1 ve balık ununda % 3,3 bulunduğu belirtilmiştir.

UEBERSCHAR ve ark. (1992), balık larvalarında triptik enzim aktivitesinin, sindirim kapasitesinin iyi bir indikatörü olduğunu bildirmiştir.

NOLTING ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada, canlı yemi ikame edebilecek mikro partikül yemlerin potansiyellerini değerlendirmişlerdir. 27 gün süren bu denemede, 15.günden sonra canlı yem (kontrol grup) ve test diyetleriyle (Nippai ML feed) levrek larvalarını beslemişlerdir. Çalışmada, her iki grupta da tripsin'in spesifik aktivitesi belirlenmiştir. Çalışma sonunda canlı yem grubunda mikro partikül test diyetine göre daha yüksek bir tripsin aktivitesinin bulunduğu bildirilmiştir ($p<0,05$).

RIBEIRO ve ark. (1999), pankreatik enzimlerin sentez işlemlerinin gıda alimiyla tetiklenmediğini teyit etmiştir. Aslında pankreatik enzimlerin spesifik aktivitesi larvanın gelişim dönemi boyunca benzer bir model takip etmektedir. Larvaların protein içeriği ile ilgili enzim aktivitesi olarak ifade edilen bu aktivite, levrek larvalarında 20.günde arttığı, 25.güne kadar azaldığı ve sonuçta post larval gelişim esnasında benzer seviyede kaldığı bildirilmiştir(ZAMBONINO ve CAHU,1994b). Bu model genç larvaların sindirim kapasitesinin ağırlıkla çok yüksek bir ilişkisi olduğunu, aynı zamanda sentez işleminin yaşla bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur. Amilaz, sindirim enzimlerinden yaşla ilgili olanlarına iyi bir örnektir. Amilaz'ın spesifik aktivitesi larvanın ilk dönemlerinde çok yüksektir. Bu aktivite larvanın gelişim döneminde azalmaktadır. Larvanın gelişim dönemi boyunca amilazda gözlenen azalma karma yemin glisit

konsantrasyonlarından bagimsiz olarak gözlenmektedir. Bu da larvanin gelisim dönemi boyunca amilaz spesifik aktivitesinde gözlenen azalmanin genetik olarak programlandigini ortaya koymaktadır. Buna karsilik amilaz'in spesifik aktivitesi yemde bulunan glusit konsantrasyonuyla da ayarlanabilmektedir. Yapilan bir çalismada, %25 glusit konsantrasyonu ile beslenen larvalardaki amilaz aktivitesindeki azalmanin, %5 glusit içeren yemle beslenenlere göre daha düşük oldugu gösterilmiştir (HENNING ve ark 1994). Sonuç olarak arastiricilar, sindirim enzimlerinin gelisiminin öncelikle genetik olarak programlandigini daha sonra diyet kompozisyonu ile modifiye edilebildigini bildirmislerdir. Glusit konsantrasyonlari degistirilmis karma yemlerle beslenen levrek larvalarinda, 18. ve 35.günde yüksek miktarda amilaz aktivitesinin mümkün oldugu gözlenmiştir. Bu gözlemler substratin konsantrasyonuna bagli olarak larvadaki enzim aktivitesinin adaptasyonunu ortaya çikarmıştır (PEREZ ve ark.,1998). Buna karsilik benzer sekilde farkli protein konsantrasyonlari(%30 ve %60/kuru yemde) ile beslenen larvalardaki tripsin aktivitesinin 35.günde arttirmanin mümkün olabilecegi fakat 18 ve 28 günlük larvalarda bu artis yemde kullanılan protein oranina göre degistirilemediği belirtilmiştir. Bu durum amilaz spesifik aktivitesini kontrol eden mekanizmanin larvanin erken dönemlerinden beri etkin oldugunu gösterirken, tripsin'i kontrol eden mekanizmanin daha sonraki asamalarda aktif oldugunu göstermiştir.

GOVONI ve ark. (1986), balik larvalarinin sindirim kanalinin morfolojik histolojik ve fizyolojik olarak ergin baliklarin sindirim kanalindan çok daha az ayrintili bir yapı gösterdigini, yumurta açilimindan sonra, sindirim kanalinin histolojik olarak farklılaşmamış, düz bir tüp seklinde oldugunu anüs ve agzin kapali oldugunu bildirmislerdir.

2.11.Canli Yemler ve Mikropartikül Yemler Üzerine Yapilan Çalismalar

KISSIL (1984), akuakültürde kültür faaliyetlerinin ve isgücünün yaklaşık %30-40'inin canlı yemlere harcandigini, gereken üretim alaninin ve maliyetinin yanında besinsel kompozisyonunun da bir dezavantaj oldugunu bildirmiştir.

PERSON-LE RUYET (1989),küçük agizli tüm deniz balıkları üretiminde iyi bir yasama oranı için canlı yemlerin kullanımının gerekliligini bildirmiştir. Arastirici, bu yemlerin besin kompozisyonunu korumanin mümkün olmadigini belirtmiştir.

PLANAS ve ark. (1990), canlı yemlerin bazı dezavantajlara sahip olduğunu, üretiminin pahalı olmasıyla birlikte biyokimyasal kompozisyonunun önceden tahmin edilemediğini ve çoğu zamanda yetersiz olduğunu bildirmiştir.

KOLKOVSKI ve ark. (1993), larval balık beslemede iki temel eğilim olduğunu, bunlardan birinin rotifer, *Brachionus plicatilis* ve Crustacea'lardan *Artemia salina* gibi canlı yemlerin kullanımı, diğerinin ise karma yemlerin kullanımı olduğunu belirtmiştir. Ayrıca mikro diyetlere enzim ilavesinin, sindirim sistemi henüz ilkel durumda olan deniz balıklarının ilk beslemesi aşamasında olumlu etki yaptığını belirtmiştir.

PERSON-LE RUYET ve ark. (1993), deniz balıkları larval yetistireciliğinde canlı yemlere olan bağlılığın azaltılmasının teknik ve ekonomik açıdan önemli olduğunu belirtmiş, levrek larvası yetistireciliğinde karma yeme geçişin 15 gün erkene alınmasının *Artemia* kullanımında %80'in üzerinde tasarruf sağlayacağını belirtmiştir.

SORGELOOS ve ark. (2001), şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *Artemia*'nin yerini tam olarak ikame edebilecek bir karma yem yapılamadığını ve *Artemia*'nin hala larval aşama için vazgeçilmez bir kaynak olduğunu, fakat 1982-1984 yılları arasında yaşanan El Nino olayının *Artemia* üretimini olumsuz etkilediğini ve bu olumsuzluğun doğrudan *Artemia* fiyatlarına yansıdığını belirtmişlerdir. Bu fiyatları artıran üretimin fiyatlarına doğrudan yansımaları, farklı suni yemler ile larval aşamada *Artemia* kullanımının azaltılmasını zorunlu kılmıştır.

TANDLER ve KOLKOVSKI (1991), çipura (*Sparus aurata*) larvalarında ilk beslemeden itibaren canlı yem kullanımını mikro diyet yemleri kullanarak % 50 azaltmayı başarmışlar ve % 80 canlı yemlerin yerine mikro diyet kullanımının larvaların gelişmesine engel olmadan sağlanabileceğini belirtmişlerdir. 8-22. günler arasında çipura larvaları üzerinde yaptıkları çalışmada, farklı oranlarda rotifer (3 rot/ml, 7,5 rot/ml ve kontrol grubu olarak 15 rot/ml) ve %50.2 protein içeren mikro diyetler kullanarak yem tüketimlerini incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda sadece mikro diyet ile beslenen grubun yaşama ve gelişme oranı kontrol grubundan önemli bir şekilde düşük bulunurken, %20 oranında rotifer ve %80 karma yemin birlikte kullanıldığı grubun gelişme oranı kontrol grubu ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada yalnızca mikro diyet kullanımı sonucunda alınan düşük gelişmenin yem tüketiminin düşük olmasından ya da henüz tam olarak gelişmemiş bir sindirim sistemine sahip larvalarda bu yemlerin sindirilememiş olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

KOLKOVSKI ve ark. (1993), larval beslemede *Artemia* ve mikro diyetlerin beraber kullanımı sırasında, mikro diyetlerin tüketim ve sindirim oranlarının artmasında 2 faktörün etkili olduğu belirtmişlerdir. Bunlar; *Artemia*'nin mikro diyetlerle beraber kullanımı sırasında dolaylı olarak kimyasal ve görsel uyarımı, diğerinin ise *Artemia*'nin biyokimyasal kompozisyonunun mikro diyetlerin sindirimine ve asimilasyonuna doğrudan etkisinin olmasıdır.

KOLKOVSKI ve ark. (1997b), çipura larvalarının, farklı *Artemia* oranları kullanılarak, görsel ve kimyasal açıdan uyarıcılarla karşı karşıya bırakıldığında, mikro diyet sindiriminin yalnız mikro diyetle beslenen gruba göre %120 arttığını, *Artemia* da bulunan 14 metabolitten, glisin, alanin, betain ve arginin'in mikro diyetlerin tüketiminde cezbedici rol üstlendiğini tespit etmişlerdir.

ROSELUND ve ark. (1997), 6-34.günler arasında, çipura ve levrek larvaları üzerinde yaptıkları çalışmada larvaları, canlı yem ve canlı yem+mikro partikül yem ile beslemişler, sonuçta karma yem+canlı yem grubundaki yaşama ve gelişme oranının canlı yem grubundan yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre eğer mikro partikül yemler ve canlı yemler birlikte kullanılırsa, larvaların erken dönemde karma yeme alıştırılabileceği, canlı yemlere olan bağlılığın bir miktarda olsa azaltılabileceğini bildirmişlerdir.

FERNANDEZ-DIAZ ve YUFERA (1995), 6-12 günlük çipura (*Sparus aurata*) larvalarını 8 farklı mikro kapsül yem ile besledikleri çalışmada, kapsül duvarının bozunmasında yaş, yeme enzim ilavesi, yemin bağlayıcı maddesi ve mikro kapsüllerin izolasyonunda kullanılan yöntemin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada aynı populasyon içindeki larvaların kapsül duvarının yıkımında bireysel farklılıklar gösterebildiği, kapsül izolasyonunda kullanılan yöntemde kapsül duvarının yıkımında önemli bir faktör olduğu tespit edilmiştir. Jelatinde izole edilen kapsüllerin duvarlarının alkolde izole edilen kapsüllere göre yasa bağlı olmaksızın daha kolay yıkılabildiği, yeme enzim eklenmesinin ve bağlayıcı maddenin kapsül duvarının yıkımında çok önemli olmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, çipura larvalarının dışarıdan beslenmeye geçtikleri dönemde suni yemleri kolayca sindirebilecekleri, larval fonksiyonlarının buna yeterli olduğunu, fakat kapsül duvarının kalınlığı ve larval yasin burada etkili olduğunu bildirmişlerdir.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (2001), deniz balıkları larvalarının ilk beslenmesinde mikro diyet yem kullanımının simdiye kadar yapılan çalışmalarla basarılmadığını ve bunda en büyük etkenin, mikro diyet yem larvalar tarafından kolay tüketilmesine rağmen, sindirilememesi olduğunu belirtmişlerdir. Yemlerin sindirilememesinde larvaların yetersiz bir sindirim sistemine sahip olmasının etkili olduğunu, buna karşılık canlı yemlerin hücre dışı enzimlerinin sindirime yardımcı olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra deniz balıkları beslenmesinde kullanılacak olan mikro diyet yemlerin boyutunun çok iyi ayarlanması gerektiğini, besin madde kompozisyonlarının homojen, içerikteki hammaddelerin boyutunun yem büyüklüğünden küçük olması gerektiğini, partiküllerin suda stabil, sindirilebilir, tadının larvalar tarafından kabul edilebilir lezzette olması gerektiğini, larvaların erken dönemde yavaş hareket ettiklerinden yemlerin yavaş batan özellikte olması gerektiğini belirtmişlerdir.

KOVEN ve ark. (2001), deniz balıkları larvalarında mikro diyetlerin performansının, *Artemia* ile birlikte kullanıldığı zaman arttığını bildirmişlerdir. Bu durumun, *Artemia* içindeki besinsel faktörlerin mikro diyetlerin tüketim, sindirim ve asimilasyonunda olumlu etkisinin sonucunda ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Buna ilaveten, 7 günlük çipura larvalarında yapılan çalışmada mikro kapsüllerin rotifer ile birlikte kullanılmasında ve mikro kapsül yem içeriğinde lipozomla kaplanmış serbest aminoasitlerin (alanin, glisin) ve betain bileşiminin eklenmesinin tüketimin oranını arttırdığını bildirmişlerdir.

GAMSIZ (2002), çipura (*Sparus aurata*) larvalarının *Artemia* kullanım oranlarının azaltılmasına yönelik yaptığı çalışmada, 21-35. günler arasında mikrokapsül yem kullanılarak, çipura larvası yetistireciliğinde yem giderleri içinde büyük bir pay tutan *Artemia* kullanım oranlarının %25 azaltılabileceğini belirtmiştir. Ayrıca bu oranda mikro kapsül yem ile beslemenin larvaların gelişme ve yaşama oranı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını bildirmiştir.

KOLKOVSKI ve ark. (1997c), levrek larvalarında 20-39.günlerde dört farklı besleme rejiminin mikro diyetlerin alımı ve absorbe edilmesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Ayrıca, mikro diyetlerin randımanı üzerine sindirim enzimi ve canlı gıdanın etkilerini incelemişlerdir. Bu denemede balıklar dört farklı besleme rejimi ile muamele edilmişlerdir. Bunlar;

1-*Artemia*+mikro diyet

2-*Artemia*+Sindirim enzimi ilaveli mikro diyet

3- Sindirim enzimi ilaveli mikro diyet

4-Enzim ilavesiz mikro diyet

Bu çalışmada mikro diyetlerin alimi ve asimilasyonu radioisotop metodu ile test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, mikro diyet ile birlikte verilen *Artemia*'nin mikro diyet'in randimanını arttırdığı göstermiştir. Araştırmacılar aynı zamanda mikro diyete enzim ilavesi yapıldığı zaman mikro diyet asimilasyonunda %30 gibi bir düzelme kaydetmişlerdir. Çalışmanın sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1-*Artemia* naupli'nin sindirim enzimleri larval sindirime yardımcı olabilir (DABROWSKI, 1984: LAUF ve HOFER, 1984: KOLKOVSKI, 1993)

2-Tripsin'in aktivitesi canlı yem ve mikro partikül yemlerle beslemede önemli bir farklılık yaratmamıştır. Bilindiği üzere tripsin'in spesifik aktivitesi yemin protein ve aminoasit kompozisyonuyla ilgilidir (CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1994).

3-Amilaz aktivitesi canlı yemden mikro diyet yeme geçişle birlikte hemen farklılık göstermektedir (CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1994).

4-Canlı gıda sindirim aktivasyonunu düzenleyen sindirim hormonlarının katkısı ile lavanın sindirim işlemine yardım etmektedir (CHAN ve HALE, 1992: KOLKOVSKI, 1995).

5-*Artemia* naupli polar lipitler ve diğer fraksiyonlar gibi faktörlerle mikro diyetlerin asimilasyonuna etki eder(KOVEN ve ark.,1993).

Sonuç olarak, canlı yemin besleme tankında bulunmasının, mikro diyet performansını larval aşamada etkilediği bildirilmiştir (TANDLER ve KOLKOVSKI, 1991: KOLKOVSKI ve TANDLER, 1995a).

2.12.Hormonlar Üzerine Yapılan Çalışmalar

Deniz larvalarının kese çekiminden itibaren ilk beslenmeye başlaması sindirim sistemlerinin hala ilkel olduğu döneme rastlamaktadır. Larvaların sindirim sistemi üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen larvanın sindirim sisteminin gelişimi hala tam olarak çözülememiştir (WALFORD ve LAM, 1993: SEGNER ve ark., 1994: CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1995b: LUIZI ve ark., 1999: RONNESTAD ve ark., 2000a,b). Balıklarda bazı bağırsak hormonlarının dağılımı ve konumu üzerine

çalısmalar baslıca immüno histokimyasal metotlar kullanılarak yürütülmüştür (HOLMGREN ve ark., 1982; REINECKE ve ark., 1997; KUOKAWA ve ark., 2000; KAMISAKA ve ark., 2001).

2.12.1.Bombesin Hormonu

KOLKOVSKI ve TANDLER (1995a), serbest aminoasitlerin, pankreatik enzimlerin salgısını kontrol eden bombesin gibi hormonal faktörlerin salinimini tesvik ettiği bildirmişlerdir.

KOLKOVSKI ve ark. (1997a), mikro partikül yemlerin ve canlı yemlerin Bombesin hormonu üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Sadece canlı yemle beslenen grupta, yalnızca mikro partikül yemle beslenen gruba göre %300 daha fazla bombesin hormonunun tespit edildiği, fakat burada kullanılan canlı yemdeki tetikleyici faktörün hala belirsiz olduğunu bildirmişlerdir.

KOLKOVSKI ve ark. (2000), juvenil tatlı su levreklerinin (*Perca flavescens*) beslenmesinde kullanılan yemlere hormon ve sindirim enzimi ilavesinin, bu balıkların büyüme ve enzimatik aktivitesi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bu hormon ve enzim ilavesinin balıkların sindirimine katkısının olup olmayacağı hipotezi bu çalışma ile test edilmiştir. Bu çalışmada test edilen diyetler;

- 1-Ticari alabalık başlangıç yemi
- 2-Yüksek oranda balık ve kalamar unu içeren yem
- 3-Deneysel diyete % 0,1 oranında ilave edilen bombesin (sindirim hormonu)
- 4- Deneysel diyete % 0,1 oranında ilave edilen pankreatin (sindirim enzimi)'dir.

Çalışma sonunda, dört farklı yemle beslenen balıklar benzer bir gelişme göstermiştir. Yasama oranı açısından deneme grupları arasında önemli bir farklılık gözlenmemiş, buna ilaveten yüksek bir yasama oranı elde edilmiştir. Deneme grupları arasında tripsin, kimotripsin ve pepsin'in aktiviteleri arasında önemli farklılık bulunmamıştır. Bu çalışma, tatlı su levreği juvenillerinde sindirim hormonu ve enzimlerinin yemlere ilavesinin gerekli olmadığını ortaya koymuştur. Hormon ve enzim ilavesine balıkların ihtiyaç duymaması bu balıkların sindirim sistemlerinin tam olarak geliştiğine işaret etmiştir.

2.12.2.Kolesistokinin (CCK)

Kolesistokinin hormonu sindirim islemlerinde en önemli düzenleyici hormonlardan biri olarak bilinmektedir. CCK bağırsak hattı boyunca epitelyum hücreler etrafında dağılan endokrin hücreler tarafından üretilmektedir. CCK'nin fonksiyonları;

- *Safranin salinimi
- *Pankreatik sindirim enzimlerin salinimi
- *Mide boşluğunun düzenlenmesi

CCK'ya yönelik balık larvalarında yapılan çalışmalar hala yetersizdir. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda CCK'nin en popüler stimulantinin di-tri peptidleri ihtiva eden proteinler ve kısmen sindirime uğramış yağ ürünleri olduğu bildirilmiştir (LIDDLE, 2000).

KOVEN ve ark. (2002), ringa balıkları üzerinde yaptıkları çalışmada çözülebilir proteinin, serbest aminoasitlerden daha hızlı ve daha büyük miktarda CCK tetiklediğini (tüm vücut homojenatında) bildirmişlerdir. Buna ilaveten triptik aktivitelerinin de proteinle beslenen larvalarda arttığını, buna karşılık serbest aminoasitlerle beslenen larvalarda bir değişim gözlenmediğini belirtmişlerdir. CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1995b), deniz levrekleri (*Dicentrarchus labrax*) üzerinde yaptıkları çalışmada, protein hidrolisati (kazein)'nin tripsin aktivitesini indirgediği tespit etmişler, buna karşılık serbest aminoasitlerin bir kısmını ile beslenen larvalarda tripsin aktivitesinde bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

LIDDLE (2000), triptofan ve fenilalanin'in CCK salgısını stimüle etmek için potansiyel ürünler olduğu bildirmiştir.

KOVEN ve ark. (2002), yaptıkları bir çalışmada, sindirim kanalı doluluğunun CCK salgılamasında etkili olmadığını bildirmişlerdir.

BENTHLEY (1998), besleme esnasında proteolitik enzim salgısının düzenlenmesinin sindirim hormonlarını ihtiva eden birçok komponent tarafından kontrol edildiği bildirmiştir. Bu araştırıcı, CCK hormonunun vertebratalarda sindirim esnasında tripsin gibi pankreatik enzimler ve safranin saliniminin düzenlenmesinde anahtar bir rolü olmasından dolayı oldukça önemli olduğunu belirtmiştir. Bu konu üzerinde yapılan diğer çalışmalarda, tripsin'in diğer proteolitik enzimleri aktive etmesinden dolayı sindirim islemlerinde anahtar bir enzim olarak hizmet ettiği belirtilmiştir (HOLST VE SCHMIDT,1994; LIDDLE 1995).

UEBERSCHAR (1988), larval asamada tripsin'in en önemli proteolitik sindirim enzimi olduğunu ve genelde çıkıştan sonra tespit edildiğini bildirmiştir.

CHEY (1993), serbest aminoasitlerin pankreatik enzimlerin salgılanmasını kontrol eden somatostatin ve CCK gibi hormonal faktörlerin salınımını tetiklediğini bildirmiştir.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Arastirma Yeri

Bu arastirmanin deneysel asamasi, Antalya ili, Demre ilçesinde bulunan Tarim Bakanligina bagli Akdeniz Su Ürünleri Arastirma Üretim Egitim Enstitüsü'nün çipura ve levrek kuluçkahanesinde gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.Denemede Kullanilan Larvalar

Bu arastirmada kullanılan anaçlar, yumurtlama sezonundan yaklaşık 2 ay önce adaptasyon tanklarına alınmıştır. Adaptasyon asamasından hemen sonra 2 disi 1 erkek seklinde yumurtlama tanklarına alınan anaçlardan, sıcaklık 16°C'ye gelince tamamen doğal koşullarda yumurta alınmıştır. Döllenen yumurtalar tank dışındaki reküperatörlerde toplanıp, gerekli tartım ve dezenfeksiyon işlemleri yapıldıktan hemen sonra konik inkübasyon tanklarına aktarılmıştır. Burada yumurtadan çıkan keseli larvalar 300 lt'lik deneme tanklarına 100 adet/lt yoğunlukta stoklanmıştır.

3.1.3.Denemede Kullanilan Tank Sistemi

Deneme grupları için 9 adet 300 lt'lik tabani konik fiber tank kullanılmıştır. Kullanılan tankların iç kısmi larvanın bu dönemdeki gereksiniminden dolayı siyah renklidir. Tanklara su dağıtımında akvaryum hortumları kullanılmıştır ve su debisinin ayarlanmasında ise akvaryumlarda kullanılan vanalardan yararlanılmıştır. Su çıkışında 200 µ'luk ve 500µ'luk plankton bezi kullanılarak yapılmış filtre kullanıldı. Besleme asamasında tankların tabanında biriken atıklar sifonla iki günde bir temizlenmiştir.

3.1.4.Denemede Kullanilan Canlı Yemler

Denemenin amacına uygun, larvanın ağız büyüklüğüne göre rotifer ve artemia gibi canlı yemler kullanıldı.

3.1.4.1.Canli Yemler

3.1.4.1.1.Alg Üretimi

Bu denemenin tüm asamalarında *Nannochloropsis sp.* türü alg kullanılmistir. Alg ünitesinde oda sicakligi 20-22°C arasinda tutulmustur. Bu odalarda aydinlatma sürekli olarak florsan lambalar ve projektörler ile yapilmistir.

Saf kültürler, öncelikle test tüplerinde yogunlastirilmis ve daha sonra 500ml'lik erlenlere alinmistir. Bu kültürler 2 litrelik büyük erlen ve 6 litrelik büyük balonlara asilanmistir. Balon jojelerden sonra algler saf kültür odasından, yogun kültür odasına alinarak burada önceden besin ortami hazir bulunan 50 litrelik ve ardindan 350 litrelik torbalara ekim yapilmistir.

Yogun alg üretimi tamamen kontrollü sartlar altında ve kesikli kültür teknigi uygulanarak yapilmistir. Uygulanan bu teknikte hizli büyüme elde etmek için etkili bir aydinlatma (3000-5000 lüx) ve havalandirmanin saglandigi kültür ortami öncelikle steril edilmekte ve ardindan uygun besin ortami ile zenginlestirildikten sonra alg hücrelerinin asilanmasi yapilmaktadir. Bu islemler esnasında kültürlere verilen havaya %1-2 oranlarında CO₂ ilave edilmistir. Kültür ortamında istenilen hücre yogunluguna ulasildigi zaman hasat islemi gerçekleştirilip, üretimde kullanilmistir.

3.1.4.1.2.Rotifer Üretimi

Rotifer kültürü test tüplerinden baslayarak, sirayla önce küçük erlenlere, oradan 2 litrelik erlenlere ve oradan da 6 lt'lik balon jojeler içindeki olgunlasmis alg kültürlerine ekim yapilarak gerçekleştirilmistir. Balonlardan da 50'lik torbalara ve buradan 350 lt'lik torbalara ekim islemi yapilmistir. 350 lt'lik torbalarda olgunlasan rotiferler buradan 2 m³'lük tanklara ekim yapilarak kültürün devamliligi saglanmistir.

Üretimde kullanılan suyun sicakligi 25°C, tuzlulugu %025'dir. Her tankta havalandirma, bir adet ortadan ve 4 tane kenardan olmak üzere 5 tane hava tasi ile saglandi. Aydinlatma 24 saat sürekli olarak yapildi. Rotiferlere besin olarak alg ve ekmek mayasi verilmistir. Rotiferler larvalara verilmeden 1 gün önce DHA Selco ve Super Selco ile esansiyel yag asitleri bakımından günde iki kez zenginlestirildi.

3.1.4.1.3 *Artemia* Üretimi

Artemia yumurtalarının açılımı için, öncelikle ekim yapılacak ortam bir gün öncesinden hazırlandı. ‰o 38'lik deniz suyunun doldurulduğu ve kuvvetli havalandırmanın yapıldığı 2 m³'lük tanklara sterilizasyonu sağlamak amacıyla ‰16'lik hipoklorit solüsyonundan 60 ml ilave edilmiştir. Daha sonra nötralizasyon için her tanka sodyum tiyosülfat ilavesi yapılmıştır. Su sıcaklığı ekim öncesi ve ekim aşamasında 30°C'de sabit tutulmuştur. Bu işlem için 3000W'lık rezistanslardan ve bu rezistansları kontrol eden dijital bir sistemden yararlanıldı. Ekim öncesi *Artemia*'nin çıkış oranını arttırmak için dekapsülasyon işlemi yapılmıştır. Aydınlatma su yüzeyinde 2000 lüks şiddetinde ayarlanmıştır. pH ise 8'in üzerinde tutulmaya çalışıldı. Çıkan naupli'ler hasat edilerek larvalara verilmştir.

Serbest aminoasitlerle besleme aşaması için ayrı bir düzenek kurulmuştur. 15 litrelik kovalarda 30°C'lik su sıcaklığında, havalandırmanın ve oksijen olduğu bir ortamda zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir (Tonheim ve ark. 2000). *Artemia* naupli'leri önceden hazırlanmış olan, ‰o38'lik tuzluluğa sahip, serbest aminoasitlerin 0,8 gr/lt olarak ilave edildiği ortama 600 adet/ml olarak stoklanmıştır. 16 saatlik zenginleştirme işleminden sonra *Artemia* metanaupli'leri hasat edilerek larvalara verilmştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneme Grupları

Çipura larvalarının farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş metanaupli'ler ile beslenmesi denemesinde 8 adet farklı esansiyel aminoasit kullanılmıştır. Kullanılan esansiyel aminoasitler aşağıdaki gibidir.

Histidin Grubu (Histidin ile zenginleştirilen grup)

İsolösin Grubu (İsolösin ile zenginleştirilen grup)

Lösin Grubu (Lösin ile zenginleştirilen grup)

Lisin Grubu (Lisin ile zenginleştirilen grup)

Metiyonin Grubu (Metiyonin ile zenginleştirilen grup)

Fenilalanin Grubu (Fenilalanin ile zenginleştirilen grup)

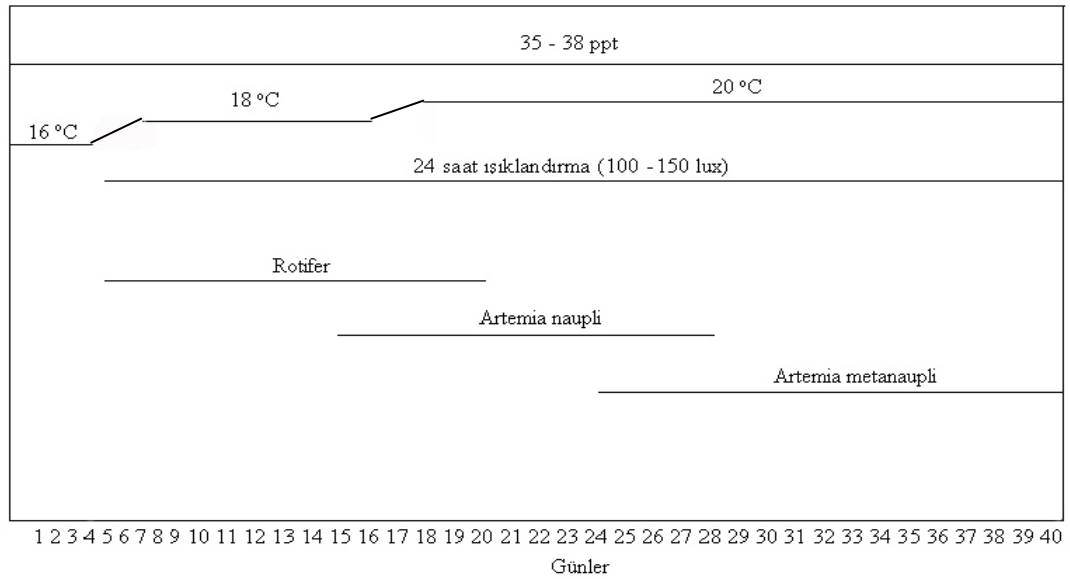
Treonin Grubu (Treonin ile zenginleştirilen grup)

Valin Grubu (Valin ile zenginleştirilen grup)

Kontrol Grubu

3.2.2.Besleme Programi

Besin kesesinin çekilmesiyle birlikte ortama alg ve rotifer eklenmiştir. Rotifer ile besleme dönemi 15. güne kadar devam etmiştir. Daha sonra *Artemia* nauplilerine alistirmek için rotiferlere ilave olarak 0,5 adet/ml olacak şekilde *Artemia* deneme tankına ilave edilmiştir. 20. güne kadar *Artemia* adaptasyon aşaması tamamlanmıştır. 20-24. günler arası bu besleme programı 1-2 adet/ml olacak şekilde devam ettirilmiştir. 24. günde ise *Artemia* metanaupli adaptasyon aşamasına geçilmiş ve deney ortamına 0,5-1 adet/ml olacak şekilde serbest aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli verilmeye başlanmıştır. 28. günde bu adaptasyon aşaması da tamamlanmış olup, postlarvalar bu günden itibaren 1-2 adet/ml olacak şekilde serbest aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli gruplarıyla beslenmiştir. Besleme denemesi 40. güne kadar devam etmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1.Çipura larvalarının beslenmesinde kullanılan protokol

3.2.3.Denemedeki Ortam Şartları

Çipura anaçlarından doğal olarak elde edilen yumurtalar gerekli sterilizasyon işlemlerinin ardından 16 °C'de tamamen karanlık ortamda inkübe edildi. Tuzluluk ‰ 35-38, pH'nin 7,5-8,3, O₂'nin 6,5 ppm'in altına düşmemesi için gerekli su akışı

saglandı. Inkübatörün konik tabanından yeterli miktarda havalandırma yapılarak yumurtaların inkübatör içinde homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır.

Yumurtadan çıkış yapan besin keseli larvalar sıcaklığı deneme boyunca hassas ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) dijital sistemlerle kontrol edilen larva tanklarına 100 adet/lt olacak şekilde stoklanmıştır. Besin kesesinin çekimi esnasında ortamın karanlık olması sağlandı. Besin kesesinin tüketiminin ardından ortama alg ilave edilerek 100-150 lüks'lük ışık projektörler ile sağlandı. Işık sistemi istenilen siddete dimmerli bir sistemin yardımıyla ayarlandı. Besin kesesinin çekimini takiben ortama rotifer girilmeye başlanmıştır. Su girişi deneme başında %10 olarak ayarlandı. Deneme sonunda ise %70 olacak şekilde kademeli olarak artırılmıştır. Su değişiminden kaynaklanan alg yoğunluğundaki değişimler gün içinde eklenmiştir.

3.2.4. Analizler

Deneme tanklarında denemenin başlamasını takiben 20 güne kadar her bes günde, 20. günden sonra ise her 4 günde bir örneklemeler yapılmıştır. Boy ve ağırlık ölçümleri işletmedeki mikroskop ve hassas terazide yapılmıştır. Enzim ve hormon gibi diğer biyokimyasal analizler için örnekler -196°C 'de sıvı azot tankında (Air Liquide, GT 40) analiz aşamasına kadar muhafaza edilmiştir. Enzim ve hormon analizleri GATA (Gülhane Askeri Tıp Akademisi) Hormon ve Biyokimya laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.2.4.1. Protein Analizi

Larva homojenatında çözülebilir protein içeriği tespit edildi. Bu ölçümler BRADFORD (1976) tarafından geliştirilen bir protein renk (dye) çözeltilisine dayalı yöntem ile yapıldı (Biorad Protein Assay, Cat No:5002). Enzimler için hazırlanan homojenatlar santrifüj edildikten sonra protein analizlerinde kullanılmıştır. Biorad tarafından üretilmiş olan kit prosedürleri uygulandıktan sonra UV-VIS spektrofotometrede 595 nm'de ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar μg protein/larva olarak ifade edilmiştir.

3.2.4.2. Aminoasit Analizi

Zenginleştirme öncesi ve sonrasında canlı yemlerden alınan örnekler uygun muhafaza metodları kullanılarak TÜBİTAK-MAM'a gönderilmiştir. Analizler burada AOAC (1995)'a göre yapılmıştır. Hidrolize edilen örnekler Phenomenex EZ Faast

GC-FID Aminoasit analiz kiti kullanılarak, GC-3800GC cihazı ile yapılmıştır. Uygulanan işlem hakkında bilgiler aşağıda verilmiştir.

| | |
|--------------------------|---|
| Kolon | ZB-AAA (10mx 0,25mm) |
| Cihaz | GC Varian 3800 |
| Sıcaklık Programı | 110°C den 30 °C artısla 310 °C ye 0,30 dk bekle |
| Detektör | FID - 320°C |
| Enjektör | 250°C |
| Hava | 300 ml/min |
| H₂ | 30 ml/min |
| Tasiyici Gaz | 1,5 ml/min (He) |
| Örnek enjeksiyonu | 2 µl |

3.2.4.3.Enzim Analizleri

3.2.4.3.1.Amilaz Enzim Aktivitesi

Balık larvalarındaki amilaz enzim aktivitesi, METAIS ve BIETH (1968)'e göre yapıldı. Sonuçlar, U/ mg protein olarak ifade edilmistir.

Unit= 37 °C'de 30 dakikada hidrolize olan mg nisasta/ml homojenat

Kullanılan Solüsyonlar;

Tampon çözeltisi olarak Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ M/15 pH= 7,4

Substrat olarak 3 ppt'lik nisasta çözeltisi

N/10'luk iyot çözeltisi (asetik asitte çözünmüs)

HCl 1N

Deneyin Yapilisi;

| Prosedür | Küvetler | |
|-------------------|-------------------------------|------------|
| | Reaksiyon Küveti | Kör Küveti |
| Nisasta çözeltisi | 100 µl | 100 µl |
| | 5 dakika 37 °C’de inkübasyon | |
| Homojenat | 50µl | - |
| | 30 dakika 37 °C’de inkübasyon | |
| HCl 1N | 20µl | 20µl |
| Homojenat | - | 50µl |
| Distile su | 400µl | 400µl |
| Iyot | 2 ml | 2 ml |

580 nm’de okuma işlemi yapılmıştır

3.2.4.3.2.Lösin-Alanin Peptidaz Enzim Aktivitesi

Örneklenen balık larvalarındaki lösin-alanin peptidaz aktivitesi NICHOLSON ve KIM (1975)’e göre yapıldı. Sonuçlar, mU/ mg protein olarak ifade edilmiştir.

Unit=37 °C’de her dakikada hidrolize olan substratin nmol cinsinden ifadesidir.

Kullanılan Solüsyonlar;

Tampon çözeltisi olarak Tris-HCl 50mM , pH= 8

Substrat olarak Leu-ala(0,010M)(Tris-HCl 50mM , pH= 8’de çözdürüldü)

Q-dianisidin:10 ml ethanol içinde 100 mg çözdürüldü.

LAOR:90 mg L-aminooksidaz+2 mg horseradish peroksidaz+1ml Q-dianisidin karıştırılır ve Tris-HCl 50mM , pH= 8 ile 100 ml’ye tamamlanmıştır.

%50’lik Sülfirik Asit çözeltisi

Deneyin Yapilisi;

Kullanılan standart solüsyonların hazırlanışı ise;

0,01 M Leu-ala solüsyonu 50 kere seyreltilerek 0,2 mM lik ana solüsyon hazırlanır. Bu ana standart solüsyon kullanılarak 100 nmol, 80 nmol, 60 nmol, 40 nmol ve 20 nmol'lük ara standart solüsyonlar hazırlanarak spektrofotometre de grafik çizdirildi. Bu işlemlerden sonra izlenen protokol aşağıda verilmiştir.

0,5 ml substrat + 1 ml LAOR + 25 µl homojenat karıştırılmıştır.

20 dakika 37 °C'de inkübasyon

0,74 ml sülfirik asit ilave edildi

530 nm'de kör'e karşı okunma yapılmıştır.

3.2.4.3.3. Aminopeptidaz N

Örneklenen balık larvalarında mevcut olan aminopeptidaz N enzim aktivitesi MAROUX ve ark. (1973)'ye göre yapılmıştır. Sonuçlar, mU/ mg protein olarak ifade edildi.

Unit=37 °C'de her dakikada hidrolize olan substratın µmol cinsinden ifadesidir.

Kullanılan Solüsyonlar;

Tampon çözeltisi olarak fosfat, 80 mM, pH=7

D.M.S.O (Dimetil sülfoksit)

L-leucine p-nitroanilid

Deneyin Yapilisi;

Spektrofotometre küvetine 2,45 ml buffer + 50 µl substrat (0,1 M D.M.S.O ile hazırlanmış L-leucine p-nitroanilid) + 100 µl homojenat ilave edilmiştir.

37 °C'de 410 nm'de okuma işlemi yapılmıştır.

3.2.4.3.4. Alkalın Fosfataz

Alınan balık larvalarında bulunan alkalın fosfataz enzim aktivitesi BESSEY ve ark. (1946)'a göre yapıldı. Sonuçlar, mU/ mg protein olarak ifade edilmiştir.

Unit=37 °C'de her dakikada hidrolize olan substratin μmol cinsinden ifadesidir.

Kullanılan Solüsyonlar;

Tampon çözeltisi olarak NaHCO_3 , 30mM, pH=9,8 kullanıldı.

Substrat; 20,3 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 185 mg p- nitrofenil fosfat 100 ml tampon içinde karıştırılması ile elde edilmiştir.

Deneyin Yapılışı;

Spektrofotometre küveti içersine 2,5 ml substrat ve 100 μl homojenat ilave edildi. Daha sonra 37 °C'de 407 nm'de okuma işlemi yapılmıştır.

3.2.4.3.5.Tripsin

Larvalardaki tripsin enzim aktivitesi, TSENG ve ark.(1982)'a göre yapıldı. Sonuçlar, mU/ mg protein olarak ifade edilmiştir.

Unit=Her dakika BAPNA'nin 1 μmol 'ünü hidrolize eden aktivite olarak ifadesidir.

Kullanılan Solüsyonlar;

Tampon çözeltisi olarak Tris-HCl,50 mM, CaCl_2 20 mM, pH=8,2

Substrat olarak 0,1 M D.M.S.O'da çözünen BAPNA(Molekül Ağırlığı=434,9). Hazırlanışı; 0,435 gr/10 ml D.M.S.O'da çözdürüldü ve siyah renkli bir sisede tutulmuştur.

Deneyin Yapılışı;

25 °C'deki spektrofotometre küvetine tampon çözeltinin 1 ml ile BAPNA substratının 10 μl 'si ilave edilmiştir. 100 μl homojenat ilave edildikten sonra 407 nm'de spektrofotometrede okuma işlemi yapılmıştır.

3.2.4.4.Hormon Analizleri

3.2.4.4.1.Bombesin

Bombesin aktivitesi RIA test kiti kullanılarak ölçüldü (Peninsula Laboratories, Bombesin RIA Kit,S-2074(RIK7113)). Distile su ile yıkanmış ve sıvı nitrojende dondurulmuş larvalar çalışma esnasında +4°C'de çözündürüldü. Larvalar, EDTA (7.2 mg/ml) and Trasyolol (Sigma, 500KIU/ml) içeren fosfat tamponu ile karıştırıldı ve Ultraturax homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Homojenat Kimax#2 filtre ile filtrelendi ve daha sonra 25000 G'de 30 dakika için soğutmalı ultra santrifüjde santrifüj edildi. Supernatantlar analiz aşamasına kadar -80°C'de donduruldu. Analiz kit prosedürleri izlenerek tamamlandı(KOLKOVSKI, 1995b).

3.2.4.4.2.Kolesistokinin (CCK)

Liyofilize edilen larvalar ependorf tüplerine konarak ağırlıkları kaydedildi. Tüpler sıvı nitrojene daldırıldı ve ardından öğütülerek toz haline getirildi. Metanol'ün 1ml'si bu örneklerin üzerine ilave edildi. Vorteks ile 30 sn muamele edilen tüpler ekstraksiyon için +4°C'de inkübe edildi. Inkübe edilen tüpler 6000g'de (+4°C'de 15 dakika) santrifüj edilmiştir. Elde edilen metanol supernatantları (RIA için) temiz ependorf tüplerine aktarılmıştır. Methanol supernatantları Speed Vac cihazı kullanılarak buharlaştırıldı. Kalan kuru ekstraktlar RIA CCK için kullanılmıştır.

3.2.4.4.2.1.Sentetik CCK Standartları ve Örneklerinin Hazırlanması

Kit (Eurodiagnostica,EURIA-CCK,Cat No:RB 302) kullanım öncesi oda sıcaklığında bekletildi. 0,78-25 pmol CCK-8/L içeren standartlar bir diluent buffer kullanılarak hazırlandı (0,05 mol/L fosfat, pH=7,4). Kurutulmuş CCK ekstraktları analiz öncesi 0,5-1ml diluent kullanılarak çözüldü. Standartlar ve örneklerin 200µl'si 4,5 ml'lik tüpler içine konmuştur.

3.2.4.4.2.2.RIA Prosedürü

Ekstraktlardaki CCK anti CCK-8 sülfat ve bir tracer(¹²⁵I-CCK-8) kullanılarak ROJAS-GARCIA ve ark. (2001) tarafından modifiye edilen metoda göre değerlendirildi. Radyoaktivite bir gamma sayıcı kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.5. Örnekleme ve İstatistik Analizler

Besleme denemesi 40. güne kadar devam etmiş olup, 5-20. günler arası her 5 günlük dönemde, 20. günden itibaren ise her 4 günlük dönemde enzim ve hormon analizleri için örnekler deneme gruplarından alınmıştır. Enzim ve hormon analizleri için örnekleme döneminde her muamele grubundan 50 larvalık 3 alt örnekleme yapılmıştır. Alınan örnekler derhal -196°C 'de (sivi azotta) muhafaza edilmiştir. Bu arada farklı amino asitlerle zenginleştirilen *Artemia* metanaupli gruplarından da serbest amino asitlerdeki değişimleri gözlemek amacıyla örnekleme yapılmıştır. Alınan örnekler TÜBİTAK-MAM'ne gönderilmiş ve 3 tekerrürlü olarak analiz ettirilmiştir. Farklı deneme gruplarına ait larvaların boy ve ağırlık değişimlerini belirlemek amacıyla 5.-40.günler arasındaki örnekleme dönemlerinde her muamele grubundan 40 larvalık 3 alt örnekleme yapılmıştır. Boy ölçümleri mikroskop altında, ağırlık ölçümleri ise hassas terazi (Precisa XB 220A, ± 0.1 mg) kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmada elde edilen veriler iki faktörlü tekrar eden ölçümlü deneme planına göre varyans analizine tabi tutulmuştur (GÖRGÜLÜ, 2002). Deneme desenine ait matematik model, GILL (1986; 1988); TIMM, (1980) ve DANIEL, (1995) tarafından aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır.

$$y_{ijk} = m + a_i + g_{(i)k} + b_j + (ab)_{ij} + e_{(i)jk}$$

$$i = 1, 2, 3, \dots, n \quad j = 1, 2, 3, \dots, p \quad k = 1, 2, 3, \dots, r \quad (n, p, r)$$

Burada;

y_{ijk} : A faktörünün i inci seviyesi ile B faktörünün j inci seviyesinde yer alan k inci deneme ünitesine ait gözlem değeri.

m : Populasyon ortalaması.

a_i : Muamele gruplarının i inci seviyesinin etkisi.

b_j : Periyot'un j inci seviyesinin etkisi.

ab_{ij} : Muamele ve Periyot faktörlerinin birlikte yapmış oldukları etki.

$g_{(i)k}$: Muamele gruplarının i inci seviyesi altındaki k inci deneme ünitesine ait etki (Hata 1). Bu etki muamele gruplarının aynı seviyesindeki deneme üniteleri arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır.

$e_{(i)jk}$: Deneysel hata.

Periyot(I. periyot: 28.gün; II. periyot: 32.gün; III. periyot: 36.gün; IV. periyot: 40.gün) ortalamaları arasındaki farklılıklar Bonferroni, muamele gruplarına ait ortalamalar ise Duncan çoklu karşılaştırma testleri ile değerlendirilerek harflendirilmiştir. İstatistiksel analizler sonucu elde edilen ortalamalar standart hata değerleri ile birlikte verilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 9.0 istatistik paket programı kullanılmıştır (SPSS, 1993).

4.ARASTIRMA BULGULARI VE TARTISMA

4.1.Çipura Larvalarında Canlı Ağırlık ve Boy Değişimleri

Çipura larvalarının deneme boyunca gözlenen ağırlık ve boy ortalama değerleri sırasıyla Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.3’de, bu ortalamalara ait varyans analiz tabloları ise Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.4’de verilmiştir. Çipura larvalarının ağırlık ve boy artışları üzerinde, muamele grupları ve periyotlara ilaveten bu iki faktörün birlikte etkisinin de önemli olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$). Deneme sonunda, en yüksek canlı ağırlık ve boy değerleri sırasıyla isolösün (29.15 ± 0.22) ve fenilalanin (13.97 ± 0.02) grubunda tespit edilmiştir. Çipura larvalarının ağırlıkları IV. periyotta isolösün grubuna ilaveten histidin (28.58 ± 0.31), metiyonin (28.58 ± 0.34), lizin (27.93 ± 0.25) ve valin (27.21 ± 0.21) gruplarının da kontrol (26.60 ± 0.01) grubuna göre yüksek değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Muamele grupları açısından durum IV. periyottaki sonuçlarla benzerlik göstermiştir. Çipura larvalarının boyları ise, IV. periyotta histidin (12.71 ± 0.02) dışında tüm muamele gruplarının kontrol (12.91 ± 0.01) grubundan üstün olduğu tespit edilmiştir. Muamele gruplarının ortalamaları açısından durum değerlendirildiğinde, IV. periyottakine benzer sonuçlar olduğu gözlenmiştir.

ÖKSÜZ (1996)’da çipura larvalarını 40’nci günde 23.5 mg bireysel canlı ağırlığa ve 14.1 mm total boya ulaştırmıştır. DENİZ (1996), çipura larvalarının 45. günde 19.8-24.4 mg bireysel canlı ağırlığa ve 8-11.4 mm total boya ulaştığını bildirmiştir. CHATAIN (1991), yaptığı çalışmada çipura larvalarının 40. günde total boyca gelişimini 10 mm olarak bildirmiştir. ALESIO (1975), BARNABE ve RENE (1973), çipura larvalarının boyca gelişimini 8-11 mm arasında bildirmiştir. CORNEILLE ve ark. (1989), çipura larvalarını 47’nci günde 13.27 mm total boya ve 27 mg bireysel canlı ağırlığa ulaştırmışlardır. PINOSA ve ark. (1995), bu sonuçlara yakın değerler elde etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada elde edilen canlı ağırlık ortalamaları bu araştırmacıların bildirdiği değerlerden büyük bulunmuştur. Elde edilen boy ortalama değerlerimiz ise ÖKSÜZ (1996) ile paralellik göstermesine karşın, diğer tüm araştırmacıların bulduğu değerlerden yüksek olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.1. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının periyotlara ve muamele gruplarına ait canlı ağırlık ortalamaları (ortalama±standart hata)(mg)

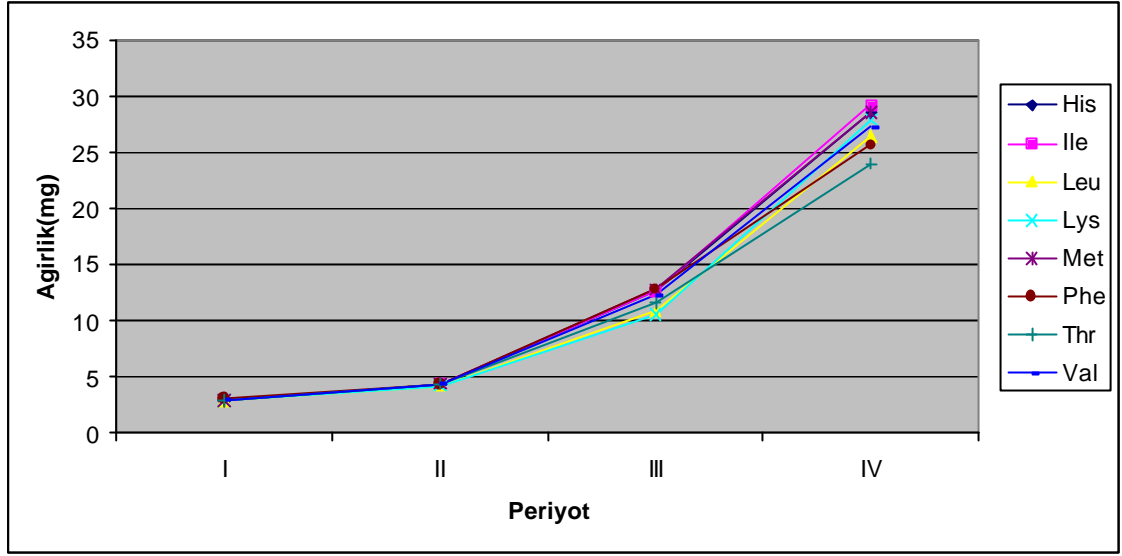
| Muamele Grupları | Periyot | | | | |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 2.95±0.01 | 4.35±0.04 | 12.60±0.06 | 28.58±0.31 | 12.12±3.07 ^c |
| İsolösin | 2.97±0.007 | 4.38±0.04 | 12.71±0.14 | 29.15±0.22 | 12.30±3.14 ^e |
| Lösin | 2.99±0.005 | 4.28±0.04 | 10.90±0.07 | 26.35±0.19 | 11.13±2.8 ^b |
| Lisin | 2.97±0.01 | 4.27±0.03 | 10.46±0.18 | 27.93±0.25 | 11.41±3.00 ^e |
| Metiyonin | 2.97±0.01 | 4.31±0.02 | 12.86±0.14 | 28.58±0.34 | 12.18±3.07 ^e |
| Fenilalanin | 3.02±0.007 | 4.30±0.02 | 12.72±0.14 | 25.58±0.32 | 11.41±2.71 ^e |
| Treonin | 2.99±0.02 | 4.30±0.04 | 11.68±0.13 | 23.92±0.23 | 10.72±2.50 ^a |
| Valin | 2.96±0.003 | 4.35±0.05 | 12.25±0.03 | 27.21±0.21 | 11.69±2.90 ^d |
| Kontrol | 2.98±0.006 | 4.30±0.03 | 11.53±0.18 | 26.60±0.01 | 11.35±2.82 ^e |
| P_{ort} | 2.98±0.005 ^a | 4.31±0.012 ^b | 11.97±0.16 ^c | 27.1±0.31 ^d | |

Aynı satır ve sütunlarda farklı harflerin kullanıldığı değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05). M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar

Çizelge 4.2. Canlı ağırlık ortalamalarına ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|-----------------|----------|--------|
| Denekler arası | 26 | 27.816 | | |
| Muamele | 80 | 26.788 | 3.348 | 0.000* |
| Hata 1 | 18 | 1.028 | 0.0571 | |
| Denekler içi | 81 | 9993.514 | | |
| Periyot | 3 | 9930.996 | 3310.332 | 0.000* |
| Muamelexperiyot | 24 | 59.038 | 2.460 | 0.000* |
| Hata 2 | 54 | 3.480 | 0.06444 | |
| Genel | 107 | 10021.33 | | |

*P<0.05; VK: varyasyon kaynakları; SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması; P: önem seviyesi



Sekil 4.1. Muamele gruplarında canlı ağırlık ortalamalarının periyotlara bağlı değişimi

Çizelge 4.3. Farklı aminoasitler ile zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının periyotlara ve muamele gruplarına ait boy ortalamaları (ortalama±standart hata)(mm)

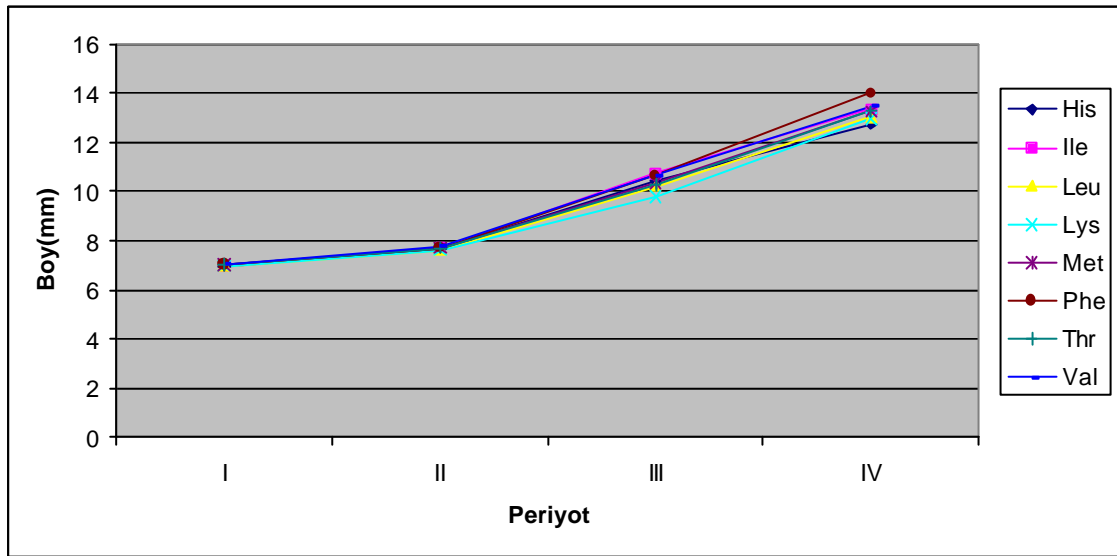
| Muamele Grupları | Periyot | | | | |
|------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 7.00±0.007 | 7.68±0.07 | 10.41±0.01 | 12.71±0.02 | 9.45±0.68 ^b |
| İsolösin | 6.98±0.003 | 7.72±0.09 | 10.70±0.005 | 13.31±0.02 | 9.68±0.75 ^d |
| Lösin | 6.99±0.001 | 7.63±0.09 | 10.18±0.01 | 13.04±0.02 | 9.46±0.72 ^b |
| Lisin | 6.96±0.003 | 7.62±0.07 | 9.75±0.005 | 12.98±0.01 | 9.33±0.70 ^a |
| Metiyonin | 7.02±0.007 | 7.68±0.09 | 10.39±0.005 | 13.27±0.02 | 9.59±0.74 ^c |
| Fenilalanin | 7.01±0.000 | 7.70±0.09 | 10.65±0.005 | 13.97±0.02 | 9.83±0.83 ^f |
| Treonin | 7.00±0.006 | 7.67±0.08 | 10.27±0.02 | 13.22±0.005 | 9.54±0.73 ^c |
| Valin | 7.01±0.003 | 7.74±0.09 | 10.70±0.01 | 13.51±0.08 | 9.74±0.77 ^e |
| Kontrol | 6.92±0.01 | 7.76±0.08 | 10.70±0.005 | 12.91±0.01 | 9.57±0.71 ^c |
| P _{ort} | 6.98±0.006 ^a | 7.69±0.02 ^b | 10.42±0.05 ^c | 13.21±0.06 ^d | |

Aynı satır ve sütunlarda farklı harflerin kullanıldığı değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05). M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar.

Çizelge 4.4. Boy ortalamalarına ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|------------------|----------|--------|
| Denekler arası | 26 | 2.46256 | | |
| Muamele | 8 | 2.368 | 0.296 | 0.000* |
| Hata 1 | 18 | 0.09456 | 0.005253 | |
| Denekler içi | 81 | 657.794 | | |
| Periyot | 3 | 653.895 | 217.965 | 0.000* |
| Muamelexperiyot | 24 | 3.495 | 0.146 | 0.000* |
| Hata 2 | 54 | 0.404 | 0.00748 | |
| Genel | 107 | 660.25656 | | |

*P<0.05; VK: varyasyon kaynakları; SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması; P:önem seviyesi

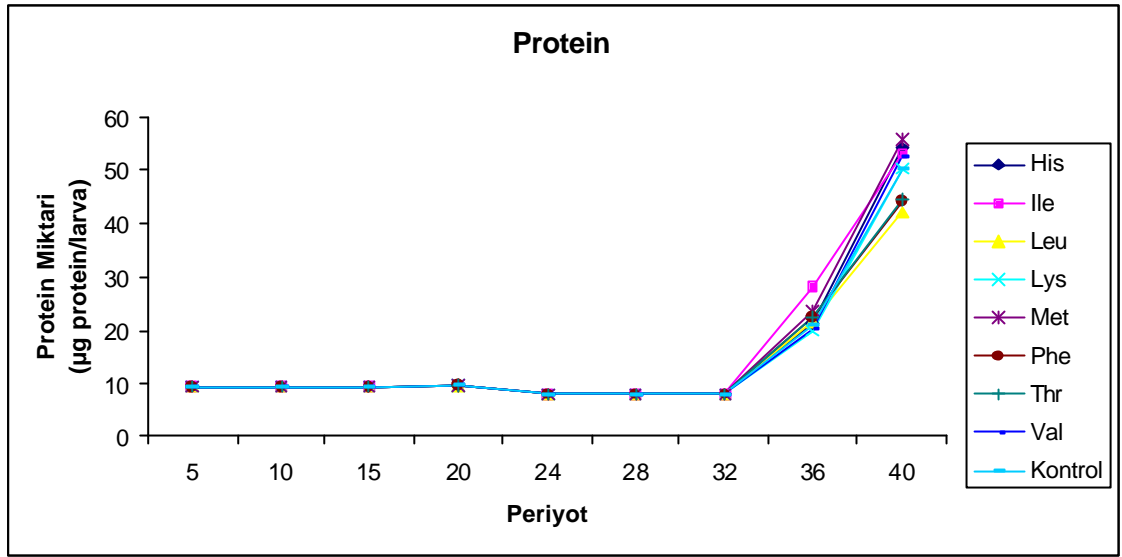


Sekil 4.2. Muamele gruplarında boy ortalamalarının periyotlara bağlı değişimi

4.2. Protein Analizleri

Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5-40. günler arasındaki çözülebilir protein konsantrasyonlarındaki değişimler Şekil 4.3'de verilmiştir. Ayrıca, çipura larvalarının deneme boyunca gözlenen protein ortalama değerleri Çizelge 4.5'de, bu ortalamalara ait varyans analiz tabloları ise Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çipura larvalarının protein ortalama değerleri üzerinde, muamele grupları ve periyotlara ilaveten bu iki faktörün birlikte etkisinin de önemli olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). Çalışma sonunda, en yüksek ve en düşük protein miktarları sırasıyla metiyonin (55.96 ± 0.02) ve lösin (42.25 ± 0.02) grubunda tespit edilmiştir. Elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde, I. ve II. periyotta protein ortalama değerlerinin benzer seviyelerde olduğu, bu dönemden sonra muamele gruplarında belirgin farklılıkların ortaya çıktığı gözlenmiştir. IV. periyotta metiyonin (55.96 ± 0.02), histidin (54.04 ± 0.001), izolösin (53.26 ± 0.02) ve valin (52.70 ± 0.01) gruplarının kontrol grubuna (50.50 ± 0.007) göre yüksek protein değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). Muamele gruplarının ortalamaları açısından ise, sıralama IV. periyotta gözlenen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Larvaların protein içeriklerinin, larvaların total boy değişimleri ve yumurtadan çıkıştan sonraki yaş ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (NOLTING ve ark., 1999). NOLTING ve ark. (1999), levrek larvaları üzerinde yaptıkları çalışmada, larvaların yaş ve total boyca artışlarına paralel olarak protein içeriklerinin arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada protein ortalama değerlerinin I. ve II. periyotta benzer olduğu, bu noktadan itibaren deneme gruplarının tümünde yüksek miktarlarda artışların meydana geldiği tespit edilmiştir. Çalışmadaki larvaların protein içeriğinde gözlenen farklılıklar, deneme süresince total boylarında meydana gelen değişimlere, yumurtadan çıkış sonrası yaşlarına ve test gruplarında kullanılan canlı yemlerin besinsel özelliklerindeki farklılıklara bağlanabilir.



Sekil 4.3. Farkli aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki protein kompozisyonlarındaki değişimler

Çizelge 4.5. Farkli aminoasitler ile zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının periyotlara ve muamele gruplarına ait protein ortalama değerleri (ortalama±standart hata)(µg protein/larva)

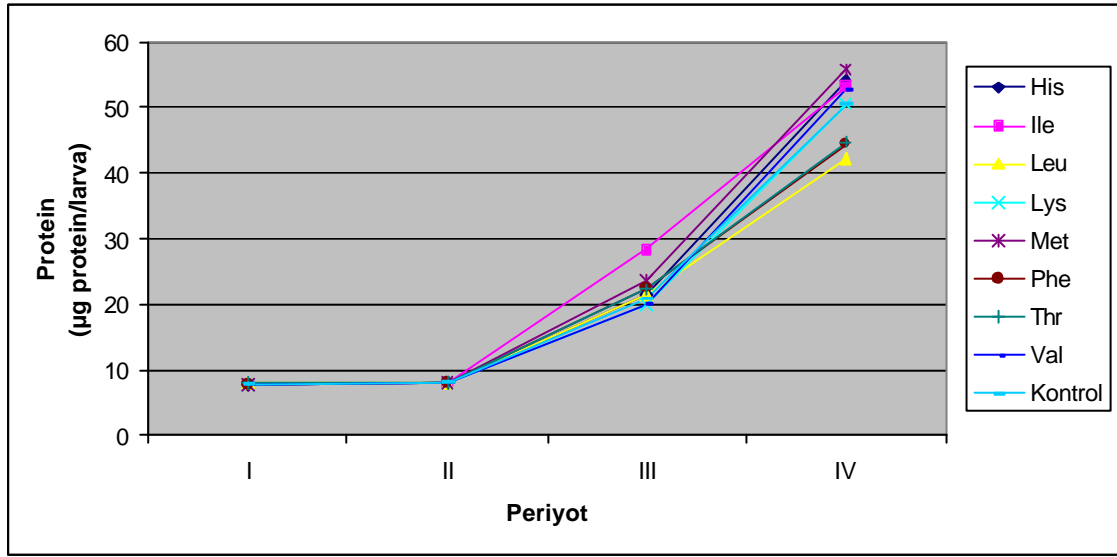
| Muamele Grupları | Periyot | | | | |
|------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 7.80±0.03 | 7.99±0.003 | 21.41±0.005 | 54.04±0.001 | 22.81±5.68 ^g |
| İsolösin | 7.89±0.04 | 7.99±0.007 | 28.24±0.007 | 53.26±0.02 | 24.34±5.61 ⁱ |
| Lösin | 7.93±0.05 | 8.01±0.004 | 21.48±0.005 | 42.25±0.02 | 19.92±4.22 ^a |
| Lisin | 7.80±0.06 | 8.01±0.0004 | 19.92±0.01 | 50.44±0.006 | 21.54±5.24 ^d |
| Metiyonin | 7.77±0.03 | 8.00±0.0007 | 23.60±0.01 | 55.96±0.02 | 23.83±5.91 ^h |
| Fenilalanin | 7.79±0.05 | 8.00±0.0008 | 22.44±0.006 | 44.30±0.01 | 20.63±4.49 ^b |
| Treonin | 7.92±0.07 | 7.99±0.005 | 22.21±0.009 | 44.64±0.03 | 20.69±4.52 ^c |
| Valin | 7.86±0.04 | 8.02±0.0006 | 20.09±0.009 | 52.70±0.01 | 22.17±5.52 ^f |
| Kontrol | 7.85±0.05 | 8.00±0.002 | 20.94±0.01 | 50.50±0.007 | 21.82±5.24 ^e |
| P _{ort} | 7.84±0.01 ^a | 8.00±0.001 ^b | 22.26±0.46 ^c | 49.79±0.90 ^d | |

Aynı satır ve sütunlarda farklı harflerin kullanıldığı değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05).M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar.

Çizelge 4.6. Protein ortalama degerlerine ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|--------------------|-----------|--------|
| Denekler arasi | 26 | 212.46831 | | |
| Muamele | 8 | 212.426 | 26.553 | 0.000* |
| Hata 1 | 18 | 0.04231 | 0.002351 | |
| Denekler içi | 81 | 32067.763 | | |
| Periyot | 3 | 31554.01 | 10518.003 | 0.000* |
| Muamelexperiyot | 24 | 513.624 | 21.401 | 0.000* |
| Hata 2 | 54 | 0.129 | 0.002387 | |
| Genel | 107 | 32280.23131 | | |

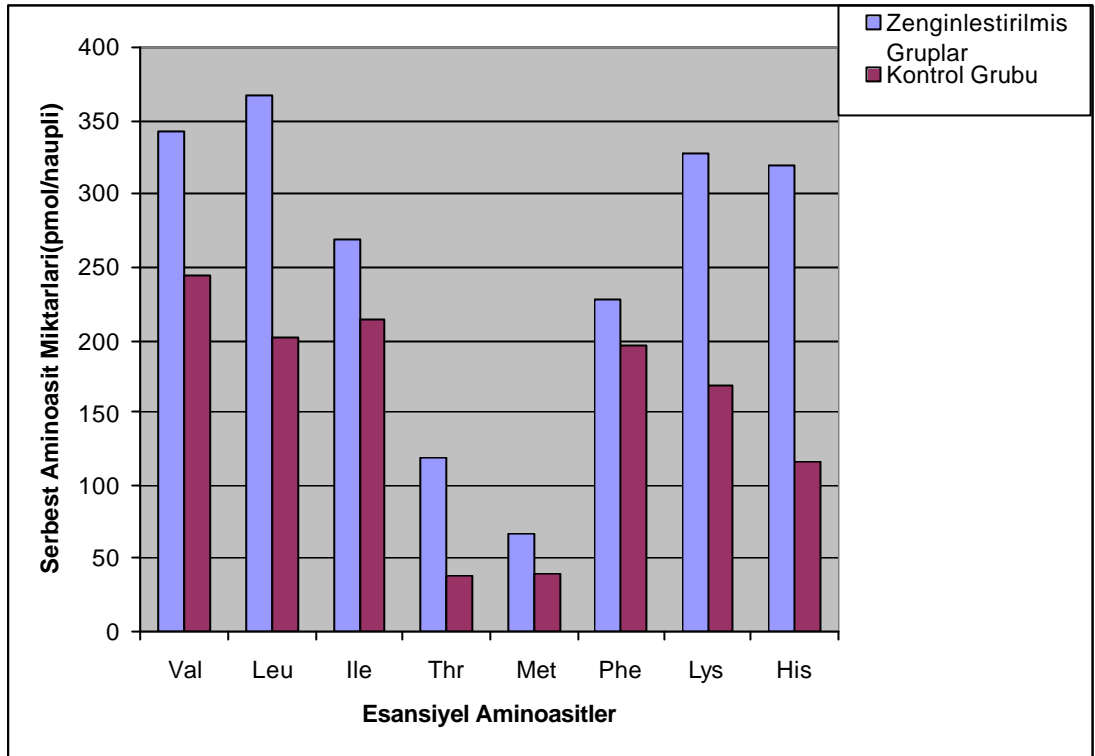
*P<0.05; VK: varyasyon kaynaklari; SD:serbestlik derecesi; KT:kareler toplami; KO: kareler ortalamasi; P: önem seviyesi



Sekil 4.4. Muamele gruplarında protein ortalamalarının periyotlara bağlı değişimi

4.3.Aminoasit Analizleri

Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş Artemia'nin esansiyel aminoasit kompozisyonlarındaki değişimler Sekil 4.5'de verilmiştir.



Sekil 4.5. Farklı aminoasitler ile zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'lerinin esansiyel aminoasit kompozisyonlarında gözlenen değişimler

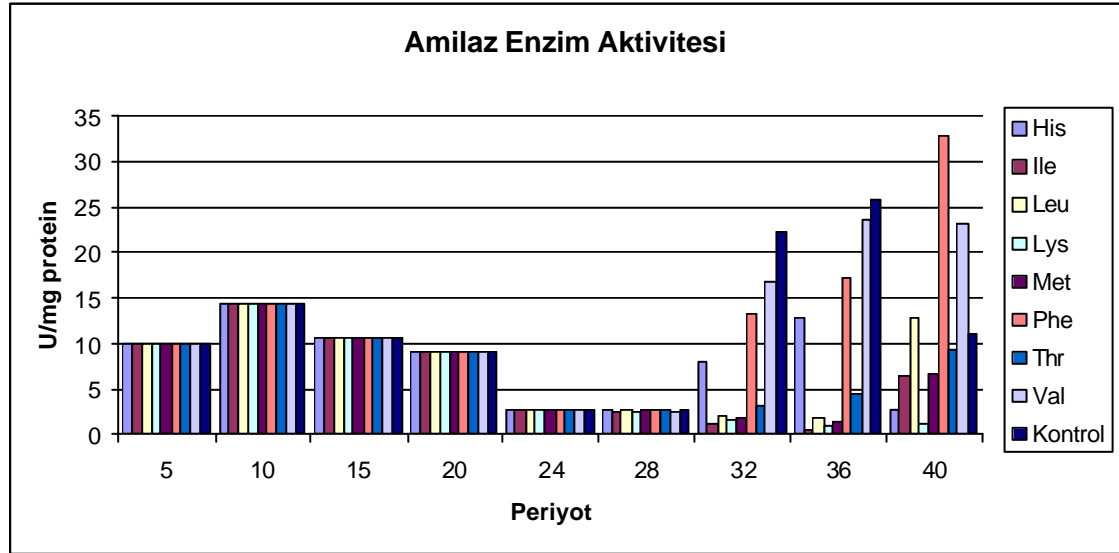
Kültür suyuna serbest aminoasitlerin ilave edilmesiyle gerçekleştirilen 16 saatlik zenginleştirme periyodu sonucunda *Artemia*'da mevcut esansiyel aminoasit içerikleri Sekil 4.5'de görüldüğü gibi tüm zenginleştirme gruplarında kontrol grubuna göre bir üstünlük sergilemiştir.

TONHEIM ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada serbest metiyonin ile *Artemia*'nin lipozom ve kültür suyuna serbest aminoasitlerin doğrudan ilave edilmesi metodu(direkt zenginleştirme) ile zenginleştirilebileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda bu araştırmacıların belirtmiş olduğu doğrudan zenginleştirme metodu kullanılmıştır. Çalışmamız *Artemia*'nin larvalar için esansiyel olan tüm aminoasitlerin kültür suyuna ilave edilerek zenginleştirilebileceğini de ortaya koymuştur. TONHEIM ve ark. (2000) tarafından bulunan bulgular çalışmamızı destekler niteliktedir.

4.4.Enzim Analizleri

4.4.1.Amilaz Enzim Aktivitesi

Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki amilaz enzim aktivitesi Şekil 4.6'da verilmiştir. Ayrıca, çipura larvalarının deneme boyunca gözlenen amilaz enzim aktiviteleri Çizelge 4.7'de, bu ortalamalara ait varyans analiz tabloları ise Çizelge 4.8'de verilmiştir. Çipura larvalarının amilaz enzim aktiviteleri üzerinde, muamele grupları ve periyotlara ilaveten bu iki faktörün birlikte etkisinin de önemli olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$). Elde edilen veriler genel olarak değerlendirilirse, histidin ve kontrol gruplarının III. periyot'a kadar arttığı, IV periyotta bu grupların değerlerinde bir azalma olduğu, buna karşılık isolösin, lösin, lisin ve metiyonin gruplarında tam tersi bir durumun olduğu gözlenmiştir. Fenilalanin, treonin ve valin gruplarının ise her periyotta artış eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. I., II. ve III. periyotta en yüksek amilaz aktivitesini kontrol grubu sergilerken, IV. periyotta fenilalanin grubu kontrol grubuna göre üstünlük göstermiştir. IV. periyotta fenilalanin grubuna ilaveten lösin ve valin gruplarının kontrol grubundan daha yüksek amilaz aktivitesi sergilediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.6.Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki amilaz enzim aktivitelerindeki değişimler.

Çizelge 4.7. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait amilaz enzim aktivitesi ortalama degerleri(ortalama±standart hata) (U/mg protein)

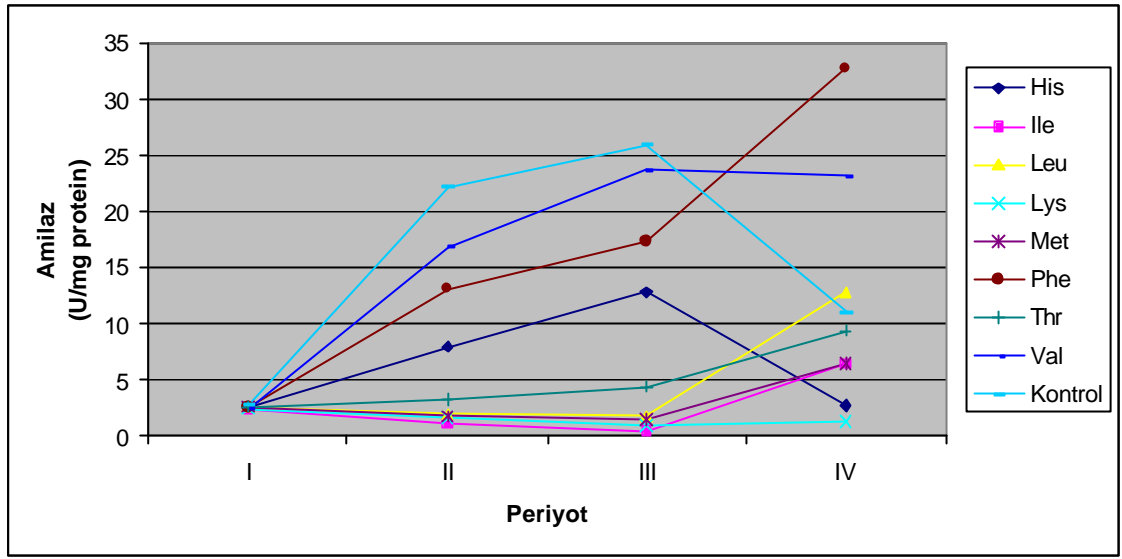
| Muamele Gruplari | Periyot | | | | |
|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 2.54±0.03 | 7.97±0.18 | 12.74±0.20 | 2.74±0.06 | 6.50±1.27 ^c |
| Isolösin | 2.36±0.08 | 1.16±0.05 | 0.49±0.10 | 6.41±0.10 | 2.60±0.69 ^b |
| Lösin | 2.65±0.16 | 1.98±0.08 | 1.70±0.01 | 12.87±0.15 | 4.80±1.40 ^d |
| Lisin | 2.42±0.11 | 1.54±0.07 | 1.05±0.07 | 1.25±0.05 | 1.57±0.16 ^a |
| Metiyonin | 2.54±0.08 | 1.84±0.08 | 1.40±0.01 | 6.53±0.12 | 3.08±0.61 ^c |
| Fenilalanin | 2.60±0.15 | 13.18±0.2 | 17.29±0.35 | 32.73±0.91 | 16.45±3.26 ^g |
| Treonin | 2.59±0.11 | 3.22±0.44 | 4.38±0.26 | 9.42±0.23 | 4.90±0.81 ^d |
| Valin | 2.38±0.17 | 16.87±0.45 | 23.60±0.22 | 23.18±0.41 | 16.51±2.59 ^g |
| Kontrol | 2.68±0.14 | 22.20±0.28 | 25.84±0.60 | 11.00±0.41 | 15.43±2.77 ^f |
| P _{ort} | 2.53±0.04 ^a | 7.78±1.45 ^b | 9.83±1.89 ^c | 11.79±1.88 ^d | |

Aynı satır ve sütunlarda farklı harflerin kullanıldığı değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05). M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar.

Çizelge 4.8.Amilaz enzim aktivitesine ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|-----------------|---------|--------|
| Denekler arası | 26 | 3793.513 | | |
| Muamele | 8 | 3789.508 | 473.688 | 0.000* |
| Hata 1 | 18 | 4.005 | 0.222 | |
| Denekler içi | 81 | 3987.414 | | |
| Periyot | 3 | 1288.139 | 429.380 | 0.000* |
| Muamelexperiyot | 24 | 2687.111 | 111.963 | 0.000* |
| Hata 2 | 54 | 12.164 | 0.225 | |
| Genel | 107 | 7780.927 | | |

*P<0.05; VK: varyasyon kaynakları; SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması; P: önem seviyesi



Sekil 4.7. Muamele gruplarında amilaz enzim aktivitesinin periyotlara bağlı değişimi

Diğer taraftan, muamele gruplarının ortalamaları açısından durum değerlendirildiğinde, valin (16.51 ± 2.59) ve fenilalanin (16.45 ± 3.26) gruplarının ($P > 0.05$), kontrol grubuna göre üstün olduğu tespit edilmiştir. Muamele gruplarının ortalamaları açısından sonuçlar, lösin dışında IV. periyotta elde edilenlere benzerlik göstermektedir.

Pankreatik sindirim enzimlerinin keseli dönem sonrası ağız açılmasıyla birlikte belirlendiği, amilaz aktivitesinin larval dönemin ilk asamalarında çok yüksek olduğu, gelişim dönemleri boyunca bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir (ZAMBONINO INFANTE, 1994b; RIBEIRO ve ark., 1999b; BUCHET ve ark., 2000).

PERSON LE RUYET, (1989), karaciğer ve pankreasın yumurta açılımında oluşmuş olduğunu, nişasta sindirimi için gereken enzimlerden amilaz aktivitesinin ilk beslemeye geçildiği dönemde mevcut olduğunu bildirmiştir.

PEREZ ve ark. (1996), larvanın gelişim dönemi boyunca gözlenen amilaz aktivitesindeki azalmayı bu enzimin genetik olarak programlanmasına bağlamışlardır.

YUFERA ve ark. (2000), larvaların yaşına bağlı olarak amilaz enzim aktivitesinin geliştiğini bildirmişlerdir.

CAHU ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada değerlendirmeye aldıkları 3 pankreatik enzim aktivitesinin, larvanın yaşı ile ilişkili olduğunu, tanklara mikroalg ilave edilip edilmemesinin bu enzimlerin aktivitelerinde çok büyük bir değişkenlik göstermediğini bildirmişlerdir.

PEREZ ve ark. (1996), amilaz aktivitesinin 18. günden sonra yemlerin karbonhidrat içeriğinin artisina paralel olarak arttığını bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda, amilaz aktivitesinin larval dönemde yeterli olduğunu, amilaz enzim aktivitesinin de yasa bağlı olarak değiştiğini belirtmişlerdir.

HENNING ve ark.(1994) yaptıkları bir çalışmada, %25 glusit içeriğine sahip yemlerle beslenen larvalardaki amilaz aktivitesindeki azalmanın, %5 glusit içeriğine sahip yemle beslenenlere göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir. PERES ve ark. (1994), farklı glusit içeriğine sahip karma yemlerle beslenen levrek larvalarında, 18. ve 35.günde yüksek miktarda amilaz aktivitesinin gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu gözlemler, substratın karma yemde bulunan miktarına bağlı olarak larvadaki enzim aktivitesinin adaptasyonunu ortaya koymuştur.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1994), pankreatik enzimlerden amilaz aktivitesinde mikro yemlere geçiş dönemlerinde artış olduğunu, bunun ise yemlerdeki %12'lik nisasta içeriği ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda, amilaz enzim aktivitesinde gözlenen bu durumu larvaların yetersiz bir besin kaynağı ile beslenmesine bağlamışlardır.

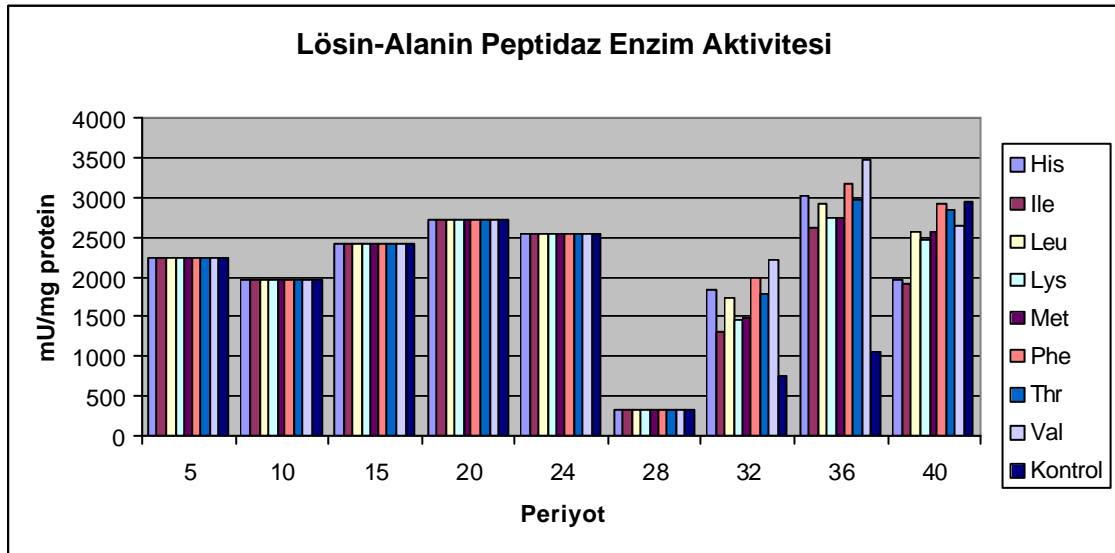
Larvalar üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları, amilaz aktivitesinin ilk ağız açıldığı dönemlerde oldukça yüksek olduğu, larvanın yasına ve mikro kapsül yemlerdeki nisasta içeriğine bağlı olarak değişim gösterebildiği şeklindedir. Bunlara ilaveten amilaz aktivitesinin genetik olarak programlanabildiği de bildirilmiştir.

Çalışmamızda, amilaz aktivitesinin larvanın ilk dönemlerinde çok yüksek olduğu, bu aktivitenin larvanın gelişim döneminde azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Buna karşılık, ilk üç periyotta amilaz aktivitesinde kontrol grubun üstünlüğü gözlenirken, IV. periyotta sıralama fenilalanin, valin ve lösin şeklinde değişmiştir. Muamele gruplarının ortalamaları açısından ise lösin grubu dışında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Amilaz aktivitesinin mikro yemlerin karbonhidrat seviyelerine ve gelişim dönemlerine göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (HENNING ve ark., 1994; CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1994; PEREZ ve ark., 1996). Ayrıca, amilaz aktivitesinin genetik olarak programlanabileceği de belirtilmiştir (PEREZ ve ark., 1996). Bu çalışmada kullanılan yemlerin karbonhidrat seviyeleri arasında bir değişim olmadığı düşünülürse, larvaların amilaz enzim aktivitelerinin genetik olarak programlanmış olma ihtimalinin yüksek olduğu söylenebilir.

Diger taraftan, amilaz enzim aktivitesinin yüksekliginin genellikle larvanin gereksinimlerine cevap veremeyen diyetlerle besleme yapildiği durumlarda ortaya çiktiği bildirilmistir (CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1994). İlk üç periyotta kontrol grubunda gözlenen bu yüksek aktivitenin nedenini, kontrol grubu canlı yem larvaların gereksinimlerini karşılayamamasına bağlayabiliriz. IV. periyotta ise, fenilalanin, valin ve lösin ile zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupliyelerinin larvaların gereksinimleri karşılamada kontrol grubundan daha zayıf kaldığını, buna karşılık diğer serbest aminoasit besleme gruplarının kontrol grubuna göre larvanın gereksinimlerine daha iyi cevap verdiği söylenebilir. Larvaların tüm periyotlardaki amilaz enzim aktivitelerini gösteren muamele gruplarının ortalamaları açısından durum değerlendirildiğinde, lösin grubu dışında IV. periyottakine benzerlik göstermektedir. Sindirim kanalının gelişiminin göstergesi olarak bilinen aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranı, ilk üç periyotta kontrol grubunda en iyi enterosist gelişimi olduğunu, buna karşılık bu durumun IV. periyotta lösin, fenilalanin, izolösin, lisin ve valin besleme grupları lehinde değiştiğini göstermiştir. Aynı zamanda bu indikatör sonuçları muamele ortalamaları açısından değerlendirildiğinde, en yüksek aktiviteyi kontrol grubunun gösterdiği tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında, ilk üç periyotta kontrol grubunun, IV. periyotta en yüksek amilaz enzim aktivitesi gösteren fenilalanin, valin ve lösin gruplarının, sindirim kanalının gelişim indikatörü olarak kabul edilen aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlarına dayanarak larvaların ihtiyacını karşılamada yetersiz kaldığı hipotezini desteklememektedir. Diğer taraftan muamele ortalamaları açısından durum değerlendirildiğinde amilaz aktivitesi açısından yüksek değerlerden birine sahip olan kontrol grubunun, aminopeptidaz N/lösin –alanin peptidaz oranları bakımından da en yüksek değere sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, serbest aminoasit besleme gruplarının çipura larvalarının sindirim kanalının gelişimini engelleyici yönde bir etkisinin olmadığı, çipura larvalarında IV. periyot'a kadar larvalara sunulan yemlerin içerdiği serbest aminoasit miktarlarından bağımsız olarak amilaz enzim aktivitesinin genetik olarak programlandığı açıkça ortaya çıkmıştır.

4.4.2.Lösin-Alanin Peptidaz Enzim Aktivitesi

Farkli aminoasitlerle zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki lösin-alanin peptidaz enzim aktivitesi Sekil 4.8'de verilmistir. Ayrica, çipura larvalarının deneme boyunca gözlenen lösin-alanin peptidaz enzim aktiviteleri Çizelge 4.9'da, bu ortalamalara ait varyans analiz tabloları ise Çizelge 4.10'da verilmistir. Çipura larvalarının lösin-alanin peptidaz enzim aktiviteleri üzerinde, muamele grupları ve periyotlara ilaveten bu iki faktörün birlikte etkisinin de önemli olduğu gözlenmistir ($P<0.05$). Kontrol grubu tüm periyotlar boyunca lösin-alanin peptidaz aktivitesi açısından yükselme gösterirken, diger besleme grupları II. ve III. periyotlarda yükselme eğiliminde olup, IV. periyotta düşüşe geçmiştir. Periyotlara göre en yüksek lösin-alanin peptidaz aktiviteleri; I. periyot histidin(352.48 ± 0.12), II. periyot valin(2219.74 ± 3.13), III. periyot valin(3465.06 ± 4.04) ve IV. periyot kontrol(2945.50 ± 3.57) grubu şeklinde olmuştur. IV. periyotta tüm besleme grupları kontrol grubuna göre daha düşük bir lösin-alanin peptidaz aktivitesi sergilemiştir. IV. periyotta en yüksek lösin-alanin peptidaz aktivitesi kontrol grubunda gözlenirken, durum muamele gruplarının ortalamaları açısından ele alındığında en düşük lösin-alanin peptidaz aktivitesini yine kontrol grubunun(1274.86 ± 300.16) gösterdiği tespit edilmiştir($P<0.05$).



Sekil 4.8.Farkli aminoasitlerle zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki lösin-alanin peptidaz enzim aktivitelerindeki değişimler.

Çizelge 4.9. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının periyotlara ve muamele gruplarına ait lösın-alanin peptidaz enzim aktivitesi (ortalama±standart hata) (mU//mg protein)

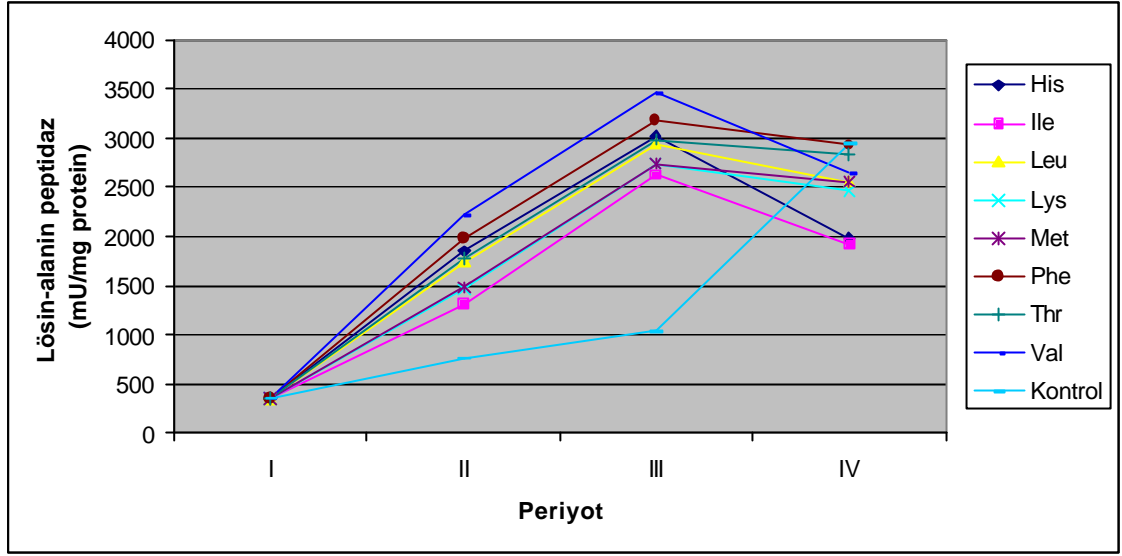
| Muamele Grupları | Periyot | | | | |
|------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 352.48±0.12 | 1850.22±8.98 | 3011.92±2.11 | 1972.75±4.55 | 1796.84±285.90 ^e |
| İsolösın | 350.50±0.69 | 1317.20±4.51 | 2623.34±4.46 | 1930.55±1.58 | 1555.40±251.80 ^b |
| Lösın | 350.86±0.27 | 1742.87±4.73 | 2935.20±3.33 | 2556.37±22.94 | 1896.33±298.78 ^f |
| Lisın | 351.81±0.37 | 1460.48±3.41 | 2736.26±5.21 | 2458.67±11.26 | 1751.80±282.60 ^c |
| Metiyonin | 351.58±0.75 | 1486.94±2.62 | 2739.61±5.19 | 2557.00±18.70 | 1783.78±288.07 ^d |
| Fenilalanin | 351.92±1.13 | 1981.31±1.52 | 3186.41±5.49 | 2931.52±6.68 | 2112.79±335.10 ^h |
| Treonin | 352.32±0.57 | 1784.86±1.86 | 2974.75±4.05 | 2834.15±6.55 | 1986.52±316.46 ^g |
| Valin | 351.67±0.41 | 2219.74±3.13 | 3465.06±4.04 | 2641.00±14.55 | 2169.37±344.05 ⁱ |
| Kontrol | 351.20±0.65 | 757.78±2.84 | 1044.94±3.18 | 2945.50±3.57 | 1274.86±300.16 ^a |
| P _{ort} | 351.59±0.21 ^a | 1622.38±79.09 ^b | 2746.39±127.08 ^d | 2536.39±69.10 ^c | |

Aynı satır ve sütunlarda farklı harflerin kullanıldığı değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05). M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar.

Çizelge 4.10. Lösın-alanin peptida enzim aktivitesine ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|--------------------|--------------|--------|
| Denekler arası | 26 | 7378929.005 | | |
| Muamele | 8 | 7376739.165 | 922092.396 | 0.000* |
| Hata 1 | 18 | 2189.840 | 121.658 | |
| Denekler içi | 81 | 107999036 | | |
| Periyot | 3 | 96296771.935 | 32098923.978 | 0.000* |
| Muamelexperiyot | 24 | 11694427.325 | 487267.805 | 0.000* |
| Hata 2 | 54 | 7836.762 | 145.125 | |
| Genel | 107 | 115377965 | | |

*P<0.05; VK: varyasyon kaynakları; SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması; P: önem seviyesi



Sekil 4.9. Muamele gruplarında lösin-alanin peptidaz aktivitesinin periyotlara bağlı değisimi

Lösin-alanin peptidaz enterosistlerin iki farklı alt hücrel bölgede dağılmaktadır. Bu enzim sitozolik peptidazlar grubuna aittir. Yasamin ilk üç haftasında sitozolik peptidazlar tarafından proteinin hücreler arası sindirimi çok yüksek bir aktivite sergilemektedir. Özellikle hücre dışı sindirimin tam olarak fonksiyonel olmadığı dönemlerde bu aktivite oldukça yüksektir (CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1995a).

Levrek larvalarının ilk dönemlerinde lösin-alanin peptidaz aktivitesi oldukça yüksektir. Levrek larvalarında yaklaşık olarak çıkıştan sonraki 3. haftada membranik enzimlerin artışına karşılık, sitozolik enzimlerin aktivitesinde bir azalma görüldüğü bildirilmiştir (CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1994; RIBEIRO, 1999b).

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1997), levrek larvaları üzerinde yaptıkları çalışmada 15. ve 25. günden 40. güne kadar olan dönemde mikro diyetleri kullanmışlar ve larvaların pankreatik bölüm ve bağırsagın iki hücrel bölgesindeki sindirim kapasitelerini incelemişlerdir. Çalışmada, lösin-alanin peptidaz enzimlerinde belirgin düşüş olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, karma yemle beslenen larvalardaki gelişmenin pankreatik enzim sentezi eksikliğinden olmadığı, zayıf gelişmenin geleneksel karma yemlerin larval sindirim özelliklerini karşılamakta yetersiz kaldığından kaynaklandığını belirtmişlerdir.

CAHU ve ark. (1998), lösin-alanin peptidaz gibi enzim aktivitelerinin larvanın yasından ziyade, ortamda mikroalg bulunup bulunmamasıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca, alglerin, sindirim enzimlerinin üretiminde tetikleyici rol üstlendiklerini ortaya koymuştur.

ZAMBONINO INFANTE ve CAHU (1997), deniz balık larvalarının iyi gelişimi ve yasama oranının yüksek olusunun, genellikle enterosistlerin erken olgunlaşması ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1995a), sitozolik bir peptidaz olan lösin-alanin peptidaz aktivitesini, mikro partikül yemle beslenen gruplarda yüksek seviyelerde olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada, klasik mikro diyetlerle beslemenin larvaların sindirim özelliklerinin korunmasına ve buna bağlı olarak enterosist farklılaşmasını engellediği sonucuna varılmıştır. Buna karşılık, hidrolize protein içeren bir karma yemin bu gecikmeyi az da olsa erteleyebileceği ve protein hidrolizatlarının larval gereksinimi karşılama oranla daha üstün olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, lösin-alanin gibi sitozolik enzimlerin yalnız olarak sindirim kanalının gelişimi konusunda iyi bir gösterge olmayacağını, buna karşılık aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranının bu gelişimin daha iyi bir göstergesi olacağını bildirmişlerdir.

CAHU ve ark. (1999), larval gereksinimlere tam olarak cevap veremeyen karma yemlerle yapılan beslemenin genetik olarak programlanmış bağırsak olgunlaşmasını geciktirdiği bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca, hidrolize proteinlerin yemlerde kullanımının bu olgunlaşma işlemi rahatlatığı tespit edilmiştir. Lösin-alanin peptidaz aktivitesindeki azalmanın, protein hidrolizasyonu ile beslenen larvalarda, diğer protein kaynakları ile beslenen larvalara oranla daha erken meydana geldiği tespit edilmiştir.

Yumurtadan çıkıştan itibaren yaşamın ilk üç haftasında lösin-alanin peptidaz aktivitesinin yüksek olduğu, bundan sonra membranik enzimlerin gelişimine paralel olarak bu enzim aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (CAHU ve ZAMBONINO, 1994; RIBEIRO, 1999b). Lösin-alanin peptidaz aktivitesindeki yükselmelere, larvanın gereksinimlere tam olarak karşılamayan karma yemlerle yapılan beslemenin neden olabileceği belirtilmiştir (CAHU ve ark., 1999). Aynı zamanda lösin-alanin peptidaz aktivitesinin yalnız basına sindirim sisteminin gelişimi konusunda iyi bir gösterge

olamayacağı, bunun yerine aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranının daha doğru sonuçlara götüreceği bildirilmiştir (CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1995a).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ilk üç hafta bu enzimin aktivitesinin yüksek olduğu, daha sonra I. periyot'a doğru bir azalma olduğu şeklindedir. II. ve III. periyotlar için durum değerlendirildiğinde, larvanın gereksinimlere tam olarak cevap veremeyen yemlerle yapılan beslemenin larvanın sindirim özelliklerinin korunmasına neden olduğu ve buna bağlı olarak enterosist farklılaşmasını engellediği düşünülebilir. Diğer taraftan lösin-alanin peptidaz aktivitesinin II. ve III. periyotlarda kontrol grubu dışındaki besleme gruplarında yüksek bulunması, zenginleştirme esnasında kullanılan serbest aminoasitlerin sitozolik enzim faaliyetinin devam etmesinde destekleyici bir rol oynadığı şeklinde yorumlanabilir. CAHU ve ark. (1998), lösin-alanin peptidaz gibi enzim aktivitelerinin larvanın yasından ziyade, ortamda mikroalg bulunup bulunmamasıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca, alglerin, sindirim enzimlerinin üretiminde tetikleyici rol üstlendiklerini ortaya koymuştur. CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1995a), serbest aminoasitlerin lösin-alanin peptidaz aktivitesini desteklediğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, bilhassa II. ve III. lösin-alanin peptidaz aktivitesinin serbest aminoasitler tarafından tetiklendiği hipotezini güçlendirmektedir. Bu yorumlara ilaveten, gözlenen bu yüksek aktivitenin, tripsin'in diğer proteazları aktive eden anahtar bir enzim olmasına ve bu enzimin besinsel kontrol mekanizmasının III. periyottan sonra aktif olmasından kaynaklandığını söyleyebiliriz. IV. periyotta ise, serbest aminoasit gruplarının sitozolik enzim faaliyetlerinde gözlenen azalmayı, larvaların bu dönemde besin ihtiyaçlarının kontrol grubuna oranla kısmen de olsa daha iyi karşılanabildiği ve enterosistlerin normal olgunlaşma moduna girmesine bağlayabiliriz.

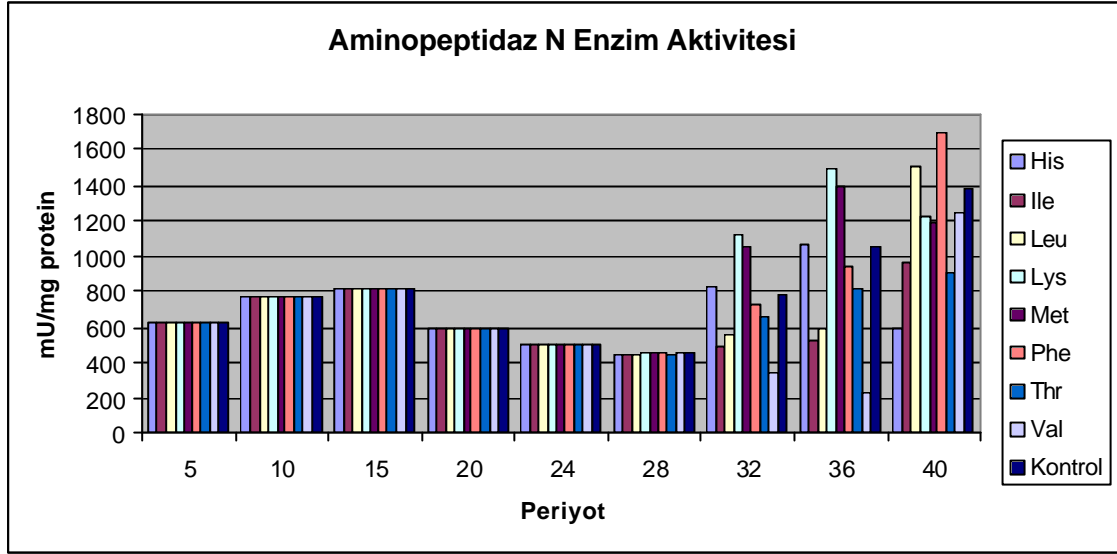
Bunlara karşılık, CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1995a), lösin-alanin peptidaz aktivitesinin tek başına sindirim kanalının durumu hakkında aydınlatıcı bilgi vermediğini, aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranı ile daha doğru sonuçlar elde edilebileceğini bildirmişlerdir. II. ve III. periyotlarda en iyi enterosist gelişiminin görüldüğü grup kontrol grubu olurken, IV. periyotta bu besleme grubunda enterosistlerin gelişiminde bir gerileme gözlenmiştir. Bu durum aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranları ile desteklenmektedir. Sindirim kanalının gelişiminin göstergesi olarak bilinen aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranları II. ve III. periyotlarda

kontrol grubunda iyi bir sindirim kanali gelismisi gözlendigini isaret ederken, IV. periyotta ise durumun özellikle lösün, fenilalanin, isolösün, lizin ve valin besleme gruplari lehinde gelistigini göstermistir. Bu indikatör sonuçlari muamele gruplari ortalamalari açısından degerlendirildiginde, en iyi sindirim kanali gelismisinin oldugu grubun kontrol grubu oldugu gözlenmistir. Tripsinin besinsel kontrol mekanizmasinin geç tesekkül etmesi sonucunda, her ne kadar IV. periyotta lösün alanin peptidaz aktiviteleri serbest aminoasit besleme gruplari kontrol grubuna göre düşük bulunmus olsa da, durum genel olarak degerlendirildiginde serbest aminoasit besleme gruplari için larvalarında lösün alanin peptidaz aktivitesini III. periyoda kadar tetikledigini açıkça ortaya konmustur. III. periyotta proteazlari aktive eden tripsin'in besinsel kontrol mekanizmasinin aktif olması sonucunda serbest aminoasit gruplari sindirim kanalini gelismisi yönündeki olumlu etkileri ortaya çikmis olmasına ragmen, bu durum ilk üç periyottaki serbest aminoasitlerin aktif rol alamamis olmasından dolayı etkisini tam olarak gösterememistir.

4.4.3. Aminopeptidaz N Enzim Aktivitesi

Farkli aminoasitlerle zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin 5.-40. günler arasindaki aminopeptidaz N enzim aktivitesi Sekil 4.10'da verilmistir. Ayrica, çipura larvalarinin deneme boyunca gözlenen lösün-alanin peptidaz enzim aktiviteleri Çizelge 4.11'de, bu ortalamalara ait varyans analiz tablolarini ise Çizelge 4.12'de verilmistir. Çipura larvalarinin aminopeptidaz N enzim aktiviteleri üzerinde, muamele gruplari ve periyotlara ilaveten bu iki faktörün birlikte etkisinin de önemli oldugu gözlenmistir ($P < 0.05$). Periyotlara göre çalışmada elde edilen en yüksek aminopeptidaz N aktivite degerleri; I. periyotta valin(449.69 ± 1.09), II. (1123.09 ± 6.34) ve III. (1490.64 ± 4.91) periyotta lizin ve IV. periyotta fenilalanin (1692.15 ± 2.69) grubu olmustur. Isolösün, lösün, fenilalanin, treonin ve kontrol gruplari tüm periyotlar boyunca artis göstermesine karsin, histidin, lizin ve metiyonin gruplari II. ve III. periyotta artis gözlemlenmis olup, IV. periyotta bu gruplarda azalmalar tespit edilmistir. Valin grubunda ise II. ve III. periyotlarda azalma gözlenirken, IV. periyotta bir artis oldugu tespit edilmistir. Muamele gruplari ortalamalari açısından durum degerlendirildiginde, lizin (1070.38 ± 115.72), metiyonin (1021.67 ± 106.61) ve

fenilalanin(954.60 ± 139.03) gruplarının kontrol(914.18 ± 102.97) grubuna göre daha yüksek bir aminopeptidaz N aktivitesi sergiledikleri tespit edilmiştir ($P < 0.05$).



Sekil 4.10. Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia metanaupli*'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki aminopeptidaz N enzim aktivitelerindeki değişimler.

Sindirim işlemine katılan bağırsak enzimlerinin çoğu enterosistlerin membranında bulunur. Aminopeptidaz N larval gelişim esnasında çok erken safhalarda gözlenebilmektedir. Aminopeptidaz N aktivitesi *Solea solea* (ALLIOT, 1979), ve *Scophthalmus maximus* (COUSIN ve ark., 1987)'de yumurtadan çıkışta gözlenmektedir. Sitolik enzimlerde yaşla gözlenen azalma ve membranik enzim aktivitesinde gözlenen artış balık larvalarının gelişiminde enterosistlerin normal olgunlaşmasını karakterize etmektedir.

Levrek larvalarında yaklaşık olarak çıkıştan sonraki 3. haftada membranik enzimlerin artışına karşılık, sitolitik enzimlerin aktivitesinde bir azalma görülmektedir (CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1994; RIBEIRO, 1999b). Aminopeptidaz N gibi membranik enzimler aynı zamanda besinsel durumun indikatörüdür (PATHAK ve ark., 1982). Eğer bu enzim düşük ise larvaların besinsel olarak yetersiz yemlerle beslenmiş olabileceklerini bildirmişlerdir (PATHAK ve ark., 1982).

Çizelge 4.11. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait aminopeptidaz N enzim aktivitesi ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (mU/mg protein)

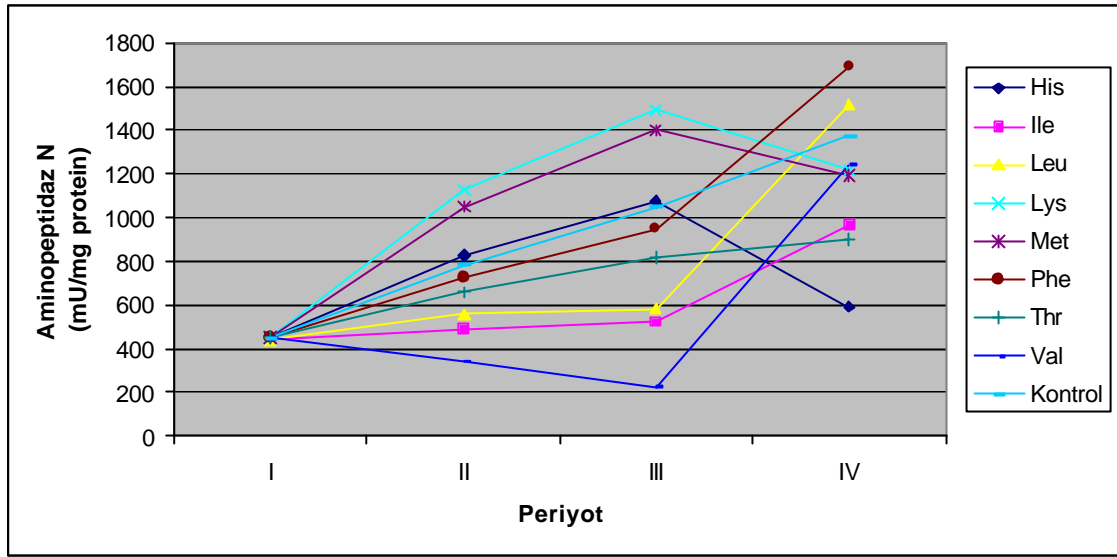
| Muamele Gruplari | Periyot | | | | |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 446.67±0.69 | 820.92±4.90 | 1072.42±3.83 | 592.00±1.63 | 733.00±71.49 ^d |
| Isolösin | 445.75±1.18 | 491.21±5.27 | 521.46±5.24 | 963.67±6.07 | 605.52±62.90 ^b |
| Lösin | 445.81±0.86 | 560.15±4.99 | 582.72±1.99 | 1515.09±5.24 | 775.94±129.62 ^e |
| Lisin | 447.97±2.65 | 1123.09±6.34 | 1490.64±4.91 | 1219.85±2.63 | 1070.38±115.72 ⁱ |
| Metiyonin | 448.05±0.92 | 1051.46±7.18 | 1398.85±4.59 | 1188.33±1.74 | 1021.67±106.61 ^h |
| Fenilalanin | 448.99±1.46 | 729.15±3.81 | 948.12±3.66 | 1692.15±2.69 | 954.60±139.03 ^g |
| Treonin | 446.78±1.54 | 655.84±7.95 | 812.94±3.19 | 903.21±5.16 | 704.70±52.27 ^c |
| Valin | 449.69±1.09 | 340.22±5.67 | 223.77±2.91 | 1241.69±5.38 | 563.84±120.44 ^a |
| Kontrol | 449.17±1.60 | 782.98±7.50 | 1046.06±3.15 | 1378.49±4.37 | 914.18±102.97 ^f |
| P_{ort} | 447.65±0.48 ^a | 728.34±46.81 ^b | 899.66±76.24 ^c | 1188.27±61.61 ^d | |

Aynı satir ve sütunlarda farklı harflerin kullanıldığı degerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05). M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar.

Çizelge 4.12. Aminopeptidaz enzim aktivitesine ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|--------------------|-------------|--------|
| Denekler arası | 26 | 3177143.429 | | |
| Muamele | 8 | 3175550.640 | 396943.830 | 0.000* |
| Hata 1 | 18 | 1592.789 | 88.488 | |
| Denekler içi | 81 | 12908751.56 | | |
| Periyot | 3 | 7801709.064 | 2600569.688 | 0.000* |
| Muameleperiyot | 24 | 5104755.575 | 212698.149 | 0.000* |
| Hata 2 | 54 | 2286.918 | 42.350 | |
| Genel | 107 | 16085894.99 | | |

*P<0.05; VK: varyasyon kaynakları; SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması; P: önem seviyesi



Sekil 4.11. Muamele gruplarında aminopeptidaz N enzim aktivitesinin periyotlara bağlı değişimi

PERSON-LE RUYET (1989), karaciger ve pankreasın yumurta açılımında olusmus oldugunu, nisasta ve protein sindirimi için gereken enzimlerden tripsin, amilaz, kemotripsin ve aminopeptidaz N'in ilk beslemeye geçildiği dönemde mevcut oldugunu bildirmislerdir.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1995a), aminopeptidaz N enziminin yalnız olarak sindirim kanalının gelişimi konusunda iyi bir gösterge olmayacağını, buna karşılık aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranının bu gelişimin daha iyi bir göstergesi olacağını bildirmislerdir.

CAHU ve ark. (1998), aminopeptidaz N enzim aktivitesinin larvanın yasından ziyade, ortamda mikro alg bulunup bulunmamasıyla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma, mikro alglerin sindirim enzimlerinin üretiminde tetikleyici rol üstlendiklerini ortaya koymuştur.

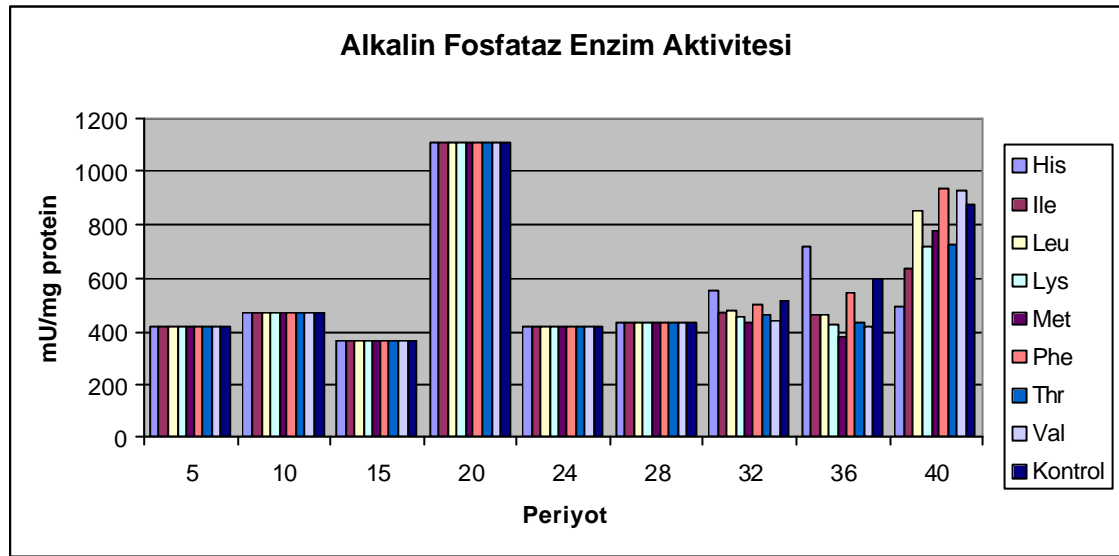
Çalışmamızda çıkıştan itibaren aminopeptidaz N aktivitesine rastlanmıştır. Her ne kadar histidin, metiyonin, lisin, lösin ve fenilalanin farklı periyotlarda kontrol grubuna göre üstünlük göstermiş olsa da aminopeptidaz N aktivitesinin tek başına sindirim kanalının olgunlaşmasının göstergesi olmayacağı bildirilmiştir (CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, (1995a). Bu aktivitenin sitozolik bir peptidaz olan lösin-alanin peptidaz ile birlikte değerlendirilmesinin sindirim kanalının olgunlaşması

hakkında daha doğru sonuçlar vereceği belirtilmiştir. II. ve III. periyotlarda elde edilen aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranları, kontrol grubunun, tüm serbest aminoasit besleme gruplarına göre daha iyi bir enterosist olgunlaşma sinyalleri verdiğini göstermiştir. . IV. periyotta ise bu durum, aminopeptidaz N aktivitesi bakımından üstünlük gösteren fenilalanin ve lösin grubuna ilaveten, isolösin, lisin valin gruplarında da iyi bir enterosist olgunlaşmasının habercisi olmuştur. Muamele gruplarının ortalama değerleri açısından durum değerlendirildiğinde, IV. periyotta elde edilen sonuçlara ilaveten lösin dışında, lisin ve metiyonin grubunda kontrol grubuna göre yüksek aktivite sergilediği tespit edilmiştir. Aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranının muamele grup ortalamaları en yüksek değer kontrol grubunda olduğunu göstermektedir. IV. periyotta fenilalanin ve lösin gruplarının kontrol grubuna göre üstünlükleri sindirim kanalının indikatörü olarak kabul edilen değerler tarafından desteklenmiştir. Buna karşılık, muamele gruplarının ortalama değerleri bakımından lisin, metiyonon ve fenilalanin grupları kontrol grubuna göre yüksek aktivite sergilemiş olsalar da aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz değerleri bu durumu desteklememektedir. Diğer taraftan aminopeptidaz N aktivitesi bakımından besleme gruplarının çok yüksek aktivite sergileyememelerini, bu peptidazların aktivasyonunda anahtar bir rol oynayan tripsin'in besinsel kontrol mekanizmasının geç meydana gelmesine bağlayabiliriz.

4.4.4. Alkalın Fosfataz Enzim Aktivitesi

Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki alkalın fosfataz enzim aktivitesi Şekil 4.12'de verilmiştir. Çipura larvalarının deneme boyunca gözlenen alkalın fosfataz enzim aktiviteleri Çizelge 4.13'de, bu ortalamalara ait varyans analiz tabloları ise Çizelge 4.14'de verilmiştir. Deneme sonunda, periyotlar ile iki faktörün birlikte etkisinin çipura larvalarının alkalın fosfataz enzim aktiviteleri üzerine etkileri önemli bulunmasına ($P < 0.05$) karşın, muamele gruplarının etkisinin önemli olmadığı anlaşılmıştır ($P > 0.05$). Çalışmada elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde fenilalanin ve kontrol grubunun tüm periyotlar da artış gösterdiği, I. periyottan II. periyota tüm muamele gruplarında artış olduğu, buna karşılık III. periyotta fenilalanin, kontrol ve histidin grupları dışında kalan muamele gruplarında bir azalma olduğu tespit

edilmiştir. Bu azalmalara karşılık IV. periyotta histidin grubu dışında genel bir artış eğilimi olduğu gözlenmiştir. En yüksek alkalın fosfataz aktivitesinin IV. periyotta fenilalanin(937.46±101.87) grubunda olduğu, buna karşılık muamele gruplarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmadığı anlaşılmıştır(P>0.05). II. ve III. periyotta en yüksek alkalın fosfataz aktivitesini histidin grubu sergilemesine karşın, IV. periyotta en düşük aktivite yine bu grupta gözlenmiştir.



Sekil 4.12. Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia metanaupli'*leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki alkalın fosfataz enzim aktivitelerindeki değişimler

Pankreatik enzimlerin sindiriminden sonra karma yem bileşenlerinin sindirimi bağırsak enzimleri ile devam etmektedir. Alkalın fosfataz aktivitesinin larval gelişimin çok erken dönemlerinde gözlemlendiği bildirilmiştir (ALLIOT, 1979; COUSIN ve ark., 1987).

Bağırsak enzimlerinin genel modeli, larvanın gelişimi esnasında pankreatik enzim aktivitesinde gözlenen benzerdir. Yani herhangi bir membranik enzim aktivitesindeki artışı, diğer sitozolik enzim aktivitesindeki azalış takip etmektedir. Yaşamın ilk üç haftasında sitozolik peptidazlar tarafından proteinin hücreler arası sindirimi çok yüksek bir aktivite sergiler. Hücre dışı sindirimin tam olarak fonksiyonel olmadığı dönemlerde bu aktivite oldukça yüksektir (CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1994; RIBEIRO, 1999b).

Çizelge 4.13. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının periyotlara ve muamele gruplarına ait alkalın fosfataz enzim aktivitesi ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (mU/mg protein)

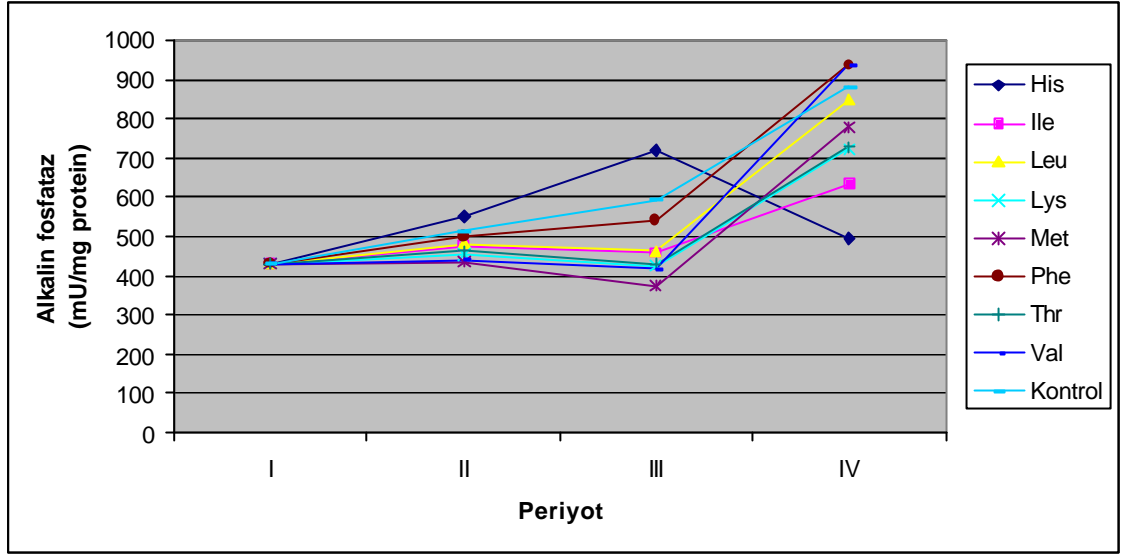
| Muamele Gruplari | Periyot | | | | |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 432.17±0.97 | 552.04±3.70 | 718.57±87.57 | 495.30±58.70 | 549.52±39.18 ^a |
| Isolösin | 430.44±0.62 | 476.49±3.33 | 456.66±53.47 | 635.93±70.40 | 499.88±30.67 ^a |
| Lösin | 432.13±0.35 | 481.22±1.16 | 462.32±48.08 | 847.73±97.89 | 555.85±56.12 ^a |
| Lisin | 432.78±0.61 | 454.60±1.99 | 425.49±42.36 | 719.95±79.63 | 508.21±41.70 ^a |
| Metiyonin | 430.62±1.21 | 433.10±2.03 | 375.35±42.17 | 776.85±88.80 | 503.98±52.38 ^a |
| Fenilalanin | 431.20±0.68 | 499.59±0.92 | 540.04±61.39 | 937.46±101.87 | 602.07±64.72 ^a |
| Treonin | 431.54±0.99 | 461.02±1.12 | 432.39±47.67 | 725.10±77.62 | 512.51±41.94 ^a |
| Valin | 431.46±0.67 | 441.58±1.77 | 415.03±41.37 | 934.77±112.12 | 555.71±70.79 ^a |
| Kontrol | 431.60±1.46 | 513.05±2.09 | 594.20±64.09 | 879.10±104.76 | 604.49±57.19 ^a |
| P _{ort} | 431.55±0.28 ^a | 479.19±6.99 ^b | 491.12±25.34 ^c | 772.47±36.71 ^d | |

Aynı satır ve sütunlarda farklı harflerin kullanıldığı degerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05). M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar.

Çizelge 4.14. Alkalın fosfataz enzim aktivitesine ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|--------------------|------------|--------|
| Denekler arası | 26 | 432738.939 | | |
| Muamele | 8 | 157896.324 | 19737.041 | 0.308 |
| Hata 1 | 18 | 274842.615 | 15269.034 | |
| Denekler içi | 81 | 2938383.052 | | |
| Periyot | 3 | 1939666.714 | 646555.571 | 0.000* |
| Muamelexperiyot | 24 | 670583.273 | 27940.970 | 0.000* |
| Hata 2 | 54 | 328133.065 | 6076.538 | |
| Genel | 107 | 3371121.991 | | |

*P<0.05; VK: varyasyon kaynakları; SD:serbestlik derecesi; KT:kareler toplamı; KO: kareler ortalaması; P: önem seviyesi



Sekil 4.13. Muamele gruplarında alkalın fosfataz enzim aktivitesinin periyotlara bağlı değisimi

Levrek larvalarında yaklaşık olarak çıkıştan sonraki 3. haftada membranik enzimlerin artışına karşılık, sitozolik enzimlerin aktivitesinde bir azalma görülmektedir (CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1994; RIBEIRO, 1999b). Alkaline fosfataz enzim aktivitesi ise bu azalışa karşılık artmaktadır. Bu durum balık larvalarının gelişiminde enterosistlerin normal olgunlaşmasını karakterize etmektedir.

WATANABE ve ark. (1983), alkaline fosfataz aktivitesinin fosfolipitler ve fosfoproteinler gibi fosforlu substratlar tarafından etkilendiği bildirilmiştir. Fosfor'un *Artemia* da %1 ve balık ununda % 3,3 olduğu bildirilmiştir.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1997), levrek larvaları üzerinde yaptıkları çalışmada 15. ve 25. günden 40. güne kadar olan dönemde mikro diyetleri kullanmışlar ve larvaların pankreatik bölüm ve bağırsagın iki hücreli bölgesindeki sindirim kapasitelerini incelemişlerdir. Pankreatik salgıların karma yem grubunda düşük olduğu, alkalın fosfataz enzimlerindeki artışların canlı yem grubu ile aynı olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonucunda karma yemle beslenen larvalardaki gelişimin pankreatik enzim sentezi eksikliğinden olmadığı, zayıf gelişimin geleneksel karma yemlerin larvanın sindirim gereksinimlerini karşılamakta yetersiz kaldığından kaynaklandığını bildirmiştir.

CAHU ve ark. (1998), alkaline fosfataz enzim aktivitesinin larvanın yasından ziyade, ortamda mikroalg bulunup bulunmamasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. 26.günde, mikroalg'li ortamda bulunan larvalarda alkalın fosfataz aktivitesinde, mikroalg'siz ortamda bulunanlara göre önemli bir artış tespit edilmiştir($p<0,05$). Çalışma, algerin, sindirim enzimlerinin üretiminde tetikleyici rol üstlendiklerini ortaya koymuştur.

PATHAK ve ark. (1982), alkaline fosfataz gibi membranik enzimlerin besinsel durumun göstergesi olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada, alkaline fosfataz aktivitesinde gözlenen düşmeler, larvaların besinsel içerik bakımından yetersiz yemle beslenmelerine bağlanmıştır.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1994), alkaline fosfataz aktivitesindeki mikro partikül yemlerle beslenen gruplarda gözlenen düşüklüğün besin yetersizliğini işaret ettiği bildirilmiştir.

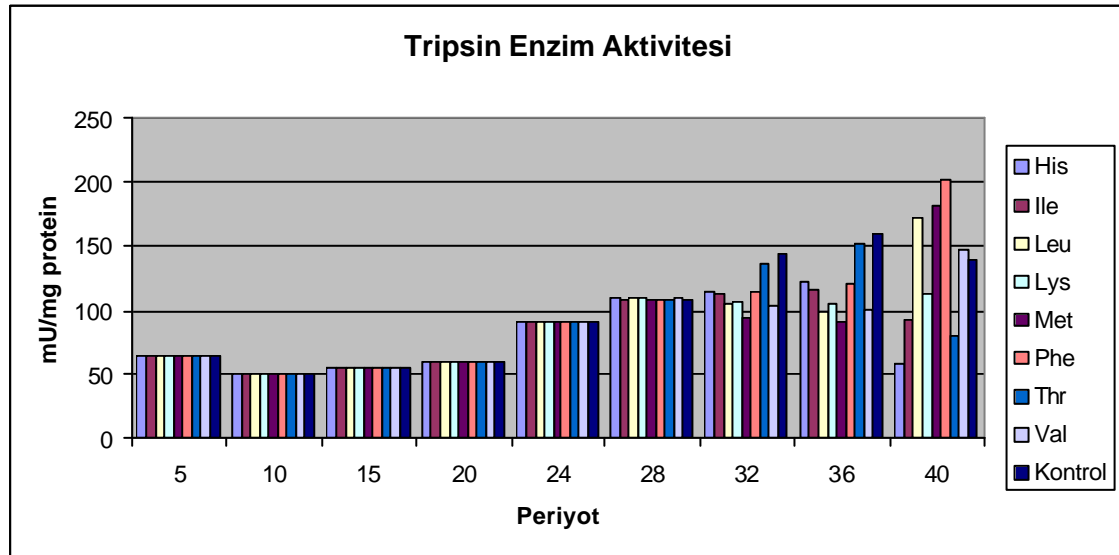
Elde edilen bilgiler, alkalın fosfataz aktivitesinin larvaların erken dönemlerinde bulunduğunu, sitozolik enzim aktivitesinde gözlenen azalmalara karşılık, arttığını göstermektedir(ALLIOT, 1979: COUSIN ve ark., 1987: CAHU ve ZAMBONINO, 1994: RIBEIRO, 1999b). Bunlara ilaveten aminopeptidaz N gibi bu enziminde besinsel durumun göstergesi olduğu bildirilmiştir (PATHAK ve ark.,1982: CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1994).

Çalışmamızda, erken dönemlerde alkalın fosfataz aktivitesi tespit edilmiş olup, 20. günde hızlı bir artış, daha sonra I. periyoda doğru bir azalma kaydedilmiştir. Alkalın fosfataz enzim aktivitesinde gözlenen bu değişimler önceki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Her ne kadar II. ve III. periyotta histidin grubunun alkalın fosfataz aktivitesi diğer muamele gruplarına göre yüksek bir aktivite sergilemiş olsa da aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranları bu durumu desteklememektedir. IV. periyotta ise en düşük alkalın fosfataz aktivitesine sahip olan histidin grubundaki durum aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranları tarafından desteklenmektedir. MCCARTY ve ark.(1980), alkaline fosfataz aktivitesinin genellikle fosfolipitler, fosfoproteinler gibi fosforlu substratlar tarafından tetiklendiğini bildirmişlerdir. Çalışmada kullanılan *Artemia*'nin fosfor içeriğinin yaklaşık % 1 olduğu WATANABE ve ark. (1983)' tarafından bildirilmiştir. Muamele gruplarının ortalamaları arasında

deneme sonunda istatistik farklılık oluşmamasını, fosfor içeriklerinin benzer olmasına bağlayabiliriz.

4.4.5. Tripsin Enzim Aktivitesi

Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki tripsin enzim aktivitesi Şekil 4.14'de verilmiştir. Ayrıca, çipura larvalarının deneme boyunca gözlenen tripsin enzim aktiviteleri Çizelge 4.15'de, bu ortalamalara ait varyans analiz tabloları ise Çizelge 4.16'da verilmiştir. Çipura larvalarının tripsin enzim aktiviteleri üzerinde, muamele grupları ve periyotlara ilaveten bu iki faktörün birlikte etkisinin de önemli olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). Histidin, izolösin, treonin ve kontrol gruplarında II. ve III. periyotlarda artma, IV. periyotta azalma gözlenirken, lösin, lizin, metiyonin ve valin gruplarında tam tersi bir durum tespit edilmiştir. Diğer taraftan fenilalanin grubunda tüm periyotlarda bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Periyotlara göre en yüksek tripsin aktivite değerleri; I. periyot histidin (109.20 ± 0.26), II. periyot kontrol (143.99 ± 0.84), III. periyot kontrol (159.60 ± 1.01), IV. periyot fenilalanin (202.20 ± 3.11) şeklinde olmuştur. IV. periyotta kontrol grubuna göre üstünlük gösteren gruplar ise, fenilalanin, metiyonin, lösin ve valin'dir.



Şekil 4.14. Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 5.-40. günler arasındaki tripsin enzim aktivitelerindeki değişimler.

Çizelge 4.15. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının periyotlara ve muamele gruplarına ait tripsin enzim aktivitesi ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (mU/mg protein)

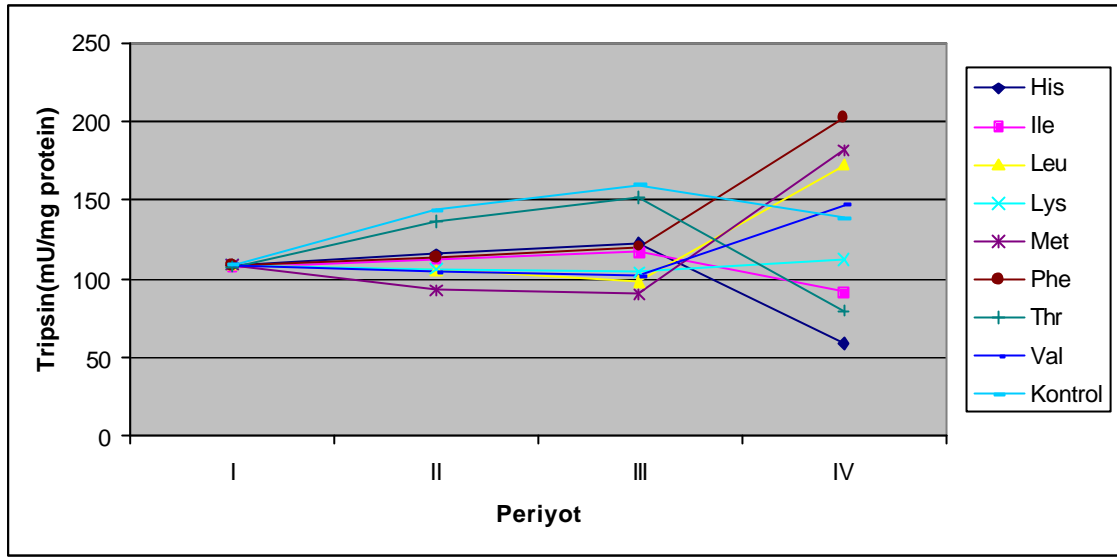
| Muamele Gruplari | Periyot | | | | |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 109.20±0.26 | 115.28±0.16 | 122.44±0.49 | 58.85±0.70 | 101.44±7.55 ^a |
| Isolösin | 108.20±0.43 | 112.22±0.22 | 117.04±0.91 | 91.88±1.46 | 107.33±2.87 ^b |
| Lösin | 108.72±0.63 | 105.26±0.68 | 98.94±0.76 | 172.58±3.38 | 121.37±9.00 ^c |
| Lisin | 108.86±0.66 | 106.82±0.40 | 104.47±0.58 | 111.98±4.01 | 108.03±1.21 ^b |
| Metiyonin | 108.27±0.28 | 93.16±0.97 | 90.39±0.58 | 181.69±3.36 | 118.38±11.23 ^d |
| Fenilalanin | 108.38±0.54 | 113.68±0.36 | 120.74±0.69 | 202.20±3.11 | 136.25±11.57 ^f |
| Treonin | 107.78±0.33 | 136.34±1.08 | 151.99±0.85 | 79.64±2.11 | 118.94±8.36 ^d |
| Valin | 108.75±1.14 | 104.25±0.13 | 101.34±1.15 | 147.48±4.42 | 115.45±5.72 ^c |
| Kontrol | 108.27±0.55 | 143.99±0.84 | 159.60±1.01 | 138.61±1.23 | 137.62±5.62 ^f |
| P _{ort} | 108.49±0.18 ^a | 114.56±2.97 ^b | 118.55±4.39 ^c | 131.66±9.14 ^d | |

Aynı satir ve sütunlarda farkli harflerin kullanildigi degerler istatistiksel olarak farkli bulunmustur (P<0.05). M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar.

Çizelge 4.16. Tripsin enzim aktivitesine ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|------------------|----------|--------|
| Denekler arasi | 26 | 14817.812 | | |
| Muamele | 8 | 14677.367 | 1834.671 | 0.000* |
| Hata 1 | 18 | 140.445 | 7.803 | |
| Denekler içi | 81 | 71470.226 | | |
| Periyot | 3 | 7793.183 | 2597.728 | 0.000* |
| Muamelexperiyot | 24 | 63279.090 | 2636.629 | 0.000* |
| Hata 2 | 54 | 397.953 | 7.369 | |
| Genel | 107 | 86288.038 | | |

*P<0.05; VK: varyasyon kaynaklari; SD: serbestlik derecesi; KT:kareler toplami; KO:kareler ortalamasi; P: önem seviyesi



Sekil 4.15. Muamele gruplarında tripsin enzim aktivitesinin periyotlara bağlı değişimi

IV. periyotta fenilalanin(202.20 ± 3.11), metiyonin(181.69 ± 3.36), lösin (172.58 ± 3.38) ve valin(147.48 ± 4.42) grupları kontrol grubuna(138.61 ± 1.23) göre yüksek bir tripsin aktivitesi sergilerken, muamele grupları açısından durum değerlendirildiğinde en yüksek aktiviteyi kontrol grubunun(137.62 ± 5.62) gösterdiği, bununla birlikte fenilalanin grubu ile kontrol grubu arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığı sonucuna varılmıştır($P > 0.05$).

Larval asamada tripsin en önemli proteolitik sindirim enzimidir ve genelde çıkıştan sonra 3.günde gözlenmektedir(HJELMELAND ve ark., 1984; PEDERSEN ve ark.,1987; UEBERSCHAR, 1988). Zimojen granüller ve pankreatik kanalın(Wirsung olarak da bilinmekte) mevcudiyeti bu olayları karakterize etmektedir (BECCARIA ve ark., 1991). Tripsin aktivitesinin tam bu asamada gözlendiği bildirilmiştir(CAHU ve ZAMBONINO INFANTE, 1994). Ağız açılması ve anüsün etkin olması ile birlikte tripsin aktivitesinde keskin bir artış gözlenmiştir

RIBEIRO ve ark. (1991), yaptıkları çalışmada, pankreatik enzimlerin sentez işlemlerinin gıda alımıyla tetiklenmediğini teyit etmiştir. Aslında pankreatik enzimlerin aktivitesi larvanın gelişim dönemi boyunca benzer bir model takip etmektedir. Larvaların protein konsantrasyonu ile ilgili enzim aktivitesi olarak ifade edilen bu aktivite, levrek larvalarında 20.günde artar, 25.güne kadar azalır ve sonuçta post larval gelişim esnasında benzer seviyede kalır(ZAMBONINO INFANTE ve CAHU, 1994b). Bu model genç larvaların sindirim kapasitesinin genellikle çok yüksek bir ilişkisi olduğu,

ayni zamanda sentez isleminin yaslara baglantili oldugu bildirilmistir. Bu durum amilaz aktivitesini kontrol eden mekanizmanin larvanin erken dönemlerinden beri etkin oldugunu gösterirken, tripsin'i kontrol eden mekanizmanin daha sonraki asamalarda aktif oldugunu göstermistir(RIBEIRO ve ark., 1991: PERES ve ark.,1996).

PERSON-LE RUYET (1989), karaciger ve pankreasin yumurta açiliminda olusmus oldugunu, protein sindirimi için gereken enzimlerden tripsin'in ilk beslemeye geçildigi dönemde mevcut oldugunu bildirmislerdir.

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1997), levrek larvalari üzerinde yaptiklari çalismada 15. ve 25. günden 40. güne kadar olan dönemde mikro diyetleri kullanmislar ve larvalarin pankreatik bölüm ve bagirsagin iki hücresele bölgesindeki sindirim kapasitelerini incelemislerdir. Buna göre tripsin aktivitesi kontrol grubunda canli yem grubuna göre ayni olmakla birlikte bazı gruplarda daha yüksek bulunmustur.

ZAMBONINO INFANTE ve CAHU(1994a), tripsin aktivitesinin yeme aminoasit karisimi eklenmesi ile arttigini bildirmislerdir.

PEREZ ve ark. (1996), yemlerin protein içeriğindeki artisa paralel olarak tripsin aktivitesinin arttigini bildirmislerdir.

CAHU ve ark. (1999), orta seviyedeki balik protein hidrolizatlarinin kullaniminin, baliklarin sindirim fonksiyonlarinin ergin hale gelmesinde kolaylastirici bir faktör oldugunu bildirmislerdir.

CAHU ve ark. (1998), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarinin üretimi asamasinda tanklarda mikroalg bulunup bulunmamasinin sindirim enzimleri ve yasama oranlari üzerine etkisini belirlemek üzere yaptiklari çalismada, degerlendirmeye alinan 3 pankreatik enzimin spesifik aktivitelerinin larvanin yasi ile ilgili oldugu, tanklara mikroalg ilave edilip edilmemesinin çok büyük bir degiskenlik göstermediği bildirilmistir. Bu enzimlerden, amilaz ve kimotripsin disinda, sadece tripsin aktivitesinde, 8-16. günler arasinda alg ilaveli ortamda gelisen larvalarda bir artis gözlemlenmistir. Deniz baliklari larvalarinda daha önce yapilan çalismalarda üretim tanklarina mikroalg ilavesinin tripsin aktivitesinde bir artisa neden olduğu gösterilmemistir (LE VAY ve ark.,1993). Bu çalismada gözlenen mikroalg ilavesinin tripsin'in spesifik aktivitesi üzerine olumlu etkisi, CCK(kolesistokininin) gibi sindirim hormonlari tarafından, pankreatik hormonal tetikleme ile karistirilmamalidir. Gerçekte böyle bir etki, pankreatik enzimlerin birçoğunun tetiklenmesiyle sonuçlanir

(SHEELE,1993). ZAMBONINO INFANTE ve CAHU (1994a) tarafından yapılan bir çalışmada, tripsinin spesifik aktivitesindeki bir hareket, karma yemlere serbest aminoasitlerin bir karisimi ilave edildiği zaman rapor edilmiştir. Daha açık bir ifade ile serbest aminoasitler tarafından tripsin'in aktivasyonu, memelilerde ortaya konmuştur. (GRENDL ve ROTHMAN, 1981). Algler serbest aminoasitlerin büyük bir kısmını bünyelerinde buldukları için, salınan aminoasitlerin larvalardaki tripsin'in tetiklenmesinden sorumlu tutulabileceği belirtilmiştir (ADMIRAL ve ark., 1986).

TSENG ark. (1982), tripsin'in aktivitesi, genellikle yemin protein içeriği ve aminoasit profili tarafından etkilendiğini bildirmişlerdir

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1995b), kasein karisimini içeren mikrodiet ile beslenen larvaların tripsin aktivitesinde bir azalma gözlenirken, diğer balık unu ve karma gruptaki larvaların tripsin aktivitesinde bir artış tespit edilmiştir. Ayrıca mikro diyet geçiş aşamalarında yem içerisinde protein hidrolizatlarının bulunmasının enzimsel aktivite üzerine olumlu etki yaptığı belirtilmiştir.

ZAMBONINO INFANTE ve CAHU (1994a), yemlere protein karisimi veya aminoasit karisimi ilavesinin larval büyüme ile birlikte bazı pankreatik enzimler ve pepsin enzimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Levrek larvalarını aminoasit(%5 karisim oranı) veya protein karisimi(%5 karisim oranı) ile elde ettikleri mikropartikül yemlerle 25. günde beslemeye başlamışlardır. Bu çalışmada kontrol grubu olarak canlı yem kullanılmıştır. Deneme sonunda, tripsin'in spesifik aktivitesinin aminoasit karisimi ilaveli diyetlerle beslenen larvalarda arttığı gözlemlenmiştir.

GRENDL ve ROTHMAN (1981), serbest aminoasitlerden bilhassa lizin'in, tripsin salgısını tetiklediği bildirmişlerdir. Bu durum memelilerde rapor edildiği gibi, nitrojenin moleküler formunun tripsin'in spesifik aktivitesi üzerindeki etkisi olduğu görüşünü desteklemektedir (VALETTE ve ark., 1992).

CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1995a), aminoasit karisimi içeren mikro diyetlerin tripsin'in spesifik aktivitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda, protein hidrolizatlarının mikro diyetlerde kullanımının larval gereksinimi karşılama da serbest aminoasitlere oranla daha üstün olduğunu ortaya koymuştur.

UEBERSCHAR (1992), balık larvalarında triptik enzim aktivitesinin, sindirim kapasitesinin iyi bir göstergesi olduğunu bildirmiştir.

NOLTING ve ark. (1998), canlı yem grubunda mikro partikül test diyetine göre daha yüksek bir tripsin aktivitesi tespit edildiği bildirilmiştir ($p < 0,05$).

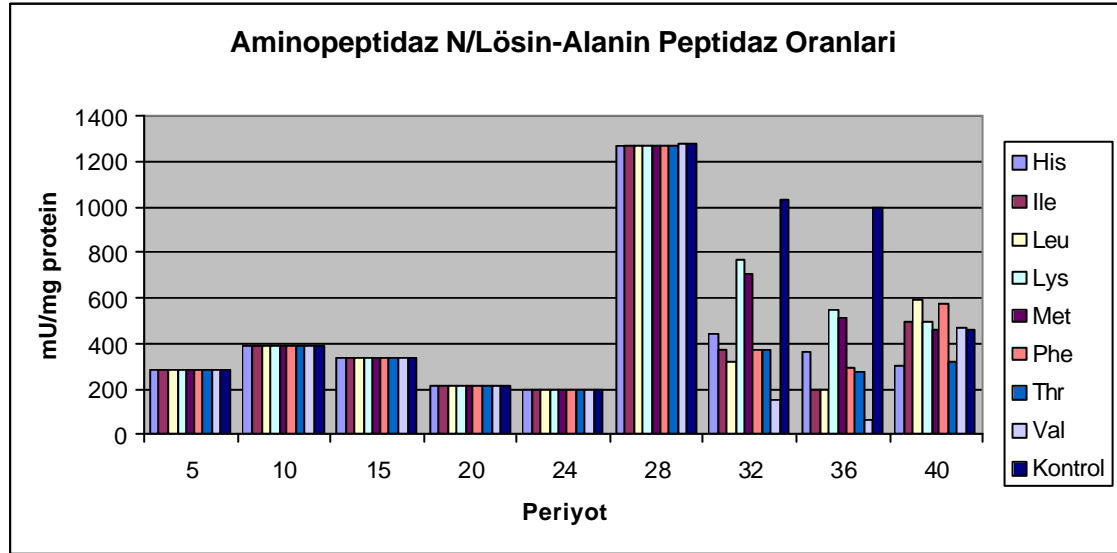
KOLKOVSKI ve ark. (2000), deneme grupları arasında tripsin enzim aktiviteleri arasında önemli farklılık bildirmemişlerdir. Bu çalışma, tatlı su levreği juvenillerinde sindirim hormonu ve enzimlerinin yemlere ilavesinin gerekli olmadığını ortaya koymuştur. Hormon ve enzim ilavesine balıkların ihtiyaç duymaması bu balıkların sindirim sistemlerinin tam olarak geliştiğine işaret etmiştir.

KOLKOVSKI ve ark. (1997c), tripsin aktivitesi canlı yem ve mikro partikül yemlerle beslemede önemli bir farklılık yaratmamıştır. CAHU ve ZAMBONINO INFANTE (1994), tripsin aktivitesinin, daha çok yemin protein ve aminoasit kompozisyonuyla ilgili olduğunu bildirmişlerdir.

Mevcut bilgiler, tripsin enziminin en önemli proteolitik enzimlerden biri olduğunu, larvanın erken dönemlerinden itibaren tespit edildiğini göstermiştir (HJELMELAND ve ark., 1984; PEDERSEN ve ark., 1987; UEBERSCHAR, 1988). Bunun yanı sıra amilaz aktivitesini kontrol eden mekanizmanın larvanın erken dönemlerinden itibaren etkin olduğu, buna karşılık tripsin'i kontrol eden mekanizmanın daha sonraki dönemlerde etkin olduğu, tripsin aktivitesinin serbest aminoasit karışımları ile besleme sonucunda arttığı bildirilmiştir (RIBEIRO ve ark., 1991; PERES ve ark., 1996; ZAMBONINO INFANTE ve CAHU, 1994a). Sindirim kanalının olgunlaşmasının göstergesi olarak kabul edilen aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlarından elde edilen sonuçlar, IV. periyotta metiyonin grubu dışında tripsin enzim aktivitesinde meydana gelen değişimleri destekler niteliktedir. Serbest aminoasitlerin tripsin aktivitesini tetiklediği bilinmektedir (ZAMBONINO INFANTE ve CAHU, 1994a). II. ve III. periyotta kontrol grubunun üstünlüğü tripsin aktivitesini kontrol eden mekanizmanın çipura larvalarında, çalışmamızda tespit edildiği üzere, III. periyottan sonraya rastlamasına bağlanabilir (RIBEIRO ve ark., 1991). II. ve III. periyotlarda her ne kadar kontrol grubunda bir üstünlük gözlenmişse de IV. periyotta tripsin'in yüksek aktivitesinin serbest aminoasitlerle zenginleştirilmiş canlı yem besleme grupları yönünde bir eğiliminin olması, erken dönemlerde de bu besleme gruplarından kaynaklı bir olumsuzluk yaşanmadığı, yani bu besleme gruplarının enterosistlerin normal olgunlaşma sürecini geciktirici bir rol oynamadıklarını göstermektedir.

4.4.6. Aminopeptidaz N/Lösin-alanin Peptidaz Oranlari

Farkli aminoasitlerle zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin 5.-40. günler arasindaki aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlari Sekil 4.16'da verilmistir. Çipura larvalarinin deneme boyunca gözlenen aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlari Çizelge 4.17'de, bu ortalamalara ait varyans analiz tablolarini ise Çizelge 4.18'de verilmistir. Çipura larvalarinin aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlari üzerinde, muamele gruplari ve periyotlara ilaveten bu iki faktörün birlikte etkisinin de önemli oldugu gözlenmistir ($P<0.05$). I., II. ve III. periyotlarda kontrol grubunun diger muamele gruplarina göre üstün oldugu, buna karsin IV. periyotta histidin, metiyonin ve treonin disinda serbest aminoasit besleme gruplari yönünde kontrol grubuna göre bir artis egilimi oldugu tespit edilmistir. İlk üç periyotta muamele gruplarinin aminopeptidaz N/lösin alanin peptidaz oranlarinda kontrol grubuna göre ani düşüşler gözlenmistir. Buna karsilik kontrol grubunda III. periyottan IV. periyoda geçiste benzer bir ani düşüş oldugu tespit edilmistir. Muamele gruplarinin ortalamalari açısından durum degerlendirildiginde, kontrol grubunun(945.31 ± 89.21) diger tüm besleme gruplarina göre yüksek bir aktivite sergiledigi tespit edilmistir.



Sekil 4.16. Farkli aminoasitlerle zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin 5.-40. günler arasindaki aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlari

Çizelge 4.17. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının periyotlara ve muamele gruplarına ait aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlarının ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (mU/mg protein)

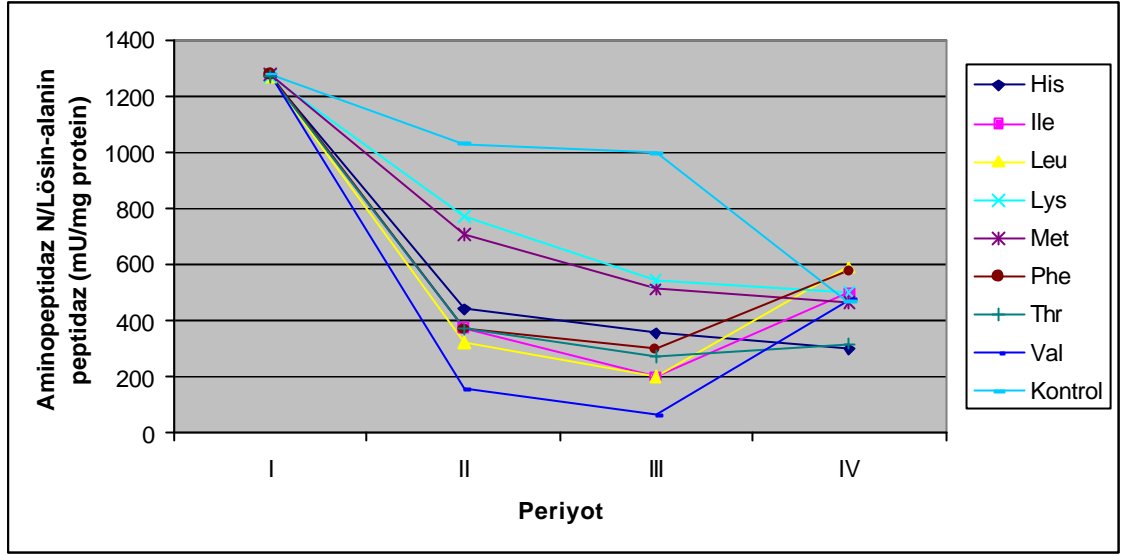
| Muamele Gruplari | Periyot | | | | |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 1267.22±2.39 | 443.68±1.61 | 356.05±1.02 | 300.09±1.30 | 591.76±118.59 ^{cd} |
| Isolösin | 1271.74±0.88 | 372.95±5.26 | 198.77±1.66 | 499.17±3.55 | 585.66±123.69 ^c |
| Lösin | 1270.59±2.12 | 321.40±3.31 | 198.52±0.45 | 592.74±4.43 | 595.82±125.09 ^d |
| Lisin | 1272.98±6.69 | 768.97±2.89 | 544.78±2.81 | 496.17±3.33 | 770.73±92.78 ^e |
| Metiyonin | 1274.38±1.65 | 707.15±6.07 | 510.61±2.42 | 464.77±2.88 | 739.23±97.13 ^f |
| Fenilalanin | 1275.88±8.23 | 368.01±2.13 | 297.55±1.42 | 577.23±1.38 | 629.67±116.70 ^c |
| Treonin | 1268.12±6.43 | 367.45±4.70 | 273.28±1.31 | 318.70±2.55 | 556.89±124.22 ^b |
| Valin | 1278.75±4.58 | 153.26±2.43 | 64.58±0.91 | 470.17±2.48 | 491.69±144.35 ^a |
| Kontrol | 1278.94±4.45 | 1033.25±9.38 | 1001.06±0.66 | 467.99±1.23 | 945.31±89.21 ^h |
| P_{ort} | 1273.18±1.54 ^d | 504.02±50.90 ^c | 382.80±51.22 ^a | 465.23±18.46 ^b | |

Aynı satir ve sütunlarda farklı harflerin kullanıldığı degerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05).M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar.

Çizelge 4.18. Aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlarına ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|--------------------|-------------|--------|
| Denekler arası | 26 | 1849146.581 | | |
| Muamele | 8 | 1848002.716 | 231000.339 | 0.000* |
| Hata 1 | 18 | 1143.865 | 63.548 | |
| Denekler içi | 81 | 15958767.35 | | |
| Periyot | 3 | 13906035.104 | 4635345.035 | 0.000* |
| Muamelexperiyot | 24 | 2050826.035 | 85451.085 | 0.000* |
| Hata 2 | 54 | 1906.210 | 35.300 | |
| Genel | 107 | 17807913.93 | | |

*P<0.05; VK: varyasyon kaynakları; SD: serbestlik derecesi; KT:kareler toplami; KO: kareler ortalamasi; P: önem seviyesi



Sekil 4.17. Muamele gruplarında aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlarının periyotlara bağlı değişimi

CAHU and ZAMBONINO INFANTE (1995a), aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranının sindirim sisteminin gelişiminin iyi bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ilk üç periyotta bu oran üzerine muamele grupların büyük bir etkisinin olmadığını buna karşılık IV. periyotta serbest aminoasit grupları ile zenginleştirilmiş *Artemia metanaupli*'leri ile çipura larvalarının beslenmesinin, sindirim sistemlerinin olgunlaşması üzerine olumsuz etki yaratmadığını göstermektedir. Özellikle, lösin, fenilalanin, isolösin, lisin ve valin gruplarının kontrol grubuna göre daha iyi bir sindirim sistemi gelişimini tetiklediği tespit edilmiştir. Buna karşılık durum muamele gruplarının ortalamaları açısından ele alındığında kontrol grubunun diğer besleme gruplarına göre üstün olduğu gözlenmiştir. Gözlenen bu yüksek aktivitenin, tripsin'in diğer proteazları aktive eden anahtar bir enzim olmasına ve bu enzimin besinsel kontrol mekanizmasının III. periyottan sonra aktif olmasından kaynaklandığını söyleyebiliriz (RIBEIRO ve ark., 1991).

4.5.Hormon Analizleri

4.5.1.Bombesin Hormon Analizi

Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 20.-40. günler arasındaki bombesin hormonundaki(5. ve 15. dakikadaki) değişimler Şekil 4.18'de verilmiştir. Çipura larvalarının deneme boyunca gözlenen bombesin hormonu ortalama değerleri Çizelge 4.19(5.dakika)'da ve Çizelge 4.21(15.dakika)'de, bu ortalamalara ait varyans analiz tabloları ise Çizelge 4.20(5.dakika)'de ve 4.22(15.dakika)'de verilmiştir. Çipura larvalarının bombesin hormon değerleri üzerinde, her iki örnekleme zamanı için(5.dakika ve 15.dakika) muamele grupları ve periyotlara ilaveten bu iki faktörün birlikte etkisinin de önemli olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$).

4.5.1.1.Bombesin Hormonu(5.dakika)

I. periyotta kontrol grubunun diğer gruplara göre yüksek bir aktivite sergilediği tespit edilmiştir. Buna karşılık II. ve III. periyotlarda tüm besleme gruplarının kontrol grubuna göre daha yüksek bir aktivite sergilediği gözlemlenmiştir. II. ve III. periyotta en yüksek aktiviteyi histidin grubu göstermiştir. IV. periyotta histidin, isolösin ve fenilalanin grupları kontrol grubuna göre daha yüksek bir aktivite sergilemiştir. IV. periyotta en yüksek aktivite isolösin grubunda meydana gelmiştir. Muamele gruplarının ortalamaları açısından durum değerlendirildiğinde, IV. periyotta elde edilen sonuçlara benzer olduğu tespit edilmiştir.

4.5.1.2.Bombesin Hormonu(15.dakika)

I. periyotta en yüksek aktiviteyi histidin grubu gösterirken, bu periyotta bu gruba ilaveten fenilalanin ve lösin gruplarının da kontrol grubuna göre yüksek bir aktivite sergilediği tespit edilmiştir. II. ve III. periyotlarda tüm muamele gruplarının kontrol grubuna göre üstün olduğu gözlemlenmiş olup, en yüksek aktivitenin histidin grubunda olduğu belirlenmiştir. IV. periyotta valin ve lösin dışında tüm muamele gruplarının kontrol grubuna göre üstün olduğu, en yüksek aktivitenin de histidin grubundan elde edildiği tespit edilmiştir. Muamele gruplarının ortalamaları açısından durum değerlendirildiğinde, tüm muamele gruplarının kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli farklılıklara sahip olduğu belirlenmiştir($P<0.05$).

Çizelge 4.19. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait bombesin hormonu(5.dakika) ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (pg/mg protein)

| Muamele Gruplari | Periyot | | | | |
|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 0.37±0.008 | 0.48±0.003 | 0.52±0.008 | 0.41±0.006 | 0.44±0.01 ^d |
| Isolösin | 0.41±0.004 | 0.46±0.006 | 0.47±0.005 | 0.45±0.009 | 0.45±0.008 ^d |
| Lösin | 0.41±0.004 | 0.43±0.005 | 0.45±0.004 | 0.12±0.007 | 0.36±0.04 ^a |
| Lisin | 0.36±0.002 | 0.45±0.007 | 0.46±0.003 | 0.29±0.01 | 0.39±0.02b ^c |
| Metiyonin | 0.37±0.004 | 0.42±0.005 | 0.45±0.006 | 0.32±0.009 | 0.39±0.01b ^c |
| Fenilalanin | 0.41±0.003 | 0.48±0.01 | 0.51±0.01 | 0.45±0.01 | 0.46±0.01 ^d |
| Treonin | 0.51±0.005 | 0.39±0.008 | 0.34±0.002 | 0.25±0.08 | 0.37±0.03 ^{ab} |
| Valin | 0.50±0.008 | 0.47±0.01 | 0.48±0.008 | 0.19±0.009 | 0.41±0.03 ^c |
| Kontrol | 0.63±0.01 | 0.37±0.007 | 0.30±0.01 | 0.33±0.006 | 0.41±0.03 ^c |
| P_{ort} | 0.44±0.01 ^b | 0.44±0.007 ^b | 0.44±0.01 ^b | 0.31±0.02 ^a | |

Aynı satır ve sütunlarda farklı harflerin kullanıldığı değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05). M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar.

Çizelge 4.20. Bombesin hormonuna(5.dakika) ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|----------------|-----------|--------|
| Denekler arası | 26 | 0,15104 | | |
| Muamele | 8 | 0,129 | 0,01607 | 0,000* |
| Hata 1 | 18 | 0,02204 | 0,001224 | |
| Denekler içi | 81 | 0,91791 | | |
| Periyot | 3 | 0,335 | 0,112 | 0,000* |
| Muamelexperiyot | 24 | 0,542 | 0,02257 | 0,000* |
| Hata 2 | 54 | 0,04091 | 0,0007576 | |
| Genel | 107 | 1,06895 | | |

*P<0.05; VK: varyasyon kaynakları; SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması; P: önem seviyesi

Çizelge 4.21. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait bombesin hormonu(15.dakika) ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (pg/mg protein)

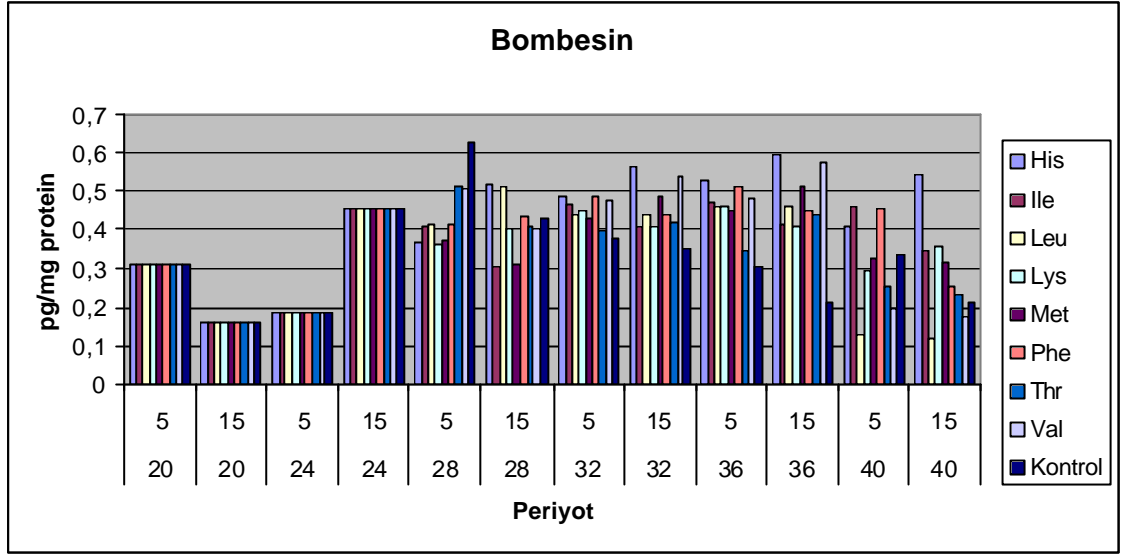
| Muamele Gruplari | Periyot | | | | |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 0.52±0.009 | 0.56±0.007 | 0.59±0.002 | 0.54±0.004 | 0.55±0.01 ^f |
| Isolösin | 0.30±0.01 | 0.40±0.003 | 0.41±0.01 | 0.34±0.01 | 0.36±0.01 ^b |
| Lösin | 0.51±0.004 | 0.44±0.03 | 0.46±0.01 | 0.12±0.006 | 0.38±0.04 ^{b^c} |
| Lisin | 0.40±0.008 | 0.40±0.006 | 0.41±0.005 | 0.35±0.01 | 0.39±0.006 ^{cd} |
| Metiyonin | 0.31±0.006 | 0.48±0.01 | 0.51±0.01 | 0.31±0.008 | 0.40±0.02 ^{de} |
| Fenilalanin | 0.43±0.003 | 0.43±0.006 | 0.44±0.008 | 0.25±0.008 | 0.39±0.02 ^{cd} |
| Treonin | 0.41±0.004 | 0.42±0.007 | 0.43±0.008 | 0.22±0.008 | 0.37±0.02 ^{bc} |
| Valin | 0.40±0.009 | 0.53±0.008 | 0.57±0.02 | 0.17±0.006 | 0.42±0.04 ^c |
| Kontrol | 0.42±0.004 | 0.34±0.004 | 0.21±0.004 | 0.21±0.009 | 0.30±0.02 ^a |
| P_{ort} | 0.41±0.01 ^b | 0.44±0.01 ^c | 0.45±0.02 ^c | 0.28±0.02 ^a | |

Aynı satir ve sütunlarda farklı harflerin kullanıldığı degerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05). M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar.

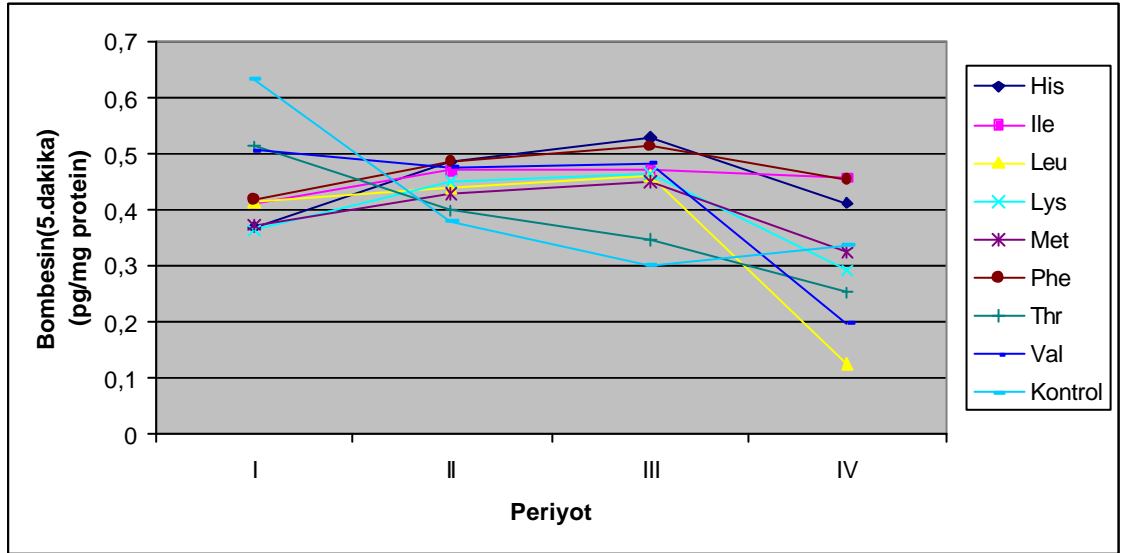
Çizelge 4.22. Bombesin hormonuna(15.dakika) ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|-----------------|-----------|--------|
| Denekler arası | 26 | 0.444769 | | |
| Muamele | 8 | 0.435 | 0.05438 | 0.000* |
| Hata 1 | 18 | 0.009769 | 0.0005427 | |
| Denekler içi | 81 | 1.01075 | | |
| Periyot | 3 | 0.510 | 0.170 | 0.000* |
| Muameleperiyot | 24 | 0.481 | 0.02006 | 0.000* |
| Hata 2 | 54 | 0.01975 | 0.0003657 | |
| Genel | 107 | 1.455519 | | |

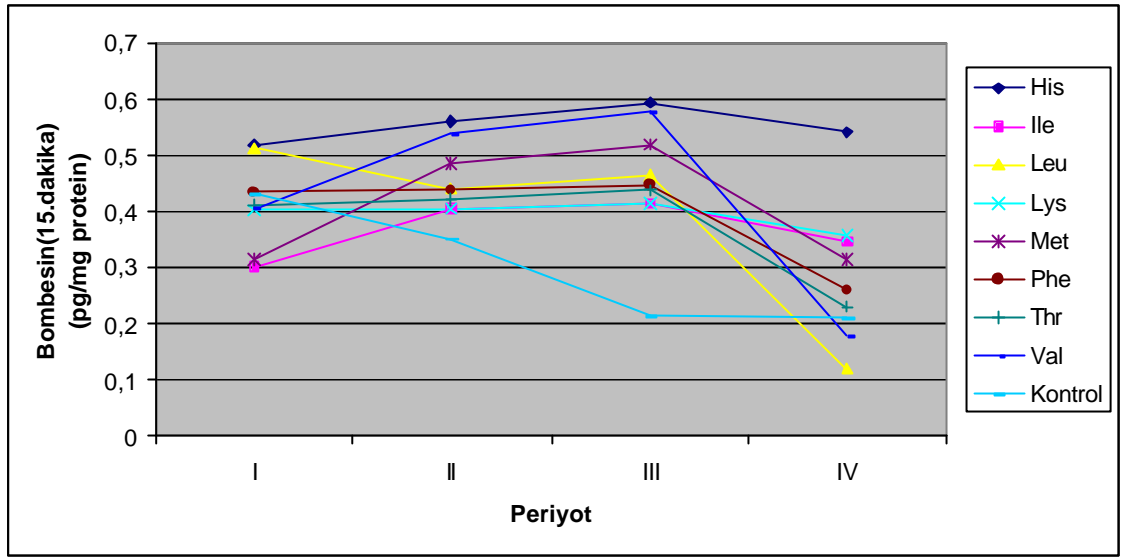
*P<0.05; VK: varyasyon kaynakları; SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması; P: önem seviyesi



Sekil 4.18. Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia metanaupli*'leri ile beslenen çipura larvalarının 20.-40. günler arasındaki bombesin hormonundaki değişimler (Besleme sonrası 5. ve 15. dakikalarda yapılan örneklemelerden elde edilen sonuçlar).



Sekil 4.19. Muamele gruplarında bombesin(5.dakika) hormonunun periyotlara bağlı değişimi



Sekil 4.20. Muamele gruplarında bombesin(15.dakika) hormonunun periyotlara bağlı değişim

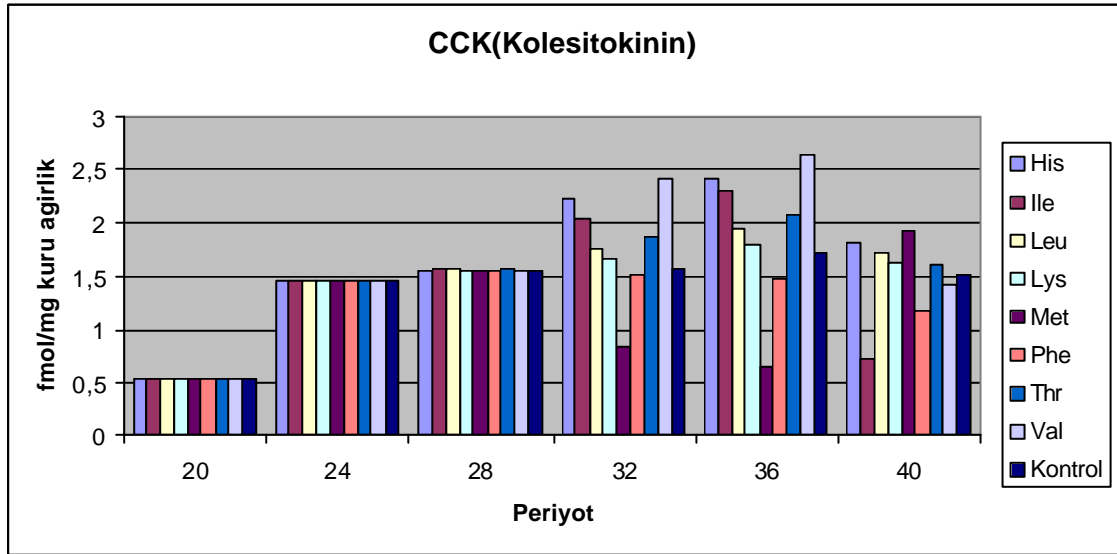
Aminoasitlerin, pankreatik enzimlerin salgısını kontrol eden somatostatin (CHEY, 1993) veya bombesin (KOLKOVSKI ve TANDLER, 1995a) gibi hormonal faktörlerin salinimini teşvik ettiği bildirilmiştir.

KOLKOVSKI ve ark. (1997a), yaptıkları çalışmada, mikro partikül yemlerin ve canlı yemlerin bombesin hormonu üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Sadece canlı yemle beslenen grupta, yalnızca mikro partikül yemle beslenen gruba göre %300 daha fazla bombesin hormonunun tespit edildiği, fakat burada kullanılan canlı yemdeki tetikleyici faktörün hala belirsiz olduğunu bildirmişlerdir.

Elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, hem 5. dakikada hem de 15. dakikada II. ve III. periyotlar için serbest aminoasit gruplarının üstünlüğü gözlenmiştir. 5.dakikada IV. periyotta sadece histidin, isoleüsin ve fenilalanin grupları kontrol grubuna göre üstünlük sergilerken, 15. dakikada tüm serbest aminoasit besleme gruplarının kontrol grubuna göre üstünlüğü tespit edilmiştir. Muamele gruplarının ortalamaları açısından durum, 15. dakikada elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir. Sonuç olarak, serbest aminoasitlerin çipura larvalarında hormonal aktiviteyi tetiklediğini söyleyebiliriz. KOLKOVSKI ve TANDLER (1995a) tarafından belirtildiği gibi serbest aminoasitlerin bombesin aktivitesini teşvik ettiği, çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

4.5.2.Kolesistokinin (CCK) Hormon Analizi

Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 20.-40. günler arasındaki CCK sindirim hormonu değişimleri Şekil 4.21'de verilmiştir. Çipura larvalarının deneme boyunca gözlenen CCK hormonu ortalama değerleri Çizelge 4.23'de, bu ortalamalara ait varyans analiz tabloları ise Çizelge 4.24'de verilmiştir. Çipura larvalarının CCK hormon değerleri üzerinde, muamele grupları ve periyotlara ilaveten bu iki faktörün birlikte etkisinin de önemli olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$). II. ve III. periyotlarda en yüksek CCK aktivitesi valin grubunda gözlenirken (sirasıyla 2.41 ± 0.009 ve 2.64 ± 0.39), IV. periyotta metiyonin grubu (1.92 ± 0.14) diğer besleme gruplarına göre daha yüksek bir aktivite sergilemiştir. II. ve III. grupta metiyonin ve fenilalanin, IV. grupta izolösin, fenilalanin ve valin grupları dışında kalan besleme grupları kontrol grubuna göre daha iyi bir CCK tetiklemesi yapmıştır. Muamele gruplarının ortalamaları açısından durum değerlendirildiğinde ise metiyonin ve fenilalanin dışındaki besleme gruplarının kontrol grubuna göre daha iyi bir CCK cevabı verdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.21. Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarının 20.-40. günler arasındaki CCK hormonundaki değişimler.

Çizelge 4.23. Farkli aminoasitler ile zenginlestirilmis *Artemia* metanaupli'leri ile beslenen çipura larvalarinin periyotlara ve muamele gruplarına ait CCK hormonu ortalama degerleri (ortalama±standart hata) (fmol/mg kuru agirlik)

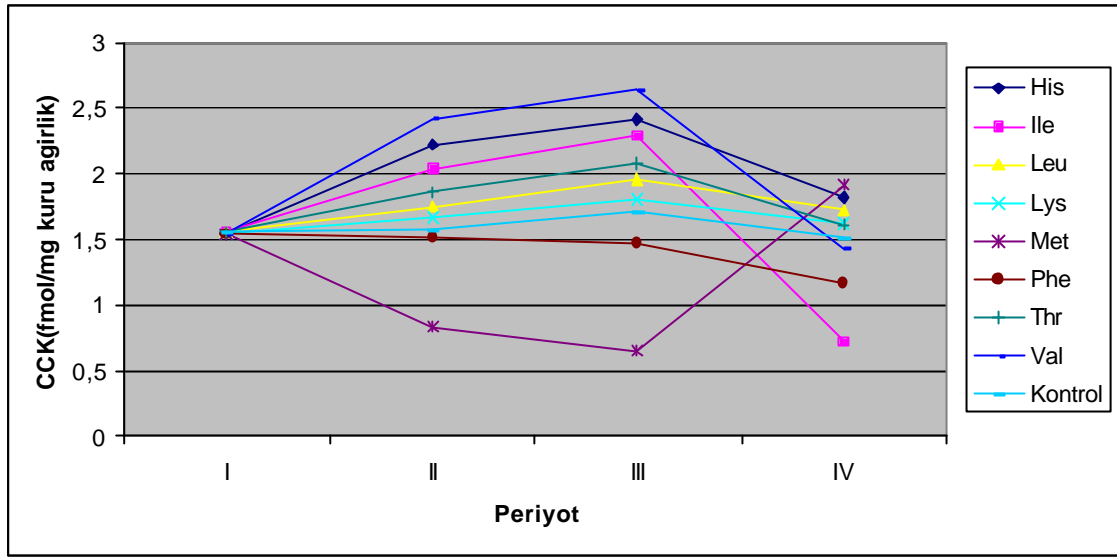
| Muamele Gruplari | Periyot | | | | |
|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | I | II | III | IV | M _{ort} |
| Histidin | 1.53±0.006 | 2.22±0.004 | 2.41±0.09 | 1.82±0.03 | 2.00±0.10 ^c |
| Isolösin | 1.55±0.007 | 2.04±0.009 | 2.29±0.04 | 0.72±0.15 | 1.65±0.18 ^d |
| Lösin | 1.55±0.004 | 1.74±0.007 | 1.95±0.11 | 1.72±0.07 | 1.74±0.05 ^d |
| Lisin | 1.54±0.01 | 1.67±0.007 | 1.80±0.30 | 1.62±0.23 | 1.66±0.08 ^c |
| Metiyonin | 1.54±0.004 | 0.83±0.02 | 0.65±0.15 | 1.92±0.14 | 1.24±0.16 ^a |
| Fenilalanin | 1.54±0.01 | 1.51±0.004 | 1.47±0.02 | 1.17±0.03 | 1.42±0.04 ^b |
| Treonin | 1.55±0.01 | 1.86±0.01 | 2.07±0.07 | 1.61±0.16 | 1.77±0.07 ^d |
| Valin | 1.54±0.01 | 2.41±0.009 | 2.64±0.39 | 1.43±0.06 | 2.00±0.18 ^c |
| Kontrol | 1.55±0.02 | 1.56±0.01 | 1.70±0.15 | 1.51±0.13 | 1.58±0.05 ^c |
| P_{ort} | 1.54±0.003 ^a | 1.76±0.08 ^b | 1.89±0.12 ^b | 1.50±0.07 ^a | |

Aynı satir ve sütunlarda farklı harflerin kullanıldığı degerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.05). M_{ort}: Muamele gruplarına ait ortalamalar, P_{ort}: Periyotlara ait ortalamalar.

Çizelge 4.24. CCK hormonuna ait varyans analiz tablosu

| VK | SD | KT | KO | P |
|-----------------------|------------|---------------|---------|--------|
| Denekler arası | 26 | 6.245 | | |
| Muamele | 8 | 5.907 | 0.738 | 0.000* |
| Hata 1 | 18 | 0.338 | 0.01878 | |
| Denekler içi | 81 | 16.05 | | |
| Periyot | 3 | 2.702 | 0.901 | 0.000* |
| Muameleperiyot | 24 | 10.771 | 0.449 | 0.000* |
| Hata 2 | 54 | 2.577 | 0.04771 | |
| Genel | 107 | 22.295 | | |

*P<0.05; VK: varyasyon kaynakları; SD: serbestlik derecesi; KT:kareler toplamı; KO:kareler ortalaması; P: önem seviyesi



Sekil 4.22. Muamele gruplarında CCK hormonunun periyotlara bağlı değişimi

CCK hormonunun vertebratlar da sindirim esnasında tripsin gibi pankreatik enzimler ve safranin saliniminin düzenlenmesinde anahtar bir rolü olmasından dolayı oldukça önemlidir (BENTHLEY, 1998). Tripsin diğer proteolitik enzimleri aktive ettiği için sindirim işlemlerinde anahtar bir enzim olarak hizmet ettiği bildirilmiştir (LIDDLE, 1995). Larval aşamada tripsin en önemli proteolitik sindirim enzimidir ve genelde çıkıştan sonra tespit edilmiştir (HJELMELAND ve ark., 1984; PEDERSEN ve ark., 1987; UEBERSCHAR, 1988).

LIDDLE (2000), CCK'ya yönelik balık larvalarında yapılan çalışmalar hala yetersizdir. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda CCK'nin en popüler stimulantinin di-tri peptidleri ihtiva eden proteinler ve kısmen sindirime uğramış yağ ürünleri olduğu bildirmiştir. Bilhassa, triptofan ve fenilalanin'in CCK salgısını stimüle etmek için potansiyel ürünler olduğu tespit edilmiştir.

CHEY (1993), serbest aminoasitlerin pankreatik enzimlerin salgılanmasını kontrol eden somatostatin ve kolesistokin gibi hormonal faktörlerin salinimini tetiklediğini bildirmiştir.

KOVEN ve ark. (2002), ringa balıkları üzerinde yaptıkları çalışmada çözülebilir proteinin, serbest aminoasitlerden daha hızlı ve daha büyük miktarda CCK tetiklediğini (tüm vücut homojenatında) bildirmişlerdir. Buna ilaveten tripsin aktivitelerinin de proteinle beslenen larvalarda arttığını, buna karşılık serbest aminoasitlerle beslenen larvalarda bir değişim gözlenmediğini belirtmişlerdir. CAHU ve

ZAMBONINO INFANTE (1995), deniz levrekleri (*Dicentrarchus labrax*) üzerinde yaptıkları çalışmada, protein hidrolisati (kazein)'nin tripsin aktivitesini indirgediği tespit etmişler, buna karşılık serbest aminoasitlerin bir karışımı ile beslenen larvalarda tripsin aktivitesinde bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, sindirim kanalı doluluğunun CCK salgılamasında etkili olmadığını bildirmişlerdir.

CCK'nin sindirim enzimlerinin tetiklenmesinde, bilhassa tripsin gibi sindirim enzimlerinin aktive edilmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (HOLST ve SCHMIDT, 1994; LIDDLE, 1995).

I. periyottan III. periyoda kadar metiyonin ve fenilalanin grupları dışında serbest aminoasit grupları ile beslenen gruplarda gözlenen CCK aktivitesindeki artışlar, serbest aminoasitlerin CCK'yi tetiklediği görüşünü desteklemektedir (CHEY, 1993). CCK'nin serbest aminoasitlerle zenginleştirilmiş besleme grupları ile beslenmesinden meydana gelen değişimlerin, tripsin gibi anahtar role sahip enzimlerin aktivitesinin değişiminde etkili olabileceği dikkate alınmalıdır. Bunun yanı sıra, CCK'da meydana gelen değişimlerin bir bütün olarak pankreatik enzimlerin tümünde etkili olabileceği gözden kaçırılmamalıdır. Bu çalışma esnasında CCK her ne kadar II. ve III. periyotlarda metiyonin ve fenilalanin, IV. periyotta isoleüsin, fenilalanin ve valin grupları dışındaki serbest aminoasit gruplarında kontrol grubuna göre yüksek aktivite göstermiş olsa bile tripsin aktivitesinde bu değişimlerin görülmemesinin nedenini tripsin'i larvalarda kontrol eden besinsel kontrol mekanizmasının III. periyottan sonra aktif olmasına bağlayabiliriz. Tripsin aktivitesinde IV. periyotta gözlenen yükselmeleri, besinsel kontrol mekanizmasının III. periyottan sonra aktif olmasına ve CCK'nin tripsin aktivitesini tetiklemiş olmasından kaynaklandığını söyleyebiliriz. Serbest aminoasitlerin CCK hormonu üzerindeki etkileri konusunda elde edilen gözlemler çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Deniz balıkları larvalarının sindirim enzimleri üzerine yapılan çalışmalarda genelde iki görüşün hakim olduğu bilinmektedir. Birinci grup araştırmacılar, larvaların yumurtadan çıkıştan itibaren yetersiz bir sindirim aktivitesine sahip olduğunu ve bu nedenle mikro yemleri sindirmede sorun yaşadıklarını, diğer grup araştırmacılar ise larvaların enzim aktivitesine sahip olduğunu ve bu aktiviteyi de aldıkları besine göre ayarlayabildiklerini bildirmişlerdir. Larvaların enzim içeriklerinin larval dönemde düşük ya da az gelişmiş olduğunu savunan araştırmacılar mikro partikül yemlerin kullanılması durumunda elde edilen düşük gelişme ve yaşama oranını, larvalardaki yetersiz enzim ve sindirim sistemine bağlarken, diğer grup araştırmacılar düşük gelişme ve yaşama oranının besleme çalışmalarında kullanılan yemlerin yetersiz bir besin içeriğine sahip olmasından, larvaların besin ihtiyaçlarının tam olarak bilinmemesinden dolayı gerekli yem içeriğinin oluşturulamamasından kaynaklandığını bildirmektedirler.

Pankreatik enzimlerden amilaz aktivitesinin genelde larvaların beslenmesinde kullanılan yemin karbonhidrat seviyelerine göre ayarlanabildiği, diğer taraftan bu enzimin daha çok genetik olarak programlandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan canlı yemlerin karbonhidrat seviyeleri arasında bir farklılık olmadığı belirtilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda amilaz enzim aktivitesinin genetik olarak programlanmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Her ne kadar amilaz aktivitesi çalışmada kullanılan canlı yemlerin besin içeriğinden bağımsız olarak genetik olarak programlanmış olsa da, IV. periyotta serbest aminoasit besleme gruplarında gözlenen üstünlük, bu besleme gruplarının kontrol grubuna göre daha iyi bir sindirim kanalı oluşturmasını engellememiştir. Amilaz aktivitesinde gözlenen bu değişimler, sindirim kanalının olgunlaşmasında indikatör olarak kabul edilen aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranları ile desteklenmiştir.

Çalışmamızda lösin-alanin peptidaz aktiviteleri üzerine elde edilen sonuçlar, ilk üç hafta bu enzimin aktivitesinin yüksek olduğu, daha sonra I. periyot'a doğru bir azalma olduğu şeklindedir. II. ve III. periyotlar için durum değerlendirildiğinde, larvanın gereksinimlere tam olarak cevap veremeyen yemlerle yapılan beslemenin larvanın sindirim özelliklerinin korunmasına neden olduğu ve buna bağlı olarak enterosist farklılaşmasını engellediği düşünülebilir. Diğer taraftan, gözlenen bu yüksek

aktivitenin, tripsin'in diğer proteazları aktive eden anahtar bir enzim olmasına ve bu enzimin besinsel kontrol mekanizmasının III. periyottan sonra aktif olmasından kaynaklandığını söyleyebiliriz. Araştırmacılar, lösin-alanin peptidaz aktivitesinin tek basına sindirim kanalının durumu hakkında aydınlatıcı bilgi vermediğini, aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranı ile daha doğru sonuçlar elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Sindirim kanalının gelişiminin göstergesi olarak bilinen aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranları II. ve III. periyotlarda kontrol grubunda iyi bir sindirim kanalı gelişimi gözlemlendiğini işaret ederken, IV. periyotta ise durumun özellikle lösin, fenilalanin, izolösin, lisin ve valin besleme grupları lehinde geliştiğini göstermiştir. Bu indikatör sonuçları muamele gruplarının ortalamaları açısından değerlendirildiğinde, en iyi sindirim kanalı gelişiminin olduğu grubun kontrol grubu olduğu gözlemlenmiştir. Tripsin'in besinsel kontrol mekanizmasının geç tesekkül etmesi sonucunda, her ne kadar IV. periyotta lösin-alanin peptidaz aktiviteleri serbest aminoasit besleme gruplarında kontrol grubuna göre düşük bulunmuş olsa da, durum genel olarak değerlendirildiğinde serbest aminoasit besleme gruplarının çipura larvalarında lösin-alanin peptidaz aktivitesini III. periyoda kadar tetiklediğini açıkça ortaya koymuştur. III. periyotta proteazları aktive eden tripsin'in besinsel kontrol mekanizmasının aktif olması sonucunda serbest aminoasit gruplarının sindirim kanalının gelişimi yönündeki olumlu etkileri ortaya çıkmış olmasına rağmen, bu durum ilk üç periyottaki serbest aminoasitlerin aktif rol alamamış olmasından dolayı etkisini tam olarak gösterememiştir.

Aminopeptidaz N ve alkalın fosfataz enzimleri besinsel durumun göstergesi olarak bilinmektedirler. Her ne kadar bu enzimlerin yüksek olması sindirim kanalının gelişmişliği konusunda bizi bilgilendirmiş olsa da, çalışmamızda elde edilen sitozolik enzim grubundan lösin-alanin peptidazlarla birlikte değerlendirilmesi, enterosistlerin olgunlaşması konusunda daha doğru sonuçlara ulaşmamızı sağlayacaktır. Aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranının muamele grup ortalamaları en yüksek değerini kontrol grubunda olduğunu göstermektedir. IV. periyotta fenilalanin ve lösin gruplarının kontrol grubuna göre üstünlükleri sindirim kanalının indikatörü olarak kabul edilen değerler tarafından desteklenmiştir. Buna karşılık, muamele gruplarının ortalama değerleri bakımından lisin, metiyonon ve fenilalanin grupları kontrol grubuna göre yüksek aktivite sergilemiş olsalar da aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz değerleri bu

durumu desteklememektedir. Diğer taraftan, aminopeptidaz N aktivitesi bakımından besleme gruplarının çok yüksek aktivite sergileyememelerini, bu peptidazların aktivasyonunda anahtar bir rol oynayan tripsin'in besinsel kontrol mekanizmasının geç meydana gelmesine bağlayabiliriz. Alkalın fosfataz açısından durum değerlendirildiğinde, bu enzim aktivitesinin fosfolipitler ve fosfoproteinler gibi fosforlu substratlar tarafından tetiklendiği bilinmektedir. Muamele grupları arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmemesini çalışmada kullanılan canlı yem *Artemia* metanaupli'nin fosfor içeriklerinin benzer olmasından kaynaklandığını söyleyebiliriz.

En önemli sindirim hormonları olarak bilinen kolesistokinin(CCK) ve bombesin(GRP)'in serbest aminoasit besleme grupları tarafından tetiklendiği tespit edilmiştir. CCK'nin tripsin aktivitesine olan etkisi, tripsin'in besinsel kontrol mekanizmasının geç meydana gelmesinden dolayı ancak III. periyottan sonra gözlenmiştir.

Bu çalışma, çipura larvalarında, normal üretim prosedürlerinde kullanılan canlı yemlerin farklı esansiyel aminoasitlerle zenginleştirilmesi sonucunda sindirim enzimleri ve hormon aktivitelerinin ne şekilde değiştiğini, mikro yemlerdeki sınırlayıcı faktörler olmadan açıkça ortaya koymuştur. Bu nedenle çalışma verileri ışığında, canlı yemlerin azaltılması hedeflenerek yapılması düşünülen mikro yem çalışmalarında aşağıda verilen konulara dikkat edilmesi, akuakültür endüstrisi için zorunluluk haline gelen bu sürecin kısaltılmasında önemli rol oynayacaktır.

1-Çalışmada, proteazların aktivasyonunda anahtar bir rol alan tripsin enzim aktivitesinin çok geç dönemlerde aktif hale geldiği gözlenmiştir. Bu aktivitenin farklı moleküler ağırlıklara sahip protein kaynakları ile daha erken bir döneme çekilip çekilemeyeceğinin belirlenmesine yönelik çalışmaların yürütülmesi,

2-Bu protein kaynaklarının, larvanın sindirim enzimlerinin gelişimine etkisinin olup olmadığına yönelik laboratuvar çalışmalarının yapılması,

3-Uygun protein kaynaklarının bulunması durumunda, bu kaynakların çalışmamız sonuçlarında verilen bombesin ve kolesistokinin gibi hormonal aktiviteleri tetikleyen serbest aminoasitleri de ihtiva eden mikro kapsüller ile besleme çalışmalarının yapılması

4-Mikro kapsül çalışmalarında enzimsel gelişimlerin sürekli takip edilmesi, sindirim kanalının gelişiminin göstergesi olarak çalışmamızda da teyit edildiği gibi, aminopeptidaz N/lösin-alanin peptidaz oranlarının kullanılması,

5-Çipura larvalarının kritik dönemleri olarak bilinen 0-40. günlerdeki besin gereksinimleri üzerine çalışmaların artırılması,

6-Simdiye kadar yürütölen mikro kapsül çalışmalarında olduğu gibi, tek bir mikro kapsülden uzun süreli randıman beklenmemelidir. Larvanın gereksinimlerinin larval dönem boyunca değistiği göz önünde bulundurularak, her besleme dönemi için larvanın gereksinimlerini karşılayacak mikro kapsüller ile besleme çalışmalarının yürütölmesi,

KAYNAKLAR

- ADMIRAL,W.,PELETIER,H., LAANE,R.W.P.M.,1986. Nitrogen metabolism of marine planctonic diatoms;excretion,assimilation and cellular pools of free amino acids in seven species with different cell size.**J.Exp.Mar.Biol.Ecol.**,98:241-263.
- ALARCON,F.J., MOYANO,F.J., DIAZ,M., FERNANDEZDIAZ,C., YUFERA,M., 1999. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques. **Aquaculture Nutrition**,5:107-113.
- ALLESIO,G.,1975. Riproduzione artificiale di orata. *Sparus aurata*. 5. Primisultai sull allevamento ad alimentazione delle larve avanzate. **Boll.Pesca Piscic.Idrobiol.**,30(1):71-92.
- ALLIOT,E.,1979. Enzymologie digestive. **III. Evolution de quelques activites digestives au cours du developement larvaire des teleosteens**. In: Fontaine, M.(Ed.), Nutrition des Poissons. Actes de Colloques, Cnerma, Paris, 79-87.
- ALPAZ,A.G.,1996. Deniz Balıkları Yetiştiriciliği. **Ege Üniv.Su Ürünleri Fak. Yayınları**, Yayın No:20,335s, Izmir.
- ALTAN,Ö.,1998. The Course of Master International Programme, Session of Larvae Culture, Imprinted notes, September 1997-April 1998. The Ins. of Grand Canary of Spain.
- ANONYMOUS, 2004. **FAO, Annual Report**: Fisheries Statistics.
- AOAC,1995. Hidroliz Yöntemi. Phenomex EZ Faast GC-FID Hidrolized Aminoacid Analysis Kit.
- BARNABE,G.,RENE,F.,1973. Reproduction contrôlée et production d'alevins chez la DAURADE *Sparus aurata*. **C.R.Acad.Sc.**,27 :1621-1623.
- BARNABE,G.,1983. Utilisation de plancton collecté pour l'élevage de masses de poissons marins. G.Barnabe et R.Billard, L'aquaculture du Bar et des *Sparides*, **INRA Publ.**,185-207pp,Paris.
- BECCARIA,C.,DIAZ,J.P.,CONNES,R.,CHATAIN,B.,1991. Organogenesis of the exocrine pancreas in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared extensively and intensively. **Aquaculture**,99:339-354.
- BENTLEY, P.J., 1998. Comparative Vertebrate Endocrinology. 3rd edn. **Cambridge Univ. Press**, UK, 526 pp.
- BESSEY, O.A., LOWRY, O.H., BROCK, M.J., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimetres of serum. *J. Biol. Chem.* 164:321-329.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *ANAL. BIOCHEM.* 72, 248-254.
- BUCHET,V.,ZAMBONINO INFANTE,J.L.,CAHU,C.L.,2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. **Aquaculture**,184:339-347.
- CAHU,C.L., ZAMBONINO INFANTE,J.,1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. **Comp.Biochem.Physiol.**,109A(2):213-222.

- CAHU, C. L., ZAMBONINO INFANTE, J. L., 1995a. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. **Fish Physiol Biochem** 14: 209-214
- CAHU, C. L., ZAMBONINO INFANTE, J. L. 1995b. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. **Fish Physiol Biochem**,14: 431-437.
- CAHU,C.L.,ZAMBONINO INFANTE,J.,1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? **Aquaculture International**,5:151-160.
- CAHU,C.L., ZAMBONINO INFANTE,J.,PERES,A.,QUAZUGUEL,MM.,LE GALL,M.M., 1998. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing:effect on digestive enzymes. *Aquaculture*,161:479-489.
- CAHU,C.L.,ZAMBONINO INFANTE,J.L.,QUAZUGUEL,P., LE GASS .M.M., 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass(*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Aquaculture**,171:109-119.
- CAHU,C.L.,ZAMBONINO INFANTE, J.,2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae.**Aquaculture**,200:161-180.
- CHAN,C.B.,HALE,E.,1992. Effect of somatostatin on intragastric pressure and smooth muscle contractility of the rainbow trout.**Fish Biol.**,40:545-556.
- CHATAIN,B.,1991.Current status of the French intensive rearing techniques for sea bass(*D.labrax*) and seabream (*Sparus aurata*) research for aquaculture:Fundamental and applied aspects.**International congress** Antibes-Jeanles Pins.
- CHEY,W.Y.,1993.Hormonal control of pancreatic exocrine secretion. In the pancreas: Biology, Pathobiology and Disease. In:Go,V.L.W., Gardner,j.d., Brooks, F.P., Lebenthal,E., DiMagno, E.P., Sheele, G.A.(Eds), **The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease**,2 nd edn.Raven Pres,New york, 403-424.
- ÇELIKKALE,M.S., DDÜZGÜNES,E., OKUMUS,I., 1999a. Türkiye Su Ürünleri Sektörü,Potansiyeli, Mevcut Durumu ve Çözüm Önerileri.**Istanbul Ticaret Odasi**,1999-2, 414s.
- ÇELIKKALE,M.S., DÜZGÜNES,E., OKUMUS,I., 1999b. Türkiye Su Ürünleri Sektörü ve Avrupa Birliği ile Entegrasyonu.**Istanbul Ticaret Odasi**,1999-63:533s.
- CORNEILLIE,S.,OLLEVIER,F.,CARRASCOSA,M.,PELLI,F.,RENDON,A.,1989. Reduction of the use of *Artemia nauplii* by early feeding of seabream larvae(*Sparus aurata*) with dry food.**Aquaculture Europe** 89,10:73-74.
- COUSIN,J.C.B.,BAUDIN-LAURENCIN,F.,GABAUDAN,J.,1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot,*Scophthalmus maximus*. **J.Fish Biol.**,30:15-33.
- DABROWSKI, K.,1984. The feeding of fish larvae: present state of the art and perspectives.**Reprod.Nutr.Dev.**,24:807-833.
- DANIEL,W.W.,1995. Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences. **John Wiley&Sons,Inc.**,780 p., Singapore.
- DEMIRSOY,A., 1997.Yasamin Temel Kurallari.Omurgalilar. Cilt III/Kisim I.**Meteksan Basimevi**,310s.

- DENİZ,H,1996.Beymelek Su Ürünleri Üretim ve Gelistirme Merkezinde Yetistirilen Çipura(*Sparus aurata*, L.,1758) ve Levrek(*Dicentrarchus labrax* L.,1758) Balıklarının Larval Dönemdeki Gelismelerinin Karsilastirmali Olarak Incelenmesi.Dok.Tez.107s,Ankara.
- DE SILVA,S.S., ANDERSON,T.A., 1998. Fish Nutrition in Aquaculture.,**Chapman and Hall**,319S.,Sulfolk.
- FERNANDEZ-DIAZ,C.,YUFERA,M.,1995. Capacity of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae break down dietary microcapsules.Aquaculture,134:269-278.
- FERNANDEZ, P.H., IZQUIERDO, M.S.,ROBANIA,L., VALANCIA,A., SALHI,M., VERGARA,J., 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**,132:325-337.
- FINN, R.N., 1994. Physiological energetics of developing marine fish embryos and larvae. Phd. Thesis, **University of Bergen**, Norway.
- FISCHER,W.,SCHNEIDER,M.,BAUCHOT,M.L., 1987. Mediterranee et mer noire zone de peche 37. Volume II(Vertebres).**FAO**.Roma,Italy.
- GAMSIZ,K.,2002. Çipura baligi(*Sparus aurata* l.) larvalarının beslenmesinde zooplankton yerine mikrokapsül yem kullanımı üzerine araştırmalar.**Dok.Tez**.103s,Izmir.
- GILL, J.L.,1986. Repeat Measurement: Sensitive Tests for Experiments with Few Animals. **Journal of Animal Science**,63:943-954.
- GILL,J.L.,1988. Repeat Measurement: Split-Plot Trend Analysis Versus Analysis of First Differences.**Biometrics**,44:289-297.
- GRENDALL,J.H.,ROTHMAN,S.S.,1981.Digestive end products mobilize secretory proteins from subcellular stores in the pancreas.**Am.J.Physiol.**,241:G67-G73.
- GOVONI,J.,J.,BOEHLERT,G.W.,WATANABE,,Y.,1986. The physiology of digestion in fish larvae. **Environmental Biology of Fishes**.16:59-77.
- GÖRGÜLÜ,Ö., 2002.**Tekrar Eden Ölçümlü Deneme Desenleri**. Mustafa Kemal Üniveristesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 150 sayfa, Hatay.
- HENNING,S.J.,RUBIN,D.C.,SHULMAN,R.J.,1994. Ontogeny of the intestinal mucosa. In:Johnson,L.R.(Ed.) **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, 3 rd edition Raven Pres,New york,pp.571-610.
- HIJELMELAND,K.,HUSE,I.,JORGESSEN,T.,MALVIK,G.,RAA,J.,1984. Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua*) larvae. Marine Research Flodevigen Rapport,198-202.
- HOLMGREN, S., VAILLANT, C., DIMALINE, R., 1982. VIP-, substance P-, gastrin /CCK-, bombesin-, somatostatin-and glucagon-like immunoreactivities in the gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Cell Tissue Res.**,223 (1):141–153.
- HOLST,J.J.,SCHMIDT,P.,1994. Gut hormones and intestinal function. **Bailliere's Clin.Endocrinol.Metab.**,8(1):137-164.

- KAMISAKA, Y., KUROKAWA, T., SUZUKI, T., TAGAWA, M., TANAKA, M., TOTLAND, G., RØNNESTAD, I., 2001. Ontogeny of cholecystokinin-immunoreactive cells in the digestive tract of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 123:31–37.
- KISSIL, G.W., 1984. Overview: Rearing larval stages of marine fish on Artificial diets. **Israel Journal of Zoology**. 33:154-160.
- KOLKOVSKI, S., TANDLER, A., KISSIL, W.G., GERTLEZ, A., 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) larvae. **Fish Phys. and Biochem.**, 12(3):203-209.
- KOLKOVSKI, S., TANDLER, A., 1995a. Why microdiets are still inadequate as viable alternative to live zooplankters for developing marine fish larvae. **Larvi'95 Fish and Shellfish Symposium**, 24:265-266.
- KOLKOVSKI, S., 1995b. The mechanism of action of live food on utilization of microdiets in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Ph.D. Thesis. The Hebrew University, Jerusalem, 120 pp.
- KOLKOVSKI, KOWEN, W., A., TANDLER, A., 1997a. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilisation of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture**, 155:193-205.
- KOLKOVSKI, S., ARIELI, A., TANDLER, A., 1997b. Visual and Chemical cues stimuli microdiet ingestion in seabream larvae. **Aquaculture International**, 5:527-536.
- KOLKOVSKI, S., TANDLER, A., IZQUIERDO, M.S., 1997c. The Effect of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Aquaculture**, 148:313-322.
- KOLKOVSKI, S., 1999. Digestive enzymes in fish larvae juveniles-implications and applications to formulated diets. “**Advanced Bio-technology in Hatchery Production**” Workshop. Oceanic Institute, 37p, Hawaii.
- KOLKOVSKI, S., YACKEY, C., CZESNY, S., DABROWSKI, K., 2000. The effect of microdiet supplementation of dietary digestive enzymes and a hormone on growth and enzyme activity in yellow perch juveniles. **North American Journal of Aquaculture**, 62:130-134.
- KOWEN, W.M., KOLKOVSKI, S., TANDLER, A., KISSIL, G.W., SKLAN, D., 1993. The effect of dietary lecithin and exogenous lipases on fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. **Fish Physiol. Biochem.**, 10:357-364.
- KOVEN, W., KOLKOVSKI, S., HADAS, E., GAMSIZ, K.T.A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. **Aquaculture** 194, 107-121.
- KOVEN, W., ROJAS-GARCÍA, C. R., FINN, R. N., TANDLER, A., RØNNESTAD, I., 2002. The stimulatory effect of ingested protein and/or free amino acids on the secretion of the gastro-endocrine hormone, cholecystokinin (CCK) and the protease, trypsin, in first feeding herring larvae, *Clupea harengus*. **Marine Biology**. 140: 1241-1247.

- KUROKAWA, T., SUZUKI, T., ANDOH, T., 2000. Development of cholecystokinin and pancreatic polypeptide endocrine systems during the larval stage of Japanese flounder, *Paralichthys oli Ö aceus*. **Gen. Comp.Endocrinol.**, 120 (1):8–16.
- LAUFF,M.,HOFER,R.,1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes,**Aquaculture**,37:335-346.
- LE VAY L.,RODRIGUEZ,A.,KAMARUDIN,M.S., JONES,D.A.,1993. Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicus* larvae. **Aquaculture**,118:287-297.
- LIDDLE, R. A., 1995. Regulation of cholecystokinin secretion by intraluminal releasing factors. *Am. J. Physiol.*269 (Gastrointest. Liver Physiol 32): G319-G327
- LIDDLE, R. A., 2000. Regulation of cholecystokinin secretion in humans. **J. Gastroenterol.**,35: 181-187
- LUIZI, F.S., GARA, B., SHIELDS, R.J., BROMAGE, N.R., 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. **Aquaculture**, 176(1–2):101–116.
- MAROUX,S.,LOUVARD,D.,BARATTI,J.,1973.The aminopeptidase from hog intestinal brush border.**Biochim.Biophys.Acta**,321:282-295.
- MCCARTY,D.M.,MICHOLSON,J.A.,KIM,Y.S.,1980. Intestinal enzyme adaptation to normal diets of different composition. **Am.J.Physiol.**, 239: G445-G451.
- METAIS, P., BIETH, J., 1968. Determination de l'a-amylase par une microtechnique. **Ann. Biol. Clin.**, 26:133–142.
- MORRIS,P.,1997.Nutritional needs of bass and bream. **Fish Farmer International File**.11(6),28-31.
- MOYANOF.J., DIAZ, M., ALARCON, F.J., SARASQUETE, M.C., 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream *Sparus aurata*. **Fish Physiol.Biochem**,15:121-130.
- MUHTAROGLU,C.G., 1988. Çipura Baligi (*Sparus aurata*, L.) Yumurta ve Larvalarında Gelisim ve Larval Safhada Canli Besin Alimi. **Yüksek Lisans Tezi**.56s,Izmir.
- NAVARRO,J.C.,1998. Aspect of Larval Phsiology and Larval Nutrition, **Mediterranean Aquaculture New Tecniques For Marine Hatcheries**.23 Feb-06 Mar. Macaroon,Spain.
- NICHOLSON, J.A., KIM, Y.S., 1975. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. **Anal. Biochem** 63, 110–117.
- NOLTING,B.M.,UEBERSCHAR,B.,ROSENTHAL,H.,1999. Trypsin activity and physiological aspects in larval rearing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using live prey and compound diets.**J.Appl.Ichthyol.**,15:138-142.
- OWYANG, C., 1994. Negative feedback-control of exocrine pancreatic-secretion - role of cholecystokinin and cholinergic pathway. **J. Nutr.**, 124:S1321-S1326
- ÖKSÜZ,I.,1996. Farkli fitoplanktonlarla beslenen rotiferlerin çipura(*Sparus aurata*) larvalarının yasama oranına etkisi.Yük.Lis.Tez.,35s,Istanbul.

- PATHAK,R.M.,DUDEJA,P.K.,ANSARI,S.,MAHMOOD,A.,1982. Alterations in intestinal functions in response to thyroxine cortisone administration in undernourished rats. **Ann.Nutr.Metab.**,26:331-336.
- PEDERSEN,B.H.,NILSSEN,E.M.,HIJELMELAND,K.,1987. Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii.Mar.Biol.,94:171-181.
- PERES,A.,CAHU,C.L.,ZAMBONINO INFANTE,J.L., LE GALL,M.M.,QUAZUGUEL,P.,1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass(*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, 15(3):237-242.
- PERES,A.,ZAMBONINO INFANTE,J.L.,CAHU,C.L.,1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae.**Fish Physiol.Biochem.**,19:145-152.
- PERSON LE RUYET,J.,1989. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets:constraints and perspectives. **Aquacop Ifremer,Actes de Collague**,9:625-642.
- PERSON-LE RUYET,J.,ALEXANDRE,J.C.,THEBAUND,L.,MUGNIER,C., 1993. Marine fish larvae feeding:Formulated diets or live prey? **Journal of the world aquaculture Society**, 24(2):211-224.
- PILLAY,T.V.R., 1995. Sea basses and Seabreams in Aquaculture.Principles and Pratices, **WriteTypesrtters Ltd**, Honkong, 398-407.
- PINOSA,M.,VOLPELLI,L.A.,BERACOO,P.,TULLI,F.,1995. Growth, survival and body composition of *Sparus aurata* larvae fed two artemis regimes and artificial diets containing different amounts of HUFA.**Larvi 95 fish and shellfish larvi culture symposium**.E.A.S. Special Publication, 24,Belgium.
- PLANAS,M.,FERNANDEZREIRIZ,M.J.,FERREIRO,M.J.,LABARTA,U.,1990.Effect of selected variables on the preparation of gelatine-acaia microcapsules for aquaculture. **Aquaculture Engineering**,9:329-341
- POLO,A.,YUFERA,M.,PASCUAL,E., 1990. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. **European Aquaculture Society Special Publication 1989**,10: 207-208.
- REINECKE, M., MULLER, C., SEGNER, H., 1997. An immunohistochemical analysis of the ontogeny, distribution and coexistence of 12 regulatory peptides and serotonin in endocrine cells and nerve fibers of the digestive tract of the turbot, *Scophthalmus maximus teleostei* . **Anat. Embryol.**, 195 (1):87–101.
- RIBEIRO,L.,ZAMBONINO INFANTE,J.L., CAHU,C.,DINISH,M.T., 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. **Aquaculture**,179:465-473.
- ROJAS-GARCIA,C.R.,RONNESTAD,I.,UEBERSCHAR,B.,2001. Combined sensitive analytical methods for cholecystokinin levels and tryptic activity in individual fish larvae.**Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**,265 :101-115.
- RONNESTAD, I., FYHN, H. J., 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. **Rev. Fish. Sci.** 1:239-259.

- RONNESTAD, I., ROBERTSON, R.R., FYHN, H.J., 1996. Free amino acids and protein content in pelagic and demersal eggs of tropical marine fishes. In: MacKinlay, D.D., Eldridge, M. Eds. , *The Fish Egg. American Fisheries Society, Physiology Section*, Bethesda, pp. 81–84.
- RONNESTAD, I., THORSEN, A., FINN, R.N., 1999. Fish larval nutrition: Recent advances in amino acid metabolism. *Aquaculture* 177, 201-216.
- RONNESTAD, I., PEREZ DOMINGUEZ, R., TANAKA, M., 2000a. Ontogeny of digestive tract functionality in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* studied by in vivo microinjection: pH and assimilation of free amino acids. *Fish Physiol. Biochem*, 22:225–235.
- RONNESTAD, I., CONCEICAO, L.E.C., ARAGAO, C., DINIS, M.T., 2000b. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole *Solea senegalensis* . *J. Nutr.*,130:2809–2812.
- ROSELUND,G.,STOSS,J.,TALBOT,C., 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture*,155:183-191.
- SERRANO,R.,ZANUY,S.,CARILLO,M., 1989. Determinacion de la caliad de hhuevos fertilizados de lubina (*Dicentrarchus labrax*) por medio de para metro bioquimicos.In:*Auacultura International*,229-235.
- SHEELLE,G.A.,1993. Regulation of pancreatic gene expression in response to hormones and nutritional substrates.In:Go,V.L.W., Gardner, J.D.,Brooks,F.P.,Lebenthal,E.,DiMagno,E.P.,Sheele,G.A.(Eds), **The Pancreas:Biological,Pathobiology and Disease**,2 nd edn.Raven Press,New york,pp.103-120.
- SORGELOOS,P.,DHERT,P.,CANDREVA,P.,2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* sp. in marine fish larviculture. *Aquaculture*,200:147-159.
- SPSS,1993.SPSS for Windows Base System User's Guide,release 8.0.2, Chicago, USA.
- SÜZER,C.,1998. Çipura (*Sparus aurata* L.) prelarvalarında aydinlatmanın vitellüs kesesi ve yağ damlacığı absorpsiyonuna, sindirim tüpüne ve boyca gelişimi ile yaşama yüzdesine etkisi. **Yük.Lis.Tez**,79s,Izmir.
- TANDLER,A.,KOLKOVSKIS.,1991. Rates of ingestion and digestibility as limiting factors ,n the succesful use of microdiets in *Sparus aurata* larval rearing. **Larvi'91.EAS Special Publication**,15:169-171.
- TANDLER,A.,KOLKOVSKIS.,1992. Rates of ingestion and digestibility as limiting factors in the succesful application of microdiets in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Isr.J. Aquaculture. Bamidgeh**, 44(4):128129.
- THORSEN, A., 1995. Oogenesis in marine bony fishes: physiological mechanisms of oocyte hydration and egg buoyancy. **PhD. Thesis**, University of Bergen, Bergen, Norway.
- TIMM,N.H.,1980. Multivariate Analysis of Variance of Repeated Measurements. P.R.Krishnaiah, ed., **Handbook of Statistics** (1):41-87p.North-Holland Publishing Company.
- TONHEIM,S.K.,KOVEN,W.,RONNESTAD,I.,2000. Enrichment of *Artemia* with free methionine.*Aquaculture*,190:223-235.

- TSENG, H.C., GRENDALL, J.H., ROTHMAN, S.S., 1982. Food, duodenal extracts, and enzyme secretion by the pancreas. **Am. J. Physiol.** 243, G304–G312.
- TUCKER, JR. J.W., 2000. Marine Fish Culture. **Kluwer Academic Publishers**, USA, 752s.
- WALFORD, J., LAM, T.J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass *Lates calcarifer* larvae and juveniles. **Aquaculture** 109:2, 187–205.
- SEGNER, H., STORCH, V., REINECKE, M., KLOAS, W., HANKE, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. **Mar. Biol.** 119, 471–486.
- UEBERSCHAR, B., 1988. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analysing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. **Meeresforschung** 32:144–154.
- UEBERSCHAR, B., PEDERSEN, B.H., HJELMELAND, K., 1992. Quantification of trypsin with radioimmunoassay in herring larvae (*Clupea harengus*) compared with a highly sensitive fluorescence technique to determine tryptic enzyme activity. **Mar. Biol.**, 113:469–473.
- VALETTE, P., MALOUIN, H., CORRING, T., SAVOIE, L., GUEUGNEAU, A.M., BEROT, S., 1992. Effects of diets containing casein and rapeseed on enzyme secretion from the exocrine pancreas in the pig. **Br. J. Nutr.**, 67:215–222.
- WALFORD, J., LAM, T.J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in sea bass *Lates calcarifer* larvae and juveniles. **Aquaculture**, 109:187–205.
- WATANABE, T., KITAJIMA, C., FUJITA, S., 1983. Nutritional values of live organism used in Japan for mass propagation of fish: a review. **Aquaculture**, 34:115–143.
- WATANABE, T., KATEUCHI, T., SAITO, M., NISHIMURA, K., 1984. Effect of low protein high calorie or essential fatty deficiency on reproduction of rainbow trout. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 51(9):1501–1509.
- YUFERA, M., FERNANDEZ-DIAZ, C., PASCUAL, E., 1995. Feeding rates of gilthead seabream, *Spurus auratu* L., larvae on microcapsules. **Aquaculture** 134:257–268.
- YUFERA, M., SARASQUETE, M.C., FERNANDEZ-DIAZ, C., 1996. Testing protein-walled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream (*Spans auratu* L.1 larvae. **Mar. Freshwater Res.**, 47:211–216.
- YUFERA, M., PASCUAL, E., FERNANDEZ-DIAZ, C., 1999. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. **Aquaculture**, 177:249–256.
- YUFERA, M., FERNANDEZ-DIAZ, C., PASCUAL, E., SARASQUETE, M.C., MOYANO, F.J., DIAZ, M., ALARCOM, F.J., GGARCIA-GALLEGO, M., PARA, G., 2000. Towards an inert diet for first feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. Larvae. **Aquaculture Nutrition**, 6:143–152.
- ZAMBONINO INFANTE, J., CAHU, C.L., 1994a. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Comp. Biochem. Physiol.** 109A(2):209–212.

ZAMBONINO INFANTE,J.,CAHU,C.L.,1994b. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiol.Biochem**,12:399-408.

ÖZGEÇMİS

1976 yılında Iskenderun da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Iskenderun da tamamladım. 1994 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümüne girerek, 1998 yılında buradan lisans diploması almaya hak kazandım.

2000 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalında Yüksek Lisans'a başladım. 2002 yılında bu programdan mezun oldum.

2001 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinin açmış olduğu "Araştırma Görevliliği" sınavını kazanarak göreve başladım. Halen bu görevimi sürdürmekteyim.

2003 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootehni Anabilim Dalında açılan Doktora programına girmeye hak kazandım.