

Araştırma Makalesi
Research Article**Balık Yemlerinde Kullanılan Farklı Protein Kaynaklarının Sibirya Mersini
(*Acipenser baerii* Brandt 1869) Jüvenillerinin Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkileri**Cemal ALPTEKİN¹ Kaya GÖKÇEK^{2*}¹İskenderun Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, 31200 İskenderun, Hatay, Türkiye²Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü 31000 Antakya, Hatay, Türkiye

*Sorumlu yazar tel: +90 534 415 07 16

Geliş Tarihi: 15.03.2016

E-posta: kayagokcek@yahoo.com

Kabul Tarihi: 10.05.2016

Öz

Bu çalışmada, Sibirya mersin balığı, *A. baerii*, pre-larvalarının kondisyon faktörü üzerine besleme protokolünün etkisi ve ticari karma yemlerde kullanılan farklı protein kaynaklarının jüvenillerin proteaz aktivitesi üzerine olası inhibisyon etkisi *in vitro* metotlar kullanılarak incelenmiştir. Canlı yemle besleme ve karma yeme geçiş dönemi, kondisyon faktörünü istatistiki olarak etkilemiştir ($p<0.05$). Çalışmada, proteaz aktivitesi üzerine en düşük inhibisyon değeri soya protein konsantresi (%14.45±1.58) ve balık unundan (15.34±3.85%) elde edilmiştir. En yüksek inhibisyon değerleri ise soya unu (%63.33±4.71) ve kan ununda (%66.67±8.02) ölçülmüştür. Balık unu ve soya unununun 1:1 kombinasyonunda ise, enzim aktivitesi nispeten daha yüksek miktarda etkilenmiştir (%31.85±10.50)($p<0.05$).

Anahtar Kelimeler: *A. baerii*, proteaz aktivitesi, protein kaynakları, inhibisyon etkisi.**Abstract****The Effects of Different Protein Sources on Protease Activity of Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt 1869) Juveniles**

In the present study, the effect of feeding regime on condition coefficients and the inhibitory effects of different protein sources on early life proteases of Siberian sturgeon juveniles were *in vitro* tested. Feeding with live prey and transition period to artificial feed significantly affected the condition coefficients ($p<0.05$). In the study, the minimum inhibitory effect were obtained from soybean protein concentration (14.45±1.58%) and fish meal (15.34±3.85%). Also, the highest inhibitory effect was obtained from soy bean meal (63.33±4.71%) and blood meal (66.67±8.02%). The enzyme activity was relatively affected higher by dual combinations between fish meal and soybean meal (1:1) (31.85±10.50 %)($p<0.05$).

Keywords: *A. baerii*, protease activity, protein sources, inhibition effect.**Giriş**

Mersin balıkları, dünyada yaşayan en eski omurgalı gruplarından biri olup, “yaşayan fosiller” diye de anılmaktadır. Bu balıklar, kuzey yarımkürenin soğuk ve ılıman sularında dağılım gösterirler. Mersin balıkları genel

olarak havyar, füme balık, çorba, jelatin ve derileri için üretilmektedir. Tüm Mersin balığı türleri aşırı avcılık baskısı, barajlar ve sulak alanlarda yapılan derinleştirme gibi düzenlemeler dolayısıyla yok olma tehlikesi ile yüz

yüzedirler (Napora-Rutkowski vd., 2009).

Birçok araştırmacı tarafından balık larvalarının kendi ürettikleri enzimlerin dışsal kaynaklı karma veya canlı yemleri sindirme için yeterli olduğu düşünülse de, mikro diyet yemlerde kullanılan yem hammaddelerinin seçimi ve yem imalat metodu alternatif türler için oldukça önemlidir. Bunun yanında, balık unu imalatında kullanılan balık türlerini korumak amacıyla, bitkisel kökenli protein kaynakları balık karma yemlerinde sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Balık üreticileri, bu yemlerden elde edilen verimsiz yem dönüştürme değerleri ve yavaş büyüme performanslarından oldukça şikâyetçidirler. Bu durumdan, bitkisel kökenli protein kaynaklarının amino asit kompozisyonlarının sorumlu olduğu iddia edilmektedir.

Bazı Mersin balığı türlerine ait yapay dölleme, larva besleme ve sindirim enzimleri ile ilgili bir çok çalışma hali hazırda mevcut olup (Willet vd., 2001; Gawlicka vd., 2002; Furne vd., 2005; Napora-Rutkowski vd., 2009; Babaei vd., 2011; Sanz vd., 2011; Noori vd., 2012), bu türler için ticari yemler üretilmiştir. Ancak, karma yemlerde kullanılan yem hammaddelerinin proteaz aktivitesi üzerine etkisi halen net bir şekilde bilinmemektedir. Sibiry mersin balığı da (*A. baerii*) ülkemiz yetiştiricilik sektörü açısından alternatif bir balık türü olup, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın mali destekleme listesine girmiş türler arasındadır. Bu çalışmada, besleme protokolünün erken dönem büyüme performansı üzerine etkisi ve ticari yemlerde kullanılan hayvansal ve bitkisel kökenli protein kaynaklarının Sibiry mersin balığı juvenillerinin proteaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu sayede, bu tür için üretilecek karma yemlerde kullanılması uygun protein kaynakları belirlenmiş olacaktır.

Materyal ve Metot

Yavru Temini ve Enzimlerin Ekstraksiyonu; Deneme, Macaristan'da bulunan bir ticari balık işletmesinde yapılmıştır (Riged & Riged Ltd.). Döllenen yumurtalar Rusya'dan ithal edilmiş ve inkübasyon McDonald şişelerinde gerçekleştirilmiştir. Deneme boyunca su sıcaklığı 17°C'de tutulmuştur. Yumurtadan çıkan prelarvalar kapalı devre sisteme transfer edilmiş ve burada 23 gün boyunca beslenmiştir. Boy-Ağırlık ilişkisinin ve kondisyon faktörünün hesaplanabilmesi için günlük olarak örnekleme yapılmış (en az 10 adet birey) ve %4'lük formaldehit içinde muhafaza edilmiştir. Juvenillerin karma yeme geçiş günü olan 24. günde toplam proteaz aktivitesi ve inhibisyon analizleri için balık stoğundan tesadüfen 1gr örnek alınmış, distile suda yıkanmış ve 3 ml'lik ependorf tüplerde analizler yapılana kadar -80°C'e kaldırılmıştır. Sindirim enzimlerinin ekstraksiyonunda tüm larva vücudu homojenize edilmiş (35 mg ml⁻¹) ve ekstratlar santrifüjle elde edilmiştir (12000g, 20 dk, 4°C).

Yemleme Protokolü; Sibiry mersin balıklarının pre-post larva ve juvenillerin beslenmesinde aşağıdaki ticari besleme protokolü kullanılmıştır (Tablo 1).

Boy-Ağırlık İlişkisi ve Kondisyon Faktörü; Pre-post larva ve juvenil dönemdeki balıklardan günlük olarak en az 10 adet bireyin boy ve ağırlıkları ölçülmüş ve bu dönem içerisindeki Boy-Ağırlık ilişkisi regresyon analizi ile ortaya konulmuştur. Kondisyon faktörü ise aşağıdaki formülle hesaplanmıştır;

$$KF = (W/L^3) \times 100 \text{ (Bagenal, 1978)}$$

W: Ağırlık (mg)

L: Boy (mm)

Tablo 1. Sibirya mersin balığı ticari besleme protokolü (Riged&Riged Ltd.)

1-6. Günler	7-13. Günler	14-20. Günler	21-23. Günler	24. ve Sonra
Besin Kesesi	Artemia	Tubifex+ M.D*	Chronomid +M.D.	M.D.

* M.D. :Mikrodiet yem

Proteaz Aktivitesinin Ölçümü; Araştırmanın 24. gününde örneklenen Sibirya mersin balığı örneklerinin toplam proteaz enzim aktivitesi Walter (1984)'e göre yapılmıştır. Analizin mantığı; yapay olarak oluşturulan bir substrat ortamında (kazein, 10 mg ml⁻¹ pH=9), sindirim enzimi olarak Tris-HCl'in (50 mM) kullanılması, inkübasyon süresi (37°C'de 1 saat) sonrasında reaksiyonun kontrollü bir şekilde Trikloroasetikasit (TCA) (500 µl, 120 g l⁻¹) ile durdurulması ve absorbansın spektrofotometrede 280 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır. Juvenillerin çözünebilir protein konsantrasyonları ise Bradford (1976)'ya göre yapılmıştır.

Protein Kaynaklarının Proteaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Miktarlarının Ölçümü; Bu çalışmada, ticari yem rasyonlarında protein kaynağı olarak kullanılan balık unu (BU), kan unu (KU), soya protein konsantrasyonu (SPK), mısır gluteni (MG), soya unu (SU) ve BU:SU (1:3, 1:1, 3:1), SU:MG (1:3, 1:1, 3:1) kombinasyonları kullanılmıştır. Bu yem hammaddelelerinden elde edilen ekstratlar, karma yeme geçiş yapmış juvenillerden elde edilen sindirim enzimleri ile reaksiyona sokulmuştur. Bu amaçla, Garcia-Carreno (1996)'nın modifiye edilmiş metodu kullanılmıştır. İlk önce, karma yeme geçiş günü olan 24. günde örneklenen larvaların enzim ekstratları (20 µl) ile protein kaynakları (20 µl) 500 µl Tris-HCl (pH 9.0) inkübe edilmiştir (25°C'de 60 dk). Kontrol grubunda ise, protein kaynağı yerine aynı miktarda saf su kullanılmıştır. Daha sonra, karışıma 100 µl kazein eklenmiş ve 120 dk daha inkübasyona devam edilmiştir. Sonuçta,

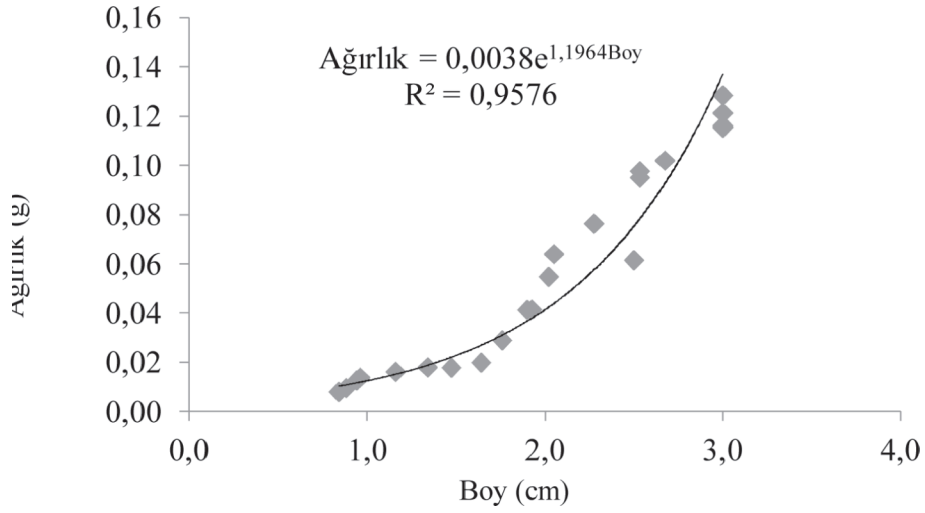
karışıma 500 µl TCA (120 g L⁻¹) eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve absorbans değeri 280 nm'de ölçülmüştür (Aларcon vd., 1999).

İstatistik Analizler; Kolmogorov-Smirnov normalite ve Barlett's homojenite testleri verilerin ön değerlendirmesinde kullanılmıştır. One-way Anova test ise SPSS 15.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

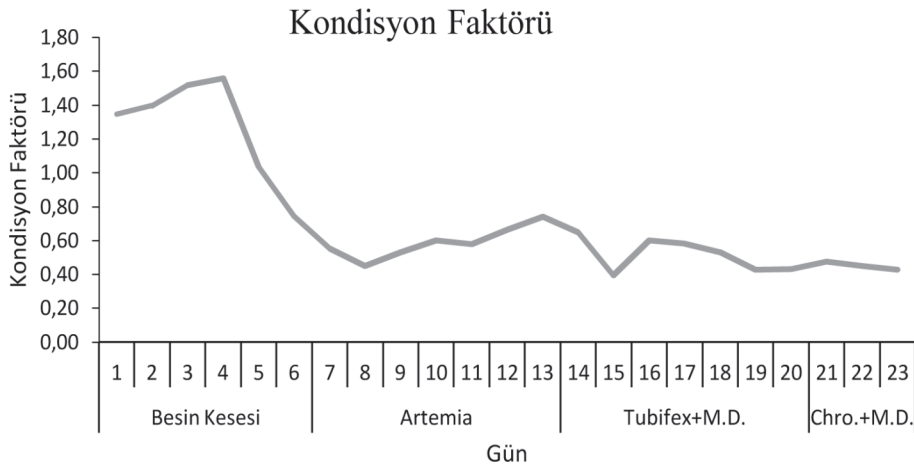
Bulgular

Boy-Ağırlık İlişkisi ve Kondisyon Faktörünün Günlük Değişimleri; Çalışmada elde edilen Boy-Ağırlık ilişkisi ve besleme protokolüne bağlı olarak değişim gösteren kondisyon faktörü değerleri aşağıdaki Şekil 1 ve 2'de verilmiştir.

Sibirya Mersin balığının yumurtadan çıkış anından itibaren ilk 23 günlük büyüme performansı incelendiğinde, ticari olarak uygulanan besleme protokolünün türün gelişimi üzerinde direk etkisinin olduğu görülmektedir. Boy-ağırlık değişimi üssel olarak artan bir eğilimde olmuştur (R²=0.9576). Bu değişim, diğer tüm balık türlerinde görülen büyüme eğrisine paralellik arz etmektedir. Bunun yanında, kondisyon faktörü yumurtadan çıktıktan 3. günün sonuna kadar artmış, daha sonra besin kesesinin azalmasına bağlı olarak azalış göstermiştir. Ortama canlı yem girişini takiben kondisyon faktörü de tekrar artmaya başlamıştır. Ancak, sörvaj (karma yeme geçiş) döneminde larvalara mikro diyet yanında canlı yem de verilmesine rağmen (*Tubifex* ve *Chronomid* larvaları), larvalar ağırlıkça değil boyca büyümeye devam etmişlerdir.



Şekil 1. Sibiry mersin balığının erken dönem Boy-Ağırlık değişimi.



Şekil 2. Besleme protokolüne bağlı olarak Kondisyon Faktöründeki değişimler

Karma Yemlerde Kullanılan Protein Kaynaklarının Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi; Karma yeme geçiş günü olan 24. günde Sibiry mersin balığı juvenillerinin proteaz aktivite değeri 131.67 ± 0.15 U/mg olarak ölçülmüştür. Ticari olarak kullanılan protein kaynaklarının Sibiry mersin balığı larvalarının proteaz aktivitesi üzerine inhibe etme oranları ise Tablo 2'de verilmiştir.

Analizler sonucunda, karma yemlerde kullanılan protein kaynaklarının juvenillerin

proteaz aktivitesi üzerine en düşük inhibisyon etkisi SPK (% 14.45 ± 1.58) ve BU'dan (% 15.34 ± 3.85) elde edilmiştir ($P > 0.05$). Bu değerleri sırasıyla MG, SU ve KU takip etmiştir ($P < 0.05$). İkili kombinasyonlarda ise, en düşük değer BU ve SU'nun 1:1 oranında kullanılmasıyla elde edilmiştir (% 31.85 ± 10.50). İkili kombinasyonlara ait veriler incelendiğinde, balık unu ve soya unununun 1:1 oranında kullanılmasıyla elde edilen inhibisyon değeri en düşük bulunmasına rağmen, 1:3 ve 3:1 oranları ile

Tablo 2. Protein kaynaklarının juvenillerin proteaz aktivitesi üzerine inhibisyon etki değerleri

Hammadde adı	Proteaz (%)
KU (%75,5 Ham Protein)	66.67±8.02 ^d
MG (%60 Ham Protein)	25.56±7.86 ^b
BU (%69 Ham Protein)	15.34±3.85 ^{ab}
SPK (%58 Ham Protein)	14.45±1.58 ^a
SU (%48 Ham Protein)	63.33±4.71 ^d
BU/SU (1:3)	42.96±5.59 ^c
BU/SU (1:1)	31.85±10.50 ^{bc}
BU/SU (3:1)	50.37±8.98 ^{cd}
SU/MG(1:3)	38.52±3.39 ^c
SU/MG(1:1)	50.37±10.50 ^{cd}
SU/MG(3:1)	45.19±10.02 ^c

Sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel fark P<0.05 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Satırlardaki farklı harfler istatistiksel farkları göstermektedir.

aralarında her hangi bir istatistiksel önem bulunmamıştır (P>0,05). Aynı durum, soya unu ve mısır glüten kombinasyonları içinde geçerlidir (P>0,05). Ancak bu ikili kombinasyonların tümü, tek tek kullanılan protein kaynakları ile mukayese edildiğinde aradaki fark önemli bulunmuştur (P<0,05).

Tartışma

Bu çalışmada, Sibirya mersin balığı larvalarının ağız 8. günde açılmıştır ve ortamda canlı yem (*Artemia*) bulunmasına bağlı olarak kondisyon faktörü artma eğilimine geçmiştir. Bu durumun, Rus mersin balığı larvalarında da görüldüğü ve buna ek olarak proteaz aktivitesinde de artış olduğu bildirilmiştir (Gökçek vd., basılmamış veri). Sanz vd. (2011), Adriyatik mersini, *A. naccari*, türünde dışsal beslenmenin başladığı günden itibaren asidik

proteaz aktivitesinin görüldüğünü ve bu artışın dış kaynaklı besinin sahip olduğu sindirim enzimlerinden olduğunu ifade etmişlerdir. Bunun temel sebebi ise, gastrik salgı bezlerinin henüz zimojen salgılayabilecek taneciklere sahip olmaması ile açıklanmıştır. Bu iddianın tam zıttı olarak bazı araştırmacılar mersin balığı larvalarının ilk yemle gelen enzimlere ihtiyacı olmadığını (Segner vd., 1993; Kim vd., 2001), canlı yemin sindirim salgılanmasını tetikleyici bir rol oynadığını iddia etmektedirler (Zambanino Infante ve Cahu, 2001). Bu çalışmada, sörvaj döneminde post-larvalara canlı yem ile birlikte mikrodiyet yem vermenin kondisyon faktörünü olumsuz etkilediği görülmektedir. Bu durumun temel sebebinin, larvaların henüz karma yemi sindirebilecek sindirim enzimlerini salgılayamaması olabilir. Benzer durum, Faulk vd. (2007) tarafından da bildirilmiştir.

Gökçek vd. (basılmamış veri), Rus mersin balığı juvenillerinin karma yemleri sindirebilecek proteaz enzimlerinin yumurta açılımını takiben 25. günden itibaren salgılayabildiklerini ve juvenillerin ancak bu noktadan itibaren yetişkin bireyler ile benzer sindirim sistemine sahip olduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen verilen ışığında, yumurta açılımını takiben 14-23. günler arasında ortamda mikro diyet yemlerin bulunmasının Sibiry mersin balığı juvenillerinin ağırlıkça büyüme performansına olumsuz etki yaptığı söylenebilir.

Ticari yem hammaddelerinden KU ve SU'nun, 24 günlük Sibiry mersin juvenillerinin proteaz aktivitesi üzerinde açıkça inhibe edici etkilerinin olduğu görülmektedir (sırasıyla %66.67±8.02 ve %63.33±4.71). Öte yandan, SPK ve BU minimum inhibe edici etki göstermişlerdir. Gökçek vd. (basılmamış veri), BU'nun Rus mersin juvenillerinin proteaz aktivitesini benzer şekilde etkilediğini (% 15.44), ancak SPK'nin ise (%63.55±5.46) çok daha yüksek bir değer sergilediğini ifade etmişlerdir. Bu durumun tam tersi, Çuka mersin balığı, *A. ruthenus*, juvenillerinde tespit edilmiştir (Kurt ve Gökçek, basılmamış veri). Bu türün proteaz aktivitesi üzerinde SPK, BU'na oranla daha düşük bir inhibisyon değeri göstermiştir (sırasıyla %38.57±10.44 ve % 57.67±4.54) (p<0.05). Bu durum, aynı familyaya ait olsalar bile, tür bazında sindirim sistemlerinin gelişim dönemlerinin farklı olduğunu ve amino asit kompozisyonlarındaki farklılığa balığı olarak farklı protein kaynaklarının juvenillerin proteaz aktivitesi üzerinde farklı etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, elde edilen verilerin ışığında, Sibiry mersin balığı post-larvalarının sörvaj döneminin daha geç bir dönemde başlatılmasının, larvaların hem ağırlık hem de

boyca büyüme performansları açısından daha iyi sonuçlar vereceği söylenebilir. Bunun yanında, karma yeme geçiş dönemi olan 24. gününde üretilen toplam proteaz enzim miktarı, yemin tam olarak sindirilebilmesi için yeterli miktarda salgılamıyor olabilir. Öte yandan, karma yemlerde kullanılan protein kaynaklarından KU ve SU'nun bu türün proteaz aktivitesine olumsuz etki yaptığı açıktır. Dolayısıyla, sörvaj dönemi de dahil, erken dönem juvenil beslemesinde kullanılacak olan mikro diyet yemlerde bu protein kaynaklarının kullanılmaması önerilir. Türün, yumurta açılımını takiben 24. günden sonraki enzim aktivitesindeki değişimler takip edilmeli ve ileri de yapılacak olan çalışmalar ile özellikle proteinlerin hidroliz derecesi de net bir şekilde ortaya konulmalıdır.

Teşekkür

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, Macaristan'ın Szent Istvan Üniversitesi Balık Yetiştiriciliği Bölümü'ne ve çalışmanın gerçekleştirildiği Rigid&Rigid Ltd. şirketine teşekkürlerimizi sunarız. Ayrıca, analizlerin yapılmasında asistanlık desteği veren Recep Kurt'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Alarcon, F. J., Moyano, F. J., Diaz, M., Fernandez-Diaz, C. ve 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.
- Babaei, S. S., Kenari, A. A., Nazari, R. ve Gisbert, E. 2011. Developmental changes of digestive enzymes in Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) during larval ontogeny. *Aquaculture*, 318: 138-144.
- Bagenal, T. B. 1978. Methods for the assessment of fish production in fresh waters. Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp. 101-136.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Faulk, C. K., Benninghoff, A. D ve, Holt, G. J. 2007. Ontogeny of the gastrointestinal tract and selected digestive enzyme in cobia *Rachycentron canadum* (L.). *J. Fish Biol.* 70:567-583.
- Furne, M., Hidalgo, M. C., Lopez, A., Garcia- Gallego, M., Morales, A. E., Domezain, A., Domezaine, J. ve Sanz, A. 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, 250: 391-398.
- Garcia-Carreno, F. L. 1996. Proteinase inhibitors. *Trends Food Sci. Technol.*, 7: 197-204.
- Gawlicka, A., Herold, M. A., Barrows, F. T., de le Noue, J. ve Hung, S. S. O. 2002. Effect of dietary lipids on growth, fatty acid composition, intestinal absorption and hepatic storage in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) larvae. *J. Appl. Ichthyol.*, 18: 673-681.
- Gökçek, K., Szabo, T., Alptekin, C., Kurt, R., Töre, Y. ve Urbanyi, B. (Yayınlanmamış veri). The Effect of Feeding Regime and Inhibitory of Different Feed Ingredients on Proteases of Russian Sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt&Ratzenburg, 1833, at Early Life Stages.
- Kim, B. G., Divakaran, S., Brown, C. L. ve Ostrowski, A. C. 2001. Comparative digestive enzyme ontogeny in two larval fishes: Pacific threadfin (*Polydattilus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*). *Fish Physiol. Biochem.* 24: 225-241.
- Kurt, R. ve Gökçek, K. (Yayınlanmamış veri). Ticari Protein Kaynaklarının Çuka Mersini, *Acipenser ruthenus* Linneaus 1758, Jüvenillerinin Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkileri.
- Napora- Rutkowski, L., Kamaszewski, M., Bielawski, W., Ostaszewska, T. ve Wegner, A. 2009. Effects of starter diets on pancreatic enzyme activity in juvenile starlet (*Acipenser ruthenus*). *The. Isr. Jour. Aqua.-Bamidgeh*, 61 (2): 143-150.
- Noori, F., Gilbert, V. S. ve Sorgeloos, P. 2012. Preliminary study on the activity of protease enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) larvae in response to different diets: effects on growth and survival. *Aquaculture Research*, 43, 198-207.
- Sanz, A., Llorente, J. L., Furne, M., Ostos-Garrido, V., Carmona, R., Domezain, A. ve Hidalgo, M. C. 2011. Digestive enzymes during ontogeny of the sturgeon *Acipenser naccarii*: intestine and pancreas development. *J. Appl. Ichthyol.*, 27: 1139-1146.
- Segner, H., Rösch, R., Verreth, J. ve Win, U. 1993. Larval nutrition physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aqua. Soc.* 24: 121-134.
- Walter, H. E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as sub-strates, In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.J. ed.), 5, 270-277.
- Willot, P., Sabeau, L., Gessner, J., Arlati, G., Bronzi, P., Gulyas, T. ve Berni, P. 2001. Sturgeon farming in Western Europe: recent developments and perspectives. *Aquat. Living Resour.*, 14: 367-374.
- Zambonino Infante, J. L. ve Cahu, C. L. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 130: 477-487.