

# Su ürünleri enzimleri ve enzimlerin işleme endüstrisinde kullanım olanakları

## Seafood enzymes and their application in the seafood industry

Yasemen Yanar

Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Avlama ve İşleme Teknolojisi Bölümü, Balcalı, Adana, Türkiye  
[yyanar@cu.edu.tr](mailto:yyanar@cu.edu.tr)

### How to cite this paper:

Yanar, Y., 2015. Seafood enzymes and their application in the seafood industry. *Ege J Fish Aqua Sci* 32(2): 105-113. doi: [10.12714/egejfas.2015.32.2.07](https://doi.org/10.12714/egejfas.2015.32.2.07)

**Abstract:** Enzymes which have very important metabolic functions are structurally proteins that catalyse biochemical reactions and they become a part of daily and economical life. The aquatic environment contains a wide variety of genetic material and, hence represents an enormous potential for different sources of enzymes. This review summarizes information related to digestive and muscular enzymes in fish and aquatic invertebrates. In addition, potential applications of enzymes in seafood processing industry is discussed.

**Keywords:** Enzymes, fish, seafood industry

**Özet:** Biyokimyasal reaksiyonları kataliz ederek, çok önemli metabolik fonksiyonlara sahip olan protein yapısındaki enzimler, günlük ve ekonomik hayatın bir parçası olmaya başlamıştır. Çok geniş genetik materyale sahip olan sucul çevre, farklı enzim kaynaklarından dolayı bu alanda önemli bir potansiyel sunmaktadır. Bu derlemede balık ve diğer sucul organizmaların sindirim ve kas dokuda bulunan enzimleri hakkında bilgi verilmektedir. Ayrıca enzimlerin su ürünleri işleme endüstrisindeki potansiyel uygulamaları anlatılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Enzimler, balık, su ürünleri endüstrisi

## GİRİŞ

Enzimler, hücrelerdeki metabolik faaliyetlerin tümünü yöneten özel katalizörlerdir. Organik kimyada kullanılan metotlar ile gerçekleştirilmesi çok güç olan birçok reaksiyon, uygun ve spesifik enzimlerle kolaylıkla gerçekleştirilir. Enzimlerin bu özelliği, canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere, günlük ve ekonomik hayata girmesine neden olmuştur (Wiseman, 1987). Biyoteknolojik ilerlemeler sayesinde enzimlerin çeşitli kaynaklardan izole edilmesi ve saflaştırılması daha ucuz ve pratik hale getirilmiştir (An ve Visessanguan, 2000). Uluslararası Biyokimya Birliğinin enzim komisyonu tarafından günümüzde yaklaşık 4000 farklı enzim sınıflandırılmış (Bairoch, 2000) ve bunların büyük bir kısmını tüm gıda myosistemlerinde benzer homolog enzimlerin oluşturduğu belirlenmiştir, örneğin sucul organizmaların kaslarındaki enzimler, kara hayvanlarının kaslarında bulunan enzimlere benzerlik göstermektedir (Haard, 1998). Ancak, sucul organizmaların enzimlerinin molekül ağırlıkları, amino asit kompozisyonları, optimum pH ve sıcaklıkları, stabiliteyi, inhibasyon özellikleri ve kinetik özellikleri arasında farklar vardır. Sucul ortamlar daha geniş genetik materyal içerirler bu yüzden farklı enzimlerin keşfinde çok büyük potansiyele sahiptirler. Örneğin teleostlar yaklaşık 50 adet taksonomik sınıf,

13.000 adet tuzlu su türü içerirler (De-Vecchi ve Coppes, 1996).

Geçmişte, su ürünleri endüstrisinde enzimlerin geleneksel kullanımları, birkaç ürünle sınırlı kalmış (balık protein hidrolizati, balık sosu ve tuzlanmış balık ürünleri) bu işlemler balıktaki endojen proteazlara dayanılarak yapılmıştır (Haard, 1992). Günümüzde balık ve kabuklu enzimlerinin su ürünleri endüstrisinde kullanımları çeşitlenmiş, eksojen enzimler ile işlem hızı artırılarak geleneksel uygulamalar iyileştirilmiş, yeni ürünlerin üretimi gerçekleştirilmiş ve işlem yardımcısı olarak kullanımları söz konusu olmuştur (Haraldsson, 1990; Stefánsson ve Steingrimsdóttir, 1990).

Bu derleme ile su ürünleri kaynaklı enzimler anlatılmakta, karasal hayvan enzimlerine göre üstünlüklerine yer verilmekte ve enzimlerin ticari kullanım olanaklarının daha iyi anlaşılması için su ürünleri işleme sanayindeki mevcut uygulamalara örnekler verilmektedir.

## SU ÜRÜNLERİ ENZİMLERİ

Balık ve sucul omurgasızlarda doğal olarak bulunan enzimler; proteazlar, lipazlar, karbohidratlar ve diğer enzimlerdir.

## Balık ve Sucul Omurgasızların Mide, Bağırsak, Hepatopankreas ve Kas Proteazları

Balık iç organlarındaki mevcut enzimlerin proteolitik aktiviteleri ile ilgili çalışmalar 19. yy'da başlamış, ilk olarak post-mortem depolama esnasında abdominal (karın) dokunun sindirim proteazlarının etkisiyle yumuşaması 1926 yılında *Almy* tarafından incelenmiştir.

### Mide Proteazları

Pepsinler; aspartik proteazlar ailesine ait olup balıkları da kapsayan omurgalıların mide mukozal salgı bezinden salgılanırlar (*Frucon, 1987*). Bu enzimler asidik koşullarda aktif endopeptitazdırlar, doğada daha az asidiktirler ve memelilerde bulunanlarına karşılık daha yüksek spesifik aktiviteye sahiptirler (*Gildberg ve Raa, 1983*). Özellikle soğuk iklim balıklarının pepsinleri, memeli pepsinlerine göre düşük sıcaklıkta daha aktiftir. Aynı zamanda, daha düşük asidik koşullarda optimal aktivite gösterirler. Bu farklılıklar, daha hassas fiziksel ve kimyasal ortamlar isteyen işleme koşulları için balık pepsinini, memeli pepsinine göre daha kullanışlı kılar.

Kimozinler ve gastrisinler; kimozen rennin olarak da bilinir asidik bir proteazdır, diğer asidik proteazlardan farklı olarak dar bir substrat spesifitesine sahiptir, pH stabilitesi yaklaşık 7'dir. Kimozin genellikle genç ruminantların 4. mide bölümünde bulunmuştur. Son yapılan çalışmalarda sazanda ve fok balığının midesinde kimozen ve kimozen benzeri enzim aktiviteleri görülmüştür (*Shamsuzzaman ve Haard, 1984; Haard ve Simpson, 1994*).

Gastrisinler; enzimatik ve kimyasal özellikleri pepsine benzeyen aspartil proteazlardır. Bununla beraber yapıları ve belirli katalitik özellikleri pepsinden farklıdır (*An vd., 1994*). Berlam balığının midesinden gastrisinin iki zimojeni ekstrakte edilmiştir. Her iki zimojenin optimal pH'sı 3.0 olup pH 10'da aktiftirler. Memelilerde bulunan gastrisinlerden farklı olarak bu iki zimojenin alkali pH'da oldukça stabil oldukları ve protein ile sentetik substratlara farklı aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (*Haard, 1986*).

### Bağırsak ve hepatopankreas proteazları

Teleost balıkların bağırsak proteazları, plorik çeka veya pankreastan salgılanırlar, plorik çeka'dan başlıca tripsin ve kimotripsin olarak isimlendirilen iki tip serin proteaz ortaya çıkarılmıştır. Bu enzimlerin dışında kollojenaz, elastaz, ve karboksipeptidazlar balık bağırsaklarında tanımlanmışlardır. Çeşitli balık türlerinin sindirim sistemlerinde proteolitik enzimlerin incelenmesi sonucunda balık bağırsağında bulunan serin proteazların nötral pH'dan ziyade alkali koşullarda daha yüksek aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Balık serin proteazlarının genellikle sıcak kanlı hayvanlardakiler ile benzer moleküler ağırlığa, amino asit kompozisyonuna ve serin proteaz inhibitörlerine olan duyarlılığa sahip oldukları belirlenmiştir.

Tripsin ve Kimotripsin; Son 20 yıldır, tripsin ve tripsin

benzeri enzimler ılıman iklim balıkları kadar soğuk iklim balıklarında da bulunduğu ve tanımlandığı bildirilmiştir. Tripsin ve tripsin benzeri proteolitik enzimler sardalya (*Murakami ve Noda, 1981*), Atlantik morina (*Amiza vd., 1997*), Atlantik somon (*Male vd., 1995*) ve hamsi (*Martinez vd., 1988*) gibi balık türlerinden saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Farklı balık türlerinden izole edilen tripsin enziminin pH stabilitesi; asidik koşullar altında daha stabil olan memelilerden elde edilen tripsine göre farklıdır, alkali pH'da aktiftir (*Haard ve Simpson, 1994; De-Vecchi ve Coppes, 1996*). Balık tripsininin termal stabilitesi inkübasyon koşulları kadar türede bağlıdır (*De-Vecchi ve Coppes, 1996*). Tripsin ile mukayese edildiğinde balık türlerinin kimotripsinleri daha az çalışmıştır (*Haard, 1994*). Kinetik özellikleri memeliler ile karşılaştırıldığında farklıdır, çünkü Atlantik morinanın yaşadığı düşük sıcaklıklara bile adapte olabilmektedir (*Asgeirsson ve Bjarnason, 1991*). Tripsin ve kimotripsin enzimleri tatlı su balıklarından da izole edilmişlerdir. Kabuklularda hepatopankreas memeli karaciğeri veya pankreası gibi çalışır ve sindirim proteazları üretir (*Tsai vd., 1991*). Serin proteaz, tıpkı tripsin gibi çeşitli krustase ve mollusklarda bulunmuştur; kimotripsin istakozlarda (*Lechevalier ve diğ., 1995*), taraklarda ve beyaz karideslerde (*Hernandez-Cortes vd., 1997*) ortaya çıkarılmıştır. Bu sindirim proteazları hasat sonrasında bu organizmaların kas proteinlerinin hızlı otolizlerinden sorumlu olduğu bilinmektedir (*Kawamura vd., 1984; Osness, 1985*). Aynı zamanda indirekt olarak karides ve istakozlarda melanosis olayından da sorumlu olduğu söylenmektedir (*Gopakumara, 1990; Wang vd., 1992; Zotos ve Taylor, 1996*).

Kollojenaz ve elastazlar; endojen kollojenazlar balık kasındaki konnektif dokuları hidroliz ederler ve böylece arzu edilmeyen tekstürel değişimlere ve filetonun gevşemesine yol açarlar (*Ando vd., 1995*), pH 6.5-8.0 arasında aktiftirler (*Haard ve Simpson, 1994*). Bu enzimlerin düşük ısı stabiliteyi nedeniyle, kullanımları sınırlıdır, 40°C'de dahi aktivitelerini kaybederler (*Zefirova vd., 1996*). Ayrıca kurustaselerin hasat sonrası depolama periyodu esnasında kas dokunun otolizinden sorumludurlar (*Baranowski vd., 1984; Kawamura vd., 1984*). Pankretik elastazlar serin proteaz ailesine ait olup, elastin olarak adlandırılan konnektif doku proteinlerini sindirebilme yeteneğine sahiptirler (*Asgeirsson ve Bjarnason, 1993*). Sazan (*Cohen ve Gertler, 1981*), yayın (*Clark vd., 1985*), Atlantik morina (*Asgeirsson ve Bjarnason, 1993*) gibi balıklarda mide elastaz enzimleri bulunmuştur.

### Nötral ve alkalin kas proteazları

Endojen balık kas proteazları başlıca kas lifleri arasında ve ekstrasellüler matrikste yer alırlar (*Haard, 1994*). Kas liflerindeki proteazlar; lizozomal proteinazlar, nötral proteinazlar, alkalin proteinazlar ve metaloproteinazlar olarak sınıflandırılırlar (*Haard, 1994*). Lizozomal proteinazlar; Katepsin A, Katepsin B, Katepsin D, Katepsin H ve Katepsin L çeşitli balık ve sucul omurgasızlardan izole edilmişler ve özellikleri belirlenmiştir (*Benjakul vd., 1996; Benjakul vd., 1997; Capasso vd., 1999*).

Katepsin D hariç diğer lizozomal proteinazlar, serin veya sistein proteazlara ait olup, optimum pH alkali bölgesidir. Katepsin D ise aspartik proteaz olup optimum pH asidik bölgedir (Haard, 1994; Kolodziejaska ve Sikorski, 1996). Balık kası memeli kasına göre 10 kat daha fazla Katepsin D içermektedir. Katepsin D kas proteinlerini otoliz eden başlıca lizozomal kas proteinazıdır (Makinodan vd., 1983). Bu nedenle balıketi siğir etine göre daha kısa sürede rigora girer. Yapılan araştırmalarda Katepsin B, H ve L gibi sistein proteazların, kas proteinlerinin yıkımında ilgisi olduğunu öngörmektedir (Ouallı vd., 1987). Katepsin C balık kas dokusundan saflaştırılmamıştır. Bu enzim kalamar hepatopankreasından ayrıştırılmış, tuza tolerans gösterdiği ve fermente balık ürünlerinde bu enzimin eksopeptidaz aktivitesi sayesinde kendine has aroma oluşumunda etkili olduğu belirlenmiştir (Raksakulthai vd., 1986). Kalpainler kas sarkoplazmı içerisinde bulunan nötral proteinazlardır, 30 °C'de ve nötral pH (6,9-7,5) da aktiftirler (Kolodziejaska ve Sikorski, 1996). Kalpainler, balıktaki myofibriler proteinlerini parçalayarak, balık kasının post-mortem yıkımına neden olurlar (Geesink vd., 2000). Balık kasındaki alkalın kas proteazları çok çalışılmış ve özellikleri belirlenmiştir. Bu enzimler kas sarkoplazmı içinde mikrozomal kısımda veya myofibriler arasında bulunur.

#### Balık ve Sucul Omurgasızların Lipazları

Lipazlar, su ürünlerini de içine alan doğada çok yaygın olarak bulunan, özellikle su-yağ fazı arasındaki iç yüzeyde substrata karşı katalitik etki göstererek, trigliseridleri; digliserid, monogliserid, gliserol ve yağ asitlerine hidrolizlemektedirler (Jensen, 1983). Aynı zamanda, lipid substratlarının esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarında katalizlemektedir (Wanasundara ve Shahidi, 1997). Bu özellikleri sayesinde yeni tip triasilgliserol, esterler ve yağ asitlerinin üretimine imkân sağlarken, konvensiyonel teknoloji ile üretilen ürünlerin kalitesini artırmada da kullanılabilir. O yüzden sucul organizmaların lipolitik enzimlerini araştırmak önemlidir, nitekim balık yağlarında inter esterifikasyonu kataliz ederek, omega-3 ile zenginleştirilmiş balık yağı üretiminde kullanılırlar (Simpson ve diğ., 1991). Lipazlar morina (Gjellesvik vd., 1992), uskumru (Nayak vd., 2003) ve somonlardan (Gjellesvik vd., 1994) karakterize edilmişlerdir. Genellikle geniş sıcaklık aralığında aktiftirler (-20 °C ile 60 °C), optimum pH aralığı ise 7-9 arasındadır.

Fosfolipazlar (PL) fosfolipitleri hidroliz eden lipolitik enzimlerdir, iki kategoriye ayrılır asilhidrolaz ve fosfodiesteraz olmak üzere. Fosfolipaz mezgitte pilorik çekadan (Shahidi ve Kamil, 2001), kırmızı deniz çipurasında hepatopankreastan (Ono ve Iijima, 1998), alabalıkta karaciğerden (Neas ve Hazel, 1985) ve morinada kastan izole edilmiştir (Shahidi ve Kamil, 2001). Optimum sıcaklık aralığı 30°C-45°C, optimum pH aralığı ise 8-10 aralığında bulunmuştur.

#### Balık ve Sucul Omurgasızların Karbonhidratları

##### Kitinolitik enzimler

Kitinaz ve lizozimleri içerirler. Gerçek kitinazlar, kitinaz ve

kitobiaz olmak üzere ikiye ayrılır (Clark vd., 1988). Denizel türlerde kitinolitik aktivite kabuklularda ve böceklerde kabuk değiştirme periyodunda etkilidirler, bununla birlikte çeşitli balık türlerinin sindirim sistemlerindeki kitinaz ve kitobiaz aktivitesi rapor edilmiştir. Bu enzimler balıkların sindirim sistemleri ve bunlar ile ilgili organlarından saflaştırılmış ve tanımlanmıştır (Rehbein vd., 1986; Matsumiya ve Mochizuki, 1996). Bazı araştırmacılar bu enzimlerin endojen olduğunu söylerken bazıları ise gıda mikroflorası ile alındığını veya sindirim sistemindeki endojen mikroflorada bulunduğunu bildirmişlerdir (Lindsay ve Gooday, 1985; Clark vd., 1988; James vd., 1989). Kitinazlar (kitinaz, kitobiaz ve lizozimler) indirekt sindirim fonksiyonuna sahiptirler.

Lizozimler gram (+) bakterilerin hücre duvarını parçalarlar. Balıkta bitkilerde ve memelilerde patojenik organizmalar ve böceklerle karşı savunma amaçlı kullanılırlar. Balık, memeli ve bitkilerde bulunan kitinazların molekül ağırlıkları, izoelektrik noktaları birbirlerinden farklıdır. Kitinolitik enzimlerinin insan barsak sisteminde yokluğu nedeniyle, kitin ve kitosan indirgenemez. Ayrıca bu biopolimerler insan vücudunun metabolizma veya fizyolojik fonksiyonlarını etkilemektedir. Bu nedenle insan sağlığını ve performansını destekleyici iddialarda bulunan çok sayıda bilimsel çalışmanın artması da beklenmektedir. Bu nedenle de balık ve sucul omurgasızların kitinolitik enzimlerinin farklı alanlarda çok geniş kullanım alanı potansiyelleri vardır. Ayrıca bakterilerin hücre duvarlarını parçalama özelliklerinden dolayı antibakteriyel özellikleri keşfedilmiştir. Genellikle balık ve sucul omurgasızlardan izole edilen lizozimler, sıcak kanlı hayvanlardan ve bitkilerden elde edilenlerden oldukça farklıdır, çünkü düşük sıcaklıklarda yüzlerce kat daha aktiftirler. Aynı zamanda lizozimler molekül olarak daha asidik bir yapıya sahip olduklarından potansiyel antimikrobiyal faaliyet gösterirler (Raa, 1990).

##### Aljinat liyazlar

Aljinat liyazlar sucul organizmalarda mevcut enerjinin etkin kullanımına izin veren önemli karbonhidrat parçalayan enzimlerdir. Denizel algler, yumuşakçalar ve mikroorganizmaları da içeren pek çok kaynaktan izole edilmişlerdir. Yumuşakçalarda, liyazlar mide, salgı bezi ve hepatopankreasından izole edilmiştir (Wong vd., 2000).

##### Diğer Enzimler

##### Transglutaminaz enzimi

Transglutaminaz, balıklarda surimi üretimi esnasında proteinlerin çapraz bağlanmasından sorumlu enzimdir (Ashie ve Lanier, 2000). Protein moleküllerinin transglutaminaz vasıtasıyla çapraz bağlanması proteince zengin gıdalarda büyük fiziksel değişikliklere neden olmaktadır ve bu benzersiz enzim reaksiyonu ile gıda proteinlerinin reolojik özelliklerini değiştirmek mümkün olabilmektedir (Lee vd., 1997; Nakahara vd., 1999). Transglutaminaz hayvan dokuları, bitkiler ve

mikroorganizmalarda bulunabilen bir enzimdir. Elde edilme kaynaklarına göre hayvan dokuları ve organlarında bulunan yapısal transglutaminaz ve mikrobiyal transglutaminaz olmak üzere ikiye ayrılır. Transglutaminaz aktivitesi, uskumru, alabalık, çipura, istakoz ve karides gibi türlerde tespit edilmiştir (Yasueda, vd., 1994; Muruyama vd., 1995). Endojen balık transglutaminaz enzimlerinin aktiviteleri, avlandıktan hemen sonra hızla azalmakta, dondurma işleminden sonra ise parçalanmaktadır bu nedenle yüksek kalitede surimi üretimi için üretim denizde yapılmalıdır. Ancak denizde üretimin maliyeti yüksek olduğu için, karada ticari transglutaminaz kullanılarak üretim yapılmaktadır (An vd., 1996). Transglutaminazlar kullanılarak farklı gıda proteinleri arasında çapraz bağlar oluşturulabilir. Örneğin kazein ve myozin, kazein ve soya fasülyesi, myozin ve soya fasülyesi, peynir altı suyu ve kazeinler, soya fasülyesi proteinleri ve et arasında oluşturulan çapraz bağlar yardımıyla yeni proteinli gıdaların gelişiminin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

### ENZİMLERİNİN SU ÜRÜNLERİ İŞLEME ENDÜSTRİSİNDE KULLANIMLARI

Günümüzde enzimlerinin su ürünleri endüstrisinde kullanımları çeşitlenmiş, eksojen enzimlerin kullanılmasıyla, işlem hızının artırılarak geleneksel uygulamaların iyileştirilmesi, yeni ürünlerin üretimi ve işlem yardımcısı olarak kullanımları söz konusu olmaktadır (Stefánsson ve Steingrímssdóttir, 1990; Haraldsson, 1990).

#### Süreç Geliştirmede Proteaz Kullanımı

Proteazlar, protein moleküllerindeki peptid bağlarını yıkmayı kataliz eden, hidrolitik enzimlerdir. Gıda işleme endüstrisinde kullanımları; ekmeğin tekstürel modifikasyonu, kurutulmuş yumurta ürünlerinde kalitenin geliştirilmesi, etin gevrekleştirilmesi, kemik atıklarından proteinlerin ayrılması, soya sosu ürünleri, peynirin olgunlaşmasının hızlandırılması ve şarabın berraklaştırılması gibi işlemlerde yararlanılır. Su ürünleri işleme endüstrisinde proteazların kullanımları aşağıda detaylı verilmiştir.

#### Balık protein hidrolizatı (FPH)

Kimyasal veya enzimatik yolla çeşitli boyutlarda peptit zincirlerine kadar parçalanmış ürünlere protein hidrolizatları denir. Proteinleri hidrolize etmek amacıyla enzimler, asitler ve alkaliler kullanılmaktadır. Enzimatik hidroliz beslenme değerinde herhangi bir azalma yapmadan fonksiyonel özelliklerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Kolay işlem koşulları, düşük tuz içeriği ve hızlı hidroliz ve buna bağlı olarak son ürün özelliklerinin kontrol edilebilir olması, enzimatik hidrolizin avantajlarından bazılarıdır. Farklı balık türleri, farklı enzimler ve koşullar oluşturularak çok çeşitli hidrolizatlar elde edilebilir. Bitkisel (papain, fisin vb.), hayvansal (tripsin,

pankreatin vb.) ve mikrobiyal (pronaz, alkalaz vb.) enzimler kullanılabilir. Hidroliz kontrollü koşullarda gerçekleştirilerek su tutma kapasitesi, emülsiyeye olma kapasitesi ve köpük oluşturma gibi fonksiyonel özellikleri düzeltilebilir. Balık proteinlerinin hidrolizinde 23 proteolitik enzim kullanılmış pankreatin, papin ve pepsin en uygun enzim olarak belirlenmiştir (Hale, 1969).

#### Balık işleme atıklarından protein ayırma

Fileto çıkarma sırasında kafa, deri, iskelet gibi atıklar yüksek kalitede protein kaynaklarıdır. Bu atıklardaki kalan etleri ayırmak oldukça güçtür bu nedenle genellikle çöpe atılırlar. Proteaz enzimleri ile muamele edildiğinde birkaç saat içerisinde karides atıklarından ve fileto atıklarından proteinler ayrılabilir (Kim vd., 1997). Morina fileto atığı, ton balığının pilorik çekasından elde edilen ham proteinaz ile muamele edildiğinde 50 °C'de 12 saat sürede proteinlerin %80'inin ayrıldığı bildirilmiştir (Kim vd., 1997). Pseudomonas aeruginosa'dan elde edilen mikrobiyal proteaz ile karides ve yengeç atıklarından proteinlerin %61'i ayrılabilmiştir (Wang ve Chio, 1998).

#### Balık pullarının ayıklanması

Günümüzde balıklardan pul ayırma işlemi elle veya mekanik olarak yapılmaktadır. Özellikle iri, pullu balıkların pullarını mekanik ayırma esnasında deride yırtılmalar veya tüm pulların temizlenememesi gibi sorunlar ile karşılaşmaktadır. Ya da pul ayırma esnasında kas tekstürüne zarar verilebilir. Enzimatik pul ayırma işlemi prensip; deri yüzeyindeki ve mukoz tabakadaki protein yapısını denatüre etmek ve su ile yıkıyarak pulları deri yüzeyinden uzaklaştırmaktır. Balıklar bu amaç için özel dizayn edilen inkübasyon tanklarında hafifçe asitlendirilmiş su solüsyonunda kollajenaz enzimi ile bekletilir. Sonrasında tanktan alınarak yıkanır (Stefansson, 1998).

#### Kabukluların kabuk soyma işlemi

Aspergillus niger'den elde edilen karbohidraz ve selüloz enzimi kullanılarak, karides ve yengeç kabuklarından et kaybını önleyerek kabuk ayırma işlemi ve tarakların iç organlarının ayrılması işlemi kolaylık sağlanmıştır. Bunun için fisin ile amilaz enzimi, sodyum bikarbonatlı su da çözündürüldükten sonra (pH 7.8, 52°C), kafası koparılmış karidesler bu solüsyonda 30 d bekletilerek, vakum pompası yardımıyla su sirküle edilerek kabuk ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde tarakların iç organlarının uzaklaştırılması için fisin, amilaz ve selüloz enzimleri, sitrik asit solüsyonunda (44°C) bekletilmiş ve 3 saat sonra su sirküle edilmiştir (Fehmerling, 1970).

#### Tuzlanmış balığın olgunlaşması

Balık işleme teknolojisinde tuzlama geleneksel bir muhafaza yöntemidir. Tuzlanmış balığın, kendine has tat ve lezzet ile istenilen yumuşak tekstürü depolanma esnasında olgunlaşma işlemi ile gerçekleşir. Tuzlanmış balıklarda olgunlaştırma işlemi, endojen proteazların yardımıyla, balık

proteinlerini hidroliz ederek, peptit ve amino asitlerin artması sağlanarak gerçekleştirilir (Voskresensky, 1965). Peptitler ve amino asitler balıkta tat ve aromayı artırır. Son ürünün tuz konsantrasyonu uygulanan işleme göre değişmekle beraber %4-18 arasında değişmektedir. Balığın tuzda olgunlaşma süresi bir seneyi bulabilmektedir. Olgunlaşma süresini kısaltan proteaz enzim karışımları sayesinde bu süre kısalmaktadır (Børresen, 1992).

### Balık sosu üretimi

Balık sosları fermente ürünler arasında yer alıp ülkelere göre değişen adlar altında (Japonya'da Shottsuru, Malezya'da Budu, Filipinler'de Patis, Tayland'ta Nam-pla, Vietnam'da Nuoc-mam) üretilmektedir. Bu soslar, tuzlanmış balıkların açık kahverengi renkte sıvı hidrolizatları olup enzim hidrolizine uğratarak veya bakteriyel fermentasyona tabi tutularak elde edilmektedir. Genellikle temizlenmemiş küçük deniz balıklarından iyi kalitede balık sosu için sadece birkaç ay gerekirken, büyük balıklar için 1 yıl veya 18 ay gerekebilmektedir. Balık enzimlerinin proteolitik aktivitelerinin düşük olması nedeniyle fermentasyonun tamamlanması 6-12 ay gibi uzun zaman almaktadır. Bu durum balık sos üretiminde kısıtlayıcı bir faktördür. Fermentasyon süresinin kısaltılması, aminlerin oluşumu gibi zehirlenmeye sebep olabilen istenmeyen bozulmaları da engelleyecektir (Raa ve Gildberg, 1982; Beddows, 1985). Proteolizi artırmak ve oluşum oranını yükseltmek için bromelain, fisin ve papain gibi doğal enzimlerin kullanıldığı çalışmalar yapılmış, en iyi sonuç % 0.2 bromelain ilave edilen uskumrudan elde edilen hidrolizatta bulunmuştur (Chuapohuk ve Raksakulthai, 1992).

### Kalamarın yumuşatılması

Papain, fisin ve bromelain gibi bitkisel proteazlar ile fungal proteazlardan ve sığır dalağından elde edilen lisosomal ekstraktan, kalamar etinin yumuşatılması (tenderizasyon) amacıyla yararlanılmaktadır. Bu proteolitik enzimler etteki elastin ve kollajeni kısmi hidrolizasyona uğratarak etin yumuşamasına neden olurlar (Melendo vd., 1997). Bu etki özellikle kas fibrillerini tutan sarkolemma ve benzeri kas doku bölgelerinde olmaktadır. Kas fibrillerindeki aşırı proteolitik parçalanma, etin lapalaşma şeklinde istenmeyen bir değişikliğe uğramasına da neden olabilir.

### Yumuşatılmış suyu alınmış balık dilimlerinin hazırlanmasında

Dehidrasyona uğratılmış balık dilimleri oldukça sert bir yapı kazanmaktadır. Suyu alınmış dehidre edilmiş balık dilimlerinin yumuşatılmasında, enzim kullanımı oldukça başarılı olmuştur. Bir tatlı su balığı olan *Labeo rohita*'nın rehidre edilen fileto dilimleri %0.5 papain enziminde 1 saat bekletildikten sonra, %10 tuz konsantrasyonunda 1 saat bekletilerek kurutma tüneline geçirilmiştir. Bu yöntemle kurutulan balık dilimlerinin, rehidrasyon kapasitesinin arttığı, ürünün sertliğinin azaldığı görülmüştür (Smruti ve Venugopal, 2003).

### Karides işleme artıklarından karotenoprotein ve astaxanthin pigmentinin eldesi

Kabukluların dış iskeletleri önemli miktarda karotenoyit bağlamaktadır. Karides ve yengeç işleme atıklarından enzimatik yöntemle karotenoproteinlerin ekstraksiyonu söz konusudur. Tripsin hidrolizi ile astaksantin pigmentlerinin %90'ı, proteinlerin ise %80'i geri kazanılabilmektedir (Simpson ve Haard, 1985). Ekstrakte edilen pigmentler, kültür balık rasyonlarında renklendirici olarak kullanılmaktadır.

### Mukozanın vizkozitesini düşürmekte

Mukoza (stickwater) balık yemi üretimi sırasında elde edilen bir yan üründür. Kondanse edilip kurutulularak satılabilir. Mukozanın içerdiği protein, kondanse edilmesi sırasında (evaporasyon işlemi esnasında) problem oluşturmaktadır. Endüstriyel anlamda proteazlar, proteinlerin vizkozitesini azaltmada kullanılmaktadır. Alkalaz ve nötraz gibi ticari proteazlar nötral pH'da mukozaya eklenerek vizkoziteyi düşürerek evaporasyona yardımcı olmaktadır (Jacobsen ve Rasmussen, 1984).

### Lipaz enzimi kullanarak çok doymamış yağ asidi üretimi

EPA ve DHA Yağ asitlerinin elde edilmesinde bir çok konvansiyonel yöntem uygulanmaktadır. Bunlar; moleküler ve fraksiyonel distilasyon, çözgen ile ekstraksiyon ve kimyasal esterifikasyondur (Haraldsson, 1990; Wills vd., 1998). Bu yöntemlerdeki ekstrem pH ve sıcaklık koşulları, uzun zincirli omega-3 yağ asitlerinin doğal formu olan cis formundan trans formuna dönüşmesine neden olur. Bu olay balık yağının ısıya daha duyarlı olmasına neden olur ve oksidasyona karşı daha az dayanıklı olur. Enzimatik yolla omega-3 yağ asitleri eldesi, daha ılımlı koşullar sayesinde, kimyasal yöntemle göre avantaj sağlar. Enzimatik yağ modifikasyonu, daha çok mikrobiyal kaynaklı lipaz enzimleri ile gerçekleştirilir (McNeill vd., 1996). Lipaz enzimleri su varlığında, trigliserid, digliserid ve monogliseridlerin hidrolizini kataliz ederler. Lipazların yağ asidi spesifiteleri balık yağlarının eldesinde enzim uygulamalarının en can alıcı noktasıdır. Balık yağlarındaki EPA ve DHA'nın trigliseride esterleştirilmesi ile yağların EPA ve DHA içeriğinin % 60 artırılması üzerine bir yöntem geliştirilmiştir (Langholz vd., 1989; Haraldsson, 1990). *Pseudomonas* sp. 'den üretilen 1,3-spesifik lipaz enzimi sayesinde, sardalya yağının EPA ve DHA içeriği %29'dan %44.5'e (w/w) yükseltilmiştir (Adachi vd., 1993). Bu teknik ton balığının PUFA içeriğini zenginleştirmek için de kullanılmıştır. *Candida cylindracea*' dan üretilen lipaz enzimi kullanılarak yağların hidrolize olmayan fraksiyonundan 3 katı fazla DHA üretimi gerçekleştirilmiştir (Tocher vd., 1986).

### Transglutaminaz (tgaz) enzimi kullanarak tekstür modifikasyonu

TGaz, protein molekülleri arasında kovalent bağlar yaparak, proteinlerin çapraz bağlanmasını ve polimerizasyonunu katalizleyen bir enzimdir (EC 2.3.2.13). Transglutaminazlar çeşitli kabuklularda, balıklarda ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Neilsen, 1995; Zhu vd., 1995; Motoki ve Seguro, 1999). TGaz aktivitesi sardalya, uskumru, kırmızı deniz çupraı, sazan, yılan balığı, somon ve alabalıkta saptanmıştır (An vd., 1996). TGaz enziminin, protein zincirindeki glisin ile lizin amino asitleri arasında gerçekleştirdiği çapraz bağlanmalar ile neden olduğu protein modifikasyonu gıda bilimcilerinin son dönemde gündemine oturmuş durumdadır. Protein substratları, TGaz ile inkübe edildiğinde jelleşmektedir. Bu jel oluşumu sonucunda ısı yoluyla jelleşmeyen proteinler jelleşebilmektedir. Moleküllerarası (g-glutamil)lisil çapraz bağları nedeniyle daha sık bir jel ağı oluşmaktadır. Oluşturulan jellerin ısıyla oluşturulanlara göre daha düzenli bir yapıya sahip olduğu saptanmıştır. Düşük değerli ve trimming uygulanmış et ve balık parçaları yeniden yapılandırılarak, tekstürel özellikleri geliştirilip, satış değeri artırılmaktadır. TGaz, kıyılmış et, balık ve tavuk ile diğer gıda ingrediyeentleri ile karıştırılarak, şekil verilir, basınca dirençli kaplarda paketlenir ve hamburger, et ve balık topları, gibi et ürünlerinin üretimi için kullanılmaktadır. Surimi teknolojisinde kritik faktör, kıyılmış balık etinin myofibriller proteinlerinden minimum kayıpla suda çözünür proteinlerin, pigmentlerin ve lipitlerin etkin ekstraksiyonudur. Özellikle yağlı balıklardan elde edilen surimi ürünlerine, TGaz eklenerek suriminin renk ve lezzet kalitesi ile jel oluşturma

yeteneği artırılır (Kuraishi vd., 2001).

### SONUÇ

İşleme sektöründe kullanılan diğer enzimler ile karşılaştırıldığında su ürünleri enzimlerinin kullanımı henüz emekleme aşamasındadır. Sucul organizmaların enzimleri geleneksel ve yeni geliştirilen gıda uygulamalarında umut vaat etse de önemi tam olarak anlaşılammıştır. Üstelik endüstriyel ölçüde sucul organizmaların enzimlerinin üretimi söz konusu değildir. İşleme hattında ve yeni teknikler geliştirme de spesifik koşulların ihtiyaç duyulduğu çeşitli gıda ürünlerinin üretiminde bu enzimlerin kullanımına gerek duyulduğunu gösteren araştırmalar yapılırsa değeri daha iyi anlaşılacaktır. Nitekim sucul organizmaların enzimleri düşük sıcaklıklarda yüksek moleküler aktiviteye sahip olmaları nedeniyle, düşük sıcaklıklarda reaksiyonları gerçekleştirmede başarılı olurlar, bu sayede geniş ölçüde uygulama imkânı bulabilirler. Sonuç olarak, bu çalışmada ortaya konan veriler ışığında ekonomik açıdan son derece değerli olan enzim uygulamaları ile proteinlerin modifikasyonu, lipitlerdeki PUFA'nın zenginleştirilmesi, raf ömrünün uzatılması, yan ürünlerin geliştirilmesi söz konusu olabilmektedir. Bu enzimlerin birçoğu, balık işleme atıklarından ve iskartalardan elde edilebilmektedir. Avlanan balıkların üç de biri denize geri atılmakta, işleme atıkları toplam yakalanan miktarın %70-85'ini oluşturmaktadır. Bu kaynaklardan daha fazla yararlanmayla ilgili birçok yaklaşım söz konusu olsa da ham materyalden enzimler gibi değeri artırılmış bileşenlerin izole edilmesi asıl ilgiyi oluşturmaktadır. Bu sayede, pek çok yerde etik ve estetik açıdan sorun yaratan çevre kirliliği azalacak, aynı zamanda, elde edilen enzimlerin endüstriyel kullanımları ile ekonomik yönden katkı sağlanacaktır.

### KAYNAKLAR

- Adahi, S., Okumura, K., Ota, Y., Mankura, M., 1993. Acidolysis of sardine oil by lipase to concentrate eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in glycerides, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75: 259-264. doi:10.1016/0922-338X(93)90148-2
- Almy, L.H., 1926. The role of the proteolytic enzymes in the decomposition of the herring. *Journal of the Analytical Chemical Society*, 48: 2136-2146. doi:10.1021/ja01419a019
- Amiza, M. A., Galani, D., Owusu-Apenten, R. K., 1997. Cod (*Gadus morhua*) trypsin heat inactivation: a reaction kinetic study, *Journal of Food Biochemistry*, 21: 273-288. doi:10.1111/j.1745-4514.1997.tb00209.x
- An, H., Seymour, T., Wu, J., Morrissey, T. 1994. Assay systems and characterization of pacific whiting (*Merluccius productus*) protease, *Journal of Food Science*, 59: 277-281. doi:10.1111/j.1365-2621.1994.tb06947.x
- An, H., Peters, M.Y., Seymours, T.A., 1996. Roles of endogenous enzymes in surimi gelation, *Trend in Food Science and Technology*, 7:321-327
- An, H., Visessanguan, W. 2000. Recovery of enzymes from seafood processing wastes. In: *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, N.F. Haard and B.K.Simpson, (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 641-664.
- Ando, M., Yoshimoto, Y., Inabu, K., Nakagawa, T., Makinodan, Y., 1995. Postmortem change of three-dimensional structure of collagen fibrillar network in fish muscle pericellular connective tissues corresponding to post-mortem tenderization, *Fisheries Science*, 61(2): 327-330.
- Ashie, I. N. A., Lanier, T.C., 2000. Transglutaminase in seafood processing. In: *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, N.F. Haard, B.K. Simpson (Ed.), Marcel Dekker, New York, USA, pp. 147-166.
- Asgeirsson, B., Bjarnason, J. B., 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99B: 327-335. doi:10.1016/0305-0491(91)90050-n
- Asgeirsson, B., Bjarnason, J. B., 1993. Properties of elastase from Atlantic cod, a cold-adapted proteinase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1164: 91-100. doi:10.1016/0167-4838(93)90116-9
- Bairoch, A., 2000. The Enzyme database in 2000. *Nucleic Acids Research*, 28: 304-305. doi:10.1093/nar/28.1.304
- Baranowski, E. S., Nip, W. K., Moy, J. H., 1984 . Partial characterization of a crude enzyme extract from the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, *Journal of Food Science*, 49: 1494-1495. doi:10.1111/j.1365-2621.1984.tb12829.x
- Beddows, C.G., 1985. Fermented fish and fish products, In: *Microbiology of fermented foods Vol: 2*, B.J.B Wood (Ed.), *Elsevier Applied Science*, London, UK, pp. 1-39.
- Benjakul, S., Seymour, T. A., Morrissey, M. T., An, H., 1996. Proteinase in Pacific whiting surimi wash water: Identification and characterization, *Journal of Food Science*, 61: 1165-1170. doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb10953.x

- Benjakul, S., Morrissey, M. T., Seymour, T. A., An, H., 1997. Recovery of proteinase from Pacific whiting surimi wash water, *Journal of Food Biochemistry*, 21: 431–443. doi:10.1111/j.1745-4514.1997.tb00198.x
- Børresen, T., 1992. Quality aspects of wild and reared fish, In: Quality Assurance in the Fish Industry, H.H. Huss, M. Jakobsen and J. Liston (Ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 1–17.
- Børresen, T., 1992. Biotechnology, by-products and aquaculture, In: Seafood Science and Technology, Bligh, G. (Ed.) Fishing News Books, Blackwell Scientific Publ., Cambridge, MA, p. 278–285.
- Capasso, C., Lees, W. E., Capasso, A., Scudiero, R., Carginale, V., Kille, P., Kay, J., Parisi, E., 1999. Cathepsin D from the liver of the Atlantic ice fish *Chionodraco hamatus* exhibits unusual activity and stability at high temperatures, *Biochimica Biophysica Acta*, 12(1431): 64–73. doi:10.1016/S0167-4838(99)00039-4
- Chuapohuk, P., Raksakulthai, N., 1992. Use of papain and bromelain in the production of oyster sauce, *Asean Food Journal*, 7: 196–199.
- Clark, J., Macdonald, N. L., Stark, J. R., 1985. Metabolism in marine flatfish III. Measurement of elastase activity in the digestive tract of dover sole (*Solea solea* L.), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81B: 695–700. doi:10.1016/0305-0491(85)90389-x
- Clark, J., Quayle, K.A., MacDonal, N.L., Stark, J.R., 1988. Metabolism in marine flatfish: V. Chitinolytic activities in Dover sole, *Solea solea* (L.), *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 90: 379–384. doi:10.1016/0305-0491(88)90091-0
- Cohen, T., Gertler, A., 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp *Cyprinus carpio* L. Purification and physical properties of trypsin, chymosin, elastase and carboxypeptidase, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 69B: 647–653.
- De-Vecchi, S. D., Coppes, Z., 1996. Marine fish digestive proteases—relevance to food industry and south-west Atlantic region—a review, *Journal of Food Biochemistry*, 20: 193–214. doi:10.1111/j.1745-4514.1996.tb00551.x
- Fehmerling, G.B., 1970. Process and composition for loosening and removing edible tissue from shells of marine creatures, U.S. Patent No: 3513071.
- Fru-ton, J. S., 1987. Aspartyl proteinases. In: Hydrolytic enzymes, X. Neuberger and K. Brocklehurst (Ed.), Elsevier Science, London, UK, pp. 1–37. doi:10.1016/S0167-7306(09)60015-6
- Geesink, G. H., Morton, J. D., Kent, M. P., Bickerstaffe, R., 2000. Partial purification and characterization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) calpains and an evaluation of their role in postmortem proteolysis, *Journal of Food Science*, 65(8): 1318–1324. doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb10605.x
- Gildberg, A., Raa, J., 1983. Purification and characterization of pepsins from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75A: 337–342. doi:10.1016/0300-9629(83)90090-7
- Gjellesvik, D.R., Lombardo, D., Walther B.T., 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*) purification and properties, *Biochimica Biophysica Acta*, 1124: 123–134. doi:10.1016/0005-2760(92)90088-D
- Gjellesvik, D.R., Lorens, J.B., Male, R., 1994. Pancreatic carboxylester lipase from Atlantic salmon (*Salmo salar*) cDNA sequence and computer-assisted modeling of tertiary structure, *European Journal of Biochemistry*, 226: 603–612. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb20086.x
- Gopakumara, K., 1990. Biochemistry of melanosis in shellfish and its prevention, Annual Industrial Fisheries Association, 7: 17–20. Groppe, J., Morse, D., 1993. Molluscan chymotrypsin-like protease; structure, localization and substrate specificity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 305: 159–169. doi:10.1006/abbi.1993.1406
- Haard, N.F. 1986. Atlantic cod gastric protease characterization with casein and milk substrate and influence of Sepharose immobilization on salt activation, temperature characteristics and milk clotting reaction, *Journal of Food Science*, 51:313–316. doi:10.1111/j.1365-2621.1986.tb11118.x
- Haard, N.F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1: 17–35
- Haard, N.F., 1994. Protein hydrolysis in seafoods, In: Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality, F. Shahidi, J.R Botta (Ed.), Chapman & Hall, New York, USA, pp. 10–33. doi:10.1007/978-1-4615-2181-5\_3
- Haard, N.F., 1998. Specialty enzymes from marine organisms, *Food Technology*, 52: 64–67.
- Haard, N.F., Simpson, B.K., Martin, A.M., 1994. Fisheries processing: Biotechnological application, Chapman & Hall, London, 337 p.
- Haard, N. F., Simpson, B. K., 1994. Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. In: Fisheries Processing: Biotechnological Applications, A. M. Martin (Ed.), Chapman and Hall, London, UK, pp. 132–154. doi:10.1007/978-1-4615-5303-8\_6
- Hale, M.B., 1969. Relative activities of commercially available enzymes in the hydrolysis of fish proteins, *Food Technology*, 23(1): 107–110.
- Haraldsson, G.G., 1990. The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils. In: Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability, M.N. Voigt, J.R. Botta, (Ed.), Technomic Publishing, Lancaster, pp 337–357.
- Hernandez-Cortes, P., Whitaker, J. R., Garcia-Carreno, F. L., 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: decapoda), *Journal of Food Biochemistry*, 21: 497–514. doi:10.1111/j.1745-4514.1997.tb00202.x
- Jacobsen, F., Rasmussen, O.L., 1984. Energy savings through enzymatic treatment of stickwater in the fish meal industry, *Process Biochemistry*, 19: 165–169.
- James, A.G., Probyn, T., Seiderer, L.J., 1989. Nitrogen excretion and absorption efficiencies of the Cape anchovy *Engraulis capensis* Gilchrist fed upon a variety of plankton diets, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 131: 101–124. doi:10.1016/0022-0981(89)90002-6
- Jensen, R. G., 1983. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources, *Lipids*, 18: 650–657. doi:10.1007/BF02534677
- Kawamura, Y., Nishimura, K., Matoba, T., Yonezawa, D., 1984. Effects of protease inhibitors on the autolysis and protease activities of Antarctic krill, *Agricultural Biology and Chemistry*, 48: 923–930. doi:10.1271/bbb1961.48.923
- Kim, S.K., Jeon, Y.J., Byun, H.G., Kim, Y.T. and Lee, C.K., 1997. Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca, *Fisheries Science*, 63: 421–427.
- Kolodziejaska, I., Sikorski, Z. E. 1996. Neutral and alkaline muscle proteases of marine fish and invertebrates - A review, *Journal of Food Biochemistry*, 20: 349–363
- Kuraishi C, Yamazaki K, Susa Y. 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Review International*, 17:221–246
- Langholz, P., Anderson, P., Forskov, T., Schmidtsdorff, W., 1989. Application of a specificity *Mucor miehei* lipase to concentrate docosahexaenoic acid (DHA), *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66: 1120–1123. doi:10.1007/BF02670097
- Lee, H.G., Lanier, T.C., Hamann, D.D., Knopp, J.A., 1997. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols, *Journal of Food Science*, 62 (1) : 20–24. doi:10.1111/j.1365-2621.1997.tb04359.x
- Le-chevalier, P., Sello, D., Van-Wormhoudt, X., 1995. Purification and partial characterization of chymotrypsin-like proteases from digestive gland of the scallop *Pecten maximus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110B: 777–784. doi:10.1016/0305-0491(94)00211-C
- Lindsay, G.J.H., Gooday, G.W. 1985. Chitinolytic enzymes and the bacterial microflora in the digestive tract of cod, *Gadus morhua*. *Fish Biology*, 26:255–265
- Makinodan, Y., Toyohara, H., Ikeda, S., 1983. Combined action of carp muscle cathepsins A and D on proteins, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 49: 1153–1161. doi:10.2331/suisan.49.481
- Male, R., Lorens, J. B., Smalas, A. O., Torrissen, K. R., 1995. Molecular cloning and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca, *Biochimica Biophysica Acta*, 658: 17–26.

- Martinez, A., Olsen, R. L., Serra, J. L., 1988. Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 91B: 677–684. doi:10.1016/0305-0491(88)90191-5
- Maruyama, N., Nozawa, H., Kimura, I., Satake, M., Seki, N., 1995. Transglutaminase-induced polymerization of a mixture of different fish myosins, *Fisheries Science*, 61 (3): 495-500.
- Matsumiya, M., Mochizuki, A., 1996. Distribution of chitinase and B-N-acetylhexosaminidase in the organs of several fishes, *Fisheries Science*, 62: 150–151.
- McNeill, G.P., Ackman, R.G., Moore, S.R., 1996. Lipase-catalyzed enrichment of long-chain polyunsaturated fatty acids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73: 1403-1407. doi:10.1007/BF02523503
- Melendo, J.A., Beltrán, J.A., Roncalés, P., 1997. Tenderization of squid (*Loligo vulgaris* and *Illex coindetii*) with bromelain and a bovine spleen lysosomal-enriched extract, *Food Research International*, 30: 335-341. doi:10.1016/S0963-9969(97)00057-4
- Motoki, M., Seguro, K., 1999. Transglutaminase and its use for food processing, *Trends in Food Science and Technology*, 9: 204-210. doi:10.1016/S0924-2244(98)00038-7
- Murakami, K., Noda, M., 1981. Studies on proteases from the digestive organs of sardine—purification and characterization of three alkaline proteases from the pyloric caeca. *Biochimica Biophysica Acta Part B*, 65: 17–26. doi:10.1016/0005-2744(81)90245-X
- Nakahara, C., Nozawa, H., Seki, N. 1999. A comparison of crosslinking of fish myofibrillar proteins by endogenous and microbial transglutaminase, *Fisheries Science*, 65: 138-144
- Nayak, J., Vishwanathan, P.G.N., Ammu, K., Susheela, M., 2003. Lipase activity in different tissues of four species of fish: rohu (*Labeo rohita* Hamilton), oil sardine (*Sardinella longiceps* Linnaeus), mullet (*Liza subviridis* Valenciennes) and Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta* Cuvier), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 1139–1142. doi:10.1002/jsfa.1515
- Neas, N.P. & Hazel, J.R. (1985). Partial purification and kinetic characterization of the microsomal phospholipase A2 from thermally acclimated rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *Journal of Comparative Physiology B*, 155: 461–469. doi:10.1007/BF00684676
- Neilsen, P.M., 1995. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents, *Food Biotechnology*, 9, 119-156. doi:10.1080/08905439509549889
- Ono, H., Iijima, N., 1998. Purification and characterization of phospholipase A2 isoforms from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*, *Fish Physiology and Biochemistry*, 18, 135–147. doi:10.1023/A:1007750618685
- Osness, K. K. , 1985. Peptide hydrolases of Antarctic krill *Euphausia superba*. Ph.D. Thesis, The Norwegian Institute of Technology, Dept. Biochemistry, Trondheim, Norway.
- Ouali, A., Garrel, N., Obled, A., Deval, C., Valin, C., 1987. Comparative action of cathepsin D, B, H, L and of a newly lysosomal cysteine proteinase on rabbit myofibrils, *Meat Science*, 19: 83–100. doi:10.1016/0309-1740(87)90014-3
- Raa, J., 1990. Biotechnology in aquaculture and the fish processing industry: a success story in Norway. In: *Advances in Fisheries Technology for Increased Profitability*, M. N. Voigt, and J. R. Botta (Ed.), Technomic Publication Company, Lancaster, PA, pp. 509–524.
- Raa, J., Gildberg, A., 1982. Fish Silage: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 16: 383-408. doi:10.1080/10408398209527341
- Raksakulthai, N., Lee, Y. Z., Haard, N. F., 1986. Effect of enzyme supplements on the production of fish sauce prepared from male capelin *Mallotus villosus*, *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 19: 28–33. doi:10.1016/S0315-5463(86)71377-1
- Rehbein, H., Danulat, E., Leineman, M., 1986. Activities of chitinase and protease and concentration of fluoride in the digestive tract of Antarctic fishes feeding on krill (*Euphausia superba* Dana), *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 85: 545–551. doi:10.1016/0300-9629(86)90444-5
- Shahidi, F., Kamil, J.Y.V.A., 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry, *Trends in Food Science & Technology*, 12: 435–464. doi:10.1016/S0924-2244(02)00021-3
- Shamsuzzaman, K., Haard, N. F., 1984. Purification and characterization of a chymosin-like protease from gastric mucosa of harp seal (*Paophilus groenlandicus*), *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 62: 699–708. doi:10.1139/c84-091
- Simpson, B.K., Haard, N.F., 1985. Extraction of carotenoprotein from shrimp processing offal with the aid of trypsin, *Journal of Applied Biochemistry*, 7: 212-222.
- Simpson, B. K., Smith, J. P., Haard, N. F., 1991. Marine enzymes. In: *Encyclopedia of Food Science and Technology*, Y. H. Hui (Ed.), John Wiley and Sons, NewYork, pp. 1645–1653.
- Smruti, K., Venugopal, V., 2003. Tenderized, dehydrated steaks of freshwater fish, Rohu: preparation and storage characteristics, *Fishery Technoogy (India)*, 40: 43-47.
- Stefansson, G., 1998. Enzymes in the fishing industry, *Food Technology*, 42(3): 64-68.
- Stefansson, G., Steingrimsdottir, U., 1990. Application of enzymes for fish processing in Iceland present and future aspects. In: *Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability*, M.N. Voigt, and J.R. Botta, (Ed.), Technomic, Lancaster, PA, pp. 237–250.
- Svenning, R., 1993. Biotechnological scaling of fish, *Info fish International*, 6: 30-35.
- Tocher, D.R., Webster, A., Sargent, J.R., 1986. Utilization of porcine pancreatic phospholipase A2 for the preparation of marine fish oil enriched in n-3 poly-unsaturated fatty acids, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 8: 675-679.
- Tsai, I. H., Lu, P., Chuang, J. L., 1991. The midgut enzymes of shrimp *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*, *Biochimica Biophysica*, 1080: 59–67. doi:10.1016/0167-4838(91)90112-D
- Wanasundara, U.N., Shahidi, F., 1997. Lipase assisted concentration of 3-polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 74: 1133–1136.
- Wang, Z., Taylor, K. D., Yan, X., 1992. Studies on the protease activities in Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) and their role in the phenolase activation process, *Food Chemistry*, 42: 111–116. doi:10.1016/0308-8146(92)90019-X
- Wang, S.L., Chio, S. H., 1998. Deproteinization of shrimp and crab shell with protease of *Pseudomonas aeruginosa* K 187, *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 629, Wiseman, A. 1987. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. 2. ed. John Wiley Sons, New York, EUA, 457 p.
- Wills, W.M., Lencki, R.W., Marangoni, G., 1998. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38: 639-674. doi:10.1080/10408699891274336
- Wiseman, A., 1987. The Application of Enzymes in Industry. In: *Handbook of Enzymes Biotechnology*, 2nd ed., Horwood, Chichester, pp. 274-373.
- Wong, T. Y., Preston, L. A., Schiller, N. L., 2000. Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications, *Annual Review of Microbiology*, 54: 289-340. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.289
- Voskresensky, N.A., 1965. Salting of herring. In: *Fish as Food*, Vol. 3, G. Borgstrom, (Ed.), Academic Press, London, pp. 107-120. doi:10.1016/B978-0-12-395571-5.50011-9
- Yasueda, H., Kumazawa, Y., Motoki, M., 1994. Purification and Characterization of a Tissue-type Transglutaminase from Red Sea Bream (*Pagrus major*), *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58 (11): 2041-2045. doi:10.1271/bbb.58.2041
- Zefirova, O. N., Mamaeva, A. V., Chupov, V. V., Valuev, L. I., Plate, N. A., 1996. Synthesis nad properties of immobilized collagenolytic protease from



- hepatopancreas of the king crab *Paralithoides camtschatica*, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 32: 461–464.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J., Bol, J., 1995. Microbial transglutaminase — a review of its production and application in food processing, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44: 277-282. doi:[10.1007/BF00169916](https://doi.org/10.1007/BF00169916)
- Zotos, A., Taylor, K. D. A., 1996. Partial purification and characterization of proteases from Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) and their role in the phenolase activation process, *Food Chemistry*, 56: 61–68. doi:[10.1016/0308-8146\(95\)00158-1](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00158-1)