

Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve sardalya (*Sardina pilchardus*) iç organlarından tripsin eldesi ve bazı fonksiyonel özelliklerinin tespiti

Extraction of trypsin enzyme from visceral organs of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) and determination of some functional characteristics

Boğaçhan Burak Erkan¹ • Şükran Çaklı^{2*}

¹ Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Bornova-İzmir, Türkiye

² Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Bornova-İzmir, Türkiye

 <http://orcid.org/0000-0002-0924-2116>

 <http://orcid.org/0000-0002-2419-9064>

*Corresponding author: sukrancakli@gmail.com

Received date: 12.07.2019

Accepted date: 01.10.2019

How to cite this paper:

Erkan, B.B. & Çaklı, Ş. (2020). Extraction of trypsin enzyme from visceral organs of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) and determination of some functional characteristics. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(1), 53-58. DOI: [10.12714/egejfas.37.1.07](https://doi.org/10.12714/egejfas.37.1.07)

Öz: Bu çalışmada hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve sardalya (*Sardina pilchardus*) iç organlarının besinsel kompozisyonu, iç organlardan elde edilen tripsin enziminin protein konsantrasyonu, tripsin aktivite tespiti, protein çözünürlüğü ve toz tripsinin renk değerleri incelenmiştir. İç organlar aseton ile homojenize edilip, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri sonucunda tripsin enzimi geri kazanılmıştır. İç organların besinsel kompozisyonu; hamsi iç organlarının nem oranı % 78,92 ± 0,11, kül oranı oranı % 2,26 ± 0,55, protein oranı % 10,82 ± 2,05, yağ oranı % 6,49 ± 0,55 olarak bulunmuştur. Sardalya iç organlarının nem oranı % 81,07 ± 1,03, kül oranı oranı % 0,71 ± 0,04, protein oranı % 5,08 ± 2,08, yağ oranı % 2,01 ± 0,17 olarak bulunmuştur. Hamsi iç organlarından elde edilen tripsinin enzim aktivitesi 0,064 U/ml, spesifik aktivitesi 0,17 U/mg, sardalya tripsinin enzim aktivitesi 0,051 U/ml, spesifik aktivitesi 0,19 U/mg olarak bulunmuştur. Enzim saflaştırma basamağında 1 kg hamsi iç organlarından 13,6 gr ve 1 kg sardalya iç organlarından 18,9 gr toz tripsin elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Tripsin enzimi, balık iç organı, hamsi, sardalya

Abstract: In this study, nutritional composition analysis of internal organs of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and sardine (*Sardina pilchardus*), trypsin activity determination of trypsin enzyme obtained from internal organs, protein solubility and color values of extracted trypsin parameters examined. Nutritional composition of internal organs: the moisture content of the anchovy internal organs 78.92±0.11 %, the ash 2.26±0.55 %, the protein 10.82±2.05 %, the fat 6.49±0.55 % were estimated. The moisture content of the sardine internal organs 81.07±1.03 %, the ash 0.71±0.04 %, the protein 5.08±2.08 %, the fat 2.01±0.17 % were estimated. Enzyme activity and specific activity of anchovy trypsin which are 0.064 U/mg, 0.17 U/ml were estimated, respectively. Enzyme activity of sardine trypsin as 0.051 U/ml and specific activity as 0.19 U/mg were estimated. In the enzyme purification step, 13.6 g of 1 kg anchovy and 18.9 g of powder trypsin were obtained from 1 kg sardine.

Keywords: Trypsin enzyme, fish internal organs, sardine, anchovy

GİRİŞ

Dünyada hamsi (*Engraulis sp.*) ve sardalya (*Sardina sp.*) türleri avcılığı yoğun yapılan türler arasında yer alır. Dünyada *Engraulis encrasicolus* türü 342609 ton ve *Sardina pilchardus* türü 1281391 ton avlanmıştır (FAO, 2016). Su ürünleri işleme tesisleri ve fabrikaları büyük miktarlarda katı atık ve atık su üretirler. Katı atıklar işleme yöntemine göre ham maddenin %15-60'ını oluşturabilir ve insan tüketimi için kullanılmayan; iç organlar, kafa, pul, deri, kan ve kılçıklardır. Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve sardalya (*Sardina pilchardus*) için de atık oranları üretilen son ürün için işleme yöntemine bağlı olarak %15-55 arasında değişmektedir. Çevre sorunlarına neden olan bu atıklar çoğu zaman yakılmakta veya denizlere atılmaktadır (Bozzano ve Sarda, 2002). Ülkemizde ise bu atıklar ya hiç kullanılmadan atılmakta ya da düşük ticari değerle yem sanayinde kullanılmaktadır. Günümüzde, balıklardan elde edilen atıklar, yüksek protein, yağ ve

mineraller açısından zengin ve bir çok biyaktif bileşikleri içerdiği için, yeni katı atık bertaraf yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır (Toppe vd., 2007; Kacem vd., 2011). Faid vd. (1997) yaptığı çalışmalar da atıklardan hayvanlar için protein değeri yüksek yemler üretmiştir. Endüstriyel biyoteknolojide ise; balık atıklarından, insan sağlığına yararlı balık yağları üretilmiştir (Kim vd., 2006; Zampolli vd., 2006; Chen vd., 2006). Üretilen bu yağlar gıda ürünleri ve içeceklerine ilave edilmiştir (Rubio-Rodriguez vd., 2010). Balıklardan çıkan deriler ve kılçıkların gıda, ilaç sanayi ve kozmetik sanayinde faydalı jelatin veya kondroitin sülfat üretimi için yararlı hammadde olabileceği belirtilmiştir (Blanco vd., 2006; Karim ve Bhat, 2009). Balık atıklarından iç organlar, proteazları içerirler ve proteazlar dünyada satılan enzimlerin %50'sini oluştururlar. (Khangembam vd., 2015; Klomklo vd., 2007). Zengin enzim kaynağı olan balık iç organları, düşük

konsantrasyonlarda yüksek katalitik aktivite sergilerler. Tripsin, pepsin, kimotripsin ve kollajenler balıklarda bulunan enzimlerdir. Balık iç organlarından çıkarılan bu enzimler ticari değere sahiptirler. Hayvansal sindirim sisteminde ki önemli proteazlardan biri de tripsindir (E.C. 3.4.21.4) Memelilerden elde edilen tripsin ile deniz canlılarından elde edilen tripsin arasında benzerlikler vardır. Amino asit bileşimi ve inhibitörlere duyarlılık bu benzerliklerdendir (Klomklo, 2008). Ayrıca tripsin iç organlarda bulunan önemli serin proteazlardan biridir. Arginin ve lisinin karboksil yanında ki peptid bağlarında parçalanmış tripsinin molekül ağırlığı 22-28 kDa arasında değişmektedir (Klomklo vd., 2007; Simpson, 2000). Tripsinin moleküler ağırlığı arasındaki farklar türler arası genetiğe bağlı olabilir (Lu vd., 2008). Tripsinler, çeşitli denizel canlılardan fiziksel, kimyasal ve enzimatik özelliklerine göre iyice izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Nil tilapyası (Menezes Estevam Alves ve Nascimento, 2016), altınbaş kefali (Bkhairia vd., 2015), beyaz ton balığı (Simpson vd., 2016), patlakgöz ton balığı (Poonsin vd., 2017), dikenli çütre gibi (Zamani ve Benjakul 2016). Khangembam vd., 2015'de yaptığı çalışmada tripsinin biyoteknolojideki önemini vurgulamıştır. Proteazların kullanım alanı oldukça geniştir. Deterjan sanayi, gıda, ziraat kimyası ve ilaç endüstrileri gibi çeşitli endüstrilerde farklı uygulama alanlarına sahiptir (Gupta vd., 2002; Zukowski, 1992). Bu çalışma kapsamında Türkiye'de yoğun bir şekilde avcılığı yapılan hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve sardalya (*Sardina pilchardus*) balıklarının işleme sonrasında geriye kalan iç organlarından tripsin enzimini elde edilerek bazı fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Araştırma için kullanılan materyal; hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve sardalya (*Sardina pilchardus*) türlerine ait iç organlardır. Hamsi ve sardalya balıklarına ait iç organlar; Ege denizinden 2018 yılı kış mevsiminde gırgır avcılık yolu ile yakalanan balıklardan İzmir- Buca'da bulunan bir işleme tesisinden elde edilmiştir. Temiz poşetler içerisinde 1 er kg'lık olarak ayrılmış ve strafor kutular ile, 1-1 buz oranı eklenerek Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi İşleme Laboratuvarı'na nakledilmiş ve -80 °C'de muhafazaya alınmıştır. Muhafazaya alınmasını takiben 1 hafta içerisinde iç organlardan tripsin üretimi gerçekleştirilmiştir.

Üretim metodu

Ham tripsin enzim ekstraktının hazırlanması

-80 °C'de depolanan iç organlar 4 °C'de çözündürüldükten sonra bıçak ile küçük parçalara ayrılarak üretime hazır hale getirilmiştir. Hamsi ve sardalya iç organları sıvı azot yardımı ile kurutulmuş ve Kishimura ve Hayashi (2002)'nin modifiye edilmiş metoduna göre (1:3) oranında aseton ile -20 °C'de 30 dk. homojen hale getirilmiştir. Homojen hale getiren örnekler whatman No. 4 filtre kağıdından geçirilerek filtre edilmiştir. Filtre kağıdından elde edilen kalıntı (1:2) oranında aseton ile -20 °C'de 30 dk. tekrar homojenize edilmiştir ve homojenize

kalıntı kuruyuncaya ve aseton kokusu gidene kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ham ekstraktı hazırlamak için, aseton ile muamele edilerek hazırlanmış olan toz, "başlangıç tamponu" olarak adlandırılan ve 1mM CaCl₂ içeren (1:50) oranındaki 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 içinde süspansiyon halinde tutularak ve 4 °C'de 3 saat boyunca sürekli karıştırılmıştır. Daha sonra süspansiyon 4 °C'de 10000 x g de 10 dk. süreyle doku kalıntılarının uzaklaştırılması için santrifüj edilerek elde edilen süpernatant toplanmıştır ve bu solüsyon "ham ekstrakt" olarak kullanılmıştır. Santrifüj işlemi tamamlandığında aseton basamağında uzaklaştırılmayan lipitler süpernatantın üst kısmında faz olarak ayrılmaktadır. Bu faz damlalık yardımıyla uzaklaştırılır. Lipitlerin iyi uzaklaştırılması gerekmektedir. Amonyum sülfat çöktürmesi basamağında santrifüj aşamasında pelletin toplanmasında sorun oluşturmaktadır. Pelletin bir kısmı dipte bir kısmı da yüzeyde toplanmaktadır. Kullanmadan önce liyofilize edilen örnek (10 gr) 50 mL soğuk distile su (4 °C) içinde çözündürülerek ve bu solüsyon "ham ekstrakt" olarak kullanılmıştır. Süpernatant liyofilize edilip saf suda çözülerek amonyum sülfat fraksiyonlamasına tabi tutulması aşaması çıkarılmıştır. Liyofilize edilip saf suda çözülmesi aşamasında aktivitede %40 civarında düşüş gözlemlendiği için bu aşama çıkarılmıştır.

Amonyum sülfat çöktürmesi ile fraksiyonların hazırlanması

Farklı doygunluk aralıklarındaki (% 0-20, 20-40, 40-60, 80-100) ham ekstrakt amonyum sülfat çöktürmesi işlemi uygulanmıştır. Amonyum sülfat eklendikten sonra karışım 4 °C'de ve 30 dk yavaşça karıştırılmıştır. Bundan sonra karışım 8000 x g de 4 °C ve 30 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen peletler en az hacimdeki 50 mM Tris-HCl, pH 8 'de çözündürülmüştür. Çözelti (1:20) oranında ekstraksiyon tamponuna karşı gece boyunca diyaliz tamponu 3 kez değiştirilmek suretiyle 4 °C'de diyalize edilmiştir. Diyalize edilmiş örnek buz içinde muhafaza edilmiştir ve bu örnek "amonyum sülfat fraksiyonu" olarak adlandırılmıştır (Khantaphant ve Benjakul, 2008).

Analizler

Tripsin aktivitesi tespiti

BAPNA substratı kullanılarak amidaz aktivitesi ölçülmüştür (Klomklo vd., 2006). Amidaz aktivitesi BAPNA substratı kullanılarak ölçülmüştür. 200 µl örnek 200 µl distile su ve 1000 µl reaksiyon tamponu (1mM CaCl₂ içeren, 50 mM Tris-HCl (pH 8) ile karıştırılarak ve reaksiyon, karışıma 200 µl 2 mg/ml BAPNA eklenerek başlatılmıştır. 60 °C'de ve 20 dk inkübasyondan sonra, 200 µl %30 asetik asit (v/v) eklenen reaksiyon sonlandırılmıştır. P-nitroanilin üretimi reaksiyon karışımının 410 nm'de absorbanası izlenerek ölçülmüştür. Kör örnek, aynı işlem sırası izlenerek fakat örnek %30 asetik asit eklendikten sonra eklenmek suretiyle hazırlanmıştır. 1 birim amidaz aktivitesi 410 nm'de absorbansta meydana gelen 1.0 artışa yol açan miktar olarak tanımlanmaktadır.

Tripsin aktivite ölçümü aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır.

$$\text{Activite (U/mL)} = \frac{(A-A_0) \times \text{Final volume of the mixture (ml)} \times 100}{8800 \times \text{Time of the reaction (min)} \times 0,2(\text{ml})}$$

A : Absorbans değeri

A₀ : Kör örneğin değeri

8800 : p-nitroaniline katsayısı

Protein konsantrasyonu

Protein konsantrasyonu tespiti [Lowry vd. \(1951\)](#) metoduna göre Bovin Serum Albumin standardı kullanılarak yapılmıştır.

Protein çözünürlüğü

Sıvı kısmın protein miktarını tespit etmek için Lowry metodu kullanılmıştır. Materyaldeki toplam protein miktarı 0.5 M NaOH de örneğin çözülmesinden sonra tespit edilmiş ve değerler aşağıdaki formül üzerinden hesaplanarak verilmiştir;

$$\text{Çözünürlük(\%)} = \frac{\text{Sıvı kısmın protein miktarı}}{\text{Örneğin toplam protein miktarı}} \times 100$$

Renk ölçümü

Spektropen (Hach-Lange GmbH & Co., Dusseldorf, Germany) renk ölçüm cihazı kullanılarak [Schubring \(2002\)](#) metodu ile gerçekleştirilmiştir. Renk ölçümü toz haldeki tripsin ekstratı üzerinden gerçekleştirilmiştir. Petri kaplarına yüzeyi pürüzsüz olacak şekilde aktararak toz örneklerde renk ölçümleri 10 tekrerr ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar CIE Lab sisteminde L* parlaklığı (0'dan 100'e kadar derecelendirme siyahtan beyaza); a*, (+) kırmızı veya (-) yeşil ve b*, (+) sarı veya (-) mavi skalasında verilmiştir.

Besinsel kompozisyon analizleri

Nem analizi [Ludorf ve Meyer \(1973\)](#)' e göre; kül analizleri [AOAC, 935.47, \(1984a\)](#)' ye göre; ham protein [AOAC, 981.10 \(1984b\)](#)' e göre; yağ analizi [Bligh ve Dyer \(1959\)](#)' a göre yapılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Tripsin aktivite tespiti

Enzim saflaştırma basamağında 1 kg hamsi iç organlarından 13,6 gr ve 1 kg sardalya iç organlarından 18,9 gr toz tripsin elde edilmiştir ([Tablo 1](#)). İki türünde yağlı olması elde edilen verimi olumlu yönde etkilerken diğer bir yandan enzim saflaştırma basamaklarından olan amonyum sülfat çöktürmesi işleminde, santrifüj işleminden sonra dipte değil üst tarafta toplanmasına neden olmuştur. Bu durum tuz uzaklaştırması için yapılan diyaliz basamağında membran

gözeneklerinin tıkanmasına neden olduğu için sorun çıkartmıştır. Bu sorun diyaliz süresinin uzatılması ile çözülmüştür.

Tablo 1. 1 kg iç organdan elde edilen toz Tripsin miktarları (gr)

Table 1. Amount of powder trypsin obtained in 1 kg of internal organs (g)

Türe Göre Elde Edilen Tripsin Miktarı (gr)	
Hamsi	Sardalya
13,6	18,9

Toz haldeki tripsin enzimi elde edildikten sonraki ilk gün aktivite tespiti yapılmıştır. Hamsi için tripsin enzim aktivitesi 0,064 U/ml, sardalya için 0,051 U/ml olarak bulgulanmıştır ([Tablo 2](#)).

Tablo 2. Hamsi ve sardalya'dan elde edilen enzim aktivite değerleri (U/ml)

Table 2. Enzyme activity values obtained from anchovy and sardine

Tripsin Enzimi Aktivitesi	
Hamsi (U/ml)	Sardalya (U/ml)
0.064	0.051

Protein konsantrasyonu

1 mg katıda hamsi ve sardalyadan elde edilen protein (mg/ml) sırasıyla 0,38 ve 0,27'dir. Spesifik aktivite değerleri ise hamsi 0,17 U/mg, sardalya 0,19 U/mg olarak ölçülmüştür ([Tablo 3](#)).

Tablo 3. 1 mg toz tripsindeki protein (mg/ml) ve spesifik aktivite (U/mg) değerleri

Table 3. Protein (mg / ml) and specific activity (U / mg) values in 1 mg powder trypsin

Örnek	Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Hamsi	0,38	0,17
Sardalya	0,27	0,19

Protein çözünürlüğü

Hamsi ve sardalya balığından elde edilen tripsinin protein çözünürlüğü hamsi için % 83,2, sardalya için % 78,3 olarak tespit edilmiştir ([Tablo 4](#)).

Tablo 4. Hamsi ve sardalya'dan elde edilen toz tripsinin protein çözünürlüğü (%)

Table 4. Protein solubility of powdered trypsin obtained from anchovy and sardine (%)

Protein Çözünürlüğü %	
Hamsi	Sardalya
% 83,2	% 78,3

Çaklı vd., (2018) çalışmasında çipura, levrek ve alabalık iç organlarından elde edilen enzimin mevsimsel depolama değerlerini, protein çözünürlüğünü, aktivite, spesifik aktivite ve protein değerlerini incelemiştir. Türlerin kış dönemine ait enzim aktiviteleri, çipura 0,030 U/ml, levrek 0,0254 U/ml, alabalık 0,021 U/ml olarak bulgulanmıştır. Spesifik aktivite, çipura için 0,043 U/mg, levrek için 0,05 U/mg ve alabalık için 0,037 U/mg olarak hesaplanmıştır. Protein miktarı, levrek 0,35 mg/ml, çipura 0,69 mg/ml ve alabalık için 0,57 mg/ml olarak ölçülmüştür. Protein çözünürlükleri, alabalık %87,68±0,08, levrek %91,11±0,35 ve çipura için %89,97±0,55 olarak bulgulanmıştır. Sila vd., (2012) yaptığı çalışmada, *Barbus callensis* iç organlarından tripsini 27 kat saflaştırmış ve %31'lik geri kazanım ile tripsinin spesifik aktivitesini 79 U/mg olarak bulmuştur. Aynı zamanda çalışmasında karides atıklarından elde edilen karotenoprotein besinsel kompozisyonunu %71.09 protein, % 16.47 lipit, % 7.78 kül ve % 1.79 kitin olarak bulgulanmıştır. Castillo-Yáñez vd., (2005), Monterey sardalyanın pilirik kesesinden, tripsinin amonyum sülfat, jel filtrasyon, afinite ve iyonik değişim kromatografisi ile fraksiyonlama ile saflaştırıldığını bildirmiştir. Heu vd., (1995), çalışmalarında hamsi iç organlarından saflaştırılarak elde edilen tripsin ve kymotripsin enzimlerinin SDS-PAGE ile tespit edilen moleküler ağırlıkları 25.6 ve 26.1 kDa olarak tespit edilmiştir. Bütün enzimler maksimal aktiviteyi kazein için pH 9.0 ve 45 °C'de gösterirken, sentetik özgenil için pH 8.0 ve 45 °C olarak tespit edilmiştir. Khaled vd., (2008) yaptıkları çalışmada sardalyanın iç organından amonyum sülfat fraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyonu, Sepharose mono Q anyon değişim kromatografisi, ultrafiltrasyon ve ikinci Sephadex G-75 jel filtrasyonu fraksiyonları ile tripsin enzimi saflaştırılmıştır ve spesifik aktivitesi 5,42 kat spesifik aktivitede yükselmiş ve %6.1 geri kazanım gerçekleşmiştir. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı eklüzyon kromatografisi ve SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat polikrilamid jel) elektroforezi kullanılarak 24 kDa olarak tespit edilmiştir. Bu saflaştırılmış enzim esterase-spesifik aktiviteyi N- α -benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) göstermiştir ki bu N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) üzerindeki amidase-spesifik aktivitesinden 4 kat daha büyüktür. Enzim aktivitesi için optimal pH ve sıcaklık BAEE substrat kullanılarak sırasıyla 8 ve 55 °C olarak tespit edilmiştir. Tripsinin BAPNA üzerindeki sabitli kinetikleri Km ve kcat sırasıyla 1.67mmol L⁻¹ ve 3.87 s⁻¹ olarak tespit edilirken katalitik verim 2.31 s⁻¹ L mmol⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

Besinsel kompozisyon

Hamsi ve sardalya iç organlarının besinsel kompozisyon verileri Tablo 5'te verilmiştir. Hamsi ve sardalya türlerinin iç organlarının ham protein oranları sırasıyla % 10,82 ve % 5,08 olarak bulgulanmıştır. Her iki iç organlarda yağ oranı hamsi için % 6,49 iken sardalya için % 2,00 bulgulanmıştır. Bunun yanında iç organların nem oranları hamsi için % 78,92 ve sardalya için % 81,07 bulunmuştur. Hamsi iç organlarında kül oranı % 2,26, sardalya iç organlarında kül oranı % 0,71 olarak bulunmuştur.

Tablo 5. Hamsi ve sardalya balığının besinsel kompozisyon oranları (%)
Table 5. Nutritional composition of anchovy and sardine (%)

Besinsel Kompozisyon	Hamsi	Sardalya
Nem	78,9279± 0,1123	81,0792± 1,0392
Kül	2,2681± 0,5510	0,7185± 0,0431
Protein	10,8241± 2,0506	5,0868± 2,0850
Yağ	6,4988± 0,5587	2,0064 ± 0,1798

Tengku-Rozaina vd (2018) sardalya fileto ve işleme yan ürünlerinin besinsel bileşimini nem, protein, yağ ve kül oranlarını (%) sırasıyla fileto 73.64; 19.43; 3.06 ve 1.49 olarak baş ve iskelet kısmında ise; 63.65; 13.64; 10.38 ve 11.47 olarak tespit etmişlerdir.

Balık iç organları, tripsin kaynağı olarak geniş bir biyoteknolojik potansiyele sahiptir. Bu enzimler, sıcaklıkları ve diğer özellikleri sıcakkanlı hayvanlardan gelen homolog proteinazlardan farklı olduğundan, gıda endüstrisi için birçok avantajlara sahip olabilir. Bu nedenle, visseral proteinazlar balık yetiştiriciliğinden katma değerli bir ürün olarak izole edilebilir ve deniz kaynaklarının kullanımını en üst düzeye çıkarmak için gıda endüstrisinde işleme yardımcıları olarak kullanılabilir (Bougatef, 2013).

Renk

Hamsi ve sardalya iç organlarından elde edilen tripsin enziminin L*, a* ve b* renk değişimleri Tablo 6'da verilmiştir. Hamsi'den elde edilen tripsin enziminin L* renk değeri 82,53 tespit edilmiştir. Sardalyadan elde edilen tripsin enziminin L* renk değeri 73,69 tespit edilmiştir. Hamsi'den elde edilen tripsinin a* renk değeri 2,29, sardalyadan elde edilen tripsinin a* değeri 2,08 olarak tespit edilmiştir. Sardalya'dan elde edilen b* değeri 24,01 hamsiden elde edilen b* değeri 21,24 tespit edilmiştir. Çaklı vd., (2018) levrek, çipura ve alabalıktan elde edilen tripsinin mevsimsel renk ve depolama kararlılığını incelemiştir. Türlerin kış dönemine ait örneklerinin üretimden hemen sonra ölçülen renk değerleri, alabalık için L* değeri 49,70±0,46, a* değeri 4,97±0,24 ve b* değeri 21,31±1,15, çipura için L* değeri 65,02±0,52, a* değeri 5,20±0,16 ve b* değeri 27,59±0,48, levrek için L* değeri 68,73±0,81, a* değeri 4,90±0,16 ve b* değeri 23,93±1,22 olarak bulgulanmıştır.

Tablo 6. Hamsi ve sardalya iç organlarından elde edilen tripsin enziminin renk değerleri

Table 6. Color values of trypsin enzyme obtained from anchovy and sardine internal organs

	L*	a*	b*
Hamsi	82,53 ± 0,81	2,29 ± 0,17	21,24 ± 0,61
Sardalya	73,69 ± 1,48	2,08 ± 0,24	24,01 ± 0,88

SONUÇ

Bu araştırmada hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve sardalya (*Sardina pilchardus*) i organlarının besinsel kompozisyonu, i organlardan elde edilen tripsin enziminin protein konsantrasyonu, tripsin aktivite tespiti, protein çözünürlüğü ve toz tripsinin renk değerleri incelenmiştir. Hamsi i organlarından elde edilen tripsinin enzim aktivitesi 0,064 U/ml, spesifik aktivitesi 0,17 U/mg, sardalya tripsinin enzim aktivitesi 0,051 U/ml, spesifik aktivitesi 0,19 U/mg olarak bulgulanmıştır. İç organların besinsel kompozisyonu; hamsi i organlarının nem % 78,92 ± 0,11, kül % 2,26 ± 0,55, protein % 10,82 ± 2,05, yağ % 6,49 ± 0,55 olarak bulgulanmıştır. Sardalya i organlarının nem % 81,07 ± 1,03, kül % 0,71 ± 0,04, protein % 5,08 ± 2,08, yağ % 2,01 ± 0,17 olarak bulgulanmıştır. Enzim saflaştırma basamağında 1 kg hamsi i organlarından 13,6 gr ve 1 kg sardalya i organlarından 18,9 gr toz tripsin elde edilmiştir.

KAYNAKA

- AOAC, (1984a). Official Methods of Analyses, Method 935.47. *Association Official Analytical Chemists*, Washington, DC., USA.
- AOAC, (1984b.) Official Methods of Analyses, Method 981.10. *Association of Official Analytical Chemists*, Washington, DC., USA.
- Bkhaireh, I., Khaled, H.B., Ktari, N., Miled, N., Nasri, M. & Ghorbel, S. (2015). Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability. *Food Chemistry*, 196, 1346-1354. DOI: [10.1016/j.foodchem.2015.10.058](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.058)
- Blanco, M., Sotelo, C.G., Chapela, M.J. & Perez-Martin, R.I. (2006). Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. *Trends Food Science Technology*, 18, 29–36. DOI: [10.1016/j.tifs.2006.07.015](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.07.015)
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917. DOI: [10.1139/y59-099](https://doi.org/10.1139/y59-099)
- Bougatef, A. (2013). Trypsins from Fish Processing Waste: Characteristics and Biotechnological Applications-Comprehensive Review. *Journal of Cleaner Production*, 57, 257–265. DOI: [10.1016/j.jclepro.2013.06.005](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.06.005)
- Bozzano, A. & Sarda, F. (2002). Fishery Discard Consumption Rate and Scavenging Activity in the Northwestern Mediterranean Sea. *The International Council for the Exploration of the Sea Journal of Marine Science*, 59, 15–28. DOI: [10.1006/jmsc.2001.1142](https://doi.org/10.1006/jmsc.2001.1142)
- Çaklı, ř., Yünlü, A.C., Yılmaz, ř.T. & Yılmaz, ř.B. (2018). Kültür ipura (*Sparus aurata*), Levrek (*Dicentrarchus labrax*), ve Alabalığın (*Oncorhynchus mykiss*) İ Organlarından Tripsin Eldesi ve Farklı Depolama Sıcaklıklarının ve Mevsimsel Farklılıklarının Elde Edilen Toz Haldeki Tripsinin Depolama Kararlılığı Üzerindeki Etkisi. TUBİTAK Program Kodu 1001, Proje No: 2140569.
- Castillo-Yáñez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F.L. & Navarrete-Del Toro, M. de los Á. (2005). Isolation and Characterization of Trypsin from Pyloric Caeca of Monterey Sardine *sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140(1), 91–98. DOI: [10.1016/j.cbpc.2004.09.031](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.031)
- Chen, C.C., Chaung, H.C., Chung, M.Y. & Huang, L.T. (2006). Menhaden fish oil improves spatial memory in rat pups following recurrent pentylene-tetrazole-induced seizures. *Epilepsy & Behavior*, 8, 516–521. DOI: [10.1016/j.yebbeh.2006.01.004](https://doi.org/10.1016/j.yebbeh.2006.01.004)
- Faid, M., Zouiten, A., Elmarrakchi, A. & Achkari-Begdouri, A. (1997). Biotransformation of fish waste into a stable feed ingredient. *Food Chemistry*, 60, 13–18. DOI: [10.1016/S0308-8146\(96\)00291-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00291-9)
- FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture. SOFIA, Roma.

Hidrolitik enzimler balıkların sindirim sisteminde bolca bulunur. Balık iç organları tripsin proteazları gibi önemli bir sinirim enzimi kaynağıdır. Bu enzimler gıda sanayinde, çözünürlük, dayanıklılık ve kalite üretimini geliştirmek için kullanılırlar. Hamsi ve sardalya tripsininin fonksiyonel özellikleri, bu enzimin gıda sanayi ve işleme sanayinde biyoteknolojik araç olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Biyolojik katalizör olarak ilaç, deterjan, gıda ve çevre uygulamalarında tripsin enziminin kullanımı mümkündür.

TEŐEKKÜR

Bu alışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 16-BİL-013. Bu alışma ayrıca “49th West European Fish Technologists Association (WEFTA) Conference” da poster olarak sunulmuştur.

- Gupta, R., Gupta, K., Saxena, R.K. & Khan, S. (1999). Bleach-Stable, Alkaline Protease from *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 21, 135–138. DOI: [10.1023/A:1005478117918](https://doi.org/10.1023/A:1005478117918)
- Hau, P.V. & Benjakul, S. (2006). Purification and Characterization of Trypsin from Pyloric Caeca of Bigeye Snapper (*Pracanthus macracanthus*). *Journal of Food Biochemistry*. 30, 478–495. DOI: [10.1111/j.1745-4514.2006.00089.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2006.00089.x)
- Heu, M.S., Kim, H.R. & Pyeon, J.H. (1995). Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(3), 557-567. DOI: [10.1016/0305-0491\(95\)00111-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00111-5)
- Hjelmeland, K. & Raa, J. (1982). Characteristics of Two Trypsin Type Isozymes Isolated from Arctic Capelin (*Mallotus villosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 71B, 557–562. DOI: [10.1016/0305-0491\(82\)90462-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90462-X)
- Kacem, M., Sellami, M., Kammoun, W., Frikha, F., Miled, N. & Ben Rebah F. (2011). Seasonal variations of chemical composition and fatty acid profiles of viscera of three marine species from the Tunisian coast. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 20, 233–246. DOI: [10.1080/10498850.2011.560365](https://doi.org/10.1080/10498850.2011.560365)
- Karim, A.A. & Bhat, R. (2009). Fish Gelatin: Properties, Challenges, and Prospects as an Alternative to Mammalian Gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23, 563–576. DOI: [10.1016/j.foodhyd.2008.07.002](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002)
- Khaled, H.B., Bougatef, A., Balti, R., Triki-Ellouz, Y. & Souissi, N. (2008). Isolation and Characterization of Trypsin from Sardinelle (*Sardinella aurita*) Viscera. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 88, 2654–2662. DOI: [10.1002/jfsa.3386](https://doi.org/10.1002/jfsa.3386)
- Khangembam, B.K. & Chakrabarti, R. (2015). Trypsin from the Digestive System of Carp *Cirrhinus mrigala*: Purification, Characterization and its Potential Application. *Food Chemistry*, 175, 386–394. DOI: [10.1016/j.foodchem.2014.11.140](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.140)
- Khantaphant, S. & Benjakul S. (2008). Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 151(4), 410-419. DOI: [10.1016/j.cbpb.2008.08.011](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.08.011)
- Kim, Y.J., Kim, H.J., No, J.K., Chung, H.Y. & Fernandes, G. (2006). Anti-inflammatory action of dietary fish oil and calorie restriction. *Life Sciences*, 78, 2523–2532. DOI: [10.1016/j.lfs.2005.10.034](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.034)

- Kim, S.K. & Mendis, E. (2005). Bioactive Compounds from Marine Processing Byproducts – A Review. *Food Research International*, 39, 383-393. DOI: [10.1016/j.foodres.2005.10.010](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.10.010)
- Kismuhara, H. & Hayashi, K. (2002). Isolation and characteristics of trypsin from the pyloric caeca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 132B, 485-490. DOI: [10.1016/S1096-4959\(02\)00062-3](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00062-3)
- Khandagale, A.S., Sarojini, B.K., Kumari, S.N., Joshi, S.D.S. & Nooralabettu, K. (2015). Isolation, purification, and biochemical characterization of trypsin from indian mackerel (*Rastralliger kanagurta*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(4), 354-367. DOI: [10.1080/10498850.2013.777864](https://doi.org/10.1080/10498850.2013.777864)
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. & Simpson, B.K. (2006). Purification and Characterization of Trypsin from the Spleen of Tongol Tuna (*Thunnus tonggol*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5617-5622. DOI: [10.1021/jf060699d](https://doi.org/10.1021/jf060699d)
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. & Simpson, B.K. (2007). Extraction of Carotenoprotein from Black Tiger Shrimp Shells with the Aid of Bluefish trypsin. *Journal of Food Chemistry*, 33, 201-217. DOI: [10.1111/j.1745-4514.2009.00213.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00213.x)
- Klomklao, S., Kishimura, H. & Benjakul, S. (2008). Endogenous Proteinases in True Sardine (*Sardinops melanostictus*). *Food Chemistry*, 107, 213-220 DOI: [10.1016/j.foodchem.2007.08.007](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.007)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fan, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 256-275.
- Lu, B.J., Zhou, L.G., Cai, Q.F., Hara, K., Maeda, A., Su, W.J. & Cao, M.J. (2008). Purification and Characterisation of Trypsins from the Pyloric Caeca of Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chemistry*, 110(2), 352-360 DOI: [10.1016/j.foodchem.2008.02.010](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.010)
- Ludorff, W. & Meyer, V. (1973). *Fische und Fisherzeugnisse*. Z. Auflage, Verlag Paul Parey In Berlin und Hamburg, 209-210.
- Menezes Estevam Alves, M.H. & Nascimento, G.A. (2016). Trypsin Purification Using Magnetic Particles of Azocasein-Iron Composite. *Food Chemistry*, 226, 75-78. DOI: [10.1016/j.foodchem.2016.12.094](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.094)
- Rubio-Rodriguez, N., Beltran, S., Jaime, I., de Diego, S.M., Sanz, M.T. & Carballido, J.R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A Review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11,1-12 DOI: [10.1016/j.ifset.2009.10.006](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.006)
- Schubring, R. (2002). Double freezing of cod fillets: Influence on sensory, physical and chemical attributes of battered and breaded fillet portions. *Nahrung / Food*, 46(4): 227-232. DOI: [10.1002/1521-3803](https://doi.org/10.1002/1521-3803)
- Shahidi, F. & Janak Kamil, J.Y.V.A. (2001). Enzymes from Fish and Aquatic Invertebrates and their Application in the Food Industry. *Trends Food Science Technologie*, 12, 435-464. DOI: [10.1016/S0924-2244\(02\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00021-3)
- Sila, A., Nasri, R., Jridi, M., Balti, R., Nasri, M. & Bougatef, A. (2012). Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. *Food Chemistry*, 132(3), 1287-1295. DOI: [10.1016/j.foodchem.2011.11.105](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.105)
- Simpson, B.K. (2000). Digestive Proteinases from Marine Animals. In: *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. Haard, N.F., and Simpson, B. K. (Eds.) New York, NY: Marcel Dekker. 531-540.
- Poonsin, T., Sripokar, P., Benjakul, S., Simpson, B.K., Visessanguan, W. & Klomklao, S. (2017). Major trypsin like-serine proteinases from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) spleen: Biochemical characterization and the effect of extraction media. *Journal of Food Biochemistry*, 41(2), e12323. DOI: [10.1111/jfbc.12323](https://doi.org/10.1111/jfbc.12323)
- Tengku-Rozaina, T.M., Jeng, W.W. & Amiza, M.A. (2018). Nutritional composition and thermal properties Of goldstripe sardinella (*Sardinella gibbosa*) fillets and by-products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(6), 667-679. DOI: [10.1080/10498850.2018.1483991](https://doi.org/10.1080/10498850.2018.1483991)
- Toppe, J., Albrektsen, S., Hope, B. & Aksnes, A. (2007). Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 146(3), 395-401. DOI: [10.1016/j.cbpb.2006.11.020](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.11.020)
- Zamani, A. & Benjakul, S. (2016). Trypsin from unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) pyloric caeca: purification and its use for preparation of fish protein hydrolysate with antioxidative activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(3), 962-969. DOI: [10.1002/jsfa.7172](https://doi.org/10.1002/jsfa.7172)
- Zampolli, A., Bysted, A., Leth, T., Mortensen, A., De Caterina, R. & Falk, E. (2006). Contrasting effect of fish oil supplementation on the development of atherosclerosis in marine models. *Atherosclerosis*, 184, 78. DOI: [10.1016/j.atherosclerosis.2005.04.018](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.04.018)
- Zhou, L., Budge, S.M., Ghaly, A.E., Brooks, M.S. & Dave, D. (2011). Extraction, Purification and Characterization of Fish Chymotrypsin. A Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 7(3), 104-123. DOI: [10.3844/ajbbsp.2011.104.125](https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2011.104.125)
- Zukowski, M.M. (1992). Production of Commercially Valuable Products. In: Doi, R.H., Mc Gloughlin, M. (Eds.), *Biology of Bacilli: Application to Industry*. Butterworth-Heinemann, London. 311-337.