

PAPER DETAILS

TITLE: Ergin ve Ergin Olmayan Gkkusagi Alabaligi Oncorhynchus mykiss'in (Osteichthyes: Salmonidae) Karaciger Lipaz Enzimi (E.C 3.1.1.3) Aktivitesinin Belirlenmesi

AUTHORS: Mehmet Ali AKPINAR,Salih GRGN,Seker DAG

PAGES: 101-106

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/214602>

Ergin ve Ergin Olmayan Gökkuşluğu Alabalığı *Oncorhynchus mykiss*'in (Osteichthyes: Salmonidae) Karaciğer Lipaz Enzimi (E.C 3.1.1.3) Aktivitesinin Belirlenmesi

Mehmet Ali AKPINAR, Salih GÖRGÜN*, Şeker DAĞ

*Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 58140 Kampus
Sivas*

Özet: Bu çalışmada, ergin ve ergin olmayan *Oncorhynchus mykiss*' in karaciğer lipaz (E.C 3.1.1.3) enzimi aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ergin ve ergin olmayan *O. mykiss* karaciğer lipazını saflaştırma işlemleri 3 adımdan oluşmuştur: Homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, Diethylamino ethyl (DEAE) selülozik iyon değişim kromatografisi. Saflaştırma işlemleri boyunca, ergin balıkların karaciğerlerinden elde edilen lipaz enziminin spesifik aktivitesi 2.23 ± 1.59 $\mu\text{mol/mg}$ protein, verimi %0.037 ve saflaştırma katsayısı 2.65 ± 1.94 olarak belirlenmiştir. Ergin olmayan balıklarda ise spesifik aktivite 1.86 ± 0.14 $\mu\text{mol/mg}$ protein, verim % 3.24 ± 0.51 ve saflaştırma katsayısı 15.50 ± 1.13 bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Oncorhynchus mykiss*, karaciğer, lipaz, saflaştırma

Determination of Liver Lipase Enzyme Activity (E.C 3.1.1.3) of Mature and Immature Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Osteichthyes: Salmonidae)

Abstract: In this study, determination of liver lipase activity of mature and immature *Oncorhynchus mykiss* has been purposed. Liver lipase (E.C 3.1.1.3) purification process from mature and immature *O. mykiss* consisted of three steps: Preparation of homogenate, ammonium sulfate precipitation, Diethylamino ethyl (DEAE) cellulose ion exchange chromatography. Through the purification procedure, liver lipase enzyme of mature fish was purified with a yield of $0.037 \pm 0.06\%$ and a purification coefficient of 2.65 ± 1.94 , having the specific activity of 2.23 ± 1.59 $\mu\text{mol/mg}$ protein. From immature fish, the enzyme was purified with a yield of $3.24 \pm 0.51\%$ and a purification coefficient of 15.50 ± 1.13 , having the specific activity of 1.86 ± 0.14 $\mu\text{mol/mg}$ protein.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*, liver, lipase, purification.

Giriş

Lipazlar (triacylglycerol acylhydrolase; (E.C 3.1.1.3) triağılglicerollerin serbest yağ asitleri ve gliserole hidrolizini katalizler ve hayvan, bitki ve mikroorganizmalar arasında geniş bir dağılım göstermektedirler [1-3]. Lipazlar farklı metotlar kullanılarak, memeli, bakteri, mantar ve bitkisel kaynaklardan saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış lipazlar moleküler hacimleri, metal bağlama kapasiteleri, glikozid ve fosfor içerikleri ve substrat spesifiteleri için karakterize edilmişlerdir. Birkaç lipazın birincil yapısı amino asit veya nükleik asit dizilerinden belirlenmiştir. Günümüze kadar sekansı yapılan lipazlar, tümünde muhafaza edilen Gly-X-Ser-X-Gly bölgesini içeren dizi

* sgorgun@cumhuriyet.edu.tr

benzerliklerini paylaşmaktadırlar ve serin grubunun substrata bağlanmada esansiyel olduğu belirtilmektedir [4]. Balıklarda lipazlar üzerine yapılan son çalışmalar, memelilerde iyi bilinmekte olan sindirime ait lipolizisi kapsamaktadır. Balıklarda çeşitli lipaz aktiviteleri özefagus, mide, pilorik çeka, karaciğer, ince barsak, pankreas ve hepatopankreasta belirlenmiş ve sindirim kanalı dokuları arasında lipaz aktivitesinin türlerde farklılık gösterdiği bildirilmiştir [5]. Lipaz enziminin elde edilmesi ve saflaştırılması ile ilgili birçok araştırma yapılmasına rağmen, bu enzimin dokularda düşük miktarlarda bulunması ve dayanıksız olması nedeniyle henüz saf olarak elde edilememektedir [6]. Mikrobiyal lipazların saflaştırılmasının çok adımlı kromatografik yöntemleri gerektirdiğini ve günümüz endüstrilerinin ucuz, hızlı, yüksek ürün veren ve geniş ölçekli saflaştırma stratejileri aradığı belirtilmektedir [7].

Bu çalışmada, ergin ve ergin olmayan *Oncorhynchus mykiss*'in karaciğer lipaz (E.C 3.1.1.3) enziminin saflaştırılması ve aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Örnek seçimi

Çalışmada kullanılan *Oncorhynchus mykiss* örnekleri Gürün (Sivas) Kayapınar alabalık üretim tesislerinden sağlanmıştır. Kromatografik işlemler dahil tüm ön denemelerde kullanılmak üzere eşeyssel olgun balıklardan 8 adet (ağırlık 474 ± 32.17 g ve boy 32.75 ± 1.27 cm), eşeyssel olgunlaşmamış balıklardan ise 28 adet (ağırlık 60.67 ± 7.11 g ve boy 16.23 ± 0.93 cm) balık kullanılmıştır.

Dokuların Homojenize Edilmesi

Ergin balıklara ait toplam 8.221 g ve toplam 17.23 g olan ergin olmayan balıklara ait karaciğer dokusu saklandıkları dondurucudan (-70 °C) alınıp çözünene kadar $+4$ °C de bekletildi. Gerek ergin gerekse ergin olmayan balıklar için doku, buzlu ortamda makas vasıtasıyla parçalandıktan sonra, ağırlığının 5 katı hacminde ve pH 7.80 olan 50 mM lık Tris HCl (0.25 mM mannitol, 1 mM etilendiamintetra asetik asit sodyum tuzu (Na_4EDTA) ilaveli) homojenizasyon tamponu içerisinde Electromag M 11 tipi homojenizatörle 1500 devir/dk hızla birkaç vuruşla homojenizasyon yapılmıştır.

Santrifüjleme İşlemleri

Uygun tampon içerikleri ile homojenleştirilen doku örnekleri $r_{avj}=5.6$ olan SANYO MSE MS 60 marka yüksek hız kapasiteli soğutmalı diferansiyel santrifüjleme tekniği ile santrifüj edilmiştir. Bu amaçla ergin balıklara ait karaciğer dokusu öncelikle 4.000 rpm de, ergin olmayan balıklara ait karaciğerler ise 11.000 rpm de 15 dk $+4$ °C de santrifüj edilmiştir. Bu işlemle elde edilen fraksiyonlar, tortu I ve üst sıvı I olarak adlandırılmıştır. Üst sıvı I den önce cam elyafı huni yardımıyla yağ tabakası ve kaba bileşenler uzaklaştırılmıştır. Buradan elde edilen süzöntü aktivite ve protein miktarı ölçüldükten sonra daha ileri santrifüjlemeye tabi tutulmuştur. Bu amaçla süzöntü, 32.000 rpm ($105.000 \times g$) de ve $+4$ °C de 60 dk süreyle aynı başlık tipi ile santrifüjlenmiştir. Bu uygulama sonunda elde edilen çökelek tortu II, üst kısım ise üst sıvı II olarak adlandırılmıştır. Her iki fraksiyon örneklerinin protein ve enzim aktiviteleri saptanmıştır. Spesifik aktivitesi yüksek bulunan üst sıvı II daha ileri saflaştırma çalışmaları için seçilmiştir. Sonraki bütün santrifüj işlemlerinde aynı teknik kullanılmıştır.

Amonyum Sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ Protein Çöktürmesi

Proteinleri çöktürmek amacıyla amonyum sülfat iki aşamalı olarak uygulanmıştır. İlk aşamada üst sıvı II ye toplam hacminin %10 u oranında amonyum sülfat, 0 °C de 30 dk süreyle ortama yavaş yavaş ilave edilerek çözündürülmüştür. Elde edilen amonyum sülfatlı çözelti, 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda bekletildikten sonra 12.000 g de 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen alt çökelti kısmı tortu III, üst kısım ise üst sıvı III olarak adlandırılmıştır. Üst fazda kalan tüm proteinleri çöktürmek amacıyla %10 luk homojenat ortamını %60 (ergin balıklar için %70) yapmak için gerekli olan amonyum sülfat miktarı aynı şartlar altında fakat 2 saat süreyle homojenat ortamına manyetik karıştırıcı eşliğinde eklenmiştir. Bu işlemle elde edilen çözelti 12.000 g de 15 dk süreyle santrifüjlenmiş ve tüm proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen %10 ve %60 ve 70 lik tortular birkaç katı başlangıç homojenat tamponunda (pH 7.80 olan 50 mM

Tris HCl, 0.25 mM mannitol, 1 mM Na₄EDTA) çözündürülmüştür. Daha ileri uygulamalarda %60-70 amonyum sülfat doygunluğa eriştirilmiş olan tortu kısmı kullanılmak üzere + 4 °C de saklanmıştır.

Enzim Aktivite Tayinleri

Enzim aktivite tayinleri Değerli ve Akpınar [8] uyarınca yapılmış ve kromojenik bir bileşik olan para-nitro fenil asetat (pNPA) substrat olarak seçilmiştir. Enzim aktivitesi belirleme çalışmalarında pH 8.0 olan 50 mM Tris-HCl (% 4 etil alkol ve %1 asetonitril katkılı) tamponu aktivite tamponu olarak kullanılmıştır.

Protein Miktarı Belirlenmesi

Çalışmada protein miktarlarını tayin etmek için, Bovine Serum Albumine (BSA) standart olarak kullanılıp, 660 nm dalga boyunda örnek absorbansları okunarak çözeltilerdeki protein miktarları tayin edilmiştir [9].

DEAE Selülozik İyon Değişim Kromatografisi

Bu işlemde daha sonraki bütün uygulamalarda kullanılmak üzere stok DEAE selüloz iyon değiştirici aktive edilmiştir. Bunun için 20 gr toz halindeki selülozik iyon değiştirici Peterson (1980)' in önerdiği uygulama esas alınarak aktivite edilmiş ve distile su ile pH 7 olana dek yıkandıktan sonra kullanılmıştır. Aktive edilmiş materyal bir pipet vasıtasıyla kolona yerleştirildikten sonra, kolon öncelikle distile su ile iyice yıkanmıştır. Daha sonra kolon dengeleme solüsyonu olan pH 7.80, 20 mM Tris-HCl (0.25 mM mannitol, 1 mM Na₄EDTA) tamponunun 200 mL si ile kolon iyice yıkandıktan sonra 10 mg/mL konsantrasyonlu olacak şekilde hazırlanan numune kolona uygulanmıştır. Uygulama sonrasında yukarıda içeriği verilen dengeleme solüsyonuyla kolon yıkanıp örneğin kolona bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra kolona bağlanmış olan proteini geri almak amacıyla kolon, 20 mM Tris-HCl çözeltisi içerisinde hazırlanan 100, 300, 600 ve 900 mM NaCl tuz gradienti ile yıkanmıştır. Elde edilen 5 er mL lik elüsyon serilerinde 280 nm dalga boyunda protein, 418 nm dalga boyunda ise aktivite çalışmaları yapılmıştır.

Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmada elde edilen ortalamalar ve seçilen parametrelerdeki enzim aktiviteleri arasındaki farkın istatistiksel kontrolünde, Microsoft Excel programı kullanılmıştır.

Sonuçlar ve Tartışma

Ergin *Oncorhynchus mykiss* karaciğer lipazını saflaştırmak amacıyla 8.221 g, ergin olmayan karaciğer lipazının saflaştırılmasında ise 17.23 g yaş ağırlık ile başlanılan çalışma sonucunda protein konsantrasyonları ve enzim aktiviteleri elde edilmiştir. Bu uygulamalarla ilgili veriler Tablo 1 ve Tablo 2 de özetlenmiştir. Gerek ergin gerekse ergin olmayan balıkların karaciğer lipaz enzimini saflaştırmak amacıyla DEAE selülozik iyon değişimi kromatografisi yöntemi her iki gruba ayrı olarak uygulanmıştır. Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmalarından elde edilen elüsyon profillerine ait bilgiler ergin balıklar için Şekil 1, ergin olmayan balıklar için ise Şekil 2 de sunulmuştur.

Ergin balıkların karaciğerinde ilk saflaştırma adımında homojenatın kaba partikülce zengin olması nedeniyle 4.000 rpm de ilk kademe santrifüjleme yapılmıştır. Bu işlem ile 0.84 ± 1.26 µmol/mg protein değerinde spesifik aktivite kaydedilmiştir. Ergin olmayan balıklarda ise, ilk kademe santrifüjleme 11.000 rpm de yapılmış ve 0.14 ± 0.11 µmol/mg protein' lik bir spesifik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

Her iki balık grubunda ilk kademe santrifüjlemeyle elde edilen üst sıvı I fraksiyonlarının 32.000 rpm de santrifüjlenmesiyle elde edilen üst sıvı II değerlendirildiğinde, ergin balıklarda karaciğer lipazının spesifik aktivitesinin (0.89 ± 0.34 µmol/mg protein) ergin olmayan balık grubundakinden (0.14 ± 0.26 µmol/mg protein) daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Saflaştırılması arzulanan lipaz enziminin sitosolik lokalizasyon gösterdiğine dair birçok kanıt bulunmaktadır ve bununla ilgili olarak başta alabalık adipöz dokusu olmak üzere, homoiterm ve poikiliterm canlılardan değişik türlerde benzer bulgular elde edilmiştir [10-12]. 32.000 rpm santrifüjleme sonucunda üst sıvıda belirlenen lipaz aktivitesinin, ilk kademe (4.000 ve 11.000 rpm)

santrifüjlemelerden daha yüksek bulunması yukarıdaki literatür bilgilerini doğrular nitelikte olup, enzimin sitosolik lokalizasyon gösterdiğini kanıtlamaktadır. Buna karşın, bu saflaştırma kademesinde ergin olmayan balıklarda elde edilen saflaştırma katsayısı 1.16 ± 0.09 luk bir değerle ergin balıklarinkinden (1.05 ± 0.07) yüksek bulunmuştur.

Tablo 1. Ergin *Oncorhynchus mykiss* karaciğer lipazı saflaştırma basamakları

Kesitler	Protein Miktarı (mg/mL) (Ort.±S.H.) [†]	Toplam Hacim (mL)	Toplam Protein (mg) (Ort.±S.H.)	Enzimatik Aktivite $\mu\text{mol/mL/dk}$ (Ort.±S.H.)	Toplam Aktivite (μmol) (Ort.±S.H.)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/mg}$ protein) (Ort.±S.H.)	% Verim (Ort.±S.H.)	Saflaştırma Katsayısı (Ort.±S.H.)
4000 rpm üst sıvı I	7.72±0.14	36	277.92±0.73	6.45±1.18	232.20±3.16	0.84±1.26	100.00	1.00
32.000 rpm üst sıvı II	4.84±0.04	32	154.88±0.22	4.33±0.77	138.56±2.24	0.89±0.34	59.67±0.13	1.05±0.07
% 70 Amonyum sülfat tortusu	3.84±0.21	8	30.72±0.63	3.93±0.34	31.44±0.77	1.02±0.16	13.54±0.34	1.21±0.11
Diyalizat	1.64±0.17	12	19.68±0.16	2.75±0.07	33.00±1.18	1.67±0.83	14.21±0.28	1.98±0.59
DEAE iyon değişim kromatografisi	0.26±0.03	15	3.9±0.04	0.58±0.09	8.7±0.37	2.23±1.59	0.037±0.06	2.65±1.94

[†]: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. (Ort.±S. H.): Ortalama ± Standart Hata.

Tablo 2. Ergin olmayan *Oncorhynchus mykiss* karaciğer lipazı saflaştırma basamakları

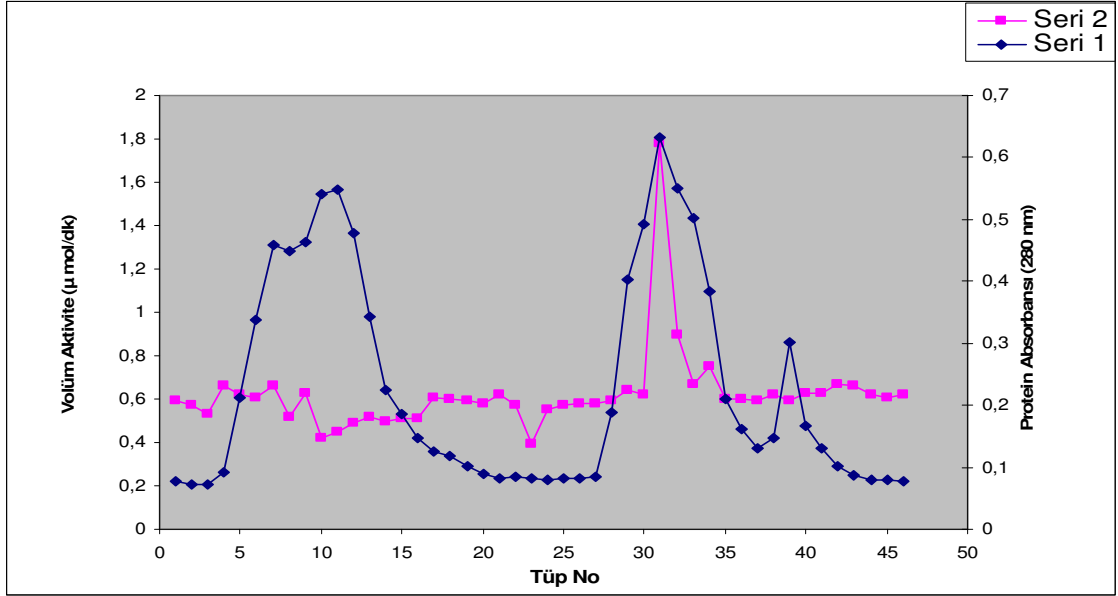
Kesitler	Protein Miktarı (mg/mL) (Ort.±S.H.) [†]	Toplam Hacim (mL)	Toplam Protein (mg) (Ort.±S.H.)	Enzimatik Aktivite $\mu\text{mol/mL/dk}$ (Ort.±S.H.)	Toplam Aktivite (μmol) (Ort.±S.H.)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/mg.p}$ rotein) (Ort.±S.H.)	% Verim (Ort.±S.H.)	Saflaştırma Katsayısı (Ort.±S.H.)
Homojenat	45.65±1.56	80	3652.00±3.59	5.32±1.16	425.60±3.14	0.12±0.08	100.00	1.00
11.000 rpm üst sıvı I	21.92±0.94	74	1622.08±8.53	3.11±1.53	230.14±1.88	0.14±0.11	54.07±1.19	1.16±0.09
32.000 rpm üst sıvı II	17.67±1.23	64	1130.88±4.93	2.39±1.67	152.96±2.55	0.14±0.26	35.93±2.83	1.16±0.84
%60 Amonyum Sülfat tortu	14.48±2.21	26	376.48±6.11	4.61±0.95	119.86±1.59	0.31±0.06	28.16±1.07	2.58±0.41
Diyalizat	5.07±0.83	30	152.10±3.17	2.16±1.12	64.80±1.36	0.43±0.05	15.22±1.53	3.58±0.71
DEAE iyon değişim kromatografisi	0.37±0.16	20	7.4±0.35	0.69±0.11	13.8±0.27	1.86±0.14	3.24±0.51	15.50±1.13

[†]: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. (Ort.±S. H.): Ortalama ± Standart Hata.

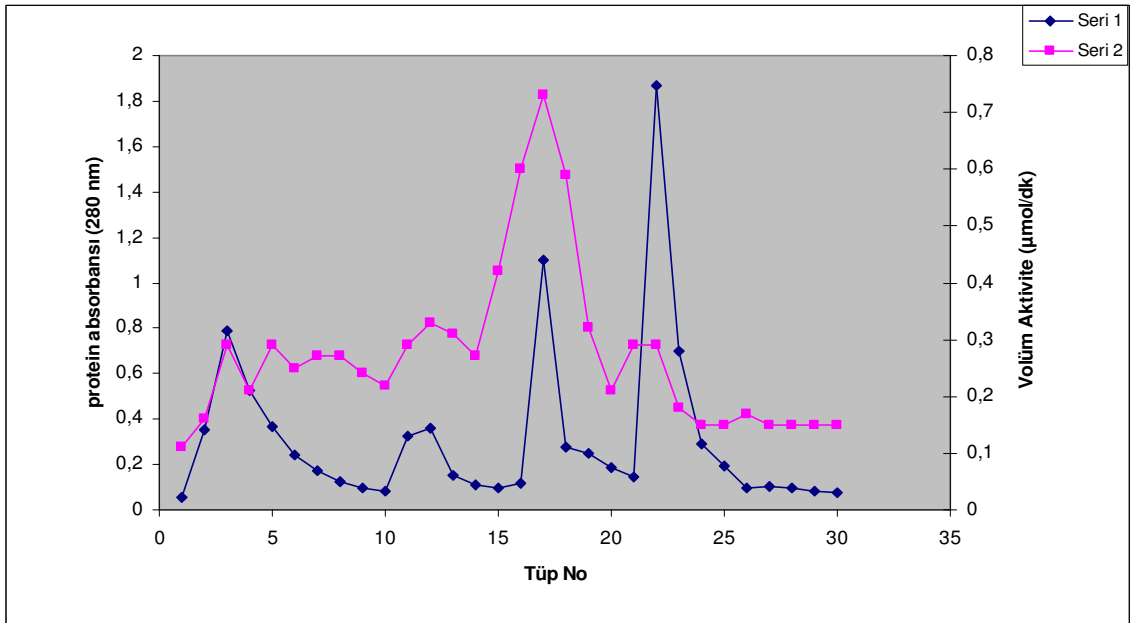
32.000 rpm den elde edilen ve lipaz enziminin de bulunduğu üst sıvı II de bulunan proteinleri çöktürmek amacıyla her iki balık grubunda öncelikle %10 amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Her iki balık grubunda elde edilen tortu kısmında lipaz enziminin spesifik aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur. Bu nedenle bu tortu kısımları daha ileri saflaştırma çalışmalarına dahil edilmemiştir. Bu aşama sonrasında ergin balıklarda %10 luk amonyum sülfat çöktürme sonucunda elde edilen üst sıvıdaki amonyum sülfat miktarını %70 yapmak için gerekli tuz miktarı materyal ve metot kısmında belirtildiği gibi üst sıvı fraksiyonuna eklenmiştir. Bu işlemle elde edilen %70 lik amonyum sülfat tortusunda 1.02 ± 0.16 $\mu\text{mol/mg}$ protein değerinde bir spesifik aktivite elde edilmiştir. Ergin olmayan balıklarda ise %70 yerine aynı işlemler %60 amonyum sülfat doygunluğundaki tortu ile yapılmıştır. Bu fraksiyonlama işleminde ergin olmayan balık karaciğer lipazının aktivitesi 0.31 ± 0.06 $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak bulunmuştur. Ergin balıkların karaciğerinde daha yüksek spesifik aktivite gözlenirken, ergin olmayan balıklarda elde edilen saflaştırma katsayısının (2.58 ± 0.41), ergin balıklardakinden (1.21 ± 0.11) daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

DEAE selulozik iyon değişim kromatografisi sonucunda, ergin balıkların karaciğer lipazı 2.23 ± 1.59 $\mu\text{mol/mg}$ protein değerinde bir spesifik aktivite gösterirken, ergin olmayan balık

karaciğerindeki lipaz enzimi spesifik aktivitesinin ($1.86 \pm 0.14 \mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) daha düşük olduğu saptanmıştır.



Şekil 1. Ergin *Oncorhynchus mykiss* karaciğer lipazı DEAE selülozik iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma profili. :Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Seri 1: 280 nm.' de protein absorbansı. Seri 2: 418 nm. dalga boyunda volüm enzim aktivite absorbansı.



Şekil 2. Ergin olmayan *Oncorhynchus mykiss* karaciğer lipazı DEAE selülozik iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma profili. :Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Seri 1: 280 nm.' de protein absorbansı. Seri 2: 418 nm. dalga boyunda enzim aktivite absorbansı

Birçok balık türünde triaçilgliserol lipaz enzimini saflaştırmak amacıyla kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırma katsayıları hesaplanmıştır. Çalışmamızda DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi sonucunda ergin balıkların karaciğer lipazı 2.65 ± 1.94 kat, ergin olmayanları ise 15.50 ± 1.13 kat saflaştırılmıştır. Örneğin, *Oncorhynchus mykiss* karaciğer lipazının Bio-gel A kromatografisi ile saflaştırma katsayısı 27.000 kat [11], *Salmo gairdneri* adipöz doku lipazının heparin-sepharose afiniti kromatografisi ile 71 kat [10], *Cyprinion macrostomus* karaciğer ve ince barsak lipazının fenil sefaroze CL-4B kromatografisiyle sırasıyla 2.96 ve 3.54 kat [2, 13] saflaştırma katsayısı belirlenmiştir. Kullanmış olduğumuz farklı tekniklere bağlı olarak bulgularımız literatür bilgilerinden farklılık göstermektedir.

Sonuç olarak, deneğimiz ergin ve ergin olmayan balık karaciğer lipazı saflaştırma çalışmalarında izlemiş olduğumuz yöntemlerle, ergin balıklarda daha yüksek spesifik aktivite belirlenmesine karşın, ergin olmayan balıklarda daha yüksek saflaştırma katsayıları elde edilmiştir.

Kaynaklar

1. Metin, K., Akpınar, M. A. ***Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 karaciğer lipaz enziminin bazı kinetik özellikleri.** Turk. J. Biol., 24, 489-502, (2000).
2. Değerli, N. and Akpınar, M. A. **Partial purification of intestinal triglyceride lipase from *Cyprinion macrostomus* Heckel, 1843 and effect of pH on enzyme activity.** Turk. J. Biol., 26, 133-143, (2002).
3. Gupta, R., Rath, P., Gupta, N. and Bradoo, S. **Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview.** Biotechnol. Appl. Biochem., 37, 63-71, (2003).
4. Antonian, E. **Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases.** Lipids, 23, 12, 1101-1106, (1988).
5. Murray, H. M., Gallant, J. W., Perez-Casanova, J. C., Johnson, S. C. and Douglas, S. E. **Ontogeny of lipase in winter flounder.** J. Fish. Biol., 62, 816-833, (2003).
6. Akpınar, M. A., Değerli, N., Aker, A., Hsiung, K-P. **Purification of liver lipase from *Cyprinion macrostomus* HECKEL, 1843 (Osteichthyes: Cyprinidae).** Cumhuriyet Üniv. Fen Bil. Derg., 17, 51-57, (1994).
7. Gupta, N., Rath, P., Singh, R., Goswami, V. K., Gupta, R. **Single step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 67, 648-653, (2005).
8. Değerli, N. ***Cyprinus carpio* L. 1758 (Osteichthyes: Cyprinidae)' nun pankreas, karaciğer ve incebağırsak lipaz enzimlerinin saflaştırılması ve bazı biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması.** Cumhuriyet Üniv. Fen Bil. Enst. Doktora Tezi. 252 sayfa. (1999).
9. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** J. Biol. Chem. 193, 265-275, (1951).
10. Sheridan, M. A. and Allen, W. V. **Partial purification of a triacylglycerol lipase isolated from steelhead trout (*Salmo gairdneri*) adipose tissue.** Lipids, 19, 5, 347-352, (1984).
11. Horman, J. S., Michelsen, K. G. and Sheridan, M. A. **Purification and characterization of hepatic triacylglycerol lipase isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.** Fish. Physiol. Biochem., 9, 4, 360-368, (1991).
12. Arrese, E. L. and Wells, M. A. **Purification and properties of a phosphorylatable triacylglycerol lipase from the fat body of an insect, *Manduca sexta*.** J. Lipid. Res., 35, 1652-1652-1660, (1994).
13. Değerli, N. ve Akpınar, M. A. ***Cyprinion macrostomus* HECKEL, 1843' ten karaciğer lipazının saflaştırılması ve pH' nın enzim aktivitesi üzerine etkisi.** S. D. Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fak. Der., 4, 1-10, (1995).