

PAPER DETAILS

TITLE: Avrupa Deniz Levregi (*Dicentrarchus labrax*) Pilorik Sekasindan Tripsin Enziminin
Saflastirilmesi ve Kismi Karakterizasyonu

AUTHORS: Nihat KARASU, Ali GÜNLÜ

PAGES: 259-272

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/2129908>

Avrupa Deniz Levreği (*Dicentrarchus labrax*) Pilorik Sekasından Tripsin Enziminin Saflaştırılması ve Kısmi Karakterizasyonu**Purification and Partial Characterisation of Trypsin from Pyloric caeca of the Seabass (*Dicentrarchus labrax*)**Nihat Karasu^{1,*}, Ali Günlü²¹ Tarım ve Orman Bakanlığı, Muğla İli, Menteşe İlçe Müdürlüğü, Muğla² Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri İşleme Teknolojisi A.B.D, Muğla*Sorumlu Yazar: nihatkarasu@hotmail.com

Geliş: 13.12.2021

Kabul: 01.04.2022

Yayın: 01.06.2022

Alıntılama: Karasu, N. & Günlü, A. (2022). Avrupa Deniz Levreği (*Dicentrarchus labrax*) pilorik sekasından Tripsin enziminin saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonu. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 259-272. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1036035>

Özet: Avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) pilorik sekasından tripsin enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi (%30-%60) ve bir boyut dışlama kromatografisi olan Sephacryl S-200 kolonu kullanılarak saflaştırılmış; saflığı, sıcaklık ve pH'ya hassasiyeti hesaplanarak karakterize edilmiştir. Avrupa deniz levreğinden tripsin enzimi 52,71 kat saflaştırılmış olup, %8,60 verimlilik oranına sahiptir. Enzimin molekül büyüklüğü SDS-PAGE elektroforez analizi sonucu 24 kDa molekül büyüklüğünde tek bant olarak tespit edilmiştir. Tripsin enzimi substrat olarak BAPNA (*N* α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) kullanılarak yapılan stabilite analizlerinde pH 8,0 ve 55 °C'de optimal aktivite göstermiştir. Ancak, aktivitesinin 50 °C'den sonra %30 ve fazlasını, 70 °C'de ise tamamını kaybetmiştir. En iyi stabiliteyi pH 7,0-10,0 arasında göstermiştir. Böylece Avrupa deniz levreğinden geniş pH ve sıcaklık aralıklarında aktivite gösteren, farklı sanayi dallarında kullanılabilecek tripsin enzimi elde edilmiştir. Bulgular, sıcaklık ve pH faktörlerinin tripsin enzimi aktivitesini önemli düzeyde etkilediğini göstermiştir (P<0,05).

Anahtar kelimeler

- *Dicentrarchus labrax*
- Pilorik seka
- Tripsin
- BAPNA
- Saflaştırma

Abstract: Trypsin was isolated from pyloric caeca of European seabass (*Dicentrarchus Labrax*) by ammonium sulphate fractionation (30-60%) and size exclusion (Sephacryl S 200) gel filtration chromatography. The enzyme was purified at a rate of 52.71 fold with a yield of 8.60%. The molecular weight of the enzyme was estimated using a low molecular weight marker (Sigma Low Range M3193) and wide molecular weight marker (Sigma Wide Range S8445). The molecular weight of the purified trypsin was estimated to be 24 kDa by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS-Page) gel electrophoresis, which showed only one band in bromophenol blue staining. The optimum temperature and pH for the trypsin activity were 55 °C and pH 8.0, respectively. The enzyme was extremely stable in the pH range of 7.0-10.0 and highly (70%) stable up to 50 °C after 30 minutes incubation. *N* α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) was used as a substrate for all activity and stability analyzes. Data of the study showed that temperature and pH factors that significantly affect trypsin enzyme activity.

Keywords

- *Dicentrarchus labrax*
- Pyloric caeca
- Trypsin
- BAPNA
- Purification



1. GİRİŞ

Denizel ortam, genetik olarak çok çeşitli türleri barındırdığı için farklı özellikteki enzimlerin elde edilmesinde en önemli kaynak olarak görülmektedir. Deniz ortamı, ekstrem koşulları da taşıyabildiğinden deniz canlılarından elde edilen enzimler de bu şartlara uyum göstermiştir (Zhou vd., 2011; Fouz vd., 2021).

Balık, karides, kabuklular gibi deniz canlılarının sindirim sistemlerinden elde edilen hidrolitik enzimler eşsiz biyoteknolojik potansiyeli olan protein molekülleridir. Sindirim enzimlerinin özelliklerinin elde edildikleri türlere ve organa göre farklılık göstermesi, çeşitli alanlarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Örneğin, salmon balığının mide suyundan elde edilen Zonase X isimli ticari enzim insan vücudundaki eski derilerin uzaklaştırılarak derinin yenilenmesini sağlamaktadır (Sarkar vd., 2010).

Balıklar poikilotermik canlılar olduğu için yaşamlarını devam ettirebilmeleri için sindirim enzimlerinin ortamın sıcaklığına adapte olması gerekir. Soğuğa dayanıklı balık türlerin genelde sıcak kanlı hayvanlara göre düşük sıcaklıkta daha yüksek enzimatik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ahsan ve Watabe, 2001; Yang vd., 2009; Fouz vd., 2021).

Türkiye su ürünleri üretimi 2020 yılı için 785.811 ton olarak gerçekleşmiştir. Toplam üretimin %69'u yetiştiricilik kaynaklı, geri kalan kısmı ise avcılık kaynaklı gerçekleşmiştir (Anon, 2021a). Türkiye su ürünleri yetiştiricilik sektöründe ekonomik olarak en önemli türler sırasıyla Avrupa deniz levreği (%35,34), gökkuşağı alabalığı (%30,36) ve (%26,05) çipuradır (Anon, 2021b). Avrupa deniz levreği Moronidae familyasına ait bir tatlı su balığıdır (Lopez ve ark., 2015). *D. labrax* Akdeniz ülkelerinde de yetiştiriciliği yapılan önemli bir kültür türüdür. Beyaz eti, düşük yağ içeriği ve arzu edilen aroma gibi kalite özellikleri sayesinde pazardaki yeri giderek artmaktadır (Kocatepe ve Turan, 2012; Alparslan ve ark., 2014). Balıklar işlendikten sonra deri ve kemik gibi atıklar oluşmaktadır (Kamer ve ark., 2018). Baş, deri, iç organlar, kemik, kan ve bağlı su gibi balık artıkları avlanan balıkların %70-80'ini oluşturmaktadır. Bu kaynaklar çok iyi enzim potansiyeli oluşturmaktadır. Balık artıklarından enzimlerin eldesi hem düşük maliyeti hem de yüksek ticari değerinden dolayı son zamanlarda dikkatleri üzerine çekmektedir (Klomkiao, 2008). Deniz canlılarından elde edilen enzimler, kara canlılarından da elde edilebilmektedir. Fakat moleküler ağırlık, aminoasit kompozisyonları, optimum sıcaklık ve pH, stabilite ve katalitik güç gibi karakteristik farklılıkları vardır (Kim ve Dewapriya, 2014; Poonsin vd., 2019; Anati, vd., 2021).

Proteinlere özgü sindirim enzimleri etkili oldukları peptit bağına göre endo ve ekzopeptidazlar olarak ikiye ayrılırlar. Proteinlerin parçalanmasında görevli olan, peptit veya proteinlerin iç kısımlarındaki peptit bağlarının hidrolizini katalize ederek daha kısa peptitleri oluşturan tripsin, kimotripsin gibi enzimlere endopeptidaz denir. Proteinlerin parçalanmasında görevli olan, peptit veya proteinlerin son kısımlarındaki peptit bağlarının hidrolizini katalize ederek serbest amino asitleri oluşturan karboksipeptidaz ve aminopeptidaz gibi enzimlere ise ekzopeptidaz denmektedir (Kim ve Dewapriya, 2014). Ticari peptidazlar dünyada enzim piyasasının %60'ını oluşturan önemli bir gruptur. Balık sindirim sisteminden elde edilen en önemli enzim de tripsindir (Liu ve ark, 2011, Silva ve ark., 2011). Suda yaşayan canlılardan elde edilen tripsin enziminin molekül büyüklüğü, diğer memelilerden elde edilen tripsin enzimleri gibi 22-30 kDa arasındadır (Khandagale ve ark., 2013).

Su ürünlerinden elde edilen proteolitik enzimlerinden tripsin, gıda sanayisinde deniz ürünü aroma üretimi ve balık sosu üretiminde, süt endüstrisinde peynir üretiminde, boya sanayisinde parlak renk eldesinde, sağlık ve eczacılıkta tedavi edici, yara kapatıcı ve veteriner ilacı olarak, deterjan endüstrisinde ise temizleme ajanı olarak kullanılmaktadır (Kim ve Dewapriya, 2014). Tripsin gibi alkali proteazlar yüksek sıcaklık, alkali pH, oksidasyon ajanları gibi zorlu koşullarda yüksek aktivite gösterdiği için çoğu endüstriyel uygulamalarda yüksek sıcaklıkta kullanılmaktadır (Ktari ve ark., 2012).

Tripsin ve kimotripsin gıda endüstrisinde besin takviyesi olarak ve sağlık endüstrisinde ise pankreas tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle tripsin biyomedikal deneylerde hücre ayırıcı olarak

ve başarılı bir şekilde deterjan enzimi olarak kullanılmaktadır. Özellikle kan, yumurta, süt ürünleri gibi maddelerden protein hücrelerinin uzaklaştırılması konusunda oldukça başarılıdır. Yapılan çalışmalarda bu enzimlerin 1 saat boyunca deterjanlarla temasından sonra bile %80 oranından katalitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Esposito vd., 2009). Bu dikkat çekici endüstriyel önemden dolayı saf tripsin ve kimotripsin yüksek ticari talep görmektedir.

Su ürünleri işleme endüstrisi atıklarının önemli kısmını oluşturan iç organlar günümüzde yem hammadde ve gübre üretiminde kullanılmakta, bir kısmı da kullanılmadan atılmaktadır. Balık iç organlarında midenin çıkış bölümünde veya bağırsakların başlangıcında yer alan, sayıları 1-200 arasında değişen uçları kapalı parmak biçiminde uzantıları olan ve sindirim enzimlerinin iyi bir kaynağını oluşturan organ pilorik sekadır ve sindirim enzimlerinin önemli kaynağını oluşturmaktadırlar. Bu çalışma ile Avrupa deniz levreği (*D. labrax*) pilorik sekasından yüksek saflıkta tripsin enziminin saflaştırılması, enzimin gıda, sağlık, kimya gibi farklı endüstrilerde kullanım olanağını belirleyen optimum pH ve sıcaklık dayanımının (stabilitesi) belirlenmesi ve böylece bölge-ülke ekonomisine yüksek katma değerli bir ürünün kazandırılabilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERİYAL VE METOT

2.1. Hammadde ve Örnekler

Araştırmada kullanılan Avrupa deniz levreği işleme artıkları (kafa, omurga ve iç organlar) Milas/Muğla bölgesinde bulunan yerel işleme fabrikalarından (NOORDZEE Su Ürünleri İşleme tesisi) temin edilmiştir. Hasat sonrası hemen işlenmiş balıklardan alınan atıklar buzlanmış strafor kutulara yerleştirilmiş ve vakit geçirilmeden soğuk zincir kuralları içerisinde Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri İşleme Teknolojisi Laboratuvarına getirmiştir. Yaklaşık 60 kg Avrupa levrek balığı artığından elde edilen pilorik sekalar saf su ile temizlenerek bir kısmı analiz için ayrılmış, geri kalanı ise -80 °C'de saklanmışlardır. Her bir balıktan ayrılan pilorik sekaların ortalama ağırlığı 10.35 ± 0.45 g'dır.

2.2. Enzim Ekstraktı Hazırlama

Avrupa deniz levreği pilorik sekaları (16g) 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, %0,9 NaCl tamponu (80 ml) ile ortalama 1 dakika homojenize (IKA Ultratrax Homojenizatör, Staufen, Almanya) edilmiştir (Solovyev vd., 2021). Homojenat, 600 g hızda 4 °C'de 15 dakika santrifüj (Hanil Supra-22K, Kore) edilmiş, sıvı üst faz (süpernatant) alınarak ham enzim ekstraktı olarak kabul edilmiştir. Enzim saflaştırma için ayrılan fazda otolizi önlemek için materyal -80 °C'de saklanmıştır (Balti vd., 2009; Khandagale vd., 2009; Silva vd., 2009; Freitas-Junior vd., 2012; Fouz vd., 2021; Anati vd., 2021).

2.3. Enzim Saflaştırma

Ham enzim ekstraktı 45 °C'de 30 dakika su banyosunda (Memmert WNB22) tutulmuştur. Su banyosundan sonra hemen soğutulan ekstrakt 13000 g'de 4 °C'de 25 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı üst faz ayrılmıştır. Sıvı üst faz %0-30, %30-60 ve %60-90 doygunlukta amonyum sülfat ile muamele edilerek tüm proteinler çöktürülmüştür. Ön çalışmalarda tripsin enzimin en bol bulunduğu çöktürme aralığının %30-60 arası olduğu belirlenmiştir. Amonyum sülfat ile çöktürme işlemi sonrası örnek 4 °C'de bir gün bekletilmiş, sıvı üst faz 13000 g'de 4 °C 25 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra sıvı üst faz dökülmüş ve kalan çökelti (pellet), ortalama 3 ml 0,01 M Tris-HCl, pH 8, %0,9 NaCl tamponu ile sulandırılmıştır. 0.01 M Tris-HCl- %0,9 NaCl tamponunda tamamen çözündürülen örnekler fazla tuzun uzaklaştırılması amacı ile diyaliz torbasına (SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO, Thermo Scientific) yerleştirilmiştir. 20 kat fazla hacimde en az 2 kere değiştirilmek suretiyle aynı tampona karşı diyaliz işlemi 1 gece boyunca 4 °C de devam edilmiştir. Diyaliz işlemi sonrası örnek 0,22 µ şırınga filtreden (Millex-GP) geçirilerek kolona yüklemek için hazır hale getirilmiştir. Son olarak örnek, tripsin enziminin yüksek saflıkta eldesi için otomatik protein saflaştırma cihazına (GE Healthcare AktaPrime Plus) bağlı Hi-Prep 16/60 Sephacryl S200 HR (GE Healthcare) kolonuna yüklenmiştir. Cihaz, 42 ml h⁻¹ akış hızı ve 0,5 mPa kolon basıncı ayarlanarak çalıştırılmış, kolon

çıkışında örnek mikroprotein, spesifik enzim aktivitesi ve elektroforetik analizler için 2 ml'lik hacimler halinde toplanmıştır. Her bir hacimde yapılan analizler sonucunda spesifik enzim aktivitesi birbirine yakın olarak hesaplanan bölüntüler birleştirilmiş ve Amicon Ultra-15 (Merck Millipore UFC900308) ultra santrifüj tüplerinde 5000 g, 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpün üstünde kalan sıvı kısım alınmıştır. (Silva vd., 2009; Ünlüsayın vd., 2009; Barkia vd., 2010; Freitas-Junior vd., 2012; Ktari vd., 2013).

2.4. Total Protein Hesaplama

Örneklerin toplam protein içerikleri Mikroprotein Kit (Sigma TP0300) ile Lowry vd., (1951) ve Peterson (1977) tarafından bildirilen yöntem kullanılarak yapılmıştır.

Kör deney için de bir deney tüpüne 1 ml saf su eklenmiş, diğer deney tüplerine de 1 ml seyreltilmiş örnek alınmıştır. Standarda, köre ve örnek tüplerine 0,1 ml %0,15'lik DOC (deoxycholate) ilave edilerek iyice karıştırılmış, 10 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra 0,1 ml %72'lik TCA (trichloroacetic acid) eklenip tekrar iyice karıştırılmıştır. Bu işlemlerden sonra çözeltiler 20000 g 4°C de 15 dk santrifüj edilmiş, elde edilen çökelti 1 ml Lowry ajanı ile çözündürülmüştür. 1 ml saf su ile durulanan örnekler 20 dakika oda sıcaklığında bırakılarak her tüpe Folin Ciocalteu's Phenol Reagent çalışma solüsyonundan 0,5'er ml ilave edilerek renk oluşumu için 30 dakika beklenmiştir. Spektrofotometre (Shimadzu UV-1201V, Japonya) küvetlerine alınan solüsyonlar en yüksek absorbans değerinin elde edildiği dalga boyu olan 700 nm'de analiz edilmiştir. Tüm okumalar 30 dakika içinde tamamlanmıştır. Bovin serum albimin standart kullanılarak hazırlanmış kalibrasyon eğrisine karşılık gelen protein konsantrasyonlarına karşı örneklerin absorbans değerleri kodlanarak protein içerikleri µg/ml cinsinden tespit edilmiştir (Lowry vd., 1951; Peterson, 1977).

2.5. Spesifik Enzim Aktivitesi

Spesifik enzim aktivite analizi için örnekler, dimethylsulphoxide (DMSO) ile hazırlanan 8 mM N-a-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) (30µl), enzim (30µl) ve 0,01 M Tris-HCl-%0,9 NaCl (140µl) tamponu beraber oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler 410 nm dalga boyunda Multiskan GO Microplate Spectrophotometre UV/Vis (Thermo-Scientific 51119300) cihazında okuması yapılmıştır. Çıkan sonuçlar aşağıdaki formüle göre total aktivitesi hesaplanmıştır (Freitas-Junior vd., 2012; Charu ve Ragini, 2020).

$$\frac{(A - A_0) * \text{Toplam örnek hacmi(ml)} * 1000 * df}{8800 * \text{İşlem zamanı(dak)} * \text{Enzim Mik (ml)}} \Rightarrow \text{Total Aktivite}$$

A= Örnek absorbans değeri A₀=Kör absorbans değeri

2.6. Sodium Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-Page)

Örneklerin tanımlanabilmesi için bir sonraki aşama olan SDS-Page elektroforez analizi Laemmli (1970) metoduna bağlı kalınarak %4 yığma ve %12 ayırma jeli kullanılarak yapılmıştır. Örnekler yığma jel kuyucuğunda 25 µg protein olacak şekilde 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, %10 SDS, Gliserol ve bromfenolblue ile hazırlanan yükleme tamponu ile karıştırılarak 100 °C'de 4 dakika ısıtılarak denatürasyonu sağlanmıştır. Bromfenolblue jelin en alt kısmına gelinceye kadar 30 mA direnç uygulanmıştır. Elektroforez uygulamasında Sigma Aldrich S8445 ve Sigma Aldrich M3193 protein markerlar kullanılmıştır. Elektroforez işlemi sonrası jeller, %0,15 commassie blue R-250, %40 metanol ve %7 asetik asit bulunan boya çözeltisi içerisinde su banyosunda 4 saat kadar boyanmıştır. Jeldeki fazla boya, %5 metanol ve %7,5 asetik asit içeren çözelti ile her 20 dakikada bir çözelti değiştirilmek suretiyle, bir saat boyunca yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Jel boyadan arındırıldığında çözeltiden çıkarılmış ve beyaz ışık altında bantlar gözlemlenmiştir.

2.7. Optimum pH ve Sıcaklık Analizleri

Optimum pH analizinde 0.01 M sodyum asetat (pH 4-6), 0,01 M Tris-HCl (pH 7-9), ve 0,01 M Glisin-NaOH (pH 10) tamponları kullanılmıştır. Analiz, total aktivite metodu ile aynıdır. 140µl

Tampon 30 µl örnek ile karıştırıldıktan sonra 30 µl BAPNA (8µM) eklenerek 10 dakika 25 °C'de inkübe edilmiştir. Son olarak 410 nm dalga boyunda mikropate reader cihazında okuma yapılmıştır (Balti vd., 2009; Barkia vd., 2010; Silva vd., 2011; Poonsin vd., 2019).

Optimum sıcaklık analizinde 30, 40, 50, 55, 60, 65 ve 70 °C sıcaklıklarda (Binder BD53 İnkübatör) 0,01 M Tris-HCl pH 8,0 tamponunda yine aynı şekilde 410 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

2.8. Sıcaklık ve pH Stabilité Analizleri

pH stabilite analizinde, optimum pH analizinde 0,01 M sodyum asetat (pH 4-6), 0,01 M Tris-HCl (pH 7-9), ve 0,01 M Glisin-NaOH (pH 10) tamponları kullanılmıştır. Fakat bu analizde enzim ile tampon 1:1 oranında karıştırılmış ve 25 °C de 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra total aktivite analizi yapılmıştır. 140µl tampon 30 µl örnek ile karıştırıldıktan sonra 30 µl BAPNA (8µM) eklenerek 10 dakika 25 °C'de inkübe edilmiştir. Son olarak 410 nm dalga boyunda mikropate reader cihazında okuma yapılmıştır (Van Hau ve Benjakul., 2006; Silva vd., 2011; Khangembam ve Chakbarti, 2015; Poonsin vd., 2019).

Sıcaklık stabilite analizinde ise, Tris-HCl pH 8.0 tamponu ile enzim 1:1 oranında karıştırılmıştır. 30-40-50-55-60-65-70°C sıcaklıklarda su banyosunda (Mettler WNB45) 30 dakika bekletilmiştir ve hemen buza konularak sıcaklığı 25 °C' ye düşürülmüştür. Sonra total aktivite analizi yapılmıştır (Van Hau ve Benjakul., 2006; Silva vd., 2011; Zamani ve Benjakul., 2015).

Okumaların hepsi 410 nm dalga boyunda mikropate reader cihazında yapılmıştır. Hesaplamalar yukarıda "Total Aktivite Analizi" başlığı altında belirtilen formül ile yapılmıştır.

2.9. İstatiksel Analizler

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 23 istatistiki paket programından yararlanılmış ve sonuçlar, faktöriyel deneme desenine varyans kaynakları kullanılarak $P < 0,05$ önem düzeyinde test edilmiştir. Faktörlerin seviye ortalamalarının arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Duncan testi kullanılmıştır. Tüm analizler üç tekrarlı analiz sonuçlarının ortalaması ve standart hatası olarak verilmiştir.

3. SONUÇ ve TARTIŞMA

Avrupa deniz levreği pilorik sekasından tripsin üç aşamalı saflaştırma (Amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz ve Sephadex G200) ile elde edilmiş ve bulgular Tablo 1'de verilmiştir. Bu çalışmada ham enzim ekstraktı (1,13 Units/mg protein) saflaştırmanın ilk basamağında farklı bölüntülerde amonyum sülfat (%0-90) ile çöktürülmüştür. Çökeltinin en yüksek spesifik tripsin aktivitesini gösterdiği aralıktaki (%30-60) bölüntü alınarak diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Tripsin amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz basamaklarında 2-3 kat saflaştırma ve %10-20 verimlilik rakamları yakalanmıştır (Tablo 1). Benzer çalışmalarda 1-2 kat saflaştırma ve %30-60 arası verimlilik rakamları yakalanmıştır (Silva vd., 2011; Freitas Junior vd., 2012; Ktari vd., 2012; Semiz vd., 2013; Khandagale vd., 2017). Verimlilik değerlerinin benzer çalışmalardan düşük olması avrupa deniz levreği ham ekstraktının total aktivite sonuçlarının yüksekliğinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

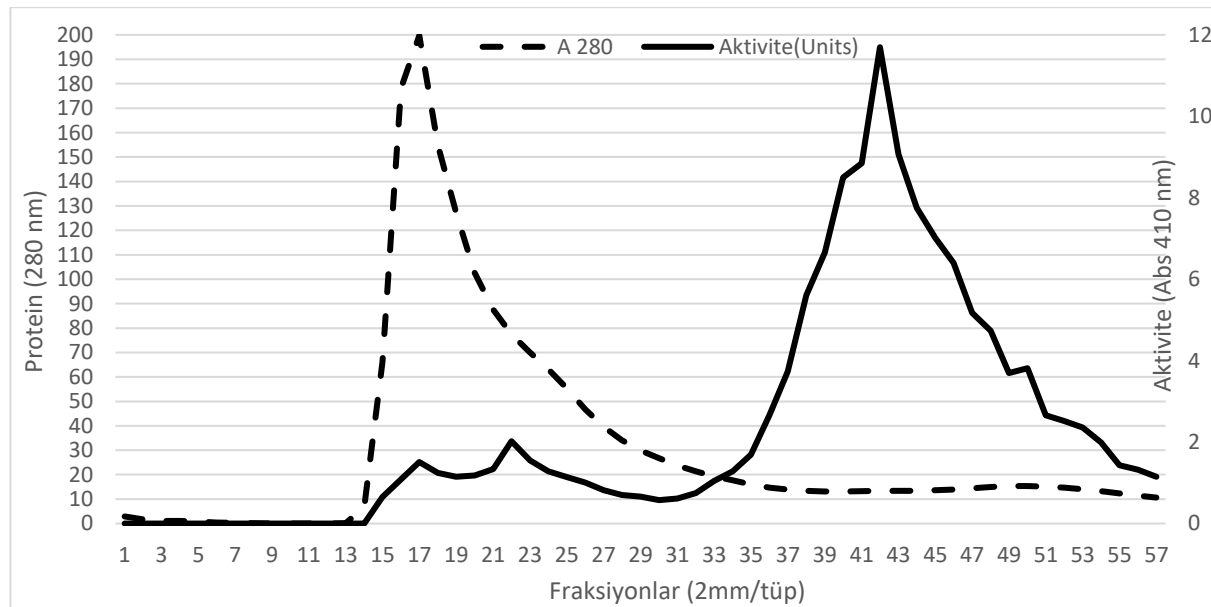
Çalışma sonuçlarına göre diyaliz işlemi sonucunda saflaştırma katsayısı 1,87'den 2,30'a çıkmıştır (Tablo 1). Bu sonuçlar diyalizin spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısını artırdığını göstermektedir. Bir gece diyalizde bekletilen ekstrakt bir sonraki saflaştırma aşaması olarak boyut dışlama kromatografisi (Sephacryl S-200) kolonuna yüklenmiştir. Kolondan geçirilen örneğin daha sonra mikro plaka okuyuculu spektrofotometre ile (Multiskan GO Microplate Spectrophotometre) 410 nm dalga boyunda aktivite belirlenmesi için ölçümler yapılmıştır. Boyut dışlama kolon kromatografisi grafiğinde bir büyük bir de çok küçük iki pik elde edilmiş yapılan aktivite testleri sonucunda en yüksek aktivitenin belirlendiği bölüntüler 40-44 numaralı tüplerde tespit edilmiştir (Şekil 1).

Tablo 1. Avrupa deniz levreği pilorik sekasından tripsin enziminin saflaştırma aşaması analiz sonuçları

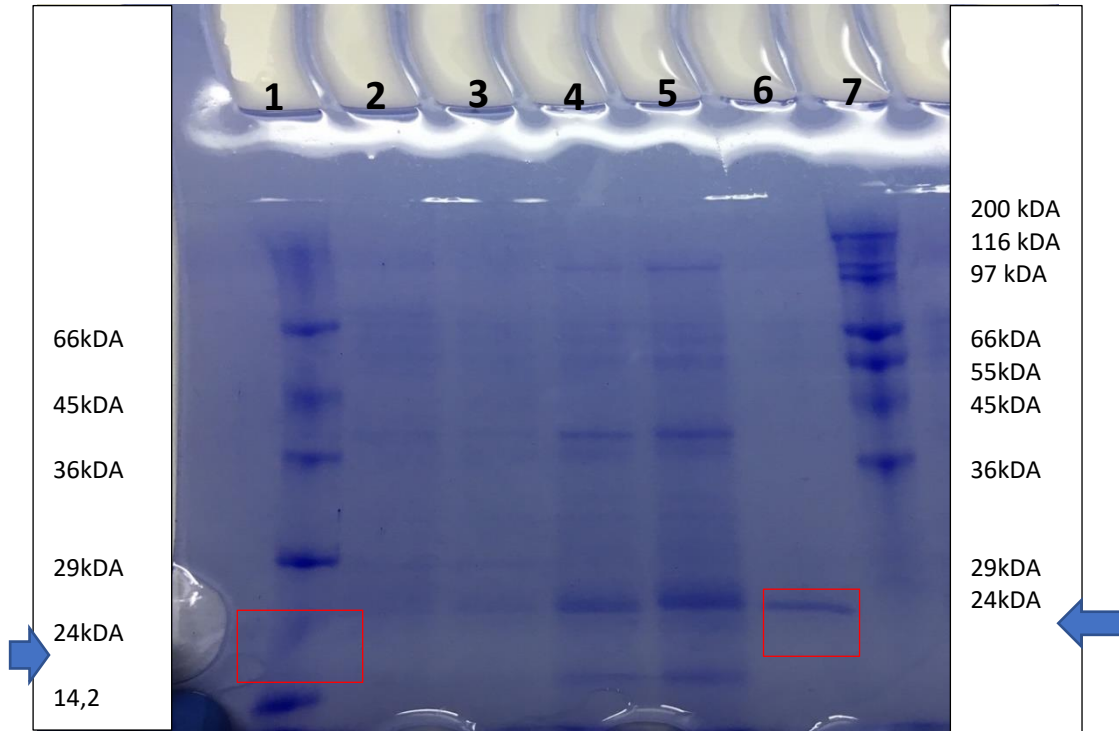
AŞAMA	Total Protein (mg)*	Total Aktivite (Unit)*	Spesifik Aktivite (U/mg)*	Verimlilik (%)*	Saflaştırma*
Ham ekstrakt	470,52 ±15,03 ^a	533,51 ±12,20 ^a	1,13 ±0,02 ^b	100,00 ±0,00 ^a	1,00 ±0,00 ^b
Enzim aktifleştirme	421,21 ±8,64 ^b	534,53 ±10,36 ^b	1,27 ±0,02 ^b	100,19 ±0,43 ^b	1.12 ±0,04 ^b
Amonyum Sülfat Çöktürme	41,63 ±1,56 ^c	87,59 ±1,54 ^c	2,11 ±0,11 ^b	16,41 ±0,56 ^c	1,87 ±0,10 ^b
Diyaliz	22,83 ±0,96 ^d	59,43 ±1,10 ^d	2,60 ±0,13 ^b	11,14 ±0,18 ^d	2,30 ±0,13 ^b
Sephadex G200	0,77 ±0,08 ^e	45,86 ±1,04 ^d	59,26 ±1,97 ^a	8,60 ±0,20 ^e	52,71 ±3,93 ^a

*Ortalama ±Standart hata (N=3), Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak önemli fark vardır (P<0,05).

Avrupa deniz levreği pilorik sekasından farklı saflaştırma aşamalarında tripsin enziminin aktivitesi, spesifik aktivitesi, verimlilik ve saflaştırma katsayıları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Aynı şekilde, tripsin enzimi total protein değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (p<0,05) (Tablo 1).

**Şekil 1.** Boyut dışlama kromatografisi (Sephacryl S 200) sonrası bölüntülerin aktivite ve toplam protein grafiği

Örneklerin kolon kromatografisi sonrasında 52,71 kat saflaştırılma, %8,60 verimlilik ve 59,26 units/mg tripsin spesifik aktivite değerlerine ulaşıldığı tespit edilmiştir (Tablo 1). Enzimin saflık kontrolü için yapılan SDS PAGE analizinde Tripsin enzimine ait tek bant (24 kDA) görüntülenmiştir (Şekil 1).



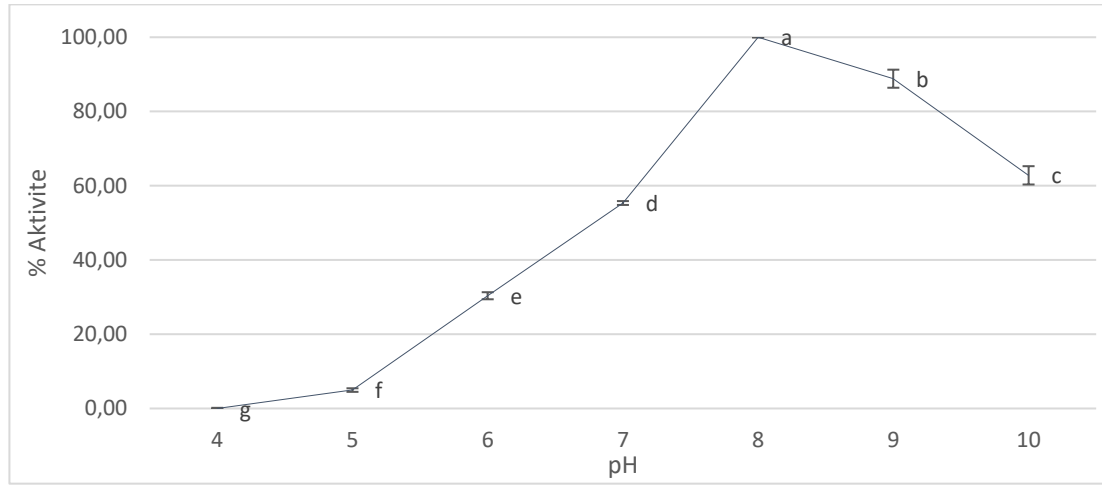
Şekil 1. Avrupa deniz levreği (*D.labrax*) pilorik sekasından saflaştırılan tripsin enziminin SDS-Page Jel Görüntüsü (1. Düşük molekül ağırlığındaki marker, 2.Ham ekstrakt, 3. Enzim aktifleştirme, 4. Amonyum sülfat ile çöktürme, 5. Diyaliz, 6. Sephadex G200, 7. Yüksek molekül ağırlığındaki marker)

Genel olarak balıklardan elde edilen tripsin enziminin molekül büyüklüğü 22-28 kDa arasında olduğu belirtilmiştir (Ktari vd., 2012). Avrupa deniz levreğinden saflaştırılan tripsinin molekül ağırlığı *Epinephelus coioides* (Liu vd., 2012), Kaliforniya Körfezi'nde bulunan pasifik uskumrusu (Valdez-Melchor vd., 2013), pasifik beyaz karides (Sephan vd., 2015), *Labeo rohita* (Charu ve Ragini, 2020) ve *Coryphaena hippurus* (Dos Santos vd., 2020) gibi su ürünlerinden elde edilen tripsin ile yüksek benzerlik göstermektedir.

Yapılan benzer çalışmalarda tripsin enziminin saflaştırma katsayısı *Boops boops*'da 8,7 kat (Barkia vd., 2010), *Salaria basilisca*'da 4,2 kat (Ktari vd., 2012), *E. coioides*'de 161,85 kat (Liu vd., 2012), Karadeniz hamsisinde (*Engralius encrasicolus*) 6,23 kat (Temiz vd., 2013), pasifik uskumrusunda (*Scomberomorus sierra*) 11,93 kat (Valdez-Melchor vd., 2013), *Cirrhinus mirgala*'da 35,64 kat (Khangembam ve Chakbarti, 2015), beyaz karideste 50,4 kat (Sephan vd., 2015), *Sardinella longiceps*'de 23,5 kat (Khandagale vd., 2017) ve *C. hippurus*'te 2,99 kat (Dos Santos vd., 2020) olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçlarımıza göre Avrupa deniz levreğinden tripsin enziminin saflaştırma katsayısı 52,71 kat olarak bulunmuş olup diğer balık türlerinde yapılan çalışmaların çoğundan yüksek oranda saflaştırma yaptığımız ortaya çıkmaktadır. Liu vd., (2012) çalışmasında saflaştırma katsayısının yüksek olmasının sebebi 3 basamak kolon kullanılması olduğu düşünülmektedir.

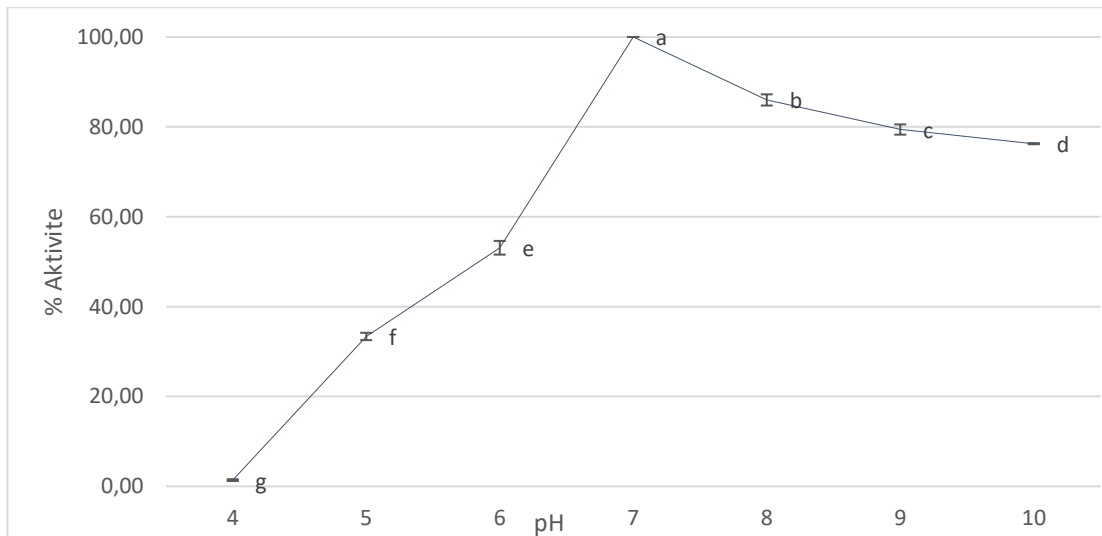
Çalışma bulgularımıza göre saflaştırılan tripsin enziminin spesifik aktivitesi 59,26 units/mg proteindir (Tablo 1). Bu da *Sepia officinalis* (Balti vd., 2009), *B. boops* (Barkia vd., 2010), *Diapterus rhombeus* (Silva vd., 2011), *Salaria basilisca* (Ktari vd., 2012), Karadeniz hamsisi (Temiz vd., 2013), *C. mirgala* (Khangembam ve Chakbarti, 2015), *Luphiosilurus alexandri* (Santos vd., 2016), *Rutilus frisii* Kutum'dan (Hasebi vd., 2020) çok yüksek olup; *S. longiceps* (Khandagale vd., 2017) ile 2 adet boyut dışlama kolonu basamağı uygulanmış *Theragra chalcogramma* (Kishimura vd., 2008)'nın elde ettiği tripsin enziminin spesifik aktivitesine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tripsin enziminin endüstriyel anlamda kullanımını belirleyen en önemli özelliği pH ve sıcaklık stabilitesidir. Bu kapsamda, Avrupa deniz levreği pilorik sekasından saflaştırılan tripsin enziminin pH ile sıcaklık stabilite testleri yapılmış ve sonuçlar Şekil 2 ve 3'te sunulmuştur.



Şekil 2. Avrupa deniz levreği pilorik sekasından saflaştırılan tripsinin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi. (Sodyum asetat_pH 4-6, Tris-HCl_pH 7-9 ve Glisin-NaOH_pH 10)(Farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark vardır ($P<0,05$)).

Avrupa deniz levreği pilorik sekasından elde edilen tripsin enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan analiz sonuçlarına göre pH 4'den pH 8'e kadar spesifik aktivite düzenli olarak artmış ($P<0,05$), takiben pH 9 ve 10'da da önemli ($P<0,05$) oranda azaldığı belirlenmiştir (Şekil 2). Sonuç olarak enzimin optimum pH değeri pH 8 olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde *Siniperca chuatsi* (Lu vd., 2008), *Gadus macrocephalus* (Fuchise vd., 2009), *D. rhombeus* (Silva vd., 2011), *E. coioides* (Liu vd., 2012), Pasifik uskumru (Valdez-Melchor vd., 2013), *C. mirgala* (Khangembam ve Chakbarti, 2015), beyaz karides balığı (Sephan vd., 2015), *Engraulis choitita* (Lamas vd., 2017), *C. hippurus* (Dos Santos vd., 2020), *L. rohita* balığı (Charu ve Ragini, 2020) gibi farklı su ürünlerinden elde edilen tripsin enziminin optimum pH değerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmaların optimum pH sonuçları da bulgularımız ile uyumludur.

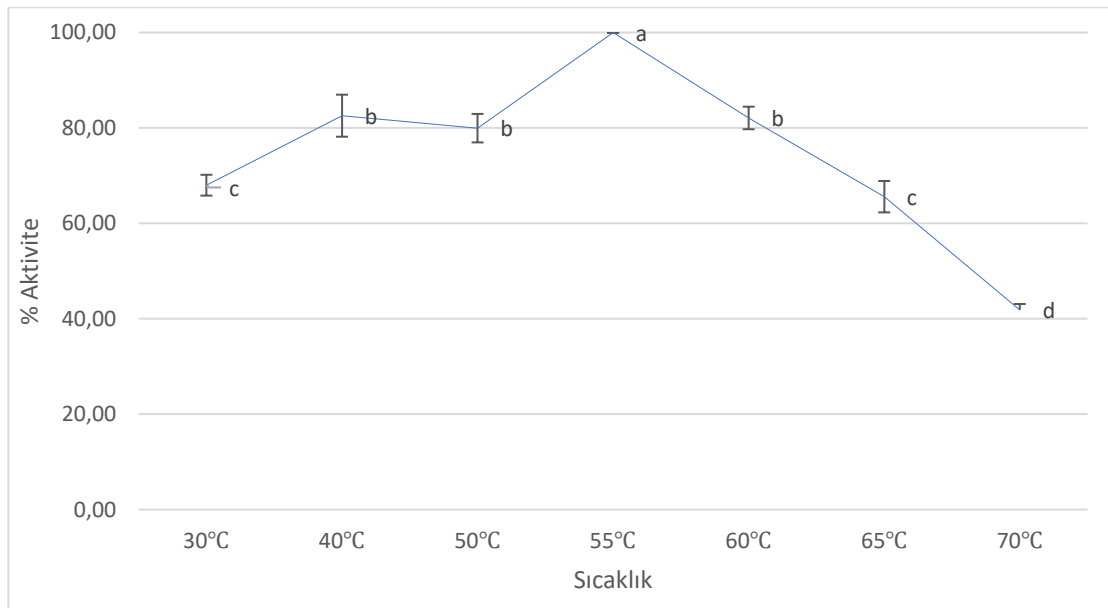


Şekil 3. Avrupa deniz levreği pilorik sekasından saflaştırılan tripsinin, farklı pH'lar da 25 °C'de, 30 dak. inkübasyon sonrası stabilitesi. (Farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark vardır ($P<0,05$)).

Avrupa deniz levreği pilorik sekasından yüksek saflıkta elde edilen tripsin enziminin farklı pH'lar da 25 °C'de, 30 dk. inkübasyon sonrası stabilitesi Şekil 3'te verilmiş olup en iyi stabilite değeri pH 7,0 de belirlenmiştir. Bu sonuca göre pH 4'ten pH 7'ye kadar stabilite önemli ($P<0,05$) oranda artmış, sonra pH 7'den pH 10'a doğru önemli ($P<0,05$) oranda azalarak %76,25'ya düşmüştür (Şekil 3). Sonuçlar tripsin enziminin pH 7-10 arasındaki spesifik aktivitesinin diğer pH değerlerine göre önemli oranda yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 3).

Yapılan benzer bir çalışma da sucul canlılardan elde edilen tripsinin pH 7,5-10,0 arasında stabil kaldığı bildirilmiştir (Freitas-Junior vd., 2012). Avrupa deniz levreği pilorik sekasından elde edilen tripsin enziminin pH stabilitesi, *S. chuatsi* (Lu vd., 2008), *G. macrocephalus* (Fuchise vd., 2009), *B. boops* (Barkia vd., 2010), *D. rhombeus* (Silva vd., 2011), beyaz karides balığı (Sephan vd., 2015), *S. longiceps* (Khandagale vd., 2017), *C. hippurus* (Santos vd., 2020) ve *Arapima gigas* (Freitas-Junior vd., 2021) türleri ile benzer stabilite aralığı gösterdiği, *E. coioides* (Liu vd., 2012)'in bulgularından farklı olarak daha geniş aralıkta stabilite gösterdiği belirlenmiştir. Bulgularımızdan farklı olarak *Pricanthus macracanthus* (Van Hau ve Banjakul, 2006), *A. gigas* (Freitas-Junior vd., 2012) ve *S. basilisca* (Ktari vd., 2012) türlerinden elde edilen tripsinlerin daha geniş pH aralığında stabilite gösterdiği belirlenmiştir. Bu farkın sebebi olarak balık türlerinin farklılığı ve türlerin yaşama ortamı farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

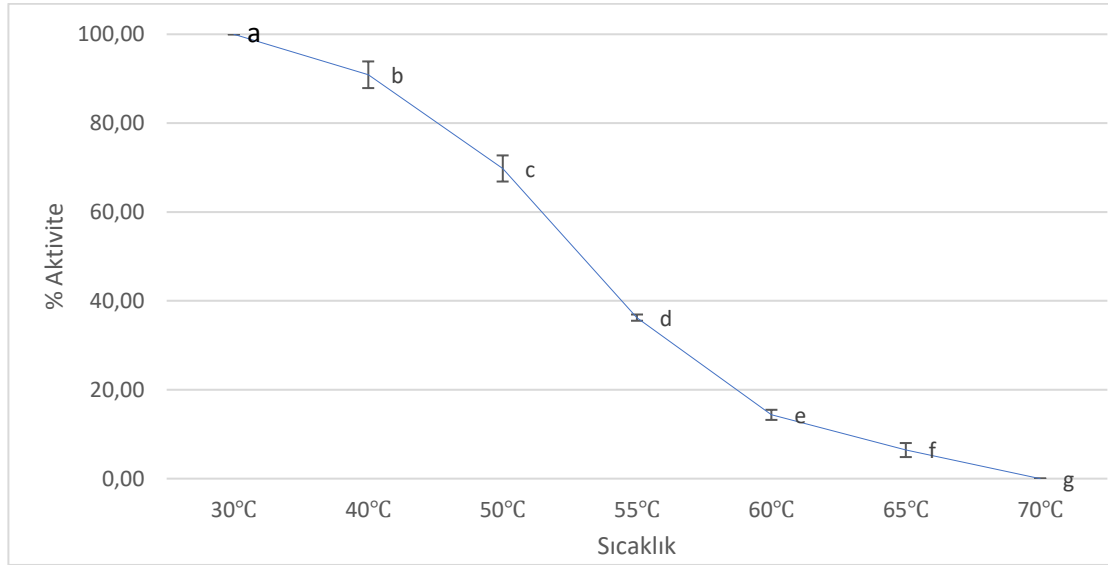
Sıcaklığın Avrupa deniz levreği pilorik sekasından elde edilen tripsin enzimi üzerine etkisi total aktivite formülü ile hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4 ve 5'te sunulmuştur.



Şekil 4. Avrupa deniz levreği pilorik sekasından saflaştırılan tripsin enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi (Farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark vardır ($P<0,05$)).

Çalışma bulgularımıza göre pilorik sekadan saflaştırılan tripsinin optimum spesifik aktivite gösterdiği sıcaklık 55 °C olarak tespit edilmiştir. Bu sıcaklıktan sonra düzenli olarak aktivitede düşüşler belirlenmiş olup, enzimin 70 °C'de %60 oranında aktivite kaybına uğradığı belirlenmiştir (Şekil 4). Bulgularımızla uyumlu şekilde *S. basilisca* balığının iç organlarından elde edilen tripsinin optimum sıcaklığı 55 °C olup, 70°C'de aktivitesinin yarısını kaybettiği bildirilmiştir (Ktari vd., 2012). Benzer şekilde Silva vd. (2011) tarafından saflaştırılan tripsin enziminin optimum sıcaklığı 50-55 °C aralığında olup, 70 °C'de aktivitenin %80'i kaybolmuştur. Diğer bir çalışmada da *P. macracanthus* balığı pilorik sekasından elde edilen tripsinin ise 55 °C'de en yüksek aktiviteyi göstermiş olduğu, aktivitesini 70 °C'de %90 oranında kaybettiği bildirilmiştir (Van Hau ve Banjakul, 2006). Ayrıca

Pasifik uskumru (Valdez-Melchor vd., 2013), beyaz karides (Sephan vd., 2015), *E. achoita* (Lamas vd., 2017), *C. hippurus* (Santos vd., 2020) gibi farklı deniz ürünlerinde yapılan tripsin enziminin optimum sıcaklık sonuçları ile bulgularımız benzerdir. *C. mirgala* (Khangembam ve Chakbarti, 2015), *Colossoma macropomum* (Balti vd., 2010), *B. boops* (Barkia vd., 2010) ve *L. rohita* (Charu ve Ragini, 2020)'da yapılan çalışma sonuçlarına göre daha yüksek sıcaklıklarda aktivitenin korunduğu belirlenmiştir.



Şekil 5. Avrupa deniz levreği pilorik sekasından saflaştırılan tripsin enziminin 25°C'de, 30 dak. inkübasyon sonrası stabilitesi. (Farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark vardır ($P<0,05$)).

Çalışma bulgularımıza göre avrupa deniz levreği pilorik sekasından elde edilen tripsin enziminin 30 dakika farklı sıcaklıklarda su banyosunda inkübasyon sonucunda 30°C'de en yüksek spesifik aktiviteyi göstermiş olduğu ve 70°C'de tamamen denatüre olarak stabilitenin kaybolduğu belirlenmiştir. Özellikle 50°C'den sonra aktivitenin yüksek hızda azaldığı görülmüştür (Şekil 5). Çalışma sonuçlarımızla uyumlu olarak, Balti vd. (2009) *S. officinalis* mürekkep balığının hepatopankreasından elde edilen tripsin enziminin spesifik aktivitesinde 50°C'den sonra hızlı bir düşüş görüldüğünü ve 70°C'de tamamen denatüre olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, *B. boops* (Kopez) balığından saflaştırılan tripsin enziminin 55°C'den sonra hızlı bir aktivite kaybettiği, 60°C'de 15 dakika sonra ise tamamen denatüre olduğu tespit edilmiştir (Barkia vd., 2010). *E. coioides* balığından elde edilen tripsin enziminin sıcaklığa dayanıklılığı 50°C'den sonra azalmış olup, 70°C'de %80'i kaybolmuştur (Liu vd., 2012). *S. longiceps* iç organlarından elde edilen tripsin üzerinde yapılan stabilite deneylerinde 50°C'den sonra spesifik aktivitenin hızla azaldığı ve 70°C'de %90'ını kaybettiği görülmüştür (Khandagale vd., 2017). Tirsi balığından elde edilen tripsinin ise 50°C'den sonra yüksek aktivite kaybı yaşadığı, 60°C'de ise tamamen denatüre olduğu tespit edilmiştir (Zamani vd., 2017).

Elde edilen tripsin enzimi sıcaklık stabilitesi Sephan ve ark., (2015) ve Freitas-Junior vd., (2012) haricinde benzerlik göstermiştir. Sephan ve ark., (2015) ve Freitas-Junior vd., (2012) tarafından elde edilen tripsinlerin sıcaklık stabilitesi elde ettiğimiz tripsinin stabilitesinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunların sebebi söz konusu araştırmadaki analiz farklılıkları olduğu düşünülmektedir. Araştırma metodunda stabilite analizinde 30 dakika su banyosunda tutulurken, belirtilen yazarların analizlerinde 15 dakika su banyosunda tutulduğu görülmüştür.

Sonuç olarak Avrupa levrek balığı ülkemizde ve bölgemizde yetiştiricilik üretiminde ekonomik olarak önemli bir tür olup önemli miktarda işlenerek değerlendirilmekte ve bunun sonucunda yüksek miktarda iç organ atıkları ortaya çıkmaktadır. Mevcut çalışmamızla deniz levreği sindirim sistemi

pilorik sekasından üç aşamalı saflaştırma yöntemi uygulanarak yüksek saflıkta tripsin enzimi saflaştırılmıştır. Böylece söz konusu balık atıklarından pek çok endüstri için kullanım olanağı sunan, katma değeri yükseltilmiş ürün geliştirilmiştir. Sindirim enzimlerinin kullanımını belirleyen en önemli unsur olan pH ve sıcaklık stabilite testleri de yapılarak saflaştırılan tripsin enzimlerinin kara hayvanlarından saflaştırılana göre daha geniş pH ve sıcaklık aralıklarından stabilite gösterdiği tespit edilmiştir. Avrupa deniz levreği balığından elde ettiğimiz tripsin enzimi literatürde bildirilen çoğu su ürünleri ve kara hayvanlarından saflaştırılan enzimlerden daha iyi özellikler göstermiştir. Saflaştırılan tripsin enziminin geniş sıcaklık ve pH değeri aralığına sahip olduğu göz önüne alındığında deterjan, boya, sağlık ve gıda endüstrisi gibi farklı endüstriyel alanlarda kullanımı mümkün olabilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Nihat KARASU'nun Doktora tezinin bir bölümünden özetlenmiştir. Çalışma Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 16/156 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Alparlan, Y., Hasanahocaoğlu, H., Metin C., & Baygar, T., 2014. Determination of meat quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sold at different selling areas, *Emirates Journal of Food Agriculture*, 26(3), 293-301. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i3.16528>
- Anati, N. J., Siti Roha, A. M., & Normah, I., 2021. African catfish (*Clarias gariepinus*) visceral protease: its specific activity and molecular weight at different purification stages. *Food Research*, 5(2), 120-128. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(2\).447](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(2).447)
- Anonim, 2021a. T.C Tarım ve Orman Bakanlığı Su Ürünleri İstatistikleri. www.tarimorman.gov.tr. 11 sayfa.
- Anonim, 2021b. *Su Ürünleri 2020 Bülteni*. Türkiye İstatistik Kurumu. www.data.tuik.gov.tr. 37252.
- Balti, R., Barkia, A., Bougatef, A., Ktari, N., & Nasri, M., 2009. A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterisation. *Food Chemistry*, 113, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.059>
- Barkia, A., Bougatef, A., Nasri, R., Fetoui, E., Balti, R., & Nasr., M., 2010. Trypsin from the viscera of bogue (*Boops boops*): Isolation and characterisation. *Fish Physiology Biochemical*, 36, 893-902. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9365-z>
- Charu, B & Ragini, G., 2020. Optimization and characterization of trypsin of *Labeo rohita* from its visceral waste. *GSC Advanced Research and Reviews*, 3(2), 39-47. <https://doi.org/10.30574/gscarr.2020.3.2.0041>
- Dos Santos, D. M. R. C., Dos Santos, C. W. V., De Souza, C. B., De Albuquerque F. S., Oliveira, J. M. S., & Pereira, H. J. V. 2020. Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish): purification, characterisation and application in commercial detergents. *Biocatalysis and Agriculture Biotechnology*, 25, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101584>
- Fouz, M. F., Sumanarathne, A. S., Seneviratne, V. N., & Rajapakse, S., 2021. Investigation of enhancement in thermal stability of trypsin in modified Mg/Al layered double hydroxides. *Ceylon Journal of Science*, 50(1), 29-38. <http://doi.org/10.4038/cjs.v50i1.7844>
- Freitas-Júnior A. C. V., Costa H. M. S., Icimoto M. Y., Machado, M. F. M., Ferreira, J. C., De Oliveira, V. M. S. B. B., Buarque, D. S., & Bezerra, R. S., (2021). Substrate specificity, physicochemical and kinetic properties of a trypsin from the giant Amazonian fish pirarucu (*Arapima gigas*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102073. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102073>

- Freitas-Júnior A. C. V., Costa H. M. S., Marcusci, M., Ícimoto M. Y., Hirata I. Y., Marcondes M., Carvalho, L. B. Jr, Oliveira, V., & Bezerra, R. S. (2012). Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chemistry*, 133(4), 1596–1602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.056>
- Fuchise, T., Kishimura, H., Sekizaki, H., Nonami, Y., Kanno, G., Klomklao, S., & Benjakul, S., 2009. Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*). *Food Chemistry*, 116, 611-616. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.078>
- Hasebi, Z., Motamedzadegan, A., Madani, R., & Zamani, A., 2020. Extraction and purification of trypsin from intestine of Caspian kutum (*Rutilus frisii* Kutum) and calculation of its kinetic parameters and half life. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 28(5), 1-13. <https://doi.org/10.22092/ISFJ.2019.119548>
- Khandagale, S. A., Sorojini, B. K., Kumari, S., Sumanjoshi S. D., & 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. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.777864>
- Khandagale, S. A., Mundodi, L., & Sorojini, B. K. 2017. Isolation and characterization of trypsin from fish viscera of oil sardine (*Sardinella longiceps*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 5(2), 33-37.
- Khangembam, B. K., & Chakrabarti, R. 2015. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: purification, characterization and its potential application. *Food Chemistry*, 175(2015) 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.140>
- Kim, K. S., & Dewapriya, P., 2014. *Enzymes from fish processing waste materials and their commercial applications. seafood processing by-products*. New-York, ABD.
- Klomklao, S. (2008). Digestive proteinases from marine organisms and their applications. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30, 37–46.
- Klomklao, S., Kishimura, H., Yabe, M., & Benjakul, S., 2007. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147, 682-689.
- Kishimura, H., Klomklao, S., Benjakul, S., & Chun, B. S., 2008. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*, 106, 194-199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.056>
- Kocatepe, D., & Turan, H. 2012. Chemical composition of cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) muscle. *Journal of Food and Nutrition Research*, 51(1): 33-39.
- Ktari, N., Khaled B. H., Nasri, R., Jellouli, K., Ghorbel, S., & Nasri, M. 2012. Trypsin from zebra blenny (*Salarias basilisca*) viscera: purification, characterisation and potential application as a detergent additive. *Food Chemistry*, 130, 467-474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.015>
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 – 685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lamas, D. L., Yeannes, M. I., & Massa, A. E. 2017. Alkaline trypsin from the viscera and heads of *Engraulis anchoita*: partial purification and characterization. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 98(2), 103 – 112. <https://doi.org/10.5114/bta.2017.68309>
- Liu, C. H., Shiu, Y. L., & Hsu, J. L. 2012. Purification and characterization of trypsin from the pyloric ceca of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Physiology Biochemical*, 38, 837-848. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9571-3>

- Lopez, R., Pontual, H., Bertignac, M., & Mahevas, S. 2015. What can exploratory modelling tell us about the ecobiology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a comprehensive overview. *Aquatic Living Resources*, 28, 61-79. <https://doi.org/10.1051/alr/2015007>
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., & Randall R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lu, B. J., Zhou, L. G., Cai, Q. F., Hara, K., Maeda, A., Su, W. J., & Cao, M. J. 2008. Purification and characterisation of trypsin from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chemistry*, 110, 352-360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.010>
- Marcuci, M., Esposito, T. S., Machado, M. F. M., Hirata, I. Y., Silva, M., Oliveira, V., & Bezerra, R. S. 2010. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2010) 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.155>
- Olives-Burrola, H., Ezequieea-Brauer, M. J., Rouzaud-Sandez, O., & Pacheco-Aguliar, R. 2001. Protease activity and partial characterization of the trypsin-like enzyme in the digestive tract of the tropical sierra *Scomberomorus concolor*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10(4), 51-64.
- Poonsin, T., Simpson, B. K., Benjakul, S., Visessanguan, W., Yoshida, A., Osatomi, K., & Klomklao, S., 2019. Anionic trypsin from the spleen of albacore tuna (*Thunnus alalunga*): Purification, biochemical properties and its application for proteolytic degradation of fish muscle. *International Journal of Biological Macromolecules*, 8130(18), 1-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.122>
- Santos, D. M. R. C., Santos, C. W. V., De Souza, C. B., De Albuquerque, F. S., Oliveira, J. M. S., & Pereira, H. J. V. 2020. Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish): Purification, characterization and application in commercial detergents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 25(2020), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101584>
- Sarkar S, Pramanik A, Mitra A, & Mukherjee J. (2010). Bioprocessing data for the production of marine enzymes. *Marine Drugs*, 8(4), 1323–1372. <https://doi.org/10.3390/md8041323>
- Sephan, T., Benjakul, S., & Kishimura, H. 2015. Purification and characterization of trypsin from hepatopancreas of pacific white shrimp. *Journal of Food Biochemistry*, 39, 388-397. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12147>
- Shahidi, F., Janak & Kamil, Y. V. A. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 12(2001), 435–464.
- Silva, J., Esposito, T., Marcuschi, M., Ribeiro, K., Cavalli, R., & Bezerra, R. 2011. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). *Food Chemistry*, 129, 777-782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.019>
- Solovyev, M. M., Kashinskaya, E. N., Rogozhin, E. A., & Moyano, F. J. 2021. Seasonal changes in kinetic parameters of trypsin in gastric and agastric fish. *Fish Physiology and Biochemistry* volume, 47, 381-391. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00919-0>
- Temiz, H., Üstün, Ş. N., Turhan, S., & Aykut, U. 2013. Partial purification and characterization of alkaline proteases from the Black Sea anchovy (*Engraulis encrasicolus*) digestive tract. *African Journal of Biotechnology*, 12(1), 56-63. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2900>
- Ünlüsayın, M., Erdilal, R., & Çağatay, T. 2009. Balık Proteinlerinin Saflaştırılmasında Kullanılan Son Yöntemler. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 3(4), 298-309.
- Valdez-Melchor, R. G., Ezquerro-Brauer, J. M., Cinco-Moroyoqui, F. J., Castillo-Yanez, F. J., Cardenas-Lopez, J. L., 2012. Purification and partial characterization of trypsin from the viscera of tropical Sierra (*Scomberomorus sierra*) from the gulf of califronia. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 694-701. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2012.00667.x>

- Van Hau, P., & Benjakul, S. 2006. Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper (*Prichanthus macracanthus*). *Journal of Food Biochemistry* 30, 478-495.
- Villalba Villalba, A. G., Ramirez-Suarez, J. C., Pacheco-Aguilar, R., Valenzuela-Soto, E. M., Lugo-Sanchez, M. E., & Figueroa-Soto, C. G. 2012. Purification and Characterization of Chymotrypsin from Viscera of Vermiculated Sailfin Catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39, 121–130. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9684-3>
- Yang, F., Su, W. J., Lu, B., Wu, T., Hara, K., & Cao, M. 2009. Purification and characterization of chymotrypsins from the hepatopancreas of crucian carp (*Carassius auratus*). *Food Chemistry*, 116, 860-866. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.035>
- Zamani, A., Madani, R., Rezaei, M., & Benjakul, S. 2017. Antioxidative activity of protein hydrolysate from the muscle of common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) prepared using the purified trypsin from common kilka intestine. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(1), 2-16. <https://doi.org/10.1080/10498850.2015.1073822>
- Zamani, A., & Benjakul, S. 2012. *Trypsin from unicorn leatherjacket (Aluterus monoceros) pyloric caeca: purification and its use for preparation of fish protein hydrolysate with antioxidative activity*. Fisheries Department, Faculty of Natural Resources and Environmental, Malayer University. IRAN.
- 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. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2011.104.123>
-