

DEĞİŞİK PROTEİN EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ KULLANILARAK BALIK TÜRLERİNİN ELEKTROFRETİK AYIRIMI, DONDURARAK SAKLAMA VE ISI İŞLEMİNİN KAS PROTEİNLERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ*

Yusuf TÜRKÖZ¹ Ali ARSLAN² Zafer GÖNÜLALAN³ Tülay İLERİ²

¹İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya-TÜRKİYE
²Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE
³Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Kayseri-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 27.04.1999

Electrophoretic Identification of Fish Species Using Various Extraction Systems, and Investigation of The Effect of Frozen Storage and Cooking on Fish Muscle Proteins

SUMMARY

Sarcoplasmic proteins were extracted from raw and cooked *Cyprinus carpio* L, *Barbus capito pectoralis*, *Capoeta turutta*, *Esox lucius*, *Onchorhynchus mykiss*, *S. Glanis* wing by using four different solutions: distilled water (dH₂O), 0.1 Molar (M) sodium chloride (NaCl), 1% sodium dodecyl sulphate (SDS), and 8 M urea. The extracts of each species were analyzed using sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Water extract of each species of raw fish showed characteristic electrophoretic protein bands. Cooking of fish caused a loss of water-extractable proteins, and no species-specific protein bands were obtained. However, 1% SDS greatly increased protein extractability and the number of protein bands on the gel, thus making the identification of the genus of cooked fish possible. The effect of frozen storage on fish muscle proteins were also investigated using SDS-PAGE.

Key Words: Fish, Protein, Identification, SDS-PAGE

ÖZET

Çiğ ve pişirilmiş sazan (*Cyprinus carpio* L), küpeli sazan (*Barbus capito pectoralis*), karabalık (*Capoeta turutta*), turna balığı (*Esox lucius*), alabalık (*Onchorhynchus mykiss*), yayın balığı (*S. glanis*) sarkoplazmik proteinleri distile su (dH₂O), 0.1 Molar (M) sodyum klorit (NaCl), % 1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 8 M üre olmak üzere 4 farklı çözelti ile ekstrakte edildi. Balıklardan elde edilen ekstraktlar sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile incelendi. Çiğ balıkların su ekstraktları elektroforezde türe spesifik karakteristik protein bandları oluşturdu. Pişirme işlemi, balıklardan su ile ekstrakte edilebilen protein miktarlarında azalmaya neden olmuştur. Pişmiş balıkların dH₂O ekstraksiyonu ile türe spesifik band elde edilemedi. Ancak % 1'lik SDS, ekstrakte edilen protein miktarı ve jelde oluşan bant sayısını büyük oranda artırarak pişmiş balıkların tür ayırımını mümkün kıldı. Ayrıca balıkları dondurarak saklamanın balık kas proteinlerine etkisi SDS-PAGE ile incelendi.

Anahtar Kelimeler: Balık, Protein, İdentifikasyon, SDS-PAGE

*Bu araştırma FÜNAP tarafından desteklenmiştir.

GİRİŞ

Hayvansal protein gereksiniminin karşılanmasında su ürünleri büyük önem taşımaktadır. Balık eti, kasaplık hayvan etlerine göre daha diyetetik ve ekonomiktir. Bu durum ülkemiz gibi çok sayıda iç sulara ve denizlere sahip olan ülkeler için daha da önemlidir. Balıkların içerdikleri kas, yağ ve kılçık oranları ile lezzet durumu satışta önemli rol oynar. Bu nedenlerle bazı balık satıcıları kılçık oranı yüksek, lezzetsiz ve kas oranı düşük olan balıkları çok kaliteli bir balık adı altında satabilir ve tüketiciyi aldatabilir.

Balık türleri elektroforetik, serolojik, kromatografik ve kimyasal yöntemlerle birbirinden ayırt edilebilir (1-6). Proteinler; molekül ağırlıkları, taşıdıkları net yükleri, izoelektrik pH'ları birbirinden farklı olan ve bazende polimorfizm gösteren makro moleküllerdir. Elektroforez, bu farklı özelliklerden yararlanılarak proteinlerin birbirinden ayrıldığı ve analizinin yapıldığı çok önemli bir tekniktir. SDS-PAGE, ısı denatürasyonu sonrası SDS'le negatif yük kazandırılan proteinlerin birbirinden ayrılarak analiz edildiği basit, pratik ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Diğer elektroforez tekniklerinde ise proteinler denatüre edilmeksizin taşıdıkları net elektriksel yük, molekül ağırlıkları ve polimorf özelliklerine göre analiz edilirler. Her bir proteinin amino asit dizisi farklı bir gen tarafından kodlanmakta ve farklı proteinler sentez edilmektedir. Bu nedenle, elektroforezde elde edilen farklı her protein bandı canlı türlerini ayırt etmede kullanılabilecek önemli bir parametredir. Bu amaçla değişik yöntemler kullanılarak, taze ve dondurulmuş balıklarda tür ayırımı (1-7); dondurulmuş balıklarda dondurmanın kas proteinlerine etkisi ve elektroforetik değişikliklerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (8-21).

Bu çalışma, SDS-PAGE ile taze ve pişmiş balık türlerini tanımlama ve dondurarak muhafazanın balık doku proteinlerine etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır.

MATERYALLER VE METOTLAR

Materyal olarak, keban baraj gölünde avlanan aynalı sazan (*Cyprinus carpio* L) küpeli sazan (*Barbus capito pectoralis*), karabalık (*Capoeta turotta*), turna balığı (*Esox lucius*) ile F.Ü. Su Ürünleri Fakültesi balık üretim çiftliğinde yetiştirilen alabalıklar (*Onchorhynchus mykiss*) kullanılmış, yayın balığı (*S. glanis*) ise Adıyaman bölgesinden temin edilmiştir. Her türden 10'ar balık araştırmaya alınmıştır.

Tür ayırımı için sarkoplazmik proteinlerin ekstraksiyonu: Sarkoplazmik proteinlerin ekstraksiyonu, An ve arkadaşları (2) metoduna göre yapıldı. Kılçık ve deriden temizlenmiş çiğ ve pişmiş (kaynar suda 5 dk. bekletilerek pişirildi) beyaz kas numuneleri, içerisinde 0.1 milimolar (mM) fenilmetilsülfonilflorid (PMSF, proteaz inhibitörü), 10 mM etilen diammin tetraasetik asit (EDTA), % 0.01'lik sodyum azid bulunan dH₂O, 0.1 M NaCl, %1'lik SDS ve 8 M üre çözeltileri ile ekstraksiyona tabii tutuldu.

Kas proteinlerinin (Aktin ve Miyozin) ekstraksiyonu: Kas proteinlerinin ekstraksiyonunda LeBLANC'ın (11) metodu uygulandı. Dondurarak muhafazanın balık doku proteinlerine etkisini incelemek amacı ile deri ve kılçıktan temizlenen kas dokuları 7, 30, 60 ve 90 gün süreyle -18 °C'de bekletildi. Dondurma sürelerinin sonunda beyaz kas dokuları, buz içinde soğutulmuş ekstraksiyon tamponu ile (100 mM KCl-20 mM KH₂PO₄; pH 7.0, 1 mM EDTA ,1 mM NaN₃ ve 0.1 mM PMSF) muamele edilerek miyofibriller proteinlerden aktin ve miyozinin izolasyonu sağlandı.

Ekstraksiyon işlemlerinin her kademesinde alınan numunelerin protein değerleri Biüret (22) ve Lowry (23) yöntemleri ile ölçüldü.

Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) uygulaması: SDS-PAGE işlemi Laemmli (24) ve O'Farrel (25) metodlarına göre yapıldı. Proteinler, 12x8 cm boyutlarında ve 1 mm kalınlığında slab jelde sepera edildi. Slab jel, proteinlerin stoklandığı yoğunlaştırıcı (% 4'lük) ve daha sonrada proteinlerin sepera edildiği ayırıcı jel (% 10'lük) kısımlarından meydana gelmektedir. Jelde sepera edilen proteinlerin molekül ağırlıkları Weber ve arkadaşları (26) metoduna göre hesaplandı. Protein standardı olarak, sığır albümini (Alb; 66.2 kD), piruvat kinaz (PK; 57 kD) ve laktat dehidrojenaz (LDH; 35 kD) kullanıldı.

BULGULAR

Araştırmanın bu kısmı çiğ ve pişmiş balık kas dokusu sarkoplazmik proteinlerinin ekstraksiyonu için en uygun ve efektif çözeltilerin tespiti amacı ile yapıldı. Örnek olması bakımından yayın balığına ait ekstraksiyon işlemi protein değerleri, çözeltilerin ekstraksiyon güçleri tablo 1 ve 2'de ve oluşan elektroforegramlar ise şekil 1 ve 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Çiğ yayın balığına ait ekstraksiyon değerleri.

| Ekstraksiyon çözeltisi | Homojenat protein değeri(mg/ml) | Süpernatant protein değ.(mg/ml) | Çözeltilinin ekstraksiyon gücü* (%) |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| dH ₂ O | 38.57 ±5.1 | 10.14 ±1.3 | 26.28 |
| 0.1 M NaCl | 44.30 ±5.85 | 12.34 ±1.9 | 27.85 |
| % 1 SDS | 35.10 ±7.5 | 23.45 ±3.5 | 66.80 |
| 8 M üre | 37.90 ±8.2 | 21.00 ±4.3 | 55.40 |

*Ekstraksiyon gücü, süpernatant protein konsantrasyonunun homojenat protein konsantrasyonuna oranının yüzdesi.

Tablo 2. Pişmiş yayın balığına ait ekstraksiyon değerleri.

| Ekstraksiyon çözeltisi | Homojenat protein değeri(mg/ml) | Süpernatant protein değ.(mg/ml) | Çözeltilinin ekstraksiyon gücü* (%) |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| dH ₂ O | 40.15 ±3.75 | 2.95 ±0.3 | 7.30 |
| 0.1 M NaCl | 44.85 ±5.5 | 3.76 ±0.6 | 8.38 |
| % 1 SDS | 100.30 ±15.2 | 17.90 ±3.5 | 17.86 |
| 8 M üre | 90.60 ±10.7 | 15.86 ±4.1 | 17.50 |

*Ekstraksiyon gücü, süpernatant protein konsantrasyonunun homojenat protein konsantrasyonuna oranının yüzdesi

Çiğ yayın balığına ait veriler, dH₂O ile 0.1 M NaCl ve % 1 SDS ile 8 M üre çözeltilerinin protein konsantrasyonları ve ekstraksiyon güçleri birbirine yakın değerler olduğunu ortaya koymuştur. Üre ve SDS'le elde edilen değerler dH₂O ve NaCl değerlerine göre oldukça yüksektir. Ancak elde edilen elektroforegramda, tür ayırımı için sadece dH₂O ve NaCl ekstraksiyonunun spesifik protein bandı oluşturduğu, SDS ve üre'nin ise spesifik protein bandı vermediği görülmektedir.

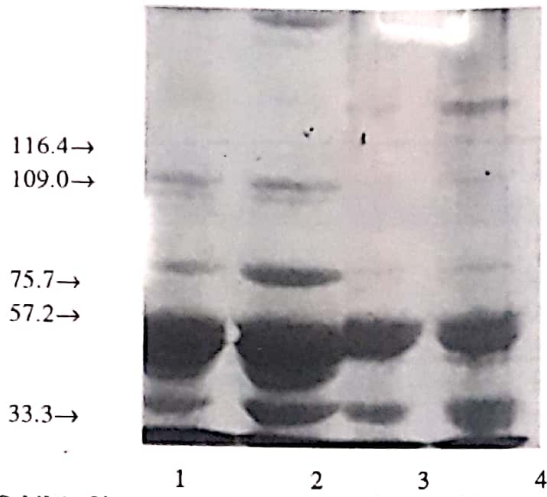
Pişirilmiş balık kas dokusunun ekstraksiyon sonuçları ve oluşan elektroforegramlar tablo 2 ve şekil 2'de verilmiştir. Isı işlemi sonrası dH₂O ve NaCl'nin ekstraksiyon güçleri ve ekstrakte ettikleri protein miktarları ortalama 4 kat azalmıştır. % 1 SDS ve 8 M üre ekstraksiyonunda protein konsantrasyonlarında önemli bir düşüş görülmezken bu çözeltilerin ekstraksiyon güçleri kayda değer derecede azalmıştır. Elde edilen elektroforegram sonuçları pişmiş balıkların tür ayırımında protein ekstraksiyonu için % 1 SDS ve 8 M ürenin daha uygun olduğunu göstermektedir. dH₂O ve NaCl ekstraksiyonu ise pişmiş balıklarda tür ayırımı için spesifik protein bandları oluşturmamıştır.

Değişik balık türlerinin elektroforetik ayırımı: Altı farklı balığın çiğ beyaz kas dokularından dH₂O ile elde edilen sarkoplazmik proteinlerin SDS-PAGE'de oluşturdukları elektroforegramlar şekil 3'te verilmiştir.

Elektroforegram verileri, alabalıkta 118.8, 62.3, 49.1; aynalı sazanda 113.8, 93.8, 63.6; karabalıkta 58.3, 49.1; küpeli sazanda 73.9; yayın balığında 116.4, 109.0, 91.8, 75.7, 57.2, 33.3 kD'luk protein bantlarının türe spesifik olduğunu ortaya koymaktadır. Turna balığı ise ayırıcı protein bandı oluşturmamıştır.

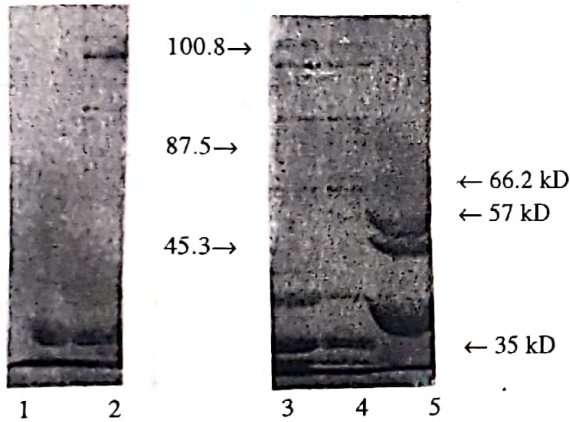
Balıkların pişmiş beyaz kas dokularından % 1'lik SDS ile elde edilen sarkoplazmik proteinlerin elektroforegramı şekil 4'te verilmiştir. Alabalık için 98.2, 50.4, 38.1; aynalı sazan için 47.3, 41.2, 34.0; karabalık için 92.6; turna balığı için 103.9, 85.4; yayın balığı için 100.8, 87.5, 84.3, 45.3 kD'luk protein bantlarının türe spesifik ayırıcı bandlar olduğu görülmektedir. Küpeli sazan ise türe spesifik protein bandı oluşturmamıştır.

Dondurarak saklamanın balık kas proteinlerine etkisi: Balıklar -18 °C'de 7, 30, 60, ve 90 gün süreyle bekletilmiştir. Her bekletme süresinin sonunda elde edilen elektroforegramlar, balık kas proteinlerinden özellikle miyozinde ve kısmende aktinde dondurarak saklamanın 30. gününden sonra başlayan, 60. ve 90. günlerinde de artarak devam eden bir azalmayı ortaya koymuştur. Dondurarak saklamanın ilk 30.uncu gününde ise balık kas proteinlerinde kayda değer bir değişiklik gözlenmemiştir.



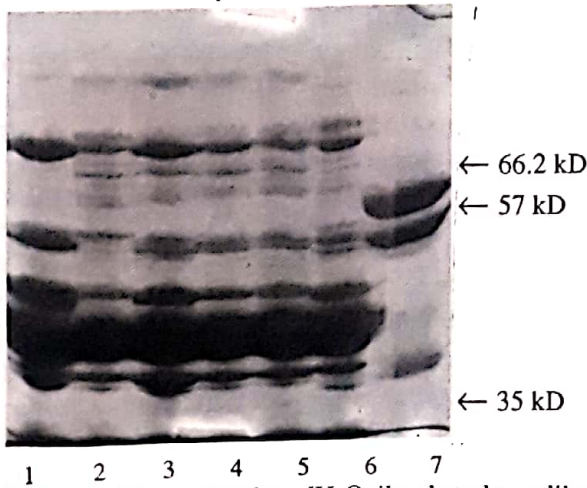
Şekil 1. Çiğ yayın balığı sarkoplazmik proteinlerinin elektroforegramı.

1. dH₂O ekstraktı,
2. 0.1 M NaCl ekstraktı,
3. % 1 SDS ekstraktı,
4. 8 M üre ekstraktı,



Şekil 2. Pişmiş yayın balığı sarkoplazmik proteinlerinin elektroforegramı.

1. dH₂O ekstraktı,
2. 0.1 M NaCl ekstraktı,
3. % 1 SDS ekstraktı,
4. 8 M üre ekstraktı,
5. Standart proteinler



Şekil 3. Çiğ balıklardan dH₂O ile ekstrakte edilen proteinlerinin elektroforegramı.

1. Alabalık, 2. Aynalı sazan 3. Kara balık, 4. Küpeli Sazan,
5. Turna, 6. Yayın, 7. Standart proteinler



Şekil 4. Pişmiş balıklardan %1'lik SDS ile ekstrakte edilen proteinlerinin elektroforegramı

1. Standart Proteinler, 2. Alabalık, 3. Aynalı Sazan,
4. Kara balık, 5. Küpeli Sazan, 6. Turna, 7. Yayın

TARTIŞMA

Bu çalışmada ekstraksiyon sistemi olarak dH₂O, 0.1 M NaCl, %1 SDS ve 8 M üre çözeltileri kullanılmıştır. dH₂O ve 0.1 M NaCl proteinleri denatüre etmeden doğal formlarını koruyarak çözünür hale getirirler, %1 SDS ve 8 M üre proteinlerin hidrofobik kısımlar ile etkileşerek veya bu etkiyi ortadan kaldırarak proteinleri alt ünitelere ayırırlar. SDS ve üre proteinleri denatüre ederken çözünürlüğü artırıcı yönde etkilerler (27). Çiğ ve pişmiş balıklardan bu dört farklı sistemle ekstrakte edilen proteinler SDS -PAGE'de sepe ayrılarak her türe ait protein bantları elde edilmiştir. Çiğ ve pişirilmiş yayın balığına ait elektroforegramlar şekil 1 ve 2'de verilmiştir.

Tüm çiğ balık numunelerinden dH₂O ve 0.1 M NaCl çözeltileri ile ekstrakte edilen protein miktarları, çözeltilerin ekstraksiyon güçleri (Tablo 1) ve elde edilen elektroforegramlar (Şekil 1) birbirine benzerlik göstermiştir. %1'lik SDS ve 8 M üre ile elde edilen protein miktarı ve ekstraksiyon güçleri dH₂O ve NaCl sisteminde göre ortalama 2 kat yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlara rağmen, çalışmaya alınan her bir tür için ayrı spesifik protein bandı oluşturması nedeni ile çiğ balık sarkoplazmik proteinlerinin ekstraksiyonunda dH₂O tercih edilmiştir.

LeBLANC ve arkadaşları (8), cod ve pollock türü balıklarla, An ve arkadaşları (1), alaska pollock ve red hake türü balıklarla ve Lundstrom (14), değişik balıklarla yaptıkları çalışmalarda, tür ayırımı için çiğ balık numunelerinden sarkoplazmik proteinlerin ekstraksiyonunda en uygun sistemin dH₂O olduğunu bildirmişlerdir.

Isı, proteinleri denatüre ederek ve büyük proteinleri daha alt ünitelere ayırarak protein çözünürlüğünü önemli derecede azaltmaktadır (9). Balık numuneleri kaynar suda 5 dk. süreyle pişirildi. Dört farklı ekstraksiyon sistemi ile elde edilen ekstraksiyon değerleri ve elektroforez sonuçları tablo 2 ve şekil 2'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre pişirme sonrası özellikle ekstrakte edilen protein miktarları, çözeltilerin ekstraksiyon güçleri çığ balık numunelerine göre kayda değer derecede azalmıştır. Elektroforez sonuçları, dH₂O ve NaCl ile elde edilen band sayısının azaldığını ve türe spesifik band oluşturmada yetersiz kaldığını göstermiştir. % 1 SDS ve 8 M üre ile oldukça yüksek değerler elde edilmiştir. Ayrıca jelde oluşan total ve türe spesifik protein band sayısı da artmıştır. SDS ve üre ekstraksiyonu ile birbirine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, 8 M ürenin çok yüksek dansite vermesi ve elektroforez sonunda protein bantlarında bozulmalara yol açması nedeni ile tür ayırımı için pişmiş balıklardan protein ekstraksiyonunda % 1'lik SDS tercih edilmiştir.

An ve arkadaşları (1), pişmiş balıklardan protein ekstraksiyonu için en uygun sistemin % 1 SDS olduğunu bildirmişlerdir.

Balık türlerinin elektroforetik ayırımı için yapılan çalışmada, çığ balık eti sarkoplazmik proteinleri dH₂O ile çözünür hale getirilerek ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktlar SDS-PAGE'ne uygulanarak proteinlerin molekül ağırlıkları ve taşıdıkları net negatif yüklerine göre birbirinden ayrılması sağlandı. Bu balıklara ait elektroforez sonuçları şekil 3'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre, türe spesifik protein bantlarının alabalıkta 118.8, 62.3, 49.1; aynalı sazanda 113.8, 93.8, 63.6; karabalıkta 58.3, 49.1; küpeli sazanda 73.9; yayın balığında 116.4, 109.0, 91.8, 75.7, 57.2, 33.3 kD'luk proteinler olduğu ve tür ayırımında kullanılabileceği tespit edilmiştir.

An ve arkadaşları (1), çığ alaska pollock ve red hake türü balıklarda yaptıkları çalışmada, alaska pollock için 94.9, 89.5, 88.3 ve 79.2; red hake türü için 87.0, 68.3, 22.7 ve 21.9 kD molekül ağırlıklı protein bantlarının türe spesifik olduğunu ve bu iki türün birbirinden ayrılmasında kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

LeBLANC ve arkadaşları (8) yaptıkları çalışmada, çığ morina ve alaska pollock türü balıkların dH₂O ekstraktlarını kapiller zon elektroforezi ile incelemişler ve türe spesifik çok sayıda protein bandı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Değişik tür balıklar kullanılarak yapılan diğer elektroforez çalışmalarında da türe spesifik çok sayıda protein bandı elde edildiği rapor edilmiştir (14-17).

Yüksek ısı, proteinleri denatüre eden ve çözünürlüğü önemli derecede azaltan bir etkidir (9). Isının doku proteinlerine etkisini incelemek amacı ile balık numuneleri kaynar suda 5 dk. bekletilerek pişirildi. Daha sonra numuneler % 1'lik SDS'le ekstrakte edildi. SDS çözeltisinde eriyen proteinler SDS-PAGE ile birbirinden ayrıldı. Boyama sonrası oluşan elektroforegram şekil 4'te verilmiştir. Pişirme işlemi protein band sayısını belirgin şekilde artırmış ancak band yoğunluklarını azaltmıştır. Özellikle çığ balıklara ait elektroforegramda 45 ve 90 kD molekül ağırlığına sahip protein bantları pişirme sonrası kaybolmuştur. Isı, proteinleri denatüre ederken muhtemelen proteinlerin % 1 SDS'deki çözünürlüğünü azaltarak yada tamamen ortadan kaldırarak çığ balık elektroforegramında tespit edilebilen bazı protein bantlarının yok olmasına neden olmuştur. Pişmiş balıklara ait elektroforegram sonuçları, alabalıkta 98.2, 50.4, 38.1; aynalı sazanda 47.3, 41.2, 34.0; karabalıkta 92.6; turna balığında 103.9, 85.4; yayın balığında 100.8, 87.5, 84.3, 45.3 kD'luk protein bantlarının türe spesifik proteinler olduğunu ve tür ayırımında kullanılabileceğini göstermiştir.

An ve arkadaşları (1) farklı türler kullanarak yaptıkları araştırmada, pişirme sonrası elde ettikleri SDS ekstraktlarını elektroforezle incelemişler ve her tür için jelde oluşan toplam band sayısının arttığını ancak türe spesifik band sayılarının dört kat azaldığını rapor etmişlerdir.

Balık üretiminin fazla olduğu ülkelerde ihtiyaç fazlası balıklar çeşitli şekillerde (konserve şeklinde veya dondurarak saklama gibi) depo edilerek yılın her gününde tüketime sunulmaktadır. Aşırı bir maliyet artışına yol açmaması sebebi ile dondurarak saklama işlemi tercih edilmektedir. Ancak dondurarak saklamada balıkların gıda değerinin zamanla düşüp düşmediği merak konusu olmuştur. Bu nedenle, dünyada ticari önemi olan balıkların dondurularak saklanmasının proteinler üzerine etkisini incelemek amacı ile çok sayıda araştırma yapılmış ve konu aydınlatılmaya çalışılmıştır (8-13).

Doğu Anadolu Bölgesi için ticari önemi olan 6 tür balık üzerinde yapılan bu çalışmada, balıkların - 18 °C'de dondurularak saklanmasının balık doku proteinlerine etkisi araştırılmıştır. Dondurarak saklamanın 7., 30., 60. ve 90. günlerinde balıkların

miyofibriler proteinleri (özellikle Aktin ve Miyozin) zole edilerek SDS-PAGE ile incelenmiştir. Elde edilen elektroforez sonuçları, balıkları -18 °C'de bekletmenin ilk 30. gününde proteinlerde kayda değer bir değişiklik olmadığını göstermektedir. Ancak 30. günden sonraki elektroforez sonuçları özellikle miyozinde başlayan ve bekletmenin 90. gününde çok belirginleşen, bir azalmayı ortaya koymuştur. Aktin proteinindeki azalma ise miyozindeki göre oldukça düşük düzeylerde kalmıştır. Miyozin bandında zamana bağlı olarak artan bu değişiklik muhtemelen miyozinin diğer proteinlerle birleşerek çözünürlüğü çok düşük ve % 10'luk poliakrilamid jele giremeyen büyük protein agregatları oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Literatürde, araştırmaya aldığımız balık türleri ile yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak -18 °C'de dondurarak saklamanın miyozin bandında azalmaya neden olması ve aktin bandının ise stabil kalması yönüyle bizim sonuçlarımız farklı türler kullanılarak yapılan diğer araştırma sonuçları ile uyumluluk göstermiştir (10-12).

LeBLANC E.L. ve LeBLANC R. (11) morina türü balıklarda yaptıkları araştırmada, balık filetolarını -12, -15, -22 ve -30 °C'de 20, 30, 90 gün süreyle bekletmek sureti ile miyofibriler proteinlerde meydana gelen değişiklikleri SDS-PAGE ve HPLC yöntemleri ile incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, -12 ve -15 °C'de muhafaza edilen balıklarda dondurarak saklamanın 20. gününde miyofibriler proteinlerden özellikle miyozin bandında kayda değer bir azalmanın olduğunu, bu azalmanın 60. ve 90. günlerde de artarak devam ettiğini ayrıca -22 ve -30 °C'de bekletilen balıkların miyozin bandındaki değişikliklerin daha düşük düzeylerde kaldığını bildirmişlerdir. Aktin bandında ise önemli bir değişiklik olmadığını ortaya koymuşlardır.

Ragnarsson ve Regenstein (10), dondurarak saklamanın miyofibriler proteinlere etkisini araştırmak amacı ile morina ve üç farklı balık türünü -7 ve -40 °C'de 50 gün süreyle bekletmişler ve dondurarak saklamanın değişik zaman aralıklarında miyofibriler proteinleri izole ederek meydana gelen değişiklikleri incelemişlerdir. Bu araştırmacılar, -7 °C'de saklamanın 3. gününde morina ve whiting türü balıkların elektroforegramında çok sayıda yeni protein bandı oluştuğunu ve 30. günde bu protein bantlarının yoğunluklarının maksimum düzeye çıktığını göstermişlerdir. 20. gün elektroforegramında ise özellikle miyozin bandının

azaldığını ve 280 kD'luk çok yoğun bir protein bandı meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Diğer iki tür balığın elektroforegramında kayda değer bir değişiklik olmadığını ortaya koymuşlardır. -40 °C'de saklanılan balıklarda ise bekletmenin 50. gününde miyofibriler proteinlerde hiç bir değişiklik gözlemediklerini bildirmişlerdir.

LeBLANC ve arkadaşları (8) morina ve pollok türü balıkları dört ay süreyle -12, -22, -30 ve -80 °C'de dondurarak saklamanın sarkoplazmik proteinlere etkisini kapiller zon elektroforezi ile incelemişlerdir. Dondurarak saklamanın 4. ayında yapılan kapiller zon elektroforez sonuçları, -12 ve -22 °C'de saklanılan balıklarda, sarkoplazmik protein band sayılarının önemli derecede azaldığını, -30 ve -80 °C'de ise protein band sayısında önemli bir değişikliğin olmadığını göstermiştir. Ayrıca bu araştırmacılar, dokulardan sarkoplazmik protein ekstraksiyonunun kolay olması ve ilave bir işlem gerektirmemesi nedeni ile sarkoplazmik protein elektroforezinin, dondurarak saklamanın balık proteinleri üzerine etkisini incelemeye daha pratik bir yol olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Dondurarak saklamanın balık miyofibriler proteinlerine etkisini araştırmak amacı ile yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (9,12,13).

Bu araştırma ile çiğ balıklar için en uygun ekstraksiyon sisteminin dH₂O, pişmiş balıklar için ise % 1'lik SDS çözeltisi olduğu ortaya konmuştur. dH₂O ve % 1'lik SDS ile ekstrakte edilen çiğ ve pişmiş balık sarkoplazmik proteinlerinin SDS-PAGE'de türe spesifik çok sayıda protein bandı oluşturduğu ve bu bandların tür ayırımında kullanılabileceği tespit edilmiştir. Aynı zamanda, -18 °C'de dondurarak saklamanın ilk 30. gününde balıkların kas proteinlerinde belirgin bir değişiklik olmadığı ancak 60. ve 90. günlerinde özellikle miyozin bandında kayda değer azalmalar meydana geldiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak; SDS-PAGE ile adı geçen balıkların çiğ ve pişmiş formlarının incelenerek tür ayırımının yapılabileceği ve ayrıca bu balıkların bir aydan uzun süre dondurularak saklanmasında -18 °C'nin uygun olmadığı, daha düşük ısı derecelerinin tercih edilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. An, H., Wei, CI., Zhao, J., Marshall, MR., Lee, CM. Electrophoretic identification of fish species in surimi products. *J.Food.Sci.*1989; 54(2): 253-7.
2. An, H., Marshall, MR., Otwell, WS., Wei, CI. Electrophoretic identification of raw and cooked shrimp using various protein extraction systems. *J.Food.Sci.* 1988; 53:313-8.
3. Armstrong, SG., Leach, DN., and Wyllie, SG. The use of HPLC protein profiles in fish species identification. *Food. Chem.* 1992; 44: 147-55.
4. Ashoor, SH., and Knox., MJ. Identification of fish species by high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.*1985; 324: 199-202.
5. Osman, MA., Ashoor, SH., and Paul, CM. Liquid chromatographic identification of common fish species. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1987; 70: 618-625.
6. Rehbein., H. Identification of fish species by HPLC of water- soluble proteins. *Informationen für die Fischwirtschaft.* 1990; 37: 25-31.
7. Salfi, V., Fucetola, F., and Pannunzio, G. A micromethod for the differentiation of fresh from frozen fish muscle. 1985, 36: 811-814.
8. LeBLANC, EL., Singh, S., and LeBLANC, RJ. Capillary zone electrophoresis of fish muscle sarcoplasmic proteins. *J.Food.Sci.*1994; 59: 1267-70.
9. Yowell, K., And Flurkey, W. Effect of freezing and microwave heating on proteins from codfish fillets: Analysis by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *J.Food.Sci.* 1986; 51: 508-12.
10. Ragnarsson, K., and Regenstein, JM. Changes in electrophoretic patterns of gadoid and non-gadoid fish muscle during frozen storage. *J.Food.Sci.* 1989; 54(4): 819-23.
11. LeBLANC, EL., and LeBLANC, R. Separation of cod (*Gadus morhua*) fillet proteins by electrophoresis and HPLC after various frozen storage treatments. *J.Food.Sci.* 1989; 54(4): 827-34.
12. Jiang, ST., and Lee, TC. Changes in free amino acids and protein denaturation of fish muscle during frozen storage. *J.Agric.Food.Chem.*1985; 33: 839-43.
13. Owusu-Ansah, YJ., and Hultin, HO. Chemical and physical changes in red hake fillets during frozen storage. *J.Food.Sci.* 1986; 135: 1402-7.
14. Lundstrom, RC. Fish species identification by agarose isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins. *J. Assoc.Off. Anal.Chem.* 1981; 64: 38-41.
15. Laird, WM., Mackie, MI, and Ritchie, AH. Differentiation of species of fish by isoelectric focusing on agarose and polyacrylamide gels- A comparison. *J.Assoc.Publ.Anal.* 1982; 20: 125-135.
16. Wei, CI., An, H., Chen, JS., and Marshall, MR. Use of a modified urea gel isoelectric focusing method for species identification of raw and boiled white, pink and rock shrimp. *J. Food. Sci.* 1990; 14: 91-102.
17. Hamilton, WD. Fish species identification by thin layer agarose isoelectric focusing and densitometric scanning. *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* 1982; 65: 119-122.
18. An, H., Marshall, MR., Otwell, WS., Wei, CI. Species identification of raw and cooked shrimp by urea gel isoelectric focusing technique. *J.Food.Sci.*1989; 54(2):233-7.
19. Chen, FTA., Keelly, L., Palmieri, R., and Schwartz, Z. Use of high ionic strength buffers for separation of protein and peptides with Capillary electrophoresis . *J.Liq.Chromatogr.*1992; 15: 1143-1161.
20. Swedberg, SA. Characterization of protein behavior in high performance capillary electrophoresis using a novel capillary system. *Anal Biochem.* 1990; 185: 51-56.
21. Gordon, MJ., Huang, X., Pentoney, SL., and Zare, RN. Capillary electrophoresis. 1988; 242: 224-228.
22. Kingsley, GR. The direct biuret method for the determination of serum proteins as applied to photoelectric and visual colorimetry. *J. Lab. Clin Med.* 1942; 27: 840- 845.
23. Lowry, OH., Rosebrough, NJ. Farr, AL. Randall, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951; 193: 265-75.
24. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680

25. O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* 1975; 250:4007.
26. Weber, K., Pringle, J.R., and Osborn, M. Measurement of molecular weights by

- electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Meth. Enzymol.* 1972; 26: 3.
27. Cantor, C.R., and Shimmel, P.R. *Biophysical Chemistry. Part.I. The Conformation of Biological Macromolecules* * W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA. 1980.