

**BALIK PROTEİNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASINDA KULLANILAN SON YÖNTEMLER****Mustafa Ünlüsayın\*, Ruhan Erdilal, Tülay Çağatay**

Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Antalya

**Özet:**

Bu çalışmada, son yıllarda balık proteinlerinin saflaştırılması için kullanılan yöntemler incelenmiştir. İncelenen kromatografik yöntemler; jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, affinite kromatografisi, revers faz kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, membran kromatografisi, hızlı performans likit kromatografisi (FPLC) ve elektroforetik yöntemler ise; izoelektrik fokuslama, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), kapiller elektroforezdir. Kullanılacak olan yöntemler saflaştırılması arzu edilen proteinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri göz önüne alınarak seçilmektedir. Proteini, en saf halde elde edebilmek için bu yöntemlerin çoğu ardaşık olarak uygulanmaktadır. En fazla miktarda protein, membran kromatografisiyle, en az miktarda protein, affinite kromatografisi ile elde edilmektedir. Son yıllarda, elde edilen saf proteinler, birçok alanda kullanıma sunulmakta ve bu alan hızla gelişen bir sektör olarak diğer sektörler arasında yerini almaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Balık, proteinlerin saflaştırılması, kromatografik yöntemler, elektroforetik yöntemler

**Abstract: The recent methods on using for purification of fish proteins**

In this study, we have reviewed that the methods have been used to purification of fish proteins in the recent years. These methods; the chromatographic (gel filtration, ion exchange, affinity, reversed phase, hidrofobic interaction, membrane and fast protein liquid chromatographies-FPLC-) and electrophoretic (isoelectric focusing, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis-SDS-PAGE-, capillary electrochromatography). Intended pure proteins which have been selected according to the characteristics of physical, chemical and biological could be purified and isolated by one or multiple of these methods. The maximum protein is obtained with the membrane chromatography, minimum protein is obtained with the affinity chromatography. In recent years, the studies about using of the pure fish proteins to increase the nutritional value in the functional foods have been carried out.

**Keywords:** Fish, protein purification, chromatographic methods, electrophoretic methods

\* **Correspondence to:** Mustafa ÜNLÜSAYIN, Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 07059, Kampus Antalya-TURKEY

Tel: (+90 326) 614 16 93 Fax: (+90 326) 614 44 68

**E-mail:** [munlusavin@akdeniz.edu.tr](mailto:munlusavin@akdeniz.edu.tr)

## Giriş

Proteinin saflaştırılması bir hücre ekstraktından, biyolojik aktivite kaybı olmaksızın proteinin izolasyonu anlamına gelmektedir. Proteinler biyolojik aktivitelerini ancak sınırlı pH ve sıcaklık aralığında göstermektedir. Dolayısıyla, saflaştırmada kullanılacak metodlar proteinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine bağlı olarak seçilmelidir (Toker, 2000).

Eczacılık sanayinde hormonlar (insülin, bovin somatostatin), viral antijenler (hepatit B antijeni), büyüme faktörleri (interferonlar, interleukinler, koloni uyarıcı faktörler) ve antikorların eldesinde protein saflaştırma yöntemleri kullanılmaktadır. Gıda sanayinde bebek mamaları gibi fonksiyonel gıdalara ilave edilmesi uygun olan proteinler ve peynir gibi gıdaların üretilmesi için zorunlu olan enzimler de saflaştırılmaktadır. Tabaklama Endüstrisinde de saflaştırılmış proteinler kullanılmakta, derilerin boyama işlemine hazırlanması amacıyla deri üzerindeki protein kısımlar, saflaştırılmış bağlayıcı proteinlerle veya saflaştırılmış proteaz enzimi ile işlenerek, deriden uzaklaştırılabilmektedir. Deterjan Endüstrisinde ise saflaştırılmış proteaz, protein bazlı lekelerdeki proteini parçalayarak, düşük ısı ve daha az enerji ile temizlik sağlar. Proteinler daha fazla verim almak için balık ve diğer hayvan yemlerine katılır, toprak iyileştirmesi ve organik azot kaynağı olarak tarlalara atılırlar. Ayrıca gıda, kimya, genetik mühendisliği gibi bölümlerde akademik çalışmalar doğrultusunda saflaştırılmış proteinler kullanılmaktadır (Wrolstad vd., 2005).

Özel bir proteinin saflaştırılması, gıdaların besinsel değerindeki rolünün ve fizikokimyasal özelliklerinin daha iyi anlaşılması için gereklidir. Benzer şekilde bir çok enzim gıdaların tekstür, renk, lezzet ve besinsel değerine olan etkisini çalışmak için saflaştırılmaktadır. Gıda zehirlenmelerine ve gıda allerjilerine neden olan proteinlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu da bu vakalardaki rollerinin daha iyi anlaşılması ve mücadele edilebilmesi bakımından gereklidir (Wrolstad vd., 2005).

Bugüne kadar su ürünleri işleme teknolojisi açısından proteinlerle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Barakuda balık proteinlerinin emülsiyon aktivitesi, emülsiyon kararlılığı, köpük oluşturma, köpük hacmi kararlılığı, viskozite, su tutma kapasitesi, jel dayanıklılığı gibi fonksiyonel özellikleri incelenmiş ve surimi gibi ürünlere ilave edilebileceği önerilmiştir (Ramachandran

vd., 2007). Alaska polloklarının (*Theragra chalcogramma*) yan ürünlerinden elde edilen proteinlerin arzu edilen fonksiyonel ve besinsel özelliklere sahip olmasından dolayı gıda endüstrisinde kullanılması önerilmiştir (Sathivel ve Bechtel, 2006). Balık yumurtalarından elde edilen proteinlerin bazı fonksiyonel özellikleri incelenmiş ve gıdaların besinsel özelliklerinin zenginleştirilmesi için ilave edilmesi uygun görülmüştür (Bechtel vd., 2007). Alabalık filetoları üzerine tuz ve şeker karışımının serpilmesiyle oluşturulan gravad balık ürününün soğukta muhafazası sırasında proteinlerinde meydana gelen değişimler incelenmiş ve saklama koşulları ile ilgili önerilerde bulunulmuştur (Michalezyk ve Surowka, 2007). Dondurulmuş ringa balıklarının muhafazası boyunca proteinlerinde meydana gelen değişiklikler incelenmiş ve 3 aydan fazla dondurulmuş olarak muhafaza edilmemesi önerilmiştir (Geirsdottir vd., 2007).

## Proteinlerin stabilizasyonu

Protein saflaştırmada en hassas konu, proteinin aktivitesinin korunmasıdır. Aktivite kaybı önlenemez ise elde edilecek ürün miktarı da o kadar azalır. Önemli olan nokta, en son basamakta daha fazla aktif protein elde etmektir. Her basamakta stabilizasyon kuralları tekrar yerine getirilmelidir. Stabilizasyonu sağlayan fiziksel ve kimyasal faktörler; pH, sıcaklık (tercihen 4°C), oksidasyon derecesi, ağır metal konsantrasyonu, polarite, proteaz ve nükleazların konsantrasyonu, saflaştırmada başlangıçtan sona kadar geçen süre ve elde edilecek ürünün ortamdaki konsantrasyonudur (Toker, 2000; Janson ve Ryden, 1998).

## Saflaştırma akış şeması

Balık proteinlerinin saflaştırılması için aşağıdaki adımlar izlenmektedir.

- *Ekstraksiyon*: Ekstraksiyon sıvılaştırma anlamına gelmektedir ve saflaştırmanın ilk koşuludur. İzolasyon koşullarına göre sadece sıvılaştırılmış materyal kullanılır. Bu işlem için su, tampon ve tuzlar kullanılmaktadır. Saflaştırma işleminin ileriki safhalarında kullanılan matriksin tıkanmasını önlemek ve matriksten maksimum performans sağlamak için, kolona uygulanmadan önce örneği diğer protein, iyon, su vb. maddelerden arındırmak önemlidir (Yada, 2004).

Gıdaların ekstraksiyon aşamasında en çok distile sudan yararlanır. Distile suda yumurta akında bulunan ovalbumin, kaslarda bulunan

miyojen, kan serumunda bulunan serumalbumin ve sütte bulunan laktalbumin gibi albuminler çökelir. Prosedür proteolizi önlemek için tercihen 4°C'de belli bir zaman periyodunda (30 dk-2 saat) distile su ile örneğin karıştırılmasını içerir. Çözünemeyen materyalleri uzaklaştırmak için yapılan santrifüj işleminden sonra, fazla tuzu elimine etmek ve kontamine olan tuzda çözünebilir proteinleri (globulinler) çöktürmek için süpernatant distile suya karşı diyaliz edilir. Hedef proteinden kayıpları engellemek için düşük moleküler ağırlıklı bir membran (<8000) diyalizde kullanılmalıdır. Diyalizin tamamlanması ile diyaliz torba içerikleri santrifüj edilir (yada filtre edilir) ve süpernatant (yada filtrat) albuminin izolasyonu için dondurulup kurutulur (Yada, 2004).

Amonyum sülfat [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] ve sodyum klorür (NaCl) gibi tuzlarda globulinler (kan serumundaki serum globülin, sütteki laktoglobülin ve kaslardaki miyosin, muko protein, glikoprotein, orosomukoid, antitripsin, lipoprotein, transferin, seruloplazmin, makroglobulin) çökelmektedir (Huang ve Ochiai, 2005; Yamashita vd., 2003). Proteinler farklı konsantrasyonlardaki çözünürlüklerine göre fraksiyonlanabilir. Bu proteinin ortamda bulunan tuza karşı hassasiyet göstermesinden kaynaklanmaktadır. Düşük iyonik güçte protein çözünürlüğü tuz konsantrasyonu ile artar (salting in), bununla birlikte yüksek iyonik güçte, protein çözünürlüğü azalır (salting out). Bu yüzden çeşitli proteinler içeren bir solüsyonda amonyum sülfat konsantrasyonu hedef proteinin çökme noktasının aşağısında ayarlanabilir. Bu hedef proteini solüsyonda bırakırken istenmeyen birçok proteini çöktürecek. Bunun aksine, tuz konsantrasyonu hedef proteinin çökme noktasının üzerinde ayarlanabilir. Bu şekilde istenmeyen proteinlerin çoğunun solüsyonda kalması sağlanır. Amonyum sülfat diyaliz, Sephadex G25 kolonunda tampon değiş tokuşu ile ya da hidrofobik interaksiyon ile proteinden uzaklaştırılabilir. Seyreltik NaCl solüsyonu kullanılarak yapılan ekstraksiyonu santrifüj ve süpernatantın (ekstrakt) suya karşı diyalizi takip eder. Diyalize (proteolizi engellemek için 4°C'de) tuz solüsyonu ile de ekstrakte edilen albuminleri globulinlerden ayırtmak için gerek vardır. Diyaliz boyunca NaCl uzaklaştırılır ve suda çözünebilir albuminler solüsyon içine bırakılırken globulinler çöktürülür. Örn: temel globulin proteinleri 0.15 M NaCl ve 11S globulin 0.35 M NaCl ile ekstrakte edilebilir (Yada, 2004).

Ayrıca uygun pH ve iyonik güçteki tamponlar da ekstraksiyon için kullanılmaktadır. Bunlara HCl/KCl, glisin/HCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/sitrik asit, sitrik asit/NaOH, asetik asit /NaOH veya sodyum asetat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, bis.tris/HCl, bis.tris propan/HCl, trietonalamin hidroklorid/NaOH, tris/HCl, dietonalamin, sodyumborata/HCl, glisin/NaOH, sodyumkarbonat/sodyum bikarbonat, sodyumborata/NaOH ve Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaOH tamponları örnek olarak verilebilir. Bütün proteinler bir izoelektrik noktaya (pI) sahiptir. İzoelektrik noktası proteinlerin hiç net yük taşımadığı pH'dır. Proteinler kendi izoelektrik noktasında en az çözünür. Proteinlerin izoelektrik noktası farklı olduğu için; başlangıçta fraksiyonlama yaparken çoğunlukla hedef proteini çözen, arzu edilmeyen proteinleri çökelekte bırakan bir pH değerindeki tampon kullanılabilir. Santrifüjden sonra, hedef proteinin izolasyonu ve saflaştırılması için süpernatant konsantre bir kaynak olarak kullanılır. Tampon çözeltiler normal konsantrasyonlarının 10-100 katı oranlarda hazırlanır ve stoklanırlar. Gerekli durumda bu stoklardan kullanılır (Ikoma vd., 2003; Yada, 2004; Toker, 2000).

Protein konsantrasyonları, örneklerin asitli sularla (pH proteinlerin pI'larına göre ayarlanır) ekstrakte edilmesi ile üretilebilir. Asitli su şeker, koku ve tat maddeleri gibi bazı küçük proteinler gibi çözünebilir maddeleri uzaklaştırır. Ekstraksiyon pH'sında polisakkaritler ve bazı minerallerle birlikte proteinlerin çoğu çözünmez ve çökelekte kalır. Çökelek bir alkali solüsyonla nötralize edilir ve protein konsantrasyonu (minimum %65 protein içeriği) gibi dondurulup kurutulur (Janson ve Ryden, 1998).

Sodyum hidroksitte (NaOH) glutelinler (buğdaydaki gluten vb.) çökelmektedir. Etanolde ise prolaminler ya da gliadinler (somon balığındaki salmin, ringa balığındaki klupein) çökelmektedir (Aksoy, 2000).

Hedef protein birçok arzu edilmeyen biyolojik materyaller içinde olabilir. Örneğin; proteazın hedef proteinin moleküler yapısı ve şeklinin bozulmasını engellemek için inaktive edilmesine ya da örnekten çabucak uzaklaştırılmasına gerek vardır. Ekstraksiyon işlemi boyunca proteaz inhibitörleri proteinlerin bozulmasını önlemek için ilave edilebilir ya da proteinlerin polimerizasyonunu teşvik eden sülfidril engelleyen için redükleyici ajanlar (merkaptotanol ve ditiotreitol) eklenebilir. Proteinlerin metal iyonlar tarafından oksitlenmesini önlemek için

EDTA gibi metal selatlar da eklenebilir. Gıda kaynaklarından alınan proteinlerin çözünebilmesi için mekanik araçlar (homojenizatör, blender ve ultrasound) kullanılır. Protein solüsyonu ekstrakte edilince denatürasyonu önlemek için soğukta (4°C) saklanır (Janson ve Ryden, 1998).

- *Hücre bütünlüğünün bozulması*: Hücre bütünlüğünün yani hücre zarının bozulması amacıyla kimyasal, fiziksel yada mekanik yöntemler kullanılmaktadır (Toker, 2000; Janson ve Ryden, 1998).

Kimyasal yöntemlerin uygulanması için deterjanlar (Triton X-100) ve organik çözücülerden yararlanılır. Bu maddeler hücrelerin membran yapısını bozarak hücre içeriğinin ortama geçmesini sağlar. Bu yöntemlerde kullanılan kimyasalların pahalı olması, istenmeyen protein denatürasyonlarına neden olması ve ortamdan hemen uzaklaştırılması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır (Janson ve Ryden, 1998).

Fiziksel yöntem olarak ozmotik lizis uygulanır. Bu metotla hücre hipotonik bir ortama alınır ve hücrenin su alıp şişerek patlaması sağlanır (Janson ve Ryden, 1998).

Mekanik yöntem olarak Fransız presi, sonikasyon ve homojenizasyon işlemleri uygulanır. Fransız presi; çelik bir kaba yerleştirilen hücre süspansiyonu üzerine uygulanan yüksek basınçla, hücreler küçük bir delikten geçirilerek membran yapılarının parçalanmasına dayanır. Sonikasyon; hücre süspansiyonuna daldırılan sonikatör, titreşim yaparak ve yüksek ses dalgalarıyla hücre bütünlüğünün bozulmasını sağlar. Homojenizasyon; en çok kullanılan yöntemdir. Cam homojenizatör kabında pistonun düzenli dönüşü ya da vuruşu ile sağlanan mekanik güçle, hücreler piston ve cam çeper arasında sıkıştırılır, hücre zarı parçalanır, hücre içeriği tampona geçer, elde edilen süspansiyon, bütünlüğü bozulmamış birçok organeli içerir ve homojenat olarak adlandırılır (Janson ve Ryden, 1998).

- *Konsantrasyon*: Konsantrasyon amacıyla santrifüj, zonal ultrasantrifügasyon, diyaliz ve ultrafiltrasyon yöntemlerinden yararlanılır (Toker, 2000; Janson ve Ryden, 1998).

Santrifüj; Sulu karışımlar (süspansiyon/homejenat)'a santrifüj kuvveti uygulandığında, daha büyük ve yoğun komponentler, daha hızlı çökerler. Santrifüj işlemi örneğe bağlı olarak 10000-50000 devirler arasında ve 15-30 dk sürmektedir. Düşük hızlı santrifüj tam hücreleri, deney ortamından ayırırken, yüksek hızlı santri-

füj farklı büyüklük ve yoğunluktaki subseleler organelleri ayırır. Differensiyel santrifüj uygulamasında homojenat, gittikçe artan santrifüj kuvvetine maruz bırakılarak fraksiyonlarına ayrılması sağlanır. Kütle büyüdükçe, çökmesini sağlayan santrifüj gücü azalır (Ramachandran vd., 2007; Chomnawang vd., 2007; Martinez-Alvarez ve Gomez-Guillen, 2006; Huang ve Ochiai, 2005). Zonal ultrasantrifügasyon; yoğunluk esasına dayanır ve santrifüje göre daha hassas bir yöntemdir. Yoğunluk ve büyüklük olarak birbirine çok yakın olan organeller, differansiyel santrifüjle ayrılamaz. Bu amaçla zonal santrifügasyon kullanılır. Plastik bir tüpte % 5-20 konsantrasyonda sukroz çözeltileri oluşturulur. En üste homojenat uygulanır. 100.000 devirde santrifüj yapılır. Homejenat, yoğunluğuna uyan tabakalara dağılır (Toker, 2000; Janson ve Ryden, 1998).

Diyaliz; molekül büyüklüğüne bağlı difüzyon anlamına gelmektedir. Yarı geçirgen bir membran aracılığıyla filtrasyon yapılır. Proteinler, tuz, iyon ve küçük moleküllerden ayrılır. 0.22µm filtreler steril filtrasyon ya da ekstra temiz örnekler için tavsiye edilir. Ultrafiltrasyonun prensibi diyalize benzer. Ultrafiltrasyon tüpünün alt kısmında yarı geçirgen bir membran bulunur. Üstten uygulanan basınçlı azot gazı ile çözücü ve küçük moleküller membran dışına çıkar. 1 000-30 000 kDa moleküler ağırlık engelleyici membranlar kullanılır (Wunschel vd., 2005; Ebran vd., 2000; Toker, 2000; Janson ve Ryden, 1998).

### Saflaştırmada kullanılan yöntemler

Proteinlerin saflaştırılması için kullanılan kromatografik ya da elektroforetik yöntemler proteinlerin fiziksel, kimyasal ya da biyolojik özelliklerine bağlı belli prensipler altında seçilir. Proteinler büyüklük ve kütlelerine göre jel filtrasyon kromatografisi, taşıdıkları net yüklere göre iyon değişim kromatografisi veya izoelektrik fokuslama, biyolojik aktivitelere göre affinite kromatografisi, polaritelerine göre revers faz kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve membran kromatografisi yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Tüm kolon kromatografilerinde prensip aynı şekildedir. Öncelikle kolon, proteinleri seçici adsorblayan bir maddeyle (katı porlu matriks) doldurulur. Matriks sistemin sabit faz kısmını oluşturur. Daha sonra protein karışımı kolona tatbik edilir ve kolon tampon çözelti ile yıkanır. Tampon çözelti sistemin mobil faz kısmıdır. Sonuçta adsorbe edilmeyen proteinler kolondan önce,

adsorbe edilen proteinler daha geç çıkarlar (Toker, 2000; Janson ve Ryden, 1998).

### Kromatografik Yöntemler

- *Jel filtrasyon kromatografisi*: Jel filtrasyon kromatografisi diğer adıyla boyut dışlama kromatografisi proteinleri molekül büyüklüğüne göre ayırır. Kolon, jel boncuklar [dekstran ya da agaros veya poliakrilamid gibi polimerler-ticari isimleri; sephadex, sepharose, biojel-, genellikle 0,1 mm çaplıdır] polisakkarid veya poliakrilamid polimer] ile doldurulur. Protein karışımını içeren tampon, kolondan geçirilir. Proteinlerin, matriksteki porlara takılma yüzdesi, büyüklüğü ile ters orantılıdır. Porlara takılan proteinler daha yavaş sürüklenirler. Bu yöntemin büyük miktarda protein karışımını saflaştırabilmesi gibi bir avantajı varken, yavaş ayırma yapması da dezavantajıdır. En iyi ayırma için kolon içine konulan örnek hacmi kolon hacminin %5'ini aşmamalıdır. Bu yüzden elde edilen örneğin hacmi küçük olmaktadır (Yada, 2004; Janson ve Ryden, 1998).

- *İyon değişim kromatografisi*: Proteinleri, üzerlerinde taşıdıkları net yüklere göre ayırır. Kolon pozitif (anyon değiştirici) veya negatif (katyon değiştirici) yüklü bağlayıcı gruplar içeren reçineyle doldurulur. Protein karışımı düşük iyonik güçteki bir tamponla kolon boyunca taşınır. Bu tamponun pH'sı hedef proteinin reçineye bağlanmasını teşvik edecek değere sahip olmalıdır. Eğer tampon pH'sı proteinin pI'dan daha küçük tutulursa proteinin yükü pozitif olur ve bir kation değiştirici ile bağlanır. Bunun tersine tampon pH'sı proteinin pI'dan daha küçük tutulursa proteinin yükü negatif olur ve bir anyon değiştirici ile bağlanarak kolonda tutulur. Bağlanmayan proteinler, kolondan ilk olarak çıkarlar. İyonik gücü ya da pH'sı farklı bir tampon kolondan geçirilir bağlı proteinlerin yükü değiştirilerek kolondan ayrılması sağlanır. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan kolonlardan farklı olarak kolonları kısa ve şişmandır. Proteinlerin pI değerinin belirlenmesi bağlayıcı grubun seçilebilmesi bakımından önemlidir. Protein çeşitliliği açısından kapasitesi yüksek olduğundan saflaştırma işleminin ilk basamaklarında kullanılabilir. Ayrıca hedef proteinin yüksek tuz konsantrasyonu içerikli tamponlarda olması arzu edilmez. Proteindeki tuzu uzaklaştırmak için yarı geçirgen membran kullanılan diyaliz uygulanabilir. Bunun için önce protein örneği bir diyaliz torbası içine konur ve bu torba su ya da arzu edilen düşük konsantrasyonlu tuzlu su tamponu içine konur.

Membran küçük tuz moleküllerini diyaliz torbasının dışını çevreleyen su ya da düşük tuz konsantrasyonlu tampon içine geçirirken proteinleri diyaliz torbasının içinde bırakır. Protein örneğinin tuzu daha hızlı bir şekilde jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak da uzaklaştırılabilir (Ötleş, 2005; Yada, 2004; Janson ve Ryden, 1998).

- *Affinite kromatografisi*: Enzim, hormon, vb. spesifik proteinlerin saflaştırılmasında kullanılır. Kolonun dolgu maddesine, (dekstran, poliakrilamid, selüloz vb.) spesifik protein ile kompleks yapabilen ligandlar (bağlayıcı grup) bağlanır. Ligand ile kompleks yapan spesifik protein, katı desteğe bağlanarak kolonda tutulurken serbest proteinler kolonu terk ederler. Bağlı protein, daha sonra, pH, iyonik güç ya da polarite değişiklikleri / tuz çözeltileri veya ligand ilavesiyle kolondan ayrılır. Ligandlar küçük moleküller (ATP, pigment, aminoasit, kofaktör ve iyonlar), nükleik asitler, şekerler, steroidler, yağ asitleri, proteinler ve antibadiler olabilir. Örneğin; konkavalin A glukoza ve Lektin mannoza bağlanan proteinlerdir ve bu yöntemle saflaştırılırlar (Ötleş, 2005; Yada, 2004; Janson ve Ryden, 1998).

- *Revers faz kromatografisi*: Proteinleri hidrofobik özelliklerine göre saflaştırır. Ters faz kromatografisi sabit fazın hidrofobik, mobil fazın sabit fazdan daha hidrofilik olduğu bir kromatografi çeşididir. Bu normal faz kromatografisinin tersi bir durumdur. Protein solüsyonu hidrokarbon zincir gruplarının bulunduğu Silica boncukları içeren bir kolona pompalanır. Örneğin; Octasesil, Butil, Propil, Fenildimetil. Proteinin hidrofobik grupları boncuklara bağlanır. Hidrofilik proteinler kolondan ilk çıkar. Bağlı proteinler genellikle asetonitril konsantrasyonunun artırılmasıyla çözündürülür. Bir çok farklı kolon boyu vardır: 2.5-5cm, 0.4-1cm ve 0.1-0.2cm. Kullanılan çözücüler, su + % 0.1 Triflorasetik asit veya Asetonitrildir. Kullanılan ligandlar: C4, C8 ya da C18 n-alkil hidrokarbonlardır. Yöntemin avantajı, çözünme daha iyi ve daha hızlı olması, dezavantajı ise standart ve kolonların pahalı olmasıdır. Bu da maliyeti arttırıcı bir özelliktir. Proteinlerin çoğu organik çözücüler yüzünden denatüre olur. Bu yüzden, bu yöntem gıda sistemlerinden ziyade analitik ayırışmalar için tavsiye edilir (Ötleş, 2005; Yada, 2004; Janson ve Ryden, 1998).

- *Hidrofobik etkileşim kromatografisi*: Kolonlar hidrofobik uçlu ligandların bağlandığı

boncuklarla doldurulur. Ligandlar hidrofobik bölgesi açıkta bırakılan proteinlere bağlanır. Böylece proteinlerin hidrofobik özelliklerindeki farklılığa göre ayrışması sağlanır. Hidrofilik bölgeleri açıkta bırakılan proteinler ligandlara bağlanmaz ve kolondan ilk olarak çıkar. Ayrıca bu interaksiyon ortama yüksek iyonik güce sahip tamponların ilavesiyle arttırılabilir. Kolona bu şekilde tutunan proteinler tuzun kademeli olarak azaltılması, deterjanların ilave edilmesi, sıcaklığın ya da pH'nın değiştirilmesi ile kolondan ayrılması sağlanır. Bu yöntemde kullanılan ligandların bağlama gücü en yüksekte en düşüğe doğru şu şekilde sıralanabilir: eter, isopropil, butil, octil, fenil (Ötleş, 2005; Yada, 2004; Janson ve Ryden, 1998).

- *Membran kromatografisi*: Metot, diğer kromatografi metotlarında olduğu gibi protein moleküllerinin katı bir desteğe adsorblanmasına dayanır. Bununla birlikte destek ortamı olarak boncukların yerine ince mikroporlu membranlar kullanılır. Bu yüzden basınç kaybı sınırlayıcı bir etki değildir. Membranların iç kısmındaki porları

hedef proteini bağlayan adsorblayıcı gruplar içerir. Yöntemin avantajı; örneğin membrandan akıp geçmesi hızı arttırır ve proteinin tutulma süresini kısaltır. Difüzyon direncinin yok edilmesinden dolayı diğer kromatografi yöntemlerinin 1/10'u sürede tamamlanır (Yada, 2004; Janson ve Ryden, 1998).

- *Hızlı performans likit kromatografisi (FPLC)*: Yerçekimi akış kromatografisi adı da verilmektedir. Proteinlerin ayrıştırılması, saflaştırılması, belirlenmesi ve nitelendirilmesi amacıyla fazlasıyla geliştirilmiş bir kolon kromatografisi modelidir. Pompalar tampon veya örneği kolon içine iter. Fraksiyonlar kolonun dışına çıkınca, protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için bir spektrofotometreden geçirildikten sonra tüpler içine otomatik olarak toplanır (Ötleş, 2005).

Tablo 1'de balık proteinlerinin saflaştırılmasında kullanılan kromatografik teknikler ile ilgili çalışmalar ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Balık proteinlerinin saflaştırılmasında kullanılan kromatografik teknikler

**Table 1.** The chromatographic methods that have been used to purification of fish protein

Tür ismi	Proteinin Adı	Ekstraksiyon	Saflaştırma Yöntemi	Kaynaklar
<b>Kas</b>				
Golyan Balığı ( <i>Gobiocypris rarus</i> )	Vitellogenin	-	Affinite Kromatografisi	Song vd. 2008
Gökkuşluğu Alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Calpain ve Calpastatin	Tris·HCl, EDTA, 2-mercaptoetanol	İyon Değişim Kromatografisi	Saito vd. 2007
Gökkuşluğu Alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Troponin, αTropomiyo sin	KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , MgCl <sub>2</sub>	HPLC	Michalczyk ve Surowka 2007
Atlantik Salmonu ( <i>Salmo salar</i> )	A-Actinin	KCl, MgCl <sub>2</sub> , metilen glikol-bis (2-aminoetil eter)-N, N, N', N'-tetraasetik asit (EGTA), phenylmethanesulfonyl florid (PMSF), sodyum profosfat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Hızlı Protein Likit Kromatografisi	Matthews vd. 2006
Japon Gümüş Balığı ( <i>Hypomesus nipponensis</i> )	Antifreeze Protein	Potasyum fosfat	Amonyum Sülfatta Fraksiyonlama, Jel Filtrasyon Kromatografisi, İyon Değişim Kromatografisi	Yamashita vd. 2003
<b>Tablo Devamı</b>				
<b>Deri</b>				
<i>Liparis atlanticus</i> , <i>Tautoglabrus adspersus</i> , <i>Hemitripterus americanus</i>	Antifreeze Protein	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Jel Filtrasyon Kromatografisi, Revers Faz Kromatografisi	Evans ve Fletcher 2004
<b>Mukus</b>				
Kaya Balığı ( <i>Sebastes schlegeli</i> )	Antibakteriyel Protein	-	İyon Değişim Kromatografisi, Jel Filtrasyon Kromatografisi	Kitani vd. 2007

Kaya Balığı ( <i>S. schlegeli</i> )	Antibakteriyel Protein	NaCl, Tris-HCl, CaCl <sub>2</sub> , MnCl <sub>2</sub>	Affinite Kromatografisi ve Jel Filtrasyon Kromatografisi	Nagashima vd. 2003
Çopra Balığı ( <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> )	Glikoprotein	Tris-HCl	Jel Filtrasyon Kromatografisi	Nakagawa vd. 2001
<b>İskelet</b>				
Sarı Yüzgeçli Dil Balığı ( <i>Limanda aspera</i> )	Antikoagulant Proteinler	Alcalas, neutras, pepsin, papain, achymotrypsin, tripsin ve Tuna balığı pilorik seka ham enzimi	İyon Değişim Kromatografisi, Jel Filtrasyon Kromatografisi	Rajapakse vd. 2005
<b>Kan</b>				
Akciğerli Baramunda ( <i>Neoceratodus forsteri</i> )	Albumin	-	İyon Değişim Kromatografisi	Metcalf vd. 2007
Sazan ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Lektin	Polietilen glikol, Tris-HCl	Affinite Kromatografisi	Nakao vd. 2007
Çopra Balıkları (Farklı türleri)	Vitellogenin	-	Kapiller Elektroferez (CZE), Membran Kromatografisi (RMCP)	Song vd. 2005
Kış Dil Balığı ( <i>Pseudopleuronectes americanus</i> )	Antifreeze Protein	-	Boyut Dışlama Kromatografisi, Affinite Kromatografisi, İyon Değişim Kromatografisi	Marshall vd. 2005
Golyan Balığı ( <i>Pimephales promelas</i> )	Vitellogenin	-	Ultrafiltrasyon Membran Kromatografisi, İyon Değişim Kromatografisi	Wunschel vd. 2005
Sazan ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Vitellogenin	-	Hydroxylapatite Kolon Kromatografisi, Jel Filtrasyon Kromatografisi	Fukada vd. 2003
Çopra Balığı ( <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> ) ve Deniz Yayın Balığı ( <i>Enchelyopus elongatus</i> )	Vitellogenin	Aprotinin, heparin	İyon Değişim Kromatografisi, Boyut Dışlama Kromatografisi	Shao vd. 2004
Sazan ( <i>Cyprinus carpio</i> ) Tatlısu Levreği ( <i>Perca fluviatilis</i> )	Vitellogenin	-	İyon Değişim Kromatografisi, Boyut Dışlama Kromatografisi	Hennies vd. 2003
Pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> )	Lipoprotein	NaCl	Jel Filtrasyon Kromatografisi	Folly vd. 2001
<b>Ovaryum</b>				
Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	Vitellogenin	Tris-HCl, aprotinin, NaCl, NaN <sub>3</sub>	Hydroxylapatite Kromatografisi, Jel Filtrasyon Kromatografisi (FPLC'de)	Fujiwara vd. 2005
Ot Sazanı ( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> )	Lektin	Tris-HCl, NaCl	Affinite Kromatografisi	Lam ve Ng 2002
Zebra Balığı ( <i>Danio rerio</i> )	Lipovitellin	Tris-HCl, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	Jel Filtrasyon Kromatografisi, İyon Değişim Kromatografisi	Holbech vd. 2001
<b>Tablo Devamı</b>				
<b>Yumurta</b>				
İspanyol Uskumrusu ( <i>Scomberomorus niphonius</i> )	Lektin	Tris-HCl, NaCl	Affinite Kromatografisi, İyon Değişim Kromatografisi	Terada vd. 2007
Ot Sazanı ( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> )	Lektin	Tris-HCl, NaCl	Affinite Kromatografisi, İyon Değişim Kromatografisi (FPLC'de)	Ng vd. 2003
Sazan ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Lektin	Tris-HCl, KCl, NaN <sub>3</sub> , PMSF, CaCl <sub>2</sub>	Jel Filtrasyon Kromatografisi	Galliano vd. 2003

### Elektroforetik Yöntemler

- *İzoelektrik fokuslama*: Metot, bir fokuslama sistemi içinde protein örneğinin arzu edilen pH aralığındaki taşıyıcı amfolit ya da diğer taşıyıcı tamponlarla karışmasına dayanır. Amfolit çözeltisindeki  $H^+$  ve  $OH^-$  iyonları, biri diğerini nötralize ederek sürüklenirken, fokuslama sistemi üzerinde farklı pH değerleri oluşur. Protein karışımı izoelektrik ortamına uygulanıp elektroforez yapıldığında, karışımdaki her protein kendi izoelektrik noktasına kadar ortam üzerinde sürüklenir ve durur. Yöntemin avantajı; protein karışımları jel ortamı olmaksızın kendi pI'larına göre fraksiyonlanır. Dezavantajı; proteinler kendi pI'larında yüksek konsantrasyonlarda çökerler ve bu fraksiyonların birleşmesine sebep olur. pH gradienti oluşturmak için kullanılan amfolitler elektrosprey iyonizasyon-mass spektrometresi gibi sonra uygulanabilecek analizleri engelleyebilir. Bu problemten kaçınmak için amfolitleri uzaklaştırmak üzere protein fraksiyonları diyaliz edilebilir ya da jel kromatografisinden geçirilebilir. Yüksek derecede hidrofobik proteinler örnek hazırlamada ya da proteinlerin kendi pI'larına ulaştıklarında fokuslama boyunca kaybedilebilir (Ötleş, 2005; Yada, 2004; Janson ve Ryden, 1998).

- *Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)*: En yaygın olarak kullanılan protein elektroforez tekniğidir. Bu metodda, örnek hazırlama tamponuna bir miktar anyonik bir deterjan olan SDS eklenir. SDS, örnekteki protein moleküllerinin etrafında boşluk kalmayacak şekilde bir katman oluşturur. Sonuçta, her molekül, homojen bir şekilde (-) yük-

kaplanmış olur. Poliakrilamid, polimerizasyondan önce akrilamid içeriği değiştirilerek porozitesi kolaylıkla değiştirilebilen inert bir destek materyalidir. Elektroforetik ayırmada sadece etkin moleküller kütleyle bağlıdır ve jeldeki moleküller elek doğrultusunda ayırma gerçekleşir. Bu yöntem daha çok proteinlerin molekül ağırlıklarının saptanmasında, protein saflığının kontrolünde, proteinleri fraksiyonlamada, saf proteinin alt yapısının incelenmesinde kullanılmaktadır (Janson ve Ryden, 1998).

- *Kapiller Elektroforez*: Bu yöntemin avantajları; duyarlı olması, düşük reaktif (sadece tampon) sarfiyatı nedeniyle test maliyetinin düşük olması, az miktarda örnekle çalışılabilmesi, hızlı sonuç alınmasından ve fazla sayıda fraksiyon elde edilmesinden dolayı otomasyona uygun olması ve test çeşitliliğinin fazla olmasıdır. Kapiller elektroforez küçük çaplı (25-75  $\mu$ m), 100 cm. uzunluğunda 'fused' silika bir kapiller boru kullanılarak gerçekleştirilen bir yöntemdir. Kapillerin sonundan yüksek bir voltaj uygulandığında örnek moleküller, iç kapiller yüzeyde aşırı (+) iyonların katoda doğru hareketinin sonucunda oluşan bir hacim akışı olan elektroozmotik akışla ayrılır. Örnekteki (+) iyonlar, elektroozmotik akış ve iyon hareketinin aynı yönde olması nedeniyle kapiller çıkışa daha erken gelirler. Örnekteki (-) iyonlar, aynı zamanda kapiller çıkışa hareket ederler, ama hızları daha yavaştır (Janson ve Ryden, 1998).

Tablo 2'de balık proteinlerinin saflaştırılmasında kullanılan elektroforetik teknikler ile ilgili çalışmalar ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Balık proteinlerinin saflaştırılmasında kullanılan elektroforetik teknikler**Table 2.** The electrophoretic methods that have been used to purification of fish protein

Tür ismi	Proteinin Adı	Ekstraksiyon	Saflaştırma Yöntemi	Kaynaklar
<b>Kas</b>				
Sardalya ( <i>Sardinops sagax</i> )	Miyoglobin (Mb)	Amonyum sülfat, etanol	SDS-PAGE	Joo ve Park 2007
Ringa Balığı ( <i>Clupea harengus</i> )	Miyosin, Nebulin, Titin	Distile su	Asit-Baz Çözünürlüğü, SDS-PAGE	Undeland vd. 2003
Uskumru ( <i>Trachurus japonicus</i> )	Connectin ve Nebulin	SDS, sodyum fosfat	SDS-PAGE	Mitsuhashi vd. 2002
<b>Deri</b>				
Nil Tilipiası ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Jelatin	Asetik asit, formik asit	SDS-PAGE	Songchotikunpan vd. 2008
<b>Mukus</b>				
Gökkuşluğu Alabalığı ( <i>O. mykiss</i> ), Yılan Balığı ( <i>Anguilla anguilla</i> ), Kadife Balığı ( <i>Tinca tinca</i> )	Glikoprotein	HEPES, NaCl, KCl, NaHCO <sub>3</sub> , EDTA, EGTA, PMSF, pepstatin A, leupeptin, aprotinin	Santrifüj, Ultrafiltrasyon, SDS-PAGE	Ebran vd. 2000
<b>Kan</b>				
Çopra Balıkları (Farklı türleri)	Vitellogenin	-	Kapiller Elektroforez (CZE), Membran Kromatografisi (RMCP)	Song vd. 2005

## Sonuç

Balık proteinlerinin saflaştırılmasında, arzu edilen proteinin saflık derecesine göre sadece tek bir yöntem kullanılabilirken ardışık olarak birçoğu da kullanılabilir. Ekstraksiyon aşamasından itibaren her saflaştırma aşamasında toplam protein içeriği ve örnekte bulunan proteinlerin çeşidi devamlı olarak kontrol edilmelidir. Miktar olarak en fazla protein eldesine imkân veren yöntemler, membran kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik interaksiyon kromatografisi ve revers faz kromatografisidir. Küçük miktarda protein saflaştırmak istendiğinde affinite kromatografisi tercih edilebilir (Wrolstad vd., 2005).

Protein herkesin almak zorunda olduğu bir temel besin maddesidir. Balık ve diğer su ürünleri protein eldesi için ucuz bir hammadde alternatifidir. Saf halde elde edilen balık proteinleri karakteris-

tik bir koku içermez ve tüketici kesim açısından protein hammadde kaynaklı besinler yerine saf proteinlerin alınması daha ucuza mal olur. Elde edilen saf proteinler çeşitli fonksiyonel gıdalara ilave edilerek gıdaların besinsel değeri arttırılabilir. Protein sadece gıda endüstrisinde değil eczacılık sanayinde, tabaklama endüstrisinde ve hatta sadece insanlar için değil bazı zirai hayvanların üretiminde ve tarımsal üretimde kullanılabilir. Günümüzde, özellikle sporcu proteinleri, proteinli içecekler vb. ürünlerin kullanımındaki artış, bu sektörün hızla geliştiğini göstermektedir. Bu kadar geniş bir kullanım alanına sahip olan proteinlerin ekonomik değeri düşük olan balıklardan saf halde elde edilmesine yönelik çalışmalar yapılmasının ülke ekonomisi için büyük bir kazanç olacağı kanısındayız.

## Kaynaklar

- Aksoy, M. (2000). *Beslenme Biyokimyası*. 622 s., Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Bechtel, P. J., Chantarachoti, J., Oliveira, A. C. M., Sathivel, S., (2007). Characterization of protein fractions from immature Alaska walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) roe, *Journal of Food Science*, **72**(5): 338-343.
- Chomnawang, C., Nantachai, K., Yongsawatdigul, J., Thawornchinsombut, S., Tungkawachara, S., (2007). Chemical and biochemical changes of hybrid catfish fillet stored at 4 °C and its gel properties, *Food Chemistry*, **103**: 420-427.
- Ebran, N., Julien, S., Orange, N., Auperin, B., Molle, G., (2000). Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1467**: 271-280.
- Evans, R. P., Fletcher, G. L., (2004). Isolation and purification of antifreeze proteins from skin tissues of snailfish, cunner and sea raven, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1700**: 209-217.
- Folly, E., Bastos, V.L.C., Alves, M.V., Bastos, J.C., Atella, G.C., (2001). A high density lipoprotein from *Piaractus mesopotamicus*, pacu, (Osteichthyes, Characidae), is associated with paraoxonase activity, *Biochimie*, **83**: 945-951.
- Fujiwara, Y., Fukada, H., Shimizu, M., Hara, A., (2005). Purification of two lipovitellins and development of immunoassays for two forms of their precursors (vitellogenins) in medaka (*Oryzias latipes*), *General and Comparative Endocrinology*, **143**: 267-277.
- Fukada, H., Fujiwara, Y., Takahashi, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., Hara, A., (2003). Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: purification and development of a simultaneous chemiluminescent immunoassay, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **134**: 615-623.
- Galliano, M., Minchiotti, L., Campagnoli, M., Sala, A., Visai, L., Amoresano, A. Pucci, P., Casbarra, A., Cauci, A., Perduca, M., Monaco, H.L., (2003). Structural and biochemical characterization of a new type of lectin isolated from carp eggs, *Biochemical Journal*, **376**: 433-440.
- Geirsdottir, M., Hlynsdottir, H., Thorkelsson, G., Sigurgisladottir, S. (2007). Solubility and viscosity of herring (*Clupea harengus*) proteins as affected by freezing and frozen storage, *Journal of Food Science*, **72**(7): 376-380.
- Hennies, M., Wiesmann, M., Allner, B., Sauerwein, H., (2003). Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. *The Science of the Total Environment*, **309**: 93-103.
- Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G. I., Korsgaard, B., Pedersen, K. L., Bjerregaard, P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **130**: 119-131.
- Huang, M-C., Ochiai, Y. (2005). Fish fast skeletal muscle tropomyosins show species-specific thermal stability, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **141**: 461 - 471.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., Mann, S., (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*, *International Journal of Biological Macromolecules*, **32**: 199-204.
- Janson, J.C., Ryden, L., (1998). Protein Purification- Principles, High Resolution Methods, and Applications. 695 p. Wiley-VCH, New York.
- Joo, J.D., Park, J.W. (2007). Extraction of sardine myoglobin and its effect on gelation properties of Pacific whiting surimi, *Journal of Food Science*, **72**: 202-207.
- Kitani, Y., Tsukamoto, C., Zhang, G. Nagai, H., Ishida, M., Ishizaki, S., Shimakura, K., Shiomi K., Nagashima, Y., (2007). Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli*, *FEBS Journal*, **274**: 125-136.
- Lam, Y.W., Ng, T.B., (2002). Purification and characterization of a rhamnose-binding

- lectin with immunoenhancing activity from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) ovaries, *Protein Expression and Purification*, **26**: 378–385.
- Marshall, C.B., Chakrabarty, A., Davies, P.L., (2005). Hyperactive antifreeze protein from winter flounder is a very long rod-like dimer of  $\alpha$ -helices, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**(18): 17920–17929.
- Martinez-Alvarez, O., Gomez-Guillen, M.C., (2006). Effect of brine salting at different pHs on the functional properties of cod muscle proteins after subsequent dry salting, *Food Chemistry*, **94**: 123-129.
- Matthews, S.J., Ross, N.W., Lall, S.P., Gill, T.A., (2006). Astaxanthin binding protein in Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **144**: 206–214.
- Metcalf, V.J., George, P.M., Brennan, S.O., (2007). Lungfish albumin is more similar to tetrapod than to teleost albumins: Purification and characterisation of albumin from the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **147**: 428–437.
- Michalezyk M., Surowka K., (2007). Changes in protein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gravads during production and storage, *Food Chemistry*, **104**: 1006–1013.
- Mitsubishi, T., Kasai, M., Hatae, K., (2002). Detection of giant myofibrillar proteins connectin and nebulin in fish meat by electrophoresis in 3-5% gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide slab gels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 7499-7503.
- Nagashima, Y., Kikuchi, N., Shimakura, K., Shiomi, K., (2003). Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegeli*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **136**: 63–71.
- Nakagawa H., Hama Y., Sumi T., Li S.C., Li Y.T., (2001). KDN-containing glycoprotein from loach skin mucus, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **491**: 171-84.
- Nakao, M., Kajiyama, T., Sato, Y., Somamoto, T., Kato-Unoki, Y., Matsushita, M., Nakata, M., Fujita, T.F., Yano, T., (2007). Lectin pathway of bony fish complement: identification of two homologs of the mannose-binding lectin associated with MASP2 in the common carp (*Cyprinus carpio*), *The Journal of Immunology*, **177**: 5471-5479.
- Ng, T.B., Lam, Y.W., Woo, N.Y.S., (2003). The immunostimulatory activity and stability of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) roe lectin, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **94**: 105–112.
- Ötleş, S., (2005). *Methods of Analysis of Food Components and Additives*. 437 p., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Rajapakse, N., Jung, W.K., Mendis, E., Moon, S.H., Kim, S.K., (2005). A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation, *Life Sciences*, **76**: 2607–2619.
- Ramachandran, D., Mohan, M., Sankar, T.V., (2007). Physicochemical characteristics of muscle proteins from barracuda (*Sphyraena jello*) of different weight groups, *LWT-Food Science and Technology*, **40**: 1418–1426.
- Saito, M., Li, H., Thompson, V. F., Kunisaki, N., Goll, D. E. (2007). Purification and characterization of calpain and calpastatin from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **146**: 445–455.
- Sathivel, S., Bechtel, P.J., (2006). Properties of soluble protein powders from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*), *International Journal of Food Science and Technology*, **41**: 520-529.
- Shao, J., Shi, G., Liu, J., Jiang, G., (2004). A rapid two-step chromatographic method for the quantitative determination of vitellogenin in fish plasma, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**: 615–620.
- Song, M, Lv, X., Wang, H., Jiang, G. (2008). Fast purification of trace vitellogenin from Chinese rare minnow using protein A-immobilized antibody, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **390**: 2151–2157.
- Song, M., Wang, J., Shao, J., He, B., Jiang, G., Shi, G., (2005). Separation and detection of vitellogenin in fish plasma by capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography B*, **821**: 38–44.

- Songchotikunpan, P., Tattiyakul, J., Supaphol P., (2008). Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin, *International Journal of Biological Macromolecules*, **42**: 247–255.
- Terada, T., Watanabe, Y., Tateno, H., Naganuma, T., Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H., (2007). Structural characterization of a rhamnose-binding glycoprotein (lectin) from Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) eggs, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1770**: 617–629.
- Toker, N.Y., (2000). Protein saflaştırılması ile ilgili bazı metodlar, *Vetfakdergi*, **2**, 12. Makale.
- Undeland, I., Kelleher, S.D. Hultin, H.O., McClements, J., Thongraung, C., (2003). Consistency and solubility changes in herring (*Clupea harengus*) light muscle homogenates as a function of pH, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 3992-3998.
- Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D.M., Sporns, P., (2005). *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 768 p. Wiley –Interscience, Hoboken, N. J.
- Wunschel, D., Schultz, I., Skillman, A., Wahl, K., (2005). Method for detection and quantitation of fathead minnow vitellogenin (Vtg) by liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Aquatic Toxicology*, **73**: 256–267.
- Yada, R.Y., (2004). *Proteins in Food Processing*. 686 p. Woodhead Publishing, Cambridge.
- Yamashita, Y., Miura, R., Takemoto, Y., Tsuda, S., Kawahara, H., Obata, H., (2003). Type III antifreeze protein from a mid-latitude freshwater fish, japanese smelt (*Hypomesus nipponensis*), *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **67**(3): 461-466.