



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİPURA (*SPARUS AURATA*, LINNEAUS 1758) LARVALARININ
KORTİZOL SEVİYELERİ ÜZERİNE TİCARİ BESLEME
PROSEDÜRÜNÜN ETKİLERİ**

Gökşen HAKÖZÜ

**SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY
ARALIK-2014**



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİPURA (*SPARUS AURATA*, LINNEAUS 1758) LARVALARININ
KORTİZOL SEVİYELERİ ÜZERİNE TİCARİ BESLEME
PROSEDÜRÜNÜN ETKİLERİ**

Gökşen HAKÖZÜ

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
ARALIK-2014**

ÖZET

ÇİPURA (*SPARUS AURATA*, LINNEAUS 1758) LARVALARININ KORTİZOL SEVİYELERİ ÜZERİNE TİCARİ BESLEME PROSEDÜRÜNÜN ETKİLERİ

Bu çalışmanın amacı çipura larvalarının (*Sparus aurata*) kortizol seviyeleri üzerine ticari yemler Gemma Micro (50-100 µ) ve Caviar (100-200µ) ve canlı yemlerin Zenginleştirilmiş Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli etkilerini belirlemektir. Aynı zamanda, larvaların proteaz aktiviteleri üzerine kullanılan ticari ve canlı yemlerin inhibisyon etkileri de belirlendi.

Çipura larvalarının prelarval aşamasında gözlenen en düşük ve en yüksek proteaz aktiviteleri sırasıyla $0,77 \pm 0,36$ U/mg protein (0. gün) ve $4,77 \pm 0,7$ U/mg protein (4. gün) oldu. Larvaların postlarval aşamasında gözlenen en düşük ve en yüksek proteaz aktiviteleri sırasıyla $5,75 \pm 0,51$ U/mg protein (25. gün) ve $111,57 \pm 0,74$ U/mg protein (15. gün) oldu. Zenginleştirilmiş rotiferler en düşük proteaz aktivitesine ($17,98 \pm 2,82$ U/mg protein) sahipti. *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli'nin proteaz aktiviteleri sırasıyla $34,67 \pm 0,88$ U/mg protein ve $317,16 \pm 2,67$ U/mg protein olarak bulundu. Canlı yemler, zenginleştirilmiş rotiferlerle beslemenin 10. günü dışında larvaların proteaz aktiviteleri üzerine pozitif katkılara sahipti.

Gemma Micro (50-100 µ)'nun en düşük inhibisyon yüzdesi %13,17 (5. gün) olarak belirlendi.. Gemma Micro (50-100 µ) 20. ve 25. günlerde çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde Caviar (100-200 µ)'dan daha düşük inhibisyonlara sahipti.

Çipura larvalarının kortizol değerleri arasında önemli farklılıklar gözlemlendi ($p < 0,05$). Çipura larvalarının en düşük ve en yüksek kortizol değerleri sırasıyla $0,099 \pm 0,009$ ng/g (35. gün) ve $4,033 \pm 0,38$ ng/g (10. gün) olarak bulundu. Çipura larvaları, anaçlardan gelen kortizol çıkıştan sonra prelarval dönemde düşürülememesinden dolayı ilk beslemenin başlangıcında yüksek kortizol değerlerine sahipti ($1,199 \pm 0,15$ ng/g).

Sonuç olarak; 1) İlk beslemenin başlangıcında yüksek kortizol değerlerinin sebepleri gelecekte araştırılması gerekir 2) Çipura larvalarının ilk 10 günlük besleme periyodu, bu aşamada kullanılan rotiferlerin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerindeki negatif etkileri ve besinsel yetersizliklerinden dolayı kritik bir öneme sahiptir 3) Kuru yemlere geçiş aşamasında *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli ticari yemlerle başarılı bir şekilde kullanılabilirken, zenginleştirilmiş rotiferlerin ticari yemlerle kullanımı önerilmez 4) Gemma Micro (50-100 µ), *Artemia* naupli ile birlikte daha erken dönemlerde kullanılabilir.

2014, 69 sayfa

Anahtar Kelimeler: Çipura, proteaz aktivite, kortizol, stres

ABSTRACT

THE EFFECTS of COMMERCIAL FEEDING PROCEDURES on CORTISOL LEVELS of GILTHEAD SEABREAM (*SPARUS AURATA*, LINNEAUS 1758) LARVAE

The aims of this study were to determine the effects of commercial diets (Gemma Micro (50-100 µ) and Caviar (100-200µ)) and live foods (Enriched Rotifer, *Artemia* nauplii and *Artemia* metanauplii) on the cortisol levels of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae and also, the inhibition effects of commercial diets and live foods used on protease activities of larvae.

The lowest and highest protease activities observed in the prelarval stage of gilthead seabream larvae were 0.77 ± 0.36 U/mg protein (day 0) and 4.77 ± 0.7 U/mg protein (day 4), respectively. The lowest and highest protease activities observed in the postlarval stage of larvae were 5.75 ± 0.51 U/mg protein (day 25) and 111.57 ± 0.74 U/mg protein (day 15), respectively. Enriched rotifer had the lowest protease activity (17.98 ± 2.82 U/mg protein). The protease activities of *Artemia* nauplii and *Artemia* metanauplii were found as 34.67 ± 0.88 U/mg protein and 317.16 ± 2.67 U/mg protein, respectively. Live foods had positive contributions on protease activities of larvae except for 10th day of feeding with enriched rotifer.

The lowest inhibition percent of Gemma Micro (50-100 µ) was determined as 13.17% (day 5). Gemma Micro (50-100 µ) had lower inhibitions on protease activities of seabream larvae than those of Caviar (100-200 µ), especially day 20 and day 25.

The significant differences between cortisol levels of seabream larvae were observed ($p < 0.05$). The lowest and highest cortisol levels of seabream larvae were found 0.099 ± 0.009 ng/g (day 35) and 4.033 ± 0.38 ng/g (day 10), respectively. Seabream larvae had high cortisol levels at the beginning of exogenous feeding due to the maternal cortisol was not reduced in prelarval stage after hatching (1.199 ± 0.15 ng/g).

In conclusion, (1) the reasons of the high cortisol levels at the beginning of exogenous feeding should be investigated in future, (2) the first 10-day feeding period of seabream larvae had a critical importance due to the rotifers used in this stage are the nutritional deficiencies and the negative effects on protease activities of seabream larvae, (3) *Artemia* nauplii and *Artemia* metanauplii in weaning stage can successfully be used together with commercial diets but not the enriched rotifer, (4) Gemma Micro (50-100 µ) can be used in earlier periods together with *Artemia* nauplii.

2014, 69 pages

Key Words: Seabream, protease activity, cortisol, stress

TEŞEKKÜR

Öncelikle lisans ve yüksek lisans eğitim hayatım boyunca her konuda bana destek olup beni eğiten, yüksek lisans tez konusunun belirlenmesi, araştırmalarının yapılması ve tez yazım süresince tecrübelerini benimle paylaşarak bana yol gösteren saygı değer hocam ve danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mehmet NAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tecrübeleri ve güler yüzleri ile bana yol gösteren saygı değer hocalarımız, Prof. Dr. Ayçe GENÇ'e ve Prof. Dr. Funda TURAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda yanımda olarak bana destek veren kıymetli dostlarım, Yük. Müh. Ali UYAN'a, Yük. Müh. Rengin GÜRAĞAÇ'a ve Sayın Betül ARSLAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi'nden Dr. İlter İLHAN'a ELISA testlerindeki yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Doğduğum günden beri her anımda yanımda olan, destekleri ile bana güç veren, çocukları olduğum için onur duyduğum sevgili annem NAZLI HAKÖZÜ, babam EMİN HAKÖZÜ'ne ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Tez çalışmamın örnekleme süresinde her türlü imkânlarından yararlanmamı sağlayan EGEMAR Su Ürünleri Gıda Sanayi Ticaret A.Ş.'nin sahibi Metin NEKE'ye ve orada her soru ve sorunuma cevap olan Sayın Onur KÜNKÇÜ'ye, Sayın İsmet OFLAZ'a ve Sayın Hüseyin DEMİRTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi'nden Uzm. Gürkan DİKEN'e, teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmamı rahmetli anneciğimin anısına ithaf ediyorum.

ARALIK 2014, Gökşen HAKÖZÜ

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Çipura (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Balığının Sistematiği.....	7
2.2. Çipura (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Balığının Biyolojisi.....	7
2.3. Çipura (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Yetiştiriciliğinde Kültür Şartları.....	8
2.4. Çipura (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Yetiştiriciliğinde Larval Dönem.....	8
2.5. Çipura (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Larvalarında Sindirim Sistemi Gelişimi.....	9
2.6. Çipura (<i>Sparus aurata</i> L.1758) Larvalarında Beslenme.....	10
2.7. Canlı Yemlerde Sindirim Enzim Çalışmaları.....	11
2.8. Balıklarda Sindirim Enzim Çalışmaları.....	13
2.9. Stres Hormonları.....	20
2.9.1. Balıklarda Stres Metabolizması.....	20
2.9.2. Kortizol Hormonu Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	22
2.10. Sindirim Hormonları.....	26
2.10.1. Bombesin.....	26
2.10.2. Kolesistokinin.....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Araştırma Yeri.....	29
3.1.2. Denemede Kullanılan Larvalar.....	29
3.1.3. Denemede Kullanılan Tank Sistemi.....	29
3.1.4. Denemede Kullanılan Canlı ve Mikroyemler.....	29
3.2. Örneklemeye.....	31

3.2.1. Denemedeki Ortam Şartları.	31
3.2.2. Beslenme Programı.	31
3.2.3. Analizler	32
3.2.3.1. Çipura Larva Ekstraktlarının Hazırlanması.....	33
3.2.3.2. Protein Solüsyonlarının Hazırlanması.....	33
3.2.3.3. Protein Analizi	34
3.2.3.4. Çipura Larvalarının Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	34
3.2.3.5. Mikroyemlerin ve Canlı Yemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkileri.....	34
3.2.3.6. Kortizol Analizi.....	35
3.2.4. İstatistiksel Analizler.....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	38
4.1. Çipura Prelarvalarının ve Postlarvalarının Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi...	39
4.2. Mikroyemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkileri	42
4.3. Canlı Yemlerin Proteaz Aktiviteleri.....	44
4.4. Canlı Yemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri.....	47
4.5. Kortizol Analizi.....	51
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	2008-2012 yılları arasındaki dünya su ürünleri üretim değerleri.....	1
Şekil 1.2.	2008-2012 yılları arasında ülkemizin yetiştiricilik ve avcılıktan gelen toplam su ürünleri üretimi ve bu üretimde çipura yetiştiriciliğinin payı...	2
Şekil 1.3.	2008-2012 yılları arasında çipura balığının ülkemizdeki toplam yetiştiricilik üretimindeki payı.....	2
Şekil 3.1.	Kortizol analizi esnasında kullanılan ELISA yıkama ünitesi.....	36
Şekil 3.2.	Kortizol analizi esnasında kullanılan RAYTO marka RT-6000 ELISA READER.....	36
Şekil 3.3.	Kortizol analizleri için ön hazırlıklar, pipetleme ve inkübasyon aşamaları.....	37
Şekil 4.1.	Çipura larvalarının prelarval (0-4.gün) dönemlerindeki proteaz aktivitelerinde gözlenen değişimler.....	38
Şekil 4.2.	Çipura larvalarının prelarval (0-4.gün) ve postlarval (5-40.gün) dönemlerindeki proteaz aktivitelerinde gözlenen değişimler.....	39
Şekil 4.3.	Mikroyemlerin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon değerleri (%)......	41
Şekil 4.4.	Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin proteaz aktivitelerinde gözlenen değişimler.....	44
Şekil 4.5.	Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin proteaz katkı ve inhibisyonları.....	47
Şekil 4.6.	Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin bireysel proteaz katkı ve inhibisyonları.....	48
Şekil 4.7.	Çipura larvalarının 5. günden ve 40. güne kadar olan her beş günlük dönemdeki kortizol seviyeleri.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Çipura (<i>Sparus aurata</i> L.1758) balığının sistematığı.....	7
Çizelge 3.1.	Çipura larvalarının ticari besleme prosedürü.....	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

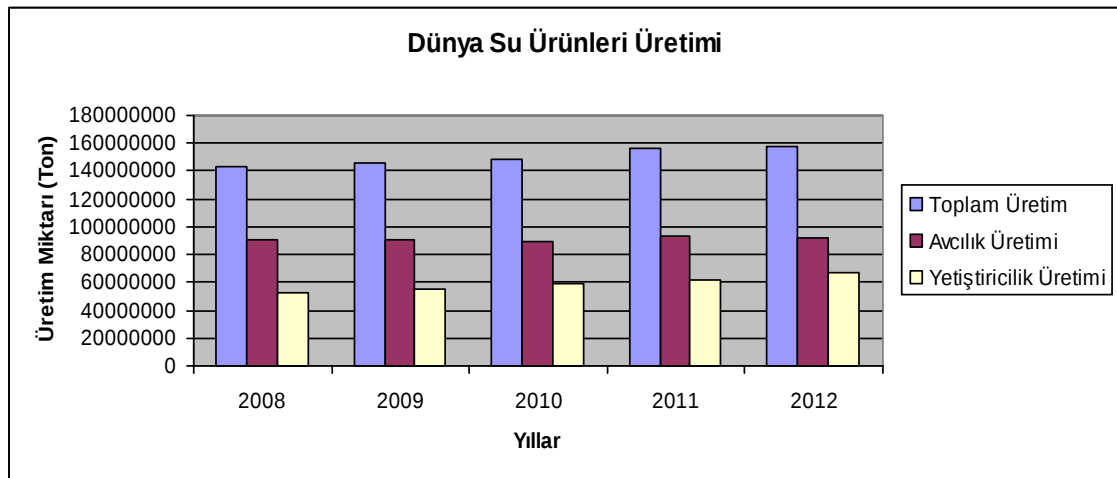
SİMGELER

U	: Unit
ng	: nanogram
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre
mg	: miligram
g	: gram
kg	: kilogram
ppm	: mg/L
ppt	: g/L
°C	: derece
ml	: mililitre
L	: litre
m ³	: metreküp
ACTH	: adrenokortikotropik hormon
CCK	: kolesistokinin
TCA	: trikloroasetik asit
%	: yüzde
PBS	: fosfat buffer saline

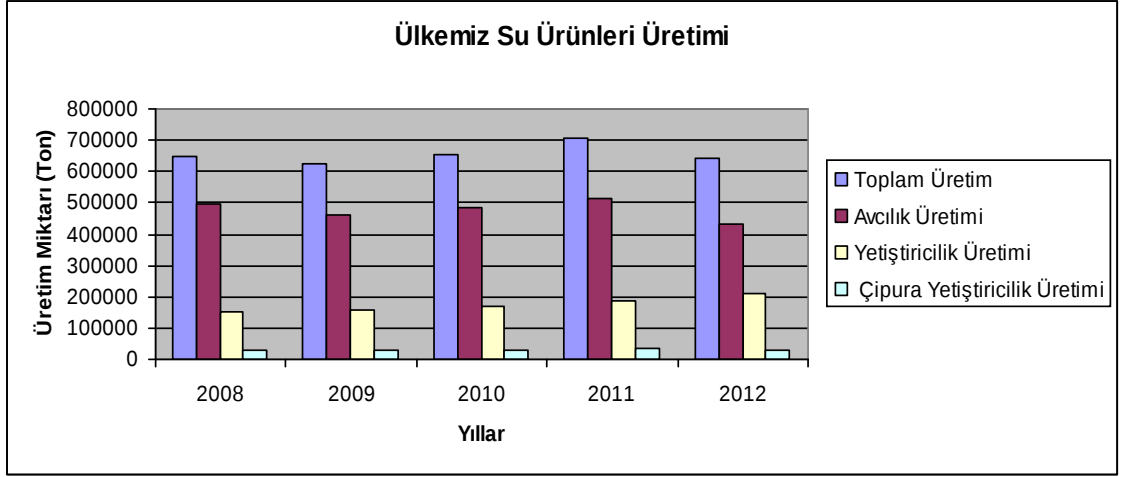
1. GİRİŞ

Ülkemiz su ürünleri üretimi ve avcılığı ile ilgili su kaynakları potansiyeli açısından oldukça zengindir. Yakın zamana kadar ülkemizde su ürünleri üretimi avcılık yoluyla yapılırken, balıkçı teknelerinin sayılarındaki ve güçlerindeki artışlar ile birlikte kontrolsüz avcılık sonucu balık stoklarında meydana gelen azalmalar avcılık yolu ile üretimin ekonomikliğini ve sürdürülebilirliğini ortadan kaldırmıştır (Çelikkale ve ark., 1999).

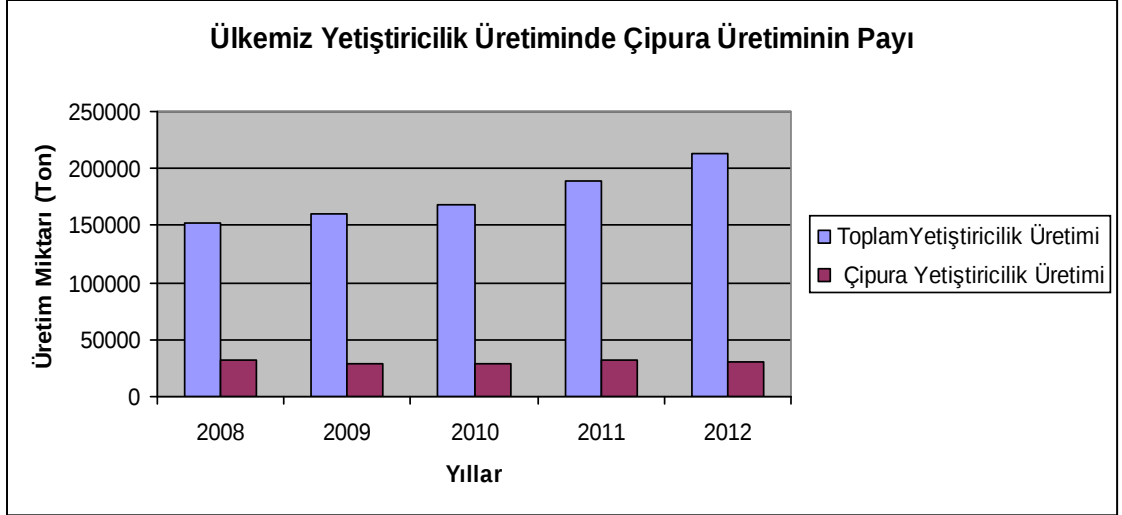
Dünyada ve ülkemizde ilk yetiştiricilik çalışmaları doğadan yavru toplama, kuluçkahane ortamlarına adaptasyon ve sonrasında tam kontrollü üretim şeklinde yapılmaktaydı. Bu üretim yöntemi, istenilen zamanda istenilen miktarlarda üreticilere yavru sağlayamadığı için, anaç beslemeden itibaren tam kontrollü üretim şekline dönüşmüştür. Ülkemizde tam kontrollü su ürünleri üretiminin diğer dünya ülkelerine göre geç başlamasının nedeni ilk dönemlerde bilinçsiz ve teknolojik gelişmelerden habersiz olarak yapılmasından kaynaklanmaktadır. Bu konudaki eğitim-öğretim faaliyetlerinin başlaması ve teknolojik gelişmeleri takip eden işletmelerin Araştırma-Geliştirme (AR-GE) birimlerinin özverili çalışmaları sonucunda sektör kısa bir süre içinde Akdeniz ülkeleri içinde söz sahibi olacak noktaya gelmiştir. F.A.O. kaynaklarına göre, Şekil 1.1 Dünya su ürünleri üretim değerlerini, Şekil 1.2 Ülkemiz su ürünleri üretim değerlerini ve Şekil 1.3 Ülkemiz yetiştiricilik üretiminde çipura üretiminin payını göstermektedir (Anonymous, 2014) .



Şekil 1.1. 2008-2012 yılları arasındaki dünya su ürünleri üretim değerleri



Şekil 1.2. 2008-2012 yılları arasında ülkemizin yetiştiricilik ve avcılıktan gelen toplam su ürünleri üretimi ve bu üretimde çipura yetiştiriciliğinin payı



Şekil 1.3. 2008-2012 yılları arasında çipura balığının ülkemizdeki toplam yetiştiricilik üretimindeki payı

Deniz balıklarının tam kontrollü üretimleri esnasında en büyük problemler larval dönemde ortaya çıkmaktadır. Kendine özgü yetiştiricilik sistemlerine ihtiyaç duyulan bu sistemlerde dikkat edilmesi gereken konuların başında;

- Anaç balık yönetimi,
- Besleme programları,
- Mikrobiyel kontroller gelmektedir.

Anaç besleme, kaliteli ve direnci yüksek döllenen yumurta elde edebilmek açısından büyük önem taşımaktadır. Kaliteli ve direnci yüksek yumurtalar, prelarval ve

postlarval üretim esnasında meydana gelebilecek çevresel, besleme programları ve mikrobiyel kontrolsüzlüklerden kaynaklanabilecek olumsuzluklara karşı larvaların yaşama oranı ve direncini arttırmaktadır. Prelarval dönemlerde larvalara bir beslenme programı uygulanmadığı için burada dikkat edilmesi gereken konuların başında su kalite parametreleri ile diğer abiyotik (pH, sıcaklık, ışık) faktörler gelmektedir. Postlarval döneme geçilmesiyle birlikte besleme programı, bilhassa yem seçimi, yemin büyüklüğü ve mikrobiyel kontroller yüksek larva yaşama oranı elde edebilmek açısından büyük önem taşımaktadır. Postlarval dönemlerde yem seçimine ve besleme programının belirlenmesine etki eden faktörlerin başında;

- Larvanın ağız açıklığı,
- Larvanın sindirim sistemindeki enzimler gelmektedir.

Larvanın ağız açıklığı ve sindirim sisteminin enzimsel durumu doğrudan doğruya;

- Yumurta çapı ve kalitesine,
- Prelarval dönemdeki besin kesesinin tüketilme süresine ve bilhassa abiyotik faktörlerdeki değişimlere bağlıdır.

Dışarıdan ilk yem almaya başlayan larvalara verilen canlı yemlerin ve mikroyemlerin büyüklüğü de yemlemenin etkinliği ve larvaların yaşayabilirlikleri üzerinde önemli etkiye sahiptir. Yumurta çapı büyük olan ve prelarval dönemi uzun sürede geçirerek postlarval döneme ulaşan larvaların postlarval dönemdeki biyotik ve abiyotik olumsuzluklara karşı direncinin daha yüksek olacağı bilinmektedir.

Postlarval döneme gelen bir larvanın sindirim sisteminin enzimsel durumu, besleme programı kapsamında verilen yemin sindirilip sindirilemeyeceği konusunda net bilgiler vermektedir. Örneğin salmon larvalarının sindirim sistemi uzun bir inkübasyon süresi geçirmiş olmalarından dolayı iyi gelişmiş olup, dışarıdan ilk yem almaya başladıkları dönemde ciddi problemler yaşanmamaktadır. Buna karşılık çipura gibi deniz balıklarının birçoğunun yumurta keselerini çevresel faktörlerin etkisiyle kısa sürede tüketiyor olmaları, postlarval dönemin başlangıcında dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle deniz balıklarının ilk beslenmeye başladıkları zaman verilecek yemlerin seçiminde dikkat edilecek hususlar;

- Larvanın ağız açıklığına uygun olmalı,
- Sindirimi kolay olmalı,
- Larvaların besin taleplerini karşılayabilmelidir (Altan,1998).

Rotiferler (*Brachionus plicatilis*) ve *Artemia* naupli'leri, deniz balıkları ve tatlı su balıklarının larval dönemlerinde canlı yem olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Kültür şartlarında bu yemlerin yoğun kullanılmalarına rağmen bazı dezavantajlara sahip oldukları bilinmektedir. Bunlar ;

- Laboratuvar ve enerji yatırımlarının yüksek olması,
- Sabit bir besin kompozisyonlarının olmaması,
- Bilhassa *Artemia* konusunda dışa bağımlı olmamız, iklimsel değişimlerden dolayı *Artemia*'nın stoklarında dünya genelinde bir azalma ve buna bağlı olarak fiyatlarındaki artış,
- Sürdürülebilir bir kaynak olmamasıdır.

Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı, su ürünleri sektörü son yıllarda daha sürdürülebilir, besin kompozisyonu sabit tutulabilir, daha ekonomik ve canlı yemlerde mevcut olmayan bazı besin maddelerinin larvaya geçişine izin verebilen mikroyemlerin üretimi üzerine yoğunlaşmıştır.

Çipuranın larval dönemlerinde gözlenen yüksek ölüm oranları ve canlı yemden mikroyeme geçişlerde yaşanan problemlerden dolayı ticari üretimlerinde halen sorun yaşandığı bilinmektedir. Deniz balıkları üzerinde yürütülen çalışmalarda, larval dönemlerde gözlenen yüksek ölüm oranlarının besinsel ihtiyaçlarının tam olarak karşılanamamasından ve bu yemlerde kullanılan hammaddelerin larvaların proteaz aktiviteleri üzerinde negatif etkilerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Yufera ve ark., 1996).

Deniz balıklarının larval dönemlerinde besinsel açıdan zenginleştirilmiş canlı yemlerin kullanılması durumunda yaşama oranlarının arttığı bildirilmiştir (Alpaz, 1996; Kolkovski ve ark., 1993). Buna karşılık araştırmacılar, canlı yemlerin verilmediği ve sadece yapay yemlerin kullanılması durumunda deniz balık larvalarının yaşama ve büyüme oranlarının düştüğünü bildirmişlerdir (Yufera ve ark., 1996; Fernandez-Diaz ve Yufera, 1997). Böyle bir sonucun ortaya çıkmasında; yemin fiziksel ve biyokimyasal

özellikleri kadar larvanın enzim faaliyetleri üzerindeki etkilerinin de önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Larvanın enzim faaliyetlerini indirgeyen protein kaynaklarının daha zor hidrolize olduğu ve buna bağlı olarak sindirimlerinin de güçleştiği tespit edilmiştir (Yufera ve ark., 2000). Deniz balıkları larva yetiştiriciliğinde canlı yemleri tamamen veya kısmen ikame edebilecek alternatif mikroyem şimdiye kadar üretilmemiştir.

Kolkowski ve ark. (1997a), çipura larvalarının canlı ve mikro partikül yemlerle beslemenin larvalardaki sindirim hormonları üzerine, özellikle bombesin hormonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Bombesin hormonunun, mide duvarlarına kan sirkülasyonunu arttırmasına ilave olarak, HCI salınımı ve midenin peristaltik hareketini aktive etmesi gibi sindirimi çeşitli yollarla etkilediği bilinmektedir. Çalışmada, canlı yem *Artemia* ile beslenen grupta, mikro partikül yemle beslenen gruba göre yaklaşık %300 kadar daha yüksek bombesin hormonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Fakat çalışma sonunda, bu endokrin cevabının artışını açıklayabilecek *Artemia* da sorumlu olabilecek besin faktörleri hakkındaki bilgiler bir netlik kazanmamıştır. Diğer araştırmacılar tarafından yapılmış olan çalışmalar sonucunda elde edilen bilgilere göre, serbest aminoasitlerin bu endokrin cevabı tetikleyebileceği düşünülmektedir. Daha doğrusu larvaların canlı yemlerinde bulunan serbest aminoasitlerin, larval sindirim sistemi tam olarak fonksiyonel olmayan yada gelişmekte olan larvalarda sindirim işlemlerini tamamlamak için larvada bulunan endokrin faktörleri harekete geçirmiş olabileceği düşünülmektedir (Koven ve ark., 2001). Bunlara ilaveten, bazı balık larvalarında çözülebilir proteinlerin , serbest aminoasitlere göre sindirim hormonları üzerinde daha iyi bir tetikleyici olduğu bildirilirken (Koven ve ark., 2002), bazen tersi bir durumunda gerçekleşebileceği belirtilmiştir (Cahu ve Zambonino Infante, 1995 a,b).

Yemlerde besinsel olmayan faktörlerin bulunması protein sindirilebilirliğini etkilemekte, büyümeyi azaltmakta ve olumsuz fizyolojik etkilere sebep olmaktadır (Olli ve ark., 1994). Aynı zamanda bu faktörlerin bazıları balıkların sindirim mekanizması üzerinde de olumsuz etkilere neden olmaktadır (Alarcon ve ark., 1999). Araştırmacılar, çipura larvaları ve karideslerin proteaz aktiviteleri üzerine mikroyemlerin üretiminde kullanılan bazı yem hammaddelerinin (ovalbumin, hemoglobin, sübye unu, kazein)

inhibisyon etkileri hakkında bilgi vermişlerdir (Alarcon ve ark., 1997; Alarcon ve ark., 1999; El-Sayed ve ark., 2000).

Biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin bu problemler üzerinde önemli bir rol oynadığı tahmin edilmektedir. Deniz balığı larva kültürü çalışmalarında çoğunlukla ışık, tuzluluk, sıcaklık gibi abiyotik stres faktörlerinin etkilerinin araştırıldığı, ancak besin kalitesindeki dalgalanmalar sonucu ortaya çıkabilecek etkilerin şimdiye kadar çalışılmadığı bilinmektedir. Yeterli miktarda beslenemeyen larvanın bu memnuniyetsizliğini hücrel ve fizyolojik tepkilerle veya her iki tepki şekliyle gösterdiği ve bu tepkilerin larval beslenme sorunlarının çözümünde anahtar rol üstleneceği düşünülmektedir.

Çalışma konusunun ortaya koyacağı bu yaklaşımda, ticari ve alternatif türlerin kültür çalışmalarında başarıya ulaşabilmek için öncelikle besinden kaynaklanan stres faktörlerinin elimine edilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, besin kalitesinin larval dönem fizyolojisi üzerinde çok önemli bir role sahip olduğu ve besin-stres ilişkisi çözülebildiği ölçüde ticari ve alternatif türlerin sorunlarına da çözüm getirilebileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda çipura ile ilgili besleme programları geliştirilmiş olsa da, mevcut besleme programında kullanılan canlı ve mikroyemlerin çipura larvalarının besinsel ihtiyaçlarını ne ölçüde karşıladığı konusunda tatmin edici bir gösterge bulunmamaktadır. Bu bağlamda geliştirilmiş olan mevcut besleme programında kullanılan canlı ve mikroyemlerin test edilmesi ve larval dönemde verilen yemlerle ilgili memnuniyetin fizyolojik olarak ortaya konması gerekmektedir. Bu nedenle, belli bir besleme programına göre ticari olarak üretimi yapılmakta olan çipuranın larval dönemlerinde kullanılan canlı ve mikroyemlerin, larvaların üzerinde yaratmış olduğu stres seviyelerinin belirlenmesi, sektörde faaliyet gösteren işletmelerin bilhassa çipura larvalarının ticari besleme programlarında kullanacakları yemlerin seçiminde yol gösterici olacaktır. Bu çalışmada kullanılacak yaklaşımla işletmelerin ticari besleme prosedüründeki yem arayışları esnasındaki ekonomik kayıplar önlenmiş olacaktır.

“Çipura (*Sparus aurata*, Linneaus 1758) Larvalarının Kortizol Seviyeleri Üzerine Ticari Besleme Prosedürünün Etkileri” isimli ve Yüksek Lisans tezi olarak planlanan bu çalışmada, çipura larvalarının besleme prosedüründe kullanılan canlı ve mikroyemlerin neden olduğu fizyolojik tepkilerin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu bölümde çipura balığının sistematigi, biyolojisi, yetiştiricilik şartları, beslenme özellikleri, sindirim sisteminin gelişimi ve stres hormonlarının yanı sıra konuyla ilgili olduğunu düşündüğümüz önemli çalışmalar özetlenmiştir.

2.1. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Balığının Sistematigi

Çipura balığının sistematikteki yeri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) balığının sistematigi

Filum	:Chordata
Alt Filum	:Vertebrata
Sınıf	:Osteichthyes
Takım	:Perciformes
Alt Takım	:Percoidei
Familiya	:Sparidae
Cins	:Sparus
Tür	: <i>Sparus aurata</i> L.1758

2.2. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Balığının Biyolojisi

Günümüzde ticari olarak üretimi yapılmakta olan çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) balıkları genellikle kumlu ya da çamurlu biyotoplarla nehir ağzlarında ve lagünlerde yoğun olarak bulunmaktadır. Genellikle iklimsel açıdan tropikal, subtropikal ve ılıman bölgeleri tercih eden çipura balığına Moritanya’dan İngiltere’ye kadar olan tüm Atlantik kıyılarıyla birlikte, ülkemizde daha çok Akdeniz ve Ege denizinde rastlanmaktadır. Karnivor olarak beslenen bu balıkların boyları genellikle 70 cm’ye ağırlıkları ise 4-8 kg’a kadar ulaşabilir. Yapılan çalışmalar, karnivor olarak bilinen bu türün özellikle Crustacea ve Mollusca’larla beslendiğini net bir şekilde ortaya koymuştur. Su sıcaklığının 6-32 °C ve deniz tuzluluğunun ise ‰ 0,5-40 olduğu sularda çipura balıkları yaşamlarını devam ettirebilmektedirler. Bu balıkların istediği optimum pH aralığı ise 6,5-9 olarak bildirilmiştir. Çipura balıklarının en iyi gelişimi için sıcaklık

değeri de 22-25°C olup, ülkemizde üreme dönemi Ekim-Ocak aylarıdır (Alpaz, 1996; Tucker, 2000).

2.3. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Yetiştiriciliğinde Kültür Şartları

Çipura larvalarının larval dönemleri üzerine yapılan çalışmalar, ilk dönemlerinde en iyi yaşama oranının 16-22°C olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle, pek çok araştırmacı tarafından da kabul edildiği gibi, prelarval dönemde optimal gelişimin gözlemlendiği sıcaklık 16°C'dir (Polo ve ark.,1990; Süzer, 1998). Prelarval ve postlarval aşamada ‰ 15-38'lik tuzluluk oranının yaşama oranını arttırdığı bildirilmektedir. Çipura larvalarında 100-150 lüks arasında ve 24 saat aydınlatma optimum gelişim için önemlidir. O₂ değeri larva besleme döneminde 5mg/L'nin altına düşürülmemelidir.

2.4. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Yetiştiriciliğinde Larval Dönem

Çipura larvalarında kritik dönem yumurtadan çıktıktan sonra başlamaktadır. Çipura larvaları yumurtadan çıktığında yaklaşık olarak 2,6-3,0 mm boyda olup, besin kesesine sahiptirler. Besin kesesinin tüketildiği ve dışarıdan yem alımının başladığı zamana kadar geçen dönem prelarval dönem olarak bilinmektedir (Muhtaroğlu, 1988; Alpaz, 1996). Bu dönemde besin rezervlerinin en iyi şekilde kullanılması larval yaşamayı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bu rezervlerin en iyi şekilde kullanımı üzerine yapılan bir çalışmada prelarval aşamada ortamın karanlık ve su sıcaklığının 16°C olması gerektiği belirtilmiştir. Bu şartlarda keseyi tüketen larvaların, aydınlık ortamlarda ve 16°C'den yüksek sıcaklıklarda tüketenlere göre besin kesesi rezervlerini daha iyi kullandığı ve postlarval dönemdeki direncinin daha yüksek olacağı bildirilmiştir. Yani, boydaki artış ile vitellüsün tüketilmesi yakından ilişkili olup bilhassa sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir (Muhtaroğlu, 1988; Alpaz, 1996; Süzer, 1998).

Prelarvalarda 4.gün gözler pigmentlenip ağız açıldığı zaman postlarval dönem başlamış olur. Bu dönemde postlarva yem almaya hazırdır. Ağız açıldığında vitellüs kesesinin büyük bir kısmı tüketilmiş durumdadır. Postlarval aşama yaklaşık olarak 40. güne kadar devam eder (Pillay, 1995; Tucker, 2000). Postlarval aşamanın başlangıcında baş ve vücut yaklaşık aynı yükseklikte olup, genelde toplam boyun 1/3'ü kadardır. Postlarval aşama genelde 28-30 mm'de son bulur. Bu safha içinde larvada sindirim

sistemi hava kesesi oluşumu başlamakta ve devam etmektedir (Muhtaroğlu, 1988; Alpaz, 1996).

2.5. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Larvalarında Sindirim Sistemi Gelişimi

Deniz balıklarında sindirim sisteminin gelişimi üzerine yapılan çalışmalar balık larvalarının küçük boylarda olmasının yarattığı zorluklara rağmen son zamanlarda hızlı ve yoğun bir şekilde devam etmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan yeşil su tekniği ve diğer tekniklerde ortamda canlı yemlerin bulunmasının sonuçları önemli şekilde etkilediği bildirilmiştir (Kolkovski ve ark., 1997a,b). Tüm deniz balıklarında larvalar erginlerine göre daha düşük sindirim fonksiyonuna, daha düşük enzim üretimine ve daha basit bir yapıya sahiptirler (De Silva, 1998; Navarro, 1998).

Embriyonal aşamada muskular segmentasyon ile ön, orta ve son bağırsak meydana gelir. Embriyonal dönemdeki gelişme daha çok abiyotik faktörlere bağlıdır. Çipura larvalarında sindirim sisteminin oluşumu ağzın açılması ve dışarıdan beslenmenin başlamasıyla birlikte hızlı bir şekilde gelişmeye devam eder. Ağzın açılması ve ilk beslemenin başlaması ile sindirim sisteminin gelişimi, larva besleme aşamasında kullanılan yemlere ve bu yemlerin larvaların besin ihtiyaçlarını karşılayıp karşılamamasına göre değişkenlik göstermektedir. Çipuranın postlarval aşamasında sindirim sisteminin gelişimini 3 aşamada incelemek mümkündür. Bunlar;

- **4-10. günlük dönem;** Ağız açılmış, farinks ve özefagus'un epitel oluşumu başlamıştır. Pankreas dış salgı salgılamaya başlar ve karaciğer de rezervler oluşur (De Silva, 1998). Yani sekonder salgılar henüz oluşmamıştır (Muhtaroğlu, 1988; De Silva, 1998). Karaciğer ve pankreas yumurtadan çıkış anında oluşmuştur ve besin kesesinin absorpsiyonundan sonra fonksiyonel hale gelir. Tat alma hücreleri çok sayıda olup, larva büyüdükçe fonksiyonelleşmektedir (Navarro, 1998). Kas tabakaları tam olarak fonksiyonel olmadığı için sindirim kanalında bulunan silli hücreler gıdaların taşınmasında etkin bir rol oynarlar (De Silva, 1998). Sindirim kanalı fonksiyonel olmadığı için besinlerin bağırsak boyunca geçişi hızlı olup, gıdaların absorpsiyon verimi düşüktür (Navarro, 1998).

- **10-30 günlük dönem;** Besin kesesi tüketilmiş, hava kesesi şişirilmiş, safra kesesi ve pankreas tam aktif değildir. Epitelyum mide gastrit salgılamaya başlamıştır. Bağırsak mukositleri bu dönemin başlangıcında görülse de, bağırsak silleri safhanın sonuna doğru görülebilmektedir (De Silva, 1998). Bu safhada aynı zamanda bağırsak ve mide arasında bir kapakçıkta gözlenmektedir.
- **30.günden sonraki dönem;** İnce bağırsak ve mide arasındaki kapakçıklar tam olarak şekillenmiş olup, mide aktif olarak faaliyete geçmiştir (Muhtaroğlu, 1988; De Silva, 1998). Sindirim sistemi ergin bireylere benzer fonksiyonlara sahiptir.

2.6. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Larvalarında Beslenme

Ağzın açılması ile prelarval dönemden postlarval döneme giren çipura larvalarının canlı yemlerle besleme periyodu başlamaktadır. Prelarvalar bu döneme girdikleri zaman tam olarak besin rezervlerini tüketmiş değillerdir. Bir taraftan kalan besin rezervlerini tüketirlerken, diğer taraftan ortamda bulunan canlı yemlerle beslenmeye çalışmaktadırlar. İlk beslenmeye başladıkları dönemde besin olarak verilecek yemlerin boyutunun 60-100µ civarındaki rotiferler olması gerekmektedir (Alpaz, 1996; Tucker, 2000). Bu dönemde verilen rotiferlerin çok zayıf hareket etme yeteneğinde olması, hem larvaları cezp etmekte hem de larvalar tarafından kolayca yakalanmasına fırsat vermektedir (Kolkovski ve ark., 1997a). Nitekim larvaların bu dönemdeki avcılık yetenekleri çok gelişmemiştir. Larvalara verilen rotifer boyutu larval dönemin sonuna doğru 300µ'a kadar büyütülür (Pillay, 1995; Alpaz, 1996). Larvalar 15. günden itibaren aşama aşama *Artemia* naupli'ye alıştırılır. Tanklara verilen rotifer sayısı azaltılarak, *Artemia* naupli sayısı artırılarak geçiş kademeli olarak sağlanır. 30. güne kadar *Artemia* naupli ile beslemesi yapılan larvalara, 30-40. günler arasında *Artemia* metanaupli verilmektedir (Alpaz, 1996; Tucker, 2000). *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli ile besleme dönemlerinde az miktarlarda mikroyem girilmesi, mikroyemlere geçiş açısından önemlidir. Bu besleme protokolleri, işletmelere göre değişiklik gösterebilmektedir. Besleme protokollerinde gözlenen değişikliklerin anaç beslemeden, yumurta kalitesinden ve prelarval dönemdeki abiyotik faktörlerden etkilendiği bilinmektedir.

Bilhassa canlı yemlerle besleme aşamalarında ortama alg verilmesi üç açıdan oldukça önemlidir. Bunlar;

- Ortamın pH-O₂ dengesini sağlamak,
- Larva tankında uzun süre kalan canlı yemlerin besin kompozisyonlarında meydana gelen azalmayı minimize etmek (Alpaz, 1996; Tucker, 2000).
- Alglerin balık larvalarının sindirim enzimleri üzerindeki tetikleyici etkisidir (Cahu ve ark.,1998)

2.7. Canlı Yemlerde Sindirim Enzim Çalışmaları

Balık larvalarının birkaç türünde alınan gıdanın sindirilebilirliği için yeterli sindirim enzimi üretildiği gösterilmiştir. Canlı yemlerden larvalara aktarılan sindirim enzim katkısının besleme periyodunun başlangıcında çok düşük olduğu, genellikle toplam enzim aktivitesinin % 6'sını geçmediği bildirilmiştir. Yaşlı larvaların sindirimine canlı yemlerden gelen dışsal enzimlerin önemli bir katkısının olmadığı söylenebilir, beslemenin ilk aşamalarında önemli bir rolünün olduğu tahmin edilmektedir.

Canlı yemlerin sahip olduğu enzimlerin, sindirim sistemi tam olarak fonksiyonel olmayan larvalarda sindirime yardımcı olduğu bilinmektedir. Munilla-Moran ve ark. (1990), 3 günlük kalkan balığının sindirim enzimlerine canlı yemlerin katkılarını, % 15-27 amilaz, % 43-60 proteaz ve % 89-94 esteraz şeklinde bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bireyler arasında sindirim enzimlerinin üretimlerinde gözlenen varyasyonların bazı larvalarda gıdanın diğerlerinden daha iyi sindirilmesiyle sonuçlanacağını bildirmişlerdir (Munilla-Moran ve ark., 1990). Bundan dolayı larvalardan daha iyi büyüme ve yaşama oranı elde edilmesi mümkündür. Larvaların yaşama oranlarındaki kayıplar ilk besleme esnasında ya da yem değişiklikleri (özellikle mikroyeme geçiş dönemlerinde) yapıldığı zaman görülmektedir. Buna karşılık bazı larvalar bu yem değişikliklerine adapte olabilmektedirler. Düşük enzim seviyeleri gıdanın küçük miktarlarını sindirmek için yeterli olabilmektedir. Buna karşılık yüksek alım oranlarında (*Artemia* naupli'de gözlemlendiği gibi) larval enzimler çok seyrek olabilir, bu nedenle canlı yemler parçalanamayabilir ve enzimler larval sindirim sistemine salınmazlar.

Artemia'nın sindirilebilirliği *Artemia*'nın yaşıyla, balığın türü ve yaşıyla değişkenlik gösterebilir. *Artemia*'nın çıkıştan 12 saate kadar (Instar II metanaupli)

sindirim sistemi açık olmayıp, *Artemia*'dan larvalara dışsal sindirim enzimlerinin girişinin sınırlı olduğu görülür. Bu durum *Artemia*'yı bazı deniz balıklarının erken dönemleri için daha az sindirilebilir yapmaktadır. Bu dönemden sonra, *Artemia*'nın sindirim enzimlerinde çıkışta gözlenen miktarının yaklaşık 5 katı kadar artış görülmektedir (Pan ve ark., 1991). Diğer taraftan dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtalarının sindirilebilirlik açısından dirençli olduğu bildirilmiştir (Dendrinis ve Thorpe, 1987).

Canlı gıdaların ringa (*Clupea harengus*) larvalarında dışsal tripsin salgısına ilaveten içsel tripsin salgısının da artışında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Pedersen ve Hjelmeland, 1987).

Warner ve ark. (1995), yaptıkları çalışmada, *Artemia* yumurtalarındaki proteazların çoğunun sistein proteaz grubundan olduğu, bu proteaz sınıfının alkalik pH'da aktif olmadıklarını bildirmişlerdir (Warner ve Shridhar, 1985). Bu nedenle sindirim sistemi fonksiyonel olmayan larvalar için dışsal enzim katkısının önemi, deniz ve tatlı su larva kültüründe yaygın olarak kullanılan canlı yemlerden biri olan *Artemia* için azalmıştır. Garcia-Ortega ve ark. (1998), dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtaları ile yeni çıkmış *Artemia* naupli arasında da besinsel kompozisyon ve enzimsel aktivite arasında çok önemli farklılığın olmayacağını bildirmişlerdir. Buna karşılık Naz ve ark. (2011), *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli arasında enzimsel farklılıkların istatistiksel olarak önemli olduğunu tespit etmişlerdir.

Garcia-Ortega ve ark. (2000), tarafından, dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtaları ile beslenen karabalıkların (*Clarias gariepinus*) sindirim sistemlerindeki proteaz aktivitesini belirlemek üzere yaptıkları çalışmada, dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtalarının larvaların proteaz aktiviteleri üzerine %1'den daha az bir katkı yaptığı, buna benzer düşük katkı oranlarının levrek larvalarında (Zambonino Infante ve Cahu, 1994a) ve çipura larvalarında (Moyano ve ark., 1996) gözlemlendiği bildirilmiştir.

Kumar ve ark. (2005), *Daphnia carinata*'nın proteaz aktivitelerinin belirlemek için yaptıkları çalışmada, en yüksek ve en düşük proteaz aktivitesinin 0,55 U/mg protein ve 0,28 U/mg protein arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

2.8. Balıklarda Sindirim Enzim Çalışmaları

Enzimler proteinlerden yapılmışlardır. Enzimler, etki ettiği maddenin sonuna “=az” eki getirilerek ya da katalizlediği tepkimeye göre isimlendirilirler. Örneğin proteinlere etki eden enzimler “proteaz” olarak adlandırılırlar. Enzimler hücrelerde zincirleme şekilde çalışmaktadırlar. Bir enzim reaksiyonunun son ürünü diğerinin substratını yapar. Örneğin amilaz enzimi nişastayı parçalayarak, maltoza çevirir. Maltaz enzimi ise bu son ürünü kullanarak maltozu, glikoza çevirir. Bu reaksiyonlar hücrede meydana gelen enerji talebi doğrultusunda devam etmektedir.

Enzimler protein (apoenzim) ve koenzim olmak üzere 2 kısımdan meydana gelmektedirler. Protein kısmı enzimin hangi substrata etki edeceğini belirlerken, koenzim kısmı ise enzimin esas işlevsel olan kısmıdır. Alman kimyacı EMIL FISCHER tarafından, enzimin hangi substrata etki edeceğini belirleyen apoenzim kısmıyla substrat arasında anahtar- kilit uyumunun olduğu bildirilmiştir. Enzimler üzerinde, sıcaklık, pH ve substratın etkili olduğu bilinmektedir.

Sıcaklık etkisi; Enzimlerin en iyi çalışabileceği optimum sıcaklıklar vardır. Bu sıcaklıkların altında ya da üstünde enzim aktivitelerinde dalgalanmalar meydana gelmektedir. Yüksek sıcaklıklarda (55-60°C) ve düşük sıcaklıklarda (0°C) enzimler etkisiz hale gelmektedirler.

pH Etkisi; Enzimlerin en iyi çalışabileceği pH aralıkları vardır. Bu aralıkların dışında tam olarak fonksiyonel değildirler. Örneğin; proteini parçalayan pepsin pH=2’de maksimum çalışırken, yine protein metabolizması ile ilgili tripsin pH=8,5’de maksimum bir şekilde çalışmaktadır.

Substrat Etkisi; Sıcaklık ve pH optimum şartlarda tutulursa, enzim-substrat konsantrasyonu arasındaki orana göre reaksiyon hızında değişiklikler görülmektedir. Fakat enzim substrata doyduktan sonra substrat konsantrasyonundaki değişimler reaksiyon hızını etkilememektedir (Akyurt, 2004).

Proteazlar peptit bağlarını hidrolize eden enzimler olarak bilinirler. Proteazlar etki gösterdikleri yere göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olarak ikiye ayrılırlar (Palma ve ark., 2002). Ekzopeptidazlar substratın amino ya da karboksil ucundaki peptit bağı parçalarken, endopeptidazlar substratın terminal ucunun uzağındaki peptit bağlarını parçalamaktadırlar. Ekzopeptidazlar, peptit zincirinin serbest N-ucuna etki ederek tek

bir aminoasitin, dipeptitin ya da tripeptitin ayrılmasını sağlayan aminopeptidazlar ve peptit zincirinin C-ucuna etki ederek tek bir aminoasitin ya da dipeptitin ayrılmasını sağlayan karboksipeptidazlar olarak iki gruba ayrılmakta olup, substrat özgünlüğüne göre kendi içlerinde farklılık göstermektedirler. Endopeptidazlar ise enzim aktif yerini işaret eden katalitik mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar. Özellikle peptit zincirinin N- ve C- ucundan uzakta veya polipeptit zincirinin iç bölgelerine etki ederek kendilerini gösterirler.

Proteazlar literatürde;

- Serin Proteazlar,
- Aspartik Proteazlar,
- Glutamik Proteazlar
- Asparjin Proteazlar
- Sistein Proteazlar,
- Metalloproteazlar
- Treonin Proteazlar olarak 7 gruba ayrılmaktadır (Rawlings ve ark., 2010)

Bunlardan aşağıda verilmiş olan 5 tanesi bitkilerde tanımlanmıştır (Rawlings ve ark., 2010).

- Serin Proteazlar,
- Aspartik Proteazlar,
- Sistein Proteazlar,
- Metalloproteazlar
- Treonin Proteazlar

Proteolitik enzimler gıda endüstrisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda teknolojistleri deniz kaynaklarından yüksek kalitedeki proteinleri ekstrakte etmek için bu enzimleri kullanmaya başlamışlardır (Cano-Lopez ve ark., 1987; Mackie, 1982; Stefanson, 1988).

Endüstriyel proteazlar;

- Orjinlerine göre (bitkisel, hayvansal veya mikrobiyel kaynaklar),
- Katalitik mekanizmalarına göre (ekzopeptidazlar veya endopeptidazlar),
- Özgünlüklerine göre (özel bir peptit bağ hedefi veya tercih ettiği ayırma yeri),

- Katalitik aktiviteye katılan aminoasit veya prostetik grubun kimyasal dogasına göre (serin proteazlar, sistin proteazlar, aspartik proteazlar, metallo proteazlar) ayrılmaktadırlar.

Balığın bir yemi sindirebilme yeteneği uygun sindirim enzimlerinin mevcudiyetine bağlıdır. Spesifik enzim aktivitelerinin (proteazlar, lipazlar) ölçümleri sindirim sistemlerinin kapasiteleri ve yem bileşenlerinin türlerin gelişim dönemleri esnasında kullanılabilme potansiyelleri hakkında bilgi sağlarlar (Buddington ve ark., 1997). Sindirim işlemi midede başlayan ve bağırsaklarda devam eden bir işlemdir. Bu işlem esnasında alınan materyaller proteinler, şekerler ve yağlar sırasıyla aminoasitler, basit şekerler ve yağ asitleri gibi daha küçük moleküllere hidrolize olurlar. Balıklar genellikle beslenme alışkanlıklarında farklı anatomik ve fonksiyonel özelliklerini yansıtan değişkenlikler göstermektedirler. Balıkların hem besinsel hem de fizyolojik karakteristikleri gıda kaynaklarının geniş kullanımına müsaade etmektedir. Bu sayede değişen çevre şartlarına adaptasyon sağlanabilmektedir.

Sindirim sistemi içindeki enzimlerin aktivitesinin ve dağılımlarının belenme alışkanlıklarından etkilendiği bildirilmiştir (Lundstedt ve ark., 2002). Herbivor balıkların, karnivor balıklardan daha uzun bir sindirim sistemine sahip olduğu ve onların polisakkarit ihtiva eden yem hammaddelerini hidrolize etme yeteneklerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık karnivor balıklar, herbivor balıklarla karşılaştırıldığında daha kısa bir sindirim sistemine sahip olup, proteinlerin hidrolizinde daha aktiftirler. Aynı zamanda, karnivor balıklarda amilaz ve lipaz aktivitesinin de sindirim sistemlerinde küçük yüzdelerde temsil edildiği bildirilmiştir (Chakrabarti ve ark., 1995; Hidalgo ve ark., 1999). Karnivor balıkların yem rasyonların da proteinler ve yağların temel besin ve enerji kaynağı olarak önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (Chou ve ark., 2001). Balıklarda alınan gıda midede ilk önce asit proteaz pepsin tarafından hidrolize edilmekte, daha sonra alkalın enzimlerle (tripsin, kimotripsin, karboksipeptidazlar ve lipazlar) hidrolize edilmektedirler (Halver, 1989).

Larvaların sentezlediği pankreatik enzimlerin içeriği ve aktivitesi genelde yumurtadan çıkışta düşüktür. Keseli larval dönem gelişimi esnasında enzimlerde, gıdadan bağımsız bir artış olduğu kabul edilir (Zambonino Infante ve Cahu 1994a,b). Prelarval dönemden sonra dış beslenmenin başladığı ilk günlerde, hem beslenen hem de

aç kalan larvaların enzimatik aktivitelerinde dalgalanmalar gözlenmektedir. Larvaların gelişimi ve besleme şartlarına vermiş oldukları cevaplar bu kısa period esnasında oldukça kritik öneme sahiptir. Bu dönem larvalarda genellikle artan ölüm ve düşük gelişim oranlarıyla karakterize edilmektedir (Blaxter, 1988). Sindirim sisteminin gelişimiyle birlikte, larvalar yeterli miktarda gıda ile beslenebiliyorlarsa enzim sentezi artma eğiliminde olur. Enzim salgısının miktarı larvanın yem alım miktarına ve yem formülasyonunda kullanılan hammaddelere bağımlı olduğu görülmektedir (Zambonino Infante ve Cahu, 2001).

Pankreatik hücreler dış beslemenin başlangıcından önce sindirim enzimlerini sentezlemeye başlarlar (Hoehne-Reitan ve ark., 2001a,b). Deniz balığı larvalarında sindirim enzimlerinin (mide enzimleri dışında) dışarıdan yem almaya başlamasından önce mevcut olduğu görülür. Bu enzimlerin lipazlar, tripsin, kimotripsin, amilaz, aminopeptidaz, maltaz ve alkalın fosfataz olduğu bilinmektedir. Pankreatik ve bağırsak enzim aktivitelerinin ilk beslemenin başlangıcında genelde düşük olduğu görülmektedir. Buna karşılık dış beslemeye geçildikten sonra larvalara verilen yemin memnuniyet derecesine göre artışlar olacağı bildirilmiştir (Hoehne-Reitan ve ark., 2001a,b). En önemli larva sindirim enzimleri lipazlar gibi lipolitik enzimler ve tripsin gibi proteolitik enzimlerdir. Bunlar ekzokrin pankreasta üretilir ve sindirim sistemine salınırlar. Bu enzimler safra tarafından üretilen alkalı bir ortamda aktif olurlar. Larvaların sindirim enzimleri üzerine yapılan kantitatif çalışmaların çoğu pankreatik hücrelerin tripsonejen (tripsinin inaktif formu) ve safra tuzu bağılı lipazın dış beslemeye başlamadan önce sentezlendiğini göstermiştir. Bahsedilen enzimler larval gelişime bağılı olarak benzer bir yol izlemektedir.

Zambonino Infante ve Cahu (1994a), tarafından yapılan çalışmada 25. günden sonra canlı yem ve mikroyem grupları oluşturularak besleme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar mikroyemle beslenen gruptaki gelişim durumunun canlı yem grubuna göre düşük olsa da, enzimatik aktivitenin mikroyem grubunda tripsin aktiviteleri dışında daha yüksek seviyelerde olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, amilaz, lösin-alanin peptidaz ve alkalın fosfataz enzimlerinin yem değişimine bağılı olarak değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Cahu ve Zambonino Infante (1994), yaptıkları çalışmada canlı yemlerin ve mikropartikül yemlerin levrek larvalarının tripsin aktivitesinde farklılık yaratmadığını bildirmişlerdir. Bu sonuçları, tripsin aktivitesinin larvalara verilen yemlerin protein ve aminoasit profillerinden etkilendiğini belirten Tseng ve ark. (1982)'nın sonuçları destekler niteliktedir. Bunun yanı sıra, Naz (2007), yaptığı çalışmada çipura larvalarında tripsinin besinsel adaptasyonunu kontrol eden mekanizmanın 36.güne kadar etkin olmadığını bildirmiştir. Naz (2007), aynı zamanda tripsini kontrol eden kolesistokin (CCK) hormonunun 32. ve 36. günlerde yüksek seviyelerde olduğunu ortaya koymuştur.

Cahu ve Zambonino Infante (1995a), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarının sindirim enzimleri üzerine farklı nitrojen kaynaklarının etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 25. günde % 10 aminoasit karışı, % 10 kazein hidrolizatı, ve % 10 balık unu içeren mikroyemler kullanmışlardır. Bu çalışmada kontrol grubu olarak canlı yem kullanılmıştır. Larval gelişim kullanılan mikroyemler arasında benzerlik göstermiş, fakat kontrol grubundan önemli seviyede daha düşük bulunmuştur. Yaşama oranı mikroyemle beslenen gruplar içinde en yüksek kazein hidrolizat grubunda gözlenmiştir. Aminoasit grubunun tripsin enzim salgısını tetiklediği, kazein hidrolizat grubunda ise ekzokrin pankreas salgılarının azaldığı tespit edilmiştir. Lösin-alanin peptidaz aktivitesi tüm mikroyem gruplarında yüksek seviyelerde kalırken, kontrol grupta larvalarının gelişimi esnasında aminopeptidaz N'in arttığı gözlenmiştir. Çalışmanın sonuçları klasik yem rasyonlarının sindirim sistemi gelişimini ertelediğini, buna karşılık protein hidrolizat içeren yemlerin bu ertelemeyi engelleyebileceğini göstermiştir.

Perez ve ark. (1996), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarını 15-35. günler arasında farklı protein ve karbonhidrat içerikli yemlerle besleyerek, yasama, gelişme oranları ile birlikte amilaz ve tripsin enzim aktivitelerini tespit etmişlerdir. En iyi gelişme ve yasama oranının %50 protein, %17 karbonhidrat içeren yemle beslenen grupta olduğunu bildirmişlerdir. Amilaz aktivitesinin 18. günden sonra yemlerin karbonhidrat içeriğinin artışına paralel olarak arttığı, 35. günde ise yemlerin protein içeriğindeki artışa paralel olarak tripsin aktivitesinin de arttığını bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda amilaz aktivitesinin larval dönemde yeterli olduğunu, enzim aktivitesinin de yaşa bağlı olarak değiştiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Cahu ve ark. (1998), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarının sindirim enzimleri üzerine alglerin etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, alglerin mevcudiyetinin tripsin ve alkalın fosfataz gibi enzimsel aktiviteler üzerinde olumlu etkilerinin yanı sıra yaşama oranını da yükselttiği sonucuna ulaşmışlardır. Aynı zamanda alglerin üretim tanklarında bulunmasının hücre membranlarının hidrolitik fonksiyonlarının başlamasına fırsat vermesiyle sindirim enzimlerinin aktiviteleri üzerinde tetikleyici bir role sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Riberio ve ark. (1999), dil balığı (*Solea senegalensis*) larvalarında sitozolik enzim olan lösin-alanın peptidazda gözlenen azalma ve sindirim sisteminin gelişmişliğinin göstergelerinden biri olan alkalın fosfataz aktivitelerinde elde edilen bilgilere dayanarak, 25. günde sindirim sisteminin fonksiyonel olduğunu bildirmişlerdir.

Martinez ve ark. (1999), dil (*Solea senegalensis*) balığının larval gelişim dönemlerindeki sindirim enzim aktivitelerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada, asit proteaz aktivitelerinin ilk günlerde düşük olduğu 12. günde artış gösterdiği, 12. günden 20. güne azalma eğilimine girdiği, bu tarihten itibaren ise artış eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık alkalın proteaz aktivitesinin ilk dönemlerde yüksek seyrettiği 12. güne kadar azaldığı, 12. günden 25. güne kadar nispeten sabit kaldığı, 25. günden itibaren asit proteaz aktivitesindeki artışa karşılık azalma gösterdiği bildirmişlerdir.

Balık larvalarının enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimleri;

- Canlı gıdaların kompozisyonlarındaki değişimlere cevap,
- Yeni organ ve dokuların gelişimi,
- Büyümenin bir sonucu olarak açıklamak mümkündür.

Martinez ve ark. (1999), alkalın proteaz aktivitesindeki azalmanın metamorfozun başlamasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir.

Moyano ve ark. (1999), farklı bitkisel kaynakların çipura (*Sparus aurata*), tilapya (*Oreochromis niloticus*) ve dil (*Solea senegalensis*) balığının proteaz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, *Sparus aurata* (25-50 g), *Oreochromis niloticus* (14-20 g), *Solea senegalensis* (70-90 g)'in proteaz aktivitelerini sırasıyla 244 ± 35 U/mg protein, 1297 ± 86 U/mg protein, 37 ± 5 U/mg protein olarak bildirmişlerdir.

Alarcon ve ark. (1999), *in vitro* analizler kullanarak mikro kapsüllerin içeriğindeki protein kaynaklarının çipura larvalarında proteaz enzim aktivitesi üzerine etkilerini çalışmışlardır. 8 günlük çipura larvalarında protein kaynağı olarak albumin kullanılmasının % 60 gibi önemli bir oranda proteaz aktivitesini düşürdüğünü, kazein ve kalamar unu gibi protein kaynaklarının kullanımının ise proteaz aktivitesinin değişmesine neden olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, larval balık beslemesinde kullanılacak mikro kapsüllerin yapımında hammadde olarak kalamar ununun en iyi aday olduğunu belirtmişlerdir.

Garcia-Ortega ve ark. (2000), dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtaları ile beslenen karabalıkların (*Clarias gariepinus*) sindirim sistemlerindeki proteaz aktivitesini açlık, bir öğün besleme ve sürekli besleme esnasında tespit etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, açlık esnasında proteaz aktivitesinin azaldığı, günde bir öğün besleme yapılan grupta besleme sonrası 3. saat ve 12. saatte proteaz aktivitelerinde artış gözlemlendiği ve istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Her 4 saatte beslenen karabalık larvalarının proteaz aktiviteleri, günde bir kere beslenen grupta bulunan değerlerden istatistiksel bakımdan farklılıklar göstermiştir. Bu çalışmada, dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtalarının % 1'den daha az bir katkı yaptığı bildirilmiştir.

Yufera ve ark. (2000), çalışmalarında çipura (*Sparus aurata*) larvalarının ilk beslenmesinde protein duvarlı farklı tipteki mikro kapsülleri kullanmışlardır. Kullanılan yemlerin hiçbirisi kontrol grubu olan canlı yemlerden sağlanan gelişme ve yaşama oranını vermezken, sindirim sisteminde yemlerin kolayca parçalanabildiği, bazı dememe gruplarında histolojik incelemeler sonucunda bağırsak epitelyum yapısının çok iyi durumda olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda 4. günde proteaz aktivitesinin başladığı, larvanın yaşına bağlı olarak bu proteaz, amilaz ve alkalın fosfataz aktivitelerinin geliştiğini, fakat ilk bir ay proteaz enzim çeşitliliğinin artmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca; mikroyemlerin gelişiminde dikkat edilmesi gereken en önemli konulardan birinin yem hammaddesinin seçimi olduğunu belirtmişlerdir.

Naz (2007), çipura larvalarının farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia*'larla beslendikleri zaman enzimatik değişimlerini belirlemeye yönelik yapmış olduğu çalışmada, lösin-alanın peptidaz aktivitesinin en düşük değerinin 28. günde gözlemlendiğini, aminopeptidaz-N enzim aktivitesinin 28. günden sonra artma eğiliminde

olduğunu, alkalın fosfataz enzim aktivitesinin 20. günde en yüksek değere ulaştığını, tripsini kontrol eden mekanizmanın 36. günden sonra aktif olduğu ve kolesistokin (CCK) hormonunun 32. gün ve 36. günlerde, yüksek seviyelere ulaştığı belirtilmiştir.

2.9. Stres Hormonları

2.9.1. Balıklarda Stres Metabolizması

Balıklar, doğal veya kültür şartlarında dinamik çevreden dolayı sürekli olarak stres faktörleri tarafından uyarılmaktadırlar. Bu stres faktörlerinin şiddeti ve süresi balık tarafından bir tepkinin oluşturulup oluşturulmamasında önemli rol oynamaktadır. Stresin homeostazi kavramı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chrousos ve Gold, 1992). Homeostazi ise canlıların fizyolojik denge hali olarak tanımlanmış olup, yaşam fonksiyonlarının yerine getirilebilmesi için önemlidir. Homeostazi dengesini bozmayı hedefleyen faktörlere karşılık canlılar bu dengelerini muhafaza edebilmek için bazı davranış ve fizyolojik değişimler göstererek stres cevabı meydana getirmektedirler (Johnson ve ark., 1992).

Balıklarda stres oluşturabilen faktörler fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak gruplandırılabilir. Stres tipleri ise akut ve kronik olmak üzere iki şekildedir. Akut stres canlının ani ve şiddetli olarak şoka uğratılması, kronik stres ise uzun zaman diliminde, kesintisiz olarak uyarılmasıdır. Akut veya kronik olarak ortaya çıkan fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlere karşı, balığın ortaya koyduğu fizyolojik değişimler “stres cevabı” olarak adlandırılmaktadır (Wedemeyer ve ark., 1990).

Akut stres balıklarda birbirini izleyen iki tepkide kendini gösterir (Gamperl ve ark., 1994).

Birincil tepki; Enerji ihtiyacını karşılamaya yönelik endokrin tepkidir. Katekolaminler kısa dönemde glikojenez aracılığıyla enerji sağlama görevi üstlenirken, kortizol ise uzun dönemde glikojen, lipid ve protein katabolizmasını uyararak enerji sağlama görevini üstlenir (Gamperl ve ark., 1994).

İkincil tepki; Metabolik adaptasyonla ilgilidir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde bilhassa yoğun stok koşullarında fizyolojik denge kurulamaz ve buna bağlı olarak dış etkenlere karşı direnç azalır (Van Weerd ve Komen, 1998).

Bir faktörün stres oluşturuucu potansiyelinin olup olmadığının değerlendirilebilmesi için, canlı açısından bir enerji maliyetinin olması gerekmektedir. Balıklarda stres esnasında enerji ihtiyacının arttığı görülmektedir (Davis ve Peterson, 2006). Akut stres metabolik aktivitelerde hızlı gerçekleşen geçici durumlardır.

Akut stresin belirlenmesinde;

- Plazma kortizol seviyeleri (Ruane ve ark., 2001),
- Glikoz seviyeleri (Martins ve ark., 2006),
- Davranışlarda gözlenen değişimler (Xu ve ark., 2006) kullanılabilir.

Kortizol ve glukoz serumda bulunan önemli bileşenler olup, balıklarda fizyolojik durum hakkında indikatör olarak kullanılmaktadırlar. Kortizol, adrenal korteks tarafından üretilen, canlının strese gösterdiği tepkiyle ilişkili bir kortikosteroid hormondur. Plazma kortizol düzeyinin yaş, beslenme, beslenme sonrası durum ve mevsim gibi birçok faktörden etkilendiği bildirilmiştir (Wedemeyer ve ark., 1990). Aynı zamanda kortizolün, doğrudan ve dolaylı olarak balıkların stres tepkilerinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen ve ark., 1999).

Stres tepkilerinin balıklarda meydana getirdiği negatif durumlara karşılık organizmanın mücadele edebilmesinin enerjiyle bağlantılı olduğu bilinmektedir. Glukoz, stres tepkilerinde organizmanın ihtiyaç duyduğu enerjiyi sağlamaktadır. Kortizol'ün balıklarda glukoneojenez ve glikojenoliz yoluyla glukoz üretimini artırdığı ve bu nedenle plazma glukoz düzeyinde yükselmelere neden olduğu bilinmektedir (Iwama ve ark., 1999). Glukozun yüksek konsantrasyonları balığın stres faktörlerine maruz kaldığını ve yoğun bir şekilde enerji kaynaklarını kullanmaya başladığını göstermektedir. Bu esnada, azalan glukoz konsantrasyonu enerji kaynaklarının tüketildiğini ve buna bağlı olarak organizmanın durumunun kötüye gittiğini gösterir (Timur ve Timur, 2003).

Wedemeyer ve ark. (1990)'a göre balıklardaki stres cevabı esnasında, kortizol salgılanması aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır.

- İlk tepki nöroendokrin bileşenleri içermektedir. Stres faktörleri kromafin dokudan katekolamin salgılamasını başlatmaktadır. Bunlar adrenal ve noradrenalinlerdir.

- Katekolaminlerin salgılanmasıyla birlikte hipotalamik hipofiz bezi sistemi uyarılmaktadır. Bu durum hipotalamustan kortikotropin salgı hormonunun serbest kalmasını sağlamak ve hipofiz bezinden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılanmasına neden olmaktadır.
- ACTH'ın böbrekler arası bezi tetiklemesiyle kortizol hormonunun sentezi ve salgılanması gerçekleşmektedir.

Kortizolün en iyi bilinen etkilerinden biride, karbonhidrat olmayan maddelerden karaciğerde glikoz oluşumunu (glikojenez) artırmasıdır. Kortizol bu görevi;

- Plazmadaki aminoasitlerin karaciğer hücrelerine girişini sağlayarak,
- Karaciğerde glikojenezde rol oynayan enzimlerin oluşumunu sağlayarak,
- Karaciğer dışındaki dokulardan, özellikle kan ve lenfoit dokulardan aminoasitlerin salınımını teşvik ederek gerçekleştirmektedir.

Kortizol başta kaslar olmak üzere karaciğer dışındaki dokulardan aminoasitlerin serbest hale gelmesine, hücre dışı sıvılara ve kana geçmesine neden olmaktadır. Böylece plazmada, karaciğerde glikoza dönüştürülmek üzere daha çok aminoasit bulundurulur. Bu hormon etkisiyle aminoasitlerin plazmadan daha doğrusu hücre dışı sıvıdan karaciğer hücrelerine taşınımı hızlanır ve karbonhidrat olmayan maddelerden glikoz oluşumu artar.

Balıkların bu değişikliklere göstermiş oldukları fizyolojik tepkilerin ölçülmesi, yetiştiricilik yöntemlerinin optimize edilmesinde önemli katkılar sağlamıştır. Kronik stresin engellenmesi balığın sağlık durumu ve büyüme performansı açısından su ürünleri yetiştiriciliğinde oldukça önemlidir. Kronik stres durumlarında kortizol seviyesi negatif feed-back mekanizmaları nedeniyle yükselmez (Procarione ve ark., 1999). Yoğun balık yetiştiriciliğinde, stres faktörlerinin neden olduğu kronik strese balıklar adapte olamamakta ve sonuçta büyümeleri olumsuz etkilenmektedir.

2.9.2. Kortizol Hormonu Üzerine Yapılan Çalışmalar

Stres faktörlerine maruz bırakılmamış balıklar kortizol içeren yemlerle beslendiklerinde plazma kortizol konsantrasyonlarının uzun süreli olarak yüksek seyrettiği gözlenmiş bu durumun büyüme ve kondisyon üzerinde negatif etkileri olduğu belirtilmiştir (Barton ve ark., 1987). Diğer taraftan balıklara kortizol enjekte edilmesi sonucunda, kortizol konsantrasyonlarında artış gözlenmiş ve bu durum;

- Gonadal steroidlerin azalmasına,
- Gonadotropik hormon seviyelerinin azalmasına,
- Gonad büyüklüğünün düşmesine neden olmuştur (Foo ve Lam, 1993).

Plazma kortizol konsantrasyonundaki dalgalanmaların büyüklüğünün ve süresinin türlere (Davis ve Parker, 1986) ve su sıcaklığına (Sumpter ve ark., 1985) bağlı olarak değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Salmonid balıkların ilk kortikosteroid stres cevabını su sıcaklığına bağlı olarak kuluçka döneminin ikinci ve beşinci haftalarında gösterdikleri bildirilmiştir (Pottinger ve Mosuwe, 1994).

Balıklarda yumurta çıkışı öncesi tiroid ve kortizol hormonlarının bulunduğu tespit edilmiştir. Bu hormonların fonksiyonel tiroid dokusu ve böbrekarası hücreler embriyogenesiste gelişmediği için anaç orjinli olduğu bildirilmiştir (Mylonas ve ark., 1994; Berry ve ark., 1995; Szisch ve ark., 2005).

Strese maruz bırakılmamış dinlenme dönemindeki balıklarda plazmadaki kortizol hormonunun konsantrasyonunun 5 ng/ml'den az olduğu ve stres faktörlerine maruz kalmalarıyla birlikte 30 dakika içinde 100 kat artış gösterdiği bildirilmiştir (Barton ve Iwama, 1991).

Morgan ve ark. (1997), tilapyaları (*O. mossambicus*) tatlı sudan ‰ 12 ve ‰ 25 tuzlu sulara aktardıkları çalışmalarında, tuzlu sulara aktarımdan 1 gün sonra plazma kortizol ve glikoz seviyelerinin yükseldiğini bildirmişlerdir.

Pottinger ve Carrick (1999), dişi gökkuşağı alabalıklarında yumurtlamadan önce ve yumurtlamadan sonrasını içine alan 21 aylık dönemdeki yüksek stresin etkisini plazma kortizol ve plazma glikoz değerleriyle belirlemeye çalışmışlardır. Çalışma sonucunda plazma kortizol ve plazma glikoz seviyesinin büyümeye herhangi bir etkisi olmadığını, ancak diğer çevresel etkenlerle beraber oluşan stresin belirlenmesinde kortizol seviyesinin belirleyici olabileceğini bildirmişlerdir.

Montero ve ark. (1999), yüksek stok yoğunluğunda üretilen stres altındaki juvenil çipuralarda bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin değişimini araştırmışlardır. Çalışmada yüksek stok yoğunluğunun kronik stres yarattığı, yüksek stok

yoğunluğundaki balıkların plazma kortizol seviyesinin düşük stok yoğunluğuna göre dört kat arttığı bildirilmiştir.

Rottlant ve ark. (2000), çipura balıkları üzerinde yaptıkları çalışmada iki stres faktörünü kullanarak glikoz, kortizol ve ACTH seviyelerini belirlemişlerdir. Birincisinde balıkları normal tanklardan alıp, daha küçük hacimli tanklara koymuşlar, ikincisinde ise kortizol içerikli yemle beslemişlerdir. İlk stres tepkisi sonrasında kortizol ve ACTH seviyelerinde artış görülmesine rağmen, ikinci stres faktöründe kortizolün, ACTH'ı baskıladığı tespit edilmiştir.

Sloman ve ark. (2001), kortizol konsantrasyonlarının davranış parametreleriyle ilişkili olduğunu bildirmiştir.

Stoltze ve Buchmann (2001), iki farklı su sıcaklığında *Gyrodactylus derjavini* ile infekte edilen yavru gökkuşakı alabalıklarının kortizol seviyelerini belirledikleri çalışmada, her iki su sıcaklığında da, infekte balıklardaki kortizol seviyesinin arttığını bildirmişlerdir.

Üreme, açlık, yoğun stoklama ve kirleticiler gibi birçok faktörün balıklarda strese neden olduğu bildirilmiştir (Almeida ve ark., 2001). Kortizol'ün balıklarda antigonadal etki gösterdiği bildirilmiştir (Bisson ve Hontela, 2002).

Çipura (*S. aurata*) ve levrek (*D. labrax*) ile yapılan bir çalışmada balıklarda kronik stres neticesinde plazma kortizol, plazma glikoz seviyeleri ve diğer bazı parametrelere bakılmıştır. Çalışmanın sonuçları, plazma kortizol seviyelerinin artışının kronik stres durumunu ortaya koymada indikatör olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Caruso ve ark., 2005).

Szisch ve ark. (2005), çipura larvalarının tiroid ve kortizol hormonlarının ontogenisi üzerine yaptıkları çalışmada, kortizol değerlerinin yumurtada $0,83 \pm 0,02$ ng/g, çıkışta $0,39 \pm 0,03$ ng/g, ilk beslemede $3,40 \pm 0,19$ ng/g olarak belirlemişlerdir. Bu aşamadan sonra kortizol değerlerinde sürekli bir artış gözlemlendiği, çıkıştan sonraki 23. günde $7,38 \pm 1,16$ ng/g, 29. günde $7,53 \pm 0,96$ ng/g ve 45. günde $14,55 \pm 2,82$ ng/g değerlerine ulaşıldığı bildirilmiştir. Çalışma esnasındaki en yüksek kortizol değerleri,

52. günde ve 71. günde sırasıyla $14,82 \pm 2,71$ ng/g ve $14,82 \pm 3,12$ ng/g olarak kaydedilmiştir.

Pek çok çalışmada stoklama yoğunluğunun artması ile balıkların plazma kortizol seviyelerinde yükseliş tespit edilmiştir (Costas ve ark., 2008). Yüksek stoklama koşullarında su kalitesinde gerçekleşen düşmelerin de balıklarda büyümeyi olumsuz etkilediği, yem alımını ve yemden yararlanmayı düşürdüğü bildirilmiştir (Björnsson ve Olafsdottir, 2006).

Jorgensen ve Buchmann (2007), *Ichthyophthirius multifiliis* ile infekte edilen gökkuşağı alabalıklarındaki kortizol seviyesinde artış olduğunu bildirmişlerdir.

Tuna Keleştemur ve Özdemir (2008), nakil işleminin gökkuşağı alabalıklarının plazma kortizol ve glikoz düzeylerine etkisini araştırdıkları çalışmada, nakil işleminin kortizol seviyelerini arttırdığını, 24 saat sonra ise eski seviyelerine geldiğini bildirilmiştir.

Rafatnezhad ve ark. (2008), mersin balığı juvenillerinde stok yoğunluğunun plazma kortizol ve glikoz konsantrasyonu üzerine önemli bir etki yapmadığını bildirmişlerdir. Bu durum mersin balıklarının kültür koşullarında yüksek stoklara toleranslı olduğunu göstermektedir.

Marco ve ark. (2008), farklı stoklama yoğunlukları ve akut stresin levrek balıkları üzerindeki fizyolojik tepkilerini belirlemek için yaptıkları çalışmada, 45 kg/m^3 ve daha üstü olan stoklama yoğunluğunun daha yüksek serum kortizol seviyelerine yol açacağına ve enerji durumunu etkileyebileceğine dikkat çekmişlerdir. Aynı balık türü ile daha yüksek stoklama yoğunluklarında çalışan Sammouth ve ark. (2009), stres indikatörlerinden kortizol seviyesine bakarak levreğin 70 kg/m^3 'e kadar büyüme parametrelerinde herhangi bir olumsuz etki olmadan yetiştirilebileceğini göstermiştir.

Santos ve ark. (2010), tarafından yapılan çalışmada ise, Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*)'inde artan stok yoğunluklarının balıklar üzerinde kronik stres etkisi yarattığı ve sonuçta yem alımını ve büyümeyi düşürdüğü belirlenmiştir.

Bayrak (2013), gökkuşağı alabalığının stoklama oranları ve refahı üzerine yaptıkları çalışmada artan kortizol konsantrasyonlarının üreme hormonlarını

baskıladığını böylece oogenez ve spermatogenezi olumsuz etkileyerek gamet kalitelerini düşürdüğünü bildirmişlerdir.

2.10. Sindirim Hormonları

Deniz balıklarının larva yetiştiriciliğinde, prelarval dönemden sonra ilk beslenmeye başlama dönemleri sindirim sistemlerinin henüz tam olarak fonksiyonel olmadığı dönemlere rastlamaktadır. Deniz balıklarının sindirim sistemlerinin gelişimi üzerine şimdiye kadar birçok çalışma yapılmıştır (Walford ve Lam,1993; Segner ve ark., 1994; Cahu ve Zambonino Infante, 1995a,b; Luizi ve ark., 1999; Ronnestad ve ark., 2000a,b). Balıklarda bağırsak hormonlarının dağılımı konusunda da bazı çalışmalar mevcuttur (Holmgren ve ark., 1982; Reinecke ve ark., 1997; Kurokawa ve ark.,2000; Kamisaka ve ark., 2001).

2.10.1. Bombesin

Kolkovski ve Tandler (1995), serbest aminoasitlerin, pankreatik enzimlerin salgısını kontrol eden bombesin gibi hormonal faktörlerin salınımını teşvik ettiği bildirmişlerdir.

Kolkovski ve ark. (1997a), mikropartikül ve canlı yemlerin bombesin hormonu üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Sadece canlı yemle beslenen grupta, yalnızca mikro partikül yemle beslenen gruba göre % 300 daha fazla bombesin hormonunun tespit edildiği, fakat burada kullanılan canlı yemdeki tetikleyici faktörün hala belirsiz olduğunu bildirmişlerdir.

Kolkovski ve ark. (2000), juvenil tatlı su levreklerinin (*Perca flavescens*) beslenmesinde kullanılan yemlere hormon ve sindirim enzimi ilavesinin, bu balıkların büyüme ve enzimatik aktivitesi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bu hormon ve enzim ilavesinin balıkların sindirimine katkısının olup olmayacağı hipotezi bu çalışma ile test edilmiştir. Bu çalışmada test edilen diyetler;

- Ticari alabalık başlangıç yemi,
- Yüksek oranda balık ve kalamar unu içeren yem,

- Deneysel diyetle % 0,1 oranında ilave edilen bombesin (sindirim hormonu),
- Deneysel diyetle % 0,1 oranında ilave edilen pankreatin (sindirim enzimi)'dir.

Çalışma sonunda, dört farklı yemle beslenen balıklar benzer bir gelişme göstermiştir. Yaşama oranı açısından deneme grupları arasında önemli bir farklılık gözlenmemiş, buna ilaveten yüksek bir yaşama oranı elde edilmiştir. Deneme grupları arasında tripsin, kimotripsin ve pepsin'in aktiviteleri arasında önemli farklılık bulunmamıştır. Bu çalışma, tatlı su levreği juvenillerinde sindirim hormonu ve enzimlerinin yemlere ilavesinin gerekli olmadığını ortaya koymuştur. Hormon ve enzim ilavesine balıkların ihtiyaç duymaması bu balıkların sindirim sistemlerinin tam olarak geliştiğine işaret etmiştir.

2.10.2. Kolesistokinin

Kolesistokinin (CCK) hormonu sindirim işlemlerinde en önemli düzenleyici hormonlardan biri olarak bilinmektedir. CCK bağırsak hattı boyunca epitelyum hücreler etrafında dağılan endokrin hücreler tarafından üretilmektedir.

CCK'nın fonksiyonları;

- Safranin salınımı,
- Pankreatik sindirim enzimlerin salınımı,
- Mide boşluğunun düzenlenmesidir.

Kolesistokininle ilgili balık larvalarında yapılan çalışmalar hala yetersizdir. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda CCK'nın en popüler stimulantının di-tri peptidleri ihtiva eden proteinler ve kısmen sindirime uğramış yağ ürünleri olduğu bildirilmiştir (Liddle, 2000).

Koven ve ark. (2002), ringa balıkları üzerinde yaptıkları çalışmada çözülebilir proteinin, serbest aminoasitlerden daha hızlı ve daha büyük miktarda CCK tetiklediğini (tüm vücut homojenatında) bildirmişlerdir. Buna ilaveten triptik aktivitelerinin de proteinle beslenen larvalarda arttığını, buna karşılık serbest aminoasitlerle beslenen larvalarda bir değişim gözlenmediğini belirtmişlerdir.

Cahu ve Zambonino Infante (1995b), deniz levrekleri (*Dicentrarchus labrax*) üzerinde yaptıkları çalışmada, protein hidrolizatı (kazein)'nın tripsin aktivitesini indirgediği tespit etmişler. Buna karşılık serbest aminoasitlerin bir karışımı ile beslenen larvalarda tripsin aktivitesinde bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Liddle (2000), triptofan ve fenilalanin'in CCK salgısını stimule etmek için potansiyel ürünler olduğu bildirmiştir.

Koven ve ark. (2002), yaptıkları bir çalışmada, sindirim kanalı doluluğunun CCK salgılamasında etkili olmadığını bildirmişlerdir.

Bentley (1998), besleme esnasında proteolitik enzim salgısının düzenlenmesinin sindirim hormonlarını iktiva eden birçok komponent tarafından kontrol edildiği bildirmiştir. Bu araştırmacı, CCK hormonunun vertebratalarda sindirim esnasında tripsin gibi pankreatik enzimler ve safranin salınımının düzenlenmesinde anahtar bir rolü olmasından dolayı oldukça önemli olduğunu belirtmiştir. Bu konu üzerinde yapılan diğer çalışmalarda, tripsin'in diğer proteolitik enzimleri aktive etmesinden dolayı sindirim işlemlerinde anahtar bir enzim olarak hizmet ettiği belirtilmiştir (Holst ve Schmidt, 1994; Liddle, 1995).

Ueberschar (1988), larval aşamada tripsin'in en önemli proteolitik sindirim enzimi olduğunu ve genelde çıkıştan sonra tespit edildiğini bildirmiştir.

Chey (1993), serbest aminoasitlerin pankreatik enzimlerin salgılanmasını kontrol eden somatostatin ve CCK gibi hormonal faktörlerin salınımını tetiklediğini bildirmiştir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma Yeri

Bu araştırmanın deneysel aşaması, **EGEMAR SU ÜRÜNLERİ Gıda San. ve Tic. A.Ş.**' de, analiz aşaması ise Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik laboratuvarı ile Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Denemede Kullanılan Larvalar

Bu çalışmada yumurtlama tanklarına alınan anaçlardan, sıcaklık 17°C'ye gelince tamamen doğal koşullarda yumurta alınmıştır. Dölllenmiş yumurtalar tank dışındaki reküperatörlerde toplanıp, gerekli tartım ve dezenfeksiyon işlemleri yapıldıktan hemen sonra konik inkübasyon tanklarına aktarılmıştır. İnkübasyon tanklarında yumurtadan çıkan keseli larvalar 8 tonluk yoğun larva üretim tankına 125 adet/lt olarak stoklanmıştır. 25. günden sonra larvalar 15 tonluk sörvaj tanklarına alınmıştır.

3.1.3. Denemede Kullanılan Tank Sistemi

Kullanılan tankların iç kısmı larvanın bu dönemdeki gereksiniminden dolayı siyah renklidir. Besleme aşamasında tankların tabanında biriken atıklar sifonla iki günde bir temizlenmiştir.

3.1.4. Denemede Kullanılan Canlı ve Mikroyemler

Çipura larvalarının ticari besleme prosedüründe;

- Alg olarak *Nanochloropsis sp.*,
- Rotifer olarak *Brachionus plicatilis* (SS- ve S- tip rotifer)
- *Artemia* naupli ile *Artemia* metanaupli (AF ve EG serisi)
- Mikroyem olarak ise GEMMA Micro (50-100µ) ve Caviar (100-200µ) kullanılmıştır.

Rotifer üretimi 3,2 tonluk tanklarda yapılmış olup, besleme esnasında Algamac Protein Plus, zenginleştirme esnasında da S.presso kullanılmıştır. Rotifer üretimindeki su sıcaklığı 24-26°C, oksijen 8-12 ppm, pH ise 7-8 arasında tutulmuştur. Rotifer kültüründe stok miktarı 1500-2000 adet/ml olmuştur. Rotifer üretiminde 14-16 saat ön besleme, 7-8 saat zenginleştirme yapılmıştır.

Artemia yumurta açılımı ve zenginleştirme işlemi 4 tonluk tanklarda yapılmış olup, 1 m³'e 2-2,5 kg artemia yumurtası konulmuştur. *Artemia* naupli besleme aşamasında küçük boyutlu ve zengin içeriğe sahip olmasından dolayı AF tip, *Artemia* metanaupli besleme aşamasında ise EG tip *Artemia*'nın kullanımı tercih edilmiştir. *Artemia*'nın zenginleştirme işleminde S.presso kullanılmış olup, zenginleştirme süresi 24 saat olarak ayarlanmıştır. *Artemia* üretimindeki su sıcaklığı, 24-26°C, oksijen 8 ppm'in altına düşürülmemiş, pH ise 7,5-8,5 arasında tutulmuştur.

3.2. Örnekleme

Çipura anaçlarından yumurta alımı, larvaların beslenmesi ve örnekleme işlemleri **EGEMAR Su Ürünleri Gıda San. ve Tic. A.Ş.**'ye ait kuluçkahanede gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Çipura larvaları ilk beslenmeye başladıkları dönemden 40. güne kadar örneklenmiştir. Örnekleme ticari besleme prosedürünün uygulandığı 8 tonluk larva üretim tankından ve 15 tonluk sörvaj tankından yapılmıştır. Örnekleme işlemi sabah saatlerinde larvalara yem verilmeden önce yapılmıştır. 200-300µ göz açıklığına sahip plankton ağı ile hazırlanan süzme düzeneği kullanılarak larvalar tanklardan toplanmış ve soğutulmuş tatlı su ile yıkanarak tuzdan arındırılmıştır. Süzme düzeneğinde toplanan larvalar spatül yardımı ile 3 ml'lik kriyojenik tüplere aktarılmıştır. Kriyojenik tüpler vial tutucuya tutturularak Air Liquide GT 40 marka sıvı nitrojen tankına konmuşlardır. Larva örnekleri işletmeden Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarlarına getirilene kadar -196°C'de muhafaza edilmiştir. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarlarına getirilen larvalar -80°C derin dondurucuya konarak analiz aşamasına kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.1. Denemedeki Ortam Şartları

Çipura anaçlarından tamamen doğal koşullarda yumurta alımı gerçekleştirilmiştir. Yumurtalar gerekli sterilizasyon işlemlerinin ardından 17°C’de tamamen karanlık ortamda inkübasyon tanklarına alınmıştır. İnkübasyon tanklarının konik tabanından havalandırma yapılarak yumurtaların tank içinde homojen dağılımları sağlanmıştır. Yumurtadan çıkış esnasında ve prelarval dönemde gelişimin daha iyi olması için ortamın karanlık olmasına dikkat edilmiştir. Besin kesesinin tüketiminin ardından inkübasyon tanklarından alınan larvalar 8 tonluk larva üretim tanklarına konulmuştur. Alg girişi yapılarak 50 lux aydınlatma uygulanmıştır. Bu esnada larvalarda ağız açılımı olduğu için canlı yem olarak rotifer girişi yapılmıştır. Larvanın ağız büyüklüğündeki değişimlere göre canlı yemler *Artemia* naupli, *Artemia* metanaupli olarak değiştirilmiştir. Besleme periyodunda belirtildiği gibi canlı yem dönemlerinde larvaları mikroyeme alıştırmak için mikroyem girişi de yapılmıştır. Larvalar 25. günden sonra sörvaj tanklarına alınarak beslemelerine devam edilmiştir. Örnekleme esnasında tuzluluk 30-37 ppt, su sıcaklığı 17-20°C, oksijen ise 7,8-8,3 arasında değişmiştir. Çipura üretimi esnasında 4. güne kadar 0,4 m³/saat, 7. güne kadar 0,6 m³/saat, 12. güne kadar 0,8 m³/saat, 17. güne kadar 1 m³/saat, 22. güne kadar 1.2 m³/saat, 27. güne kadar 1,4 m³/saat, 30-40. günler arasında 2 m³/saat olarak su değişimi yapılmıştır.

3.2.2. Beslenme Programı

Çizelge 3.1’de çipura larvalarının postlarval dönemdeki besleme prosedürü ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çipura larvalarının ticari besleme prosedürü

LARVA	ALG	ROTİFER	ARTEMİA		MİKROPARTİKÜL	
YAŞ (GÜN)	10 ⁶ hücre/ml	(adet/ml)	AF (adet/ml)	EG (adet/ml)	50-100 µ (%)	100-200 µ (%)
-3	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	3-3,5	8-13	-	-	-	-
10	5-5,5	8-13	-	-	-	-
15	7-8	8-13	1-1,5	-	-	-
20	7-8	8-13	2-3	2-3	-	-
25		-	-	7-8	5	-
30	-	-	-	1-2	5	-
35	-	-	-	-	2,5	2,5
40	-	-	-	-	-	5

3.2.3. Analizler

EGEMAR Su Ürünleri Gıda San. ve Tic. A.Ş.'ye ait kuluçkahanede ticari olarak üretimi yapılan çipura larvalarından 40. güne kadar, her 5 günde bir örnekleme yapılmıştır. İşletme koşullarında sıvı nitrojen tankında -196°C'de, Eğirdir su ürünleri fakültesinde -80°C'de muhafaza edilen larvalarda ilk olarak proteaz aktiviteleri belirlenmiştir.

Daha sonra ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin (Zenginleştirilmiş Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli) ve mikroyemlerin (GEMMA Micro (50-100µ) ve Caviar (100-200µ)) larvalar üzerinde yaratmış oldukları inhibisyon etkileri analiz edilmiştir. Bu çalışma esnasında ticari besleme prosedürünün

ileri safhalarında yaygın olarak kullanılan Caviar (200-300µ) ve Caviar (300-500µ) yemleri de test edilmiştir.

Son olarak larvalarda stres indikatörü olan kortizol aktiviteleri belirlenmiştir. Larva örneklerinin aşağıdaki gibi hazırlanan solüsyonlarının analizleri 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Proteaz ve inhibisyon analizleri Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarlarında yapılmış olup, kortizol analizleri ise Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Çipura Larva Ekstraktlarının Hazırlanması

Çipura larvaları distile su ile homojenize edildikten sonra, örnekler 16000 g, 30 dakika (+4°C) süre ile santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantlar analizlerde kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. Protein Solüsyonlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak protein kaynakları (Zenginleştirilmiş Rotifer, *Artemia* naupli, *Artemia* metanaupli, GEMMA Micro(50-100µ), Caviar (100-200µ), Caviar (200-300µ) ve Caviar (300-500µ)) 100 mg/ml’lik konsantrasyonlarda distile su ile hazırlandıktan sonra homojenize edilmiştir. Homojenize olan örneklerle 15000 g de 10 dakikalık bir santrifüj işlemi uygulanmıştır. Elde edilen süpernatantlar analizlerde kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.3. Protein Analizi

Çipura larva ekstraktlarının, çözülebilir protein konsantrasyonları Bradford (1976) tarafından geliştirilen bir protein renk (dye) çözeltisine dayalı yöntem ile belirlenmiştir (Biorad Protein Assay, Cat. No: 5002). Biorad kit prosedürleri uygulandıktan sonra **UV-MİNİ 1240 (SHIMADZU)** spektrofotometrede 595 nm’de ölçümler yapılmıştır. Elde edilen değerler proteaz ve inhibisyon sonuçlarının mg protein şeklinde ifade edilmesinde kullanılmıştır.

3.2.3.4. Çipura Larvalarının Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çipura larva ekstraktlarında proteaz aktiviteleri Walter (1984) tarafından belirtilen metoda göre belirlenmiştir. Substrat olarak kazein kullanılmış olup, kazein solusyonu 10 g/l konsantrasyonda (buffer: 50 mM Tris HCl, pH:8,5) hazırlanmıştır. Substrat ve larva ekstraktlarının inkübasyon reaksiyonu 0,5 ml trikloroasetik asitin (TCA, 120 g/l konsantrasyonunda) ilavesi ile durdurulmuştur. Proteaz aktiviteleri, dakikada salınan tyrosin miktarının µg cinsinden ifadesi olarak verilmiştir (U/mg protein).

3.2.3.5. Mikroyemlerin ve Canlı Yemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkileri

Bu aşamada daha önceden hazırlanmış olan protein solüsyonlarının (Zenginleştirilmiş Rotifer, *Artemia* naupli, *Artemia* metanaupli, GEMMA Micro (50-100µ), Caviar (100-200µ), Caviar (200-300µ) ve Caviar (300-500µ)) çipura larvalarının proteaz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri analiz edilmiştir. Analizlerde Garcia-Carreno (1996) tarafından tanımlanan yöntem kullanılmıştır. Öncelikle larva, buffer ve protein solüsyonları oda sıcaklığında inkübe edilmiş, daha sonra kazein solüsyonu ilave edilerek tekrar inkübasyona tabi tutulmuştur. Reaksiyon 0,5 ml TCA (120 g/l konsantrasyonunda) ilavesi ile durdurulmuştur. Körler benzer şekilde hazırlanmış olup, TCA kazein solüsyonundan önce ilave edilmiştir. Proteaz inhibisyonu kontrol grubundakine göre azalan proteaz aktivitesi olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar % değerler olarak verilmiştir.

3.2.3.6. Kortizol Analizi

Çipura larvaların kortizol ekstraktlarının elde edilmesinde Alderman ve Bernier (2009) tarafından tanımlanan metot kullanılmıştır. Kortizol analizleri ise **FISH CORTISOL ELISA KIT (CUSABIO BIOTECH CO.,Ltd)** prosedürlerine uygun olarak yapılmıştır. Yıkama işlemleri **BIOTEK marka ELx50** otomatik yıkama cihazı kullanılarak (Şekil 3.2), okuma işlemleri ise **RAYTO marka RT-6000 ELISA READER** kullanılarak 450 nm 'de yapılmıştır (Şekil 3.3).

Cipura larvalarının kortizol ekstraktları aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

- Çözdürülen larvalar, tartıldıktan sonra 500 µl PBS’de homojenize edilmiştir.
- Homojenizasyon sonrasında homojenizatör ucu 500 µl PBS ile yıkanmıştır. Örnek geçişleri arasında kontaminasyonu önlemek amacıyla % 100’lük etanol ve de iyonize su ile iyice temizlenmiştir.
- Elde edilen homojenatlar 10 ml’lik tüplere alınarak 5 ml di etil ether ilave edilmiştir.
- 1 dakika vortekslendikten sonra 3500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Sarı renkli kortizol tabakası alınır. Speed-VAC cihazı kullanılarak eter hızlı bir şekilde ortamdan uzaklaştırılır. Buharlaştırma sonrası örnekler -20°C’de ELISA KİT prosedürleri uygulanana kadar muhafaza edilmiştir.

ELISA KİT prosedürlerinin uygulanmasından önce örnekler 1 ml PBS ile tekrar oluşturulmuş ve +4°C’de gece boyu inkübe edilmiştir (Şekil 3.4).

3.2.4. İstatistiksel Analizler

Elde edilen canlı yem ve mikroyemlerin proteaz aktivite ve kortizol değerleri tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar ise Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılarak belirlenmiştir ($p < 0.05$). Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata şeklinde verilmiştir. Araştırma sonucundan elde edilen bütün veriler SPSS 9.0 istatistik paket programı kullanılarak analiz edilmiştir (SPSS, 1993).



Şekil 3.1. Kortizol analizi esnasında kullanılan ELISA yıkama ünitesi



Şekil 3.2. Kortizol analizi esnasında kullanılan RAYTO marka RT-6000 ELISA READER



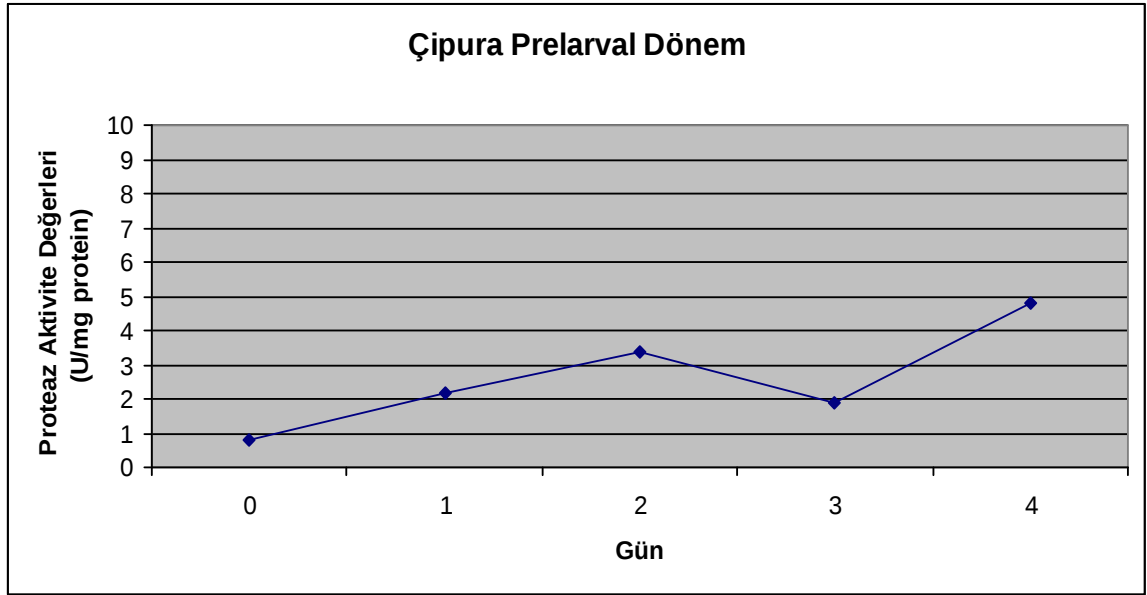
Şekil 3.3. Kortizol analizleri için ön hazırlıklar, pipetleme ve inkübasyon aşamaları

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışma ile çipura larvalarının ticari besleme prosedüründe kullanılan yemlerin, larvaların proteaz aktiviteleri üzerindeki etkileri ve bu yemlere larvaların vermiş oldukları fizyolojik tepkilerin test edilmesi amaçlanmıştır.

4.1. Çipura Prelarvalarının ve Postlarvalarının Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çipura larvalarının prelarval dönemlerindeki proteaz aktiviteleri incelendiğinde en düşük aktivitenin larvanın yumurtadan ilk çıkış yaptığı 0. günde $0,77 \pm 0,36$ U/mg protein, en yüksek aktivitenin ise postlarval döneme geçiş yapmaya başladığı 4. gün de $4,77 \pm 0,7$ U/mg protein olarak gözlemlendiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). 3. gündeki prelarvaların proteaz aktivitelerinde bir azalma gözlenmiştir ($1,91 \pm 0,23$ U/mg protein). Prelarvaların 0. gün, 1. gün, 2. gün, 3. gün ve 4. gün proteaz aktivitelerinin ortalamaları arasındaki farklılıkların, istatistiksel açıdan önemli olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$).

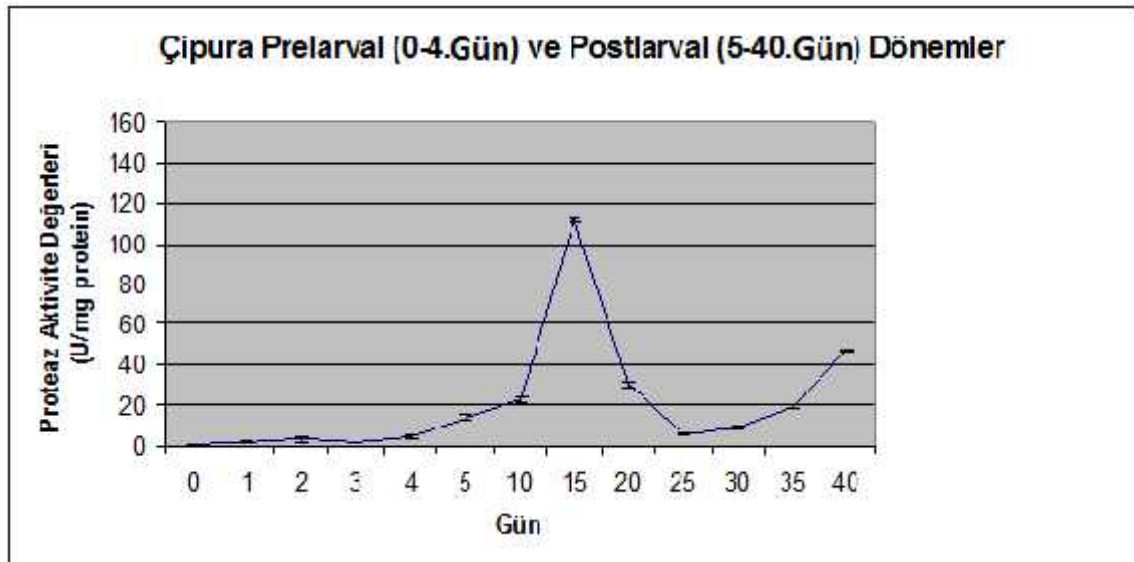


Şekil 4.1. Çipura larvalarının prelarval (0-4. gün) dönemlerindeki proteaz aktivitelerinde gözlenen değişimler

0. gün, 1. gün, 2. gün ve 3. gün prelarvalarında gözlenen proteaz aktivitelerinin ortalamaları arasında istatistiksel farklılık bulunmadığı ($p > 0,05$), buna karşılık 4. gün

grubunun sadece 0. gün ve 3. gün prelarvalarının proteaz aktivitelerinin ortalama değerlerinden istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çipura larvalarının postlarval dönemlerindeki proteaz aktiviteleri değerlendirildiğinde en düşük aktivite 25. günde $5,75\pm0,51$ U/mg protein, en yüksek aktivite ise 15. gün de $111,57\pm0,74$ U/mg protein olarak gözlenmiştir (Şekil 4.2). Postlarval döneme geçiş yapmaya başladığı 4. gün de $4,77\pm0,7$ U/mg protein olarak gözlenen proteaz aktivitesi, postlarval döneme geçiş yaptığı ilk günde (5. gün) artış göstererek $14,04 \pm 1,09$ U/mg protein olmuştur. 5. günden 15. güne kadar postlarvaların proteaz aktivitelerinde yükselme eğilimi gözlenmiş olup, 15. günde çalışma süresi içindeki en yüksek proteaz aktivite değerine ulaşılmıştır ($111,57\pm0,74$ U/mg protein). 15. günden sonra 25. güne kadar postlarvaların proteaz aktiviteleri düşme eğiliminde olmuştur. 25. günde postlarvalar en düşük proteaz aktivitesine sahip olmuşlardır ($5,75\pm0,51$ U/mg protein). 25. günden itibaren postlarvaların proteaz aktivitelerinde artış eğilimi başlamış olup, çalışmanın sonunda proteaz aktivite değeri $47,13\pm0,79$ U/mg protein (40. günde) olmuştur. Postlarvaların 5. günden 40. güne kadar olan tüm yaş gruplarının proteaz aktivitelerinin ortalamalarının birbirlerinden farklı olduğu, bu farklılıklarında istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.2. Çipura larvalarının prelarval (0-4. gün) ve postlarval (5-40. gün) dönemlerindeki proteaz aktivitelerinde gözlenen değişimler

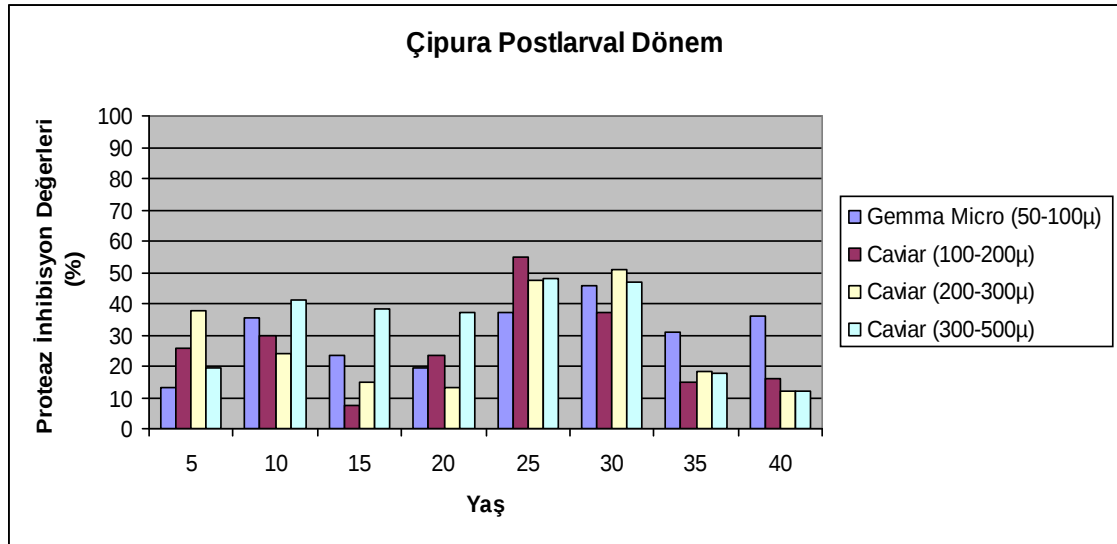
Balık larvalarında toplam spesifik enzim aktivitesinin hem doku ağırlığında hem de doku proteinlerinin her gramında ki enzim aktivitesinde gözlenen artıştan dolayı yaşa bağlı olarak artış gösterdiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Martinez ve ark. 1999; Ribeiro ve ark. 1999; Zambonino Infante ve Cahu, 2001). Araştırmacılar aynı zamanda, spesifik enzim aktivitesindeki azalmaların, enzim sentezinde bir azalmadan kaynaklanmadığını, daha çok doku proteinlerindeki artışın bir sonucu olduğunu ortaya koymuşlardır. Zambonino Infante ve Cahu (1994b) tarafından yapılan çalışmada sindirim enzimlerinin yem değişimine bağlı olarak değişim gösterdiği belirlenmiştir. Perez ve ark. (1996), amilaz aktivitesinin 18. günden sonra yemlerin karbonhidrat içeriğinin artışına paralel olarak arttığını, 35. günde ise yemlerin protein içeriğindeki artışa paralel olarak tripsin aktivitesinin de arttığını bildirmişlerdir. Naz (2007), yaptığı çalışmada çipura larvalarında tripsinin besinsel adaptasyonunu kontrol eden mekanizmanın 36. güne kadar etkin olmadığını bildirmiştir. Pankreatik ve bağırsak enzim aktivitelerinin ilk beslemenin başlangıcında genelde düşük olduğu görülmektedir. Sindirim sisteminin gelişimiyle birlikte, larvalar yeterli miktarda gıda ile beslenebiliyorlarsa enzim sentezinde artma eğiliminin olacağı bildirilmiştir (Hoehne-Reitan ve ark., 2001a,b). Enzim salgısı miktarının larvanın yem alım miktarına ve yem formülasyonunda kullanılan hammaddelere bağımlı olduğuna dikkat çekilmiştir (Zambonino Infante ve Cahu, 2001).

Çipura larvalarının prelarval (0-4. gün) ve postlarval dönemleri (5-40. gün) arasındaki proteaz aktivitesindeki dalgalanmaların;

- Doku protein konsantrasyonlarındaki değişikliklerinden,
- Postlarval dönemde sindirim sisteminin gelişiminin bir sonucu olarak ticari besleme programında kullanılan canlı ve mikroyemlere karşı vermiş olduğu tepkilerden,
- Ticari besleme programında kullanılan canlı ve mikroyemlerin biyokimyasal kompozisyonlarına vermiş olduğu tepkilerden,
- Ticari besleme programındaki mikroyemlerin rasyonlarında kullanılan yem hammaddelerine karşı göstermiş olduğu tepkilerden,
- Naz (2007)'de belirtilen kolesistokin (CCK)-tripsin ilişkisi, mevcut çalışmada ki 25. günden sonra ki proteaz aktivitelerinde gözlenen artışları desteklemektedir.

4.2. Mikroyemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkileri

Mevcut çalışmanın ticari besleme prosedüründe larvaların sörvaj tankına alınması ile birlikte kullanılan yemler Gemma Micro (50-100 μ) ve Caviar (100-200 μ)’dır. Ticari besleme prosedürlerinde yaygın olarak kullanılan Caviar (200-300 μ) ve Caviar (300-500 μ) mikroyemleri de bu çalışma kapsamında test edilmiştir (Şekil 4.3). Gemma Micro (50-100 μ) en düşük inhibisyon yüzdesini 5. günde % 13,17 olarak göstermiştir. 10. ve 15. günlerde %29,99 ve %7,67’lik inhibisyon değerleri ile Caviar (100-200 μ)’ın, Gemma Micro (50-100 μ)’ya göre üstün olduğu dikkat çekmektedir. 20. ve 25. günlerde sırasıyla % 19,59 ve % 37,28’lik inhibisyon yüzdesiyle Gemma Micro (50-100 μ)’nun, Caviar (100-200 μ)’dan daha iyi bir yem olduğu gözlenmektedir. 30., 35. ve 40. günlerde sırasıyla % 36,93, % 14,62 ve % 16,18’lik inhibisyon yüzdeleriyle Caviar (100-200 μ)’ın Gemma Micro (50-100 μ)’ya göre daha iyi bir performans sergilediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Mikroyemlerin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon Değerleri (%)

Diğer taraftan 10. ve 20. günlerde Caviar (200-300 μ)’ın sırasıyla % 23,78 ve % 12,87’lik inhibisyon yüzdeleriyle, Gemma Micro (50-100 μ) ve Caviar (100-200 μ)’dan daha iyi bir performans sergilediği görülmüştür. 30., 35. ve 40. günlerde sırasıyla %

36,93, % 14,62 ve % 16,18'lik inhibisyon yüzdeleriyle iyi bir performans sergileyen Caviar (100-200 μ)'a yakın inhibisyon yüzdeleri, 35. ve 40. günlerde Caviar (200-300 μ) ve Caviar (300-500 μ)'dan elde edilmiştir.

Deniz balığı larvalarının besinsel problemlerini çözmek için, larvaların beslenmesinde potansiyel olarak kullanılabilecek yem hammaddelerinin inhibisyon etkilerinin incelenmesi kadar, üretilmiş olan yemlerin larvaların sindirim sistemi üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalarında önemi oldukça fazladır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda deniz balığı larvalarının sindirim enzimlerinin fonksiyonel özellikleri, biyokimyasal karakteristikleri tanımlanmıştır (Alarcon ve ark., 1998; Perez-Jimenez ve ark., 2009). Araştırmacılar, çipura larvaları ve karideslerin proteaz aktiviteleri üzerine mikroyemlerin üretiminde kullanılabilen bazı yem hammaddelerinin (ovalbumin, hemoglobin, sübye unu, kazein) inhibisyon etkileri hakkında bilgi vermişlerdir (Alarcon ve ark., 1997; Alarcon ve ark., 1999; El-Sayed ve ark., 2000).

Gemma Micro (50-100 μ) ve Caviar (100-200 μ) arasında gözlenen bu farklılıkların, bu yemlerin üretimlerinde kullanılan hammaddelerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Alarcon ve ark. (1999), mikroyemlerin balık larvaları tarafından sınırlı faydalanmasının yem hammaddelerinin larvaların proteaz aktivitelerini kısmi inhibisyonu ile ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Alarcon ve ark. (1999), 8 günlük çipura larvalarında mevcut proteaz aktivitesinin % 60'dan fazlasını ovalbuminin inhibe ettiğini rapor etmiştir. Alarcon ve ark. (1997), ovalbumin içeren ticari olarak üretilen mikroyemler karides proteazları üzerinde test edildiğinde de benzer sonuçlar almışlardır. Kolkovski ve Tandler (2000), çipura larvalarının yemlerinde % 50'den daha fazla kalamar hidrolizatı kullanıldığında büyümede azalma olduğunu belirlemişlerdir. Diğer taraftan, Alarcon ve ark. (1999), sübye ununun 8 günlük çipura larvalarının proteaz aktivitesini etkilemediğini, mikroyemlerin hazırlanmasında iyi bir aday olabileceği gösterilmiştir. Moyano ve ark. (1999), çipura proteaz aktivitesinin soya ununda bulunan proteaz inhibitörüne karşı çok hassas olduğunu rapor etmiştir. El-Sayed ve ark. (2000), tilapya'nın toplam proteaz aktivitesi üzerine soya ununun % 60'dan daha yüksek oranlarda inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

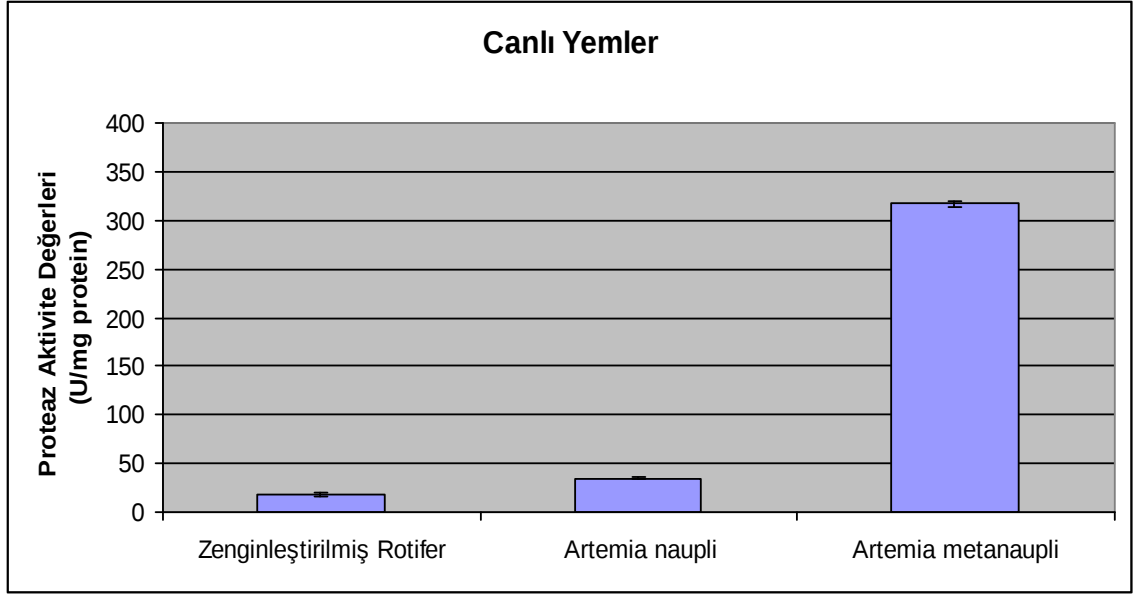
Bilindiği üzere larvaların farklı dönemler farklı besinsel talepleri olmaktadır. Besin gereksinimlerini karşılayabilen yemlerle beslendikleri zaman bu memnuniyetlerini fizyolojik olarak gösterebilmektedirler. Yukarıda Gemma Micro

(50-100 μ) ve Caviar (100-200 μ) için verilmiş olan % değerler larvaların sunulan yemlerden memnuniyetsizliklerinin göstergesidir. Bu değerler ticari besleme prosedürü esnasında çipura larvalarının vermiş oldukları stres tepkileri ile birlikte değerlendirildiğinde, Gemma Micro (50-100 μ)’nun çipura larvalarına sörvaj döneminin başlangıcında (25. gün) *Artemia* metanaupli ile birlikte verildiği, bu dönemde çipura larvalarının fizyolojik stres tepkilerinden kortizol değerlerinde istatistiksel olarak bir değişim gözlenmediği, 30. günde de yine *Artemia* metanaupli ile birlikte verildiğinde kortizol değerinde düşüş gözlenmesine rağmen bunun istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir. *Artemia* metanauplinin verilmediği (35. günde), Gemma Micro (50-100 μ) ile Caviar (100-200 μ)’ın birlikte verildiği durumda da kortizol değerlerinde düşme gözlenmiştir fakat bu durum istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Buna karşılık Caviar (100-200 μ)’ın yalnız verildiği 40. günde kortizol değerlerinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir yükselme gözlenmiştir.

Bu veriler, Gemma Micro (50-100 μ)’nun daha düşük inhibisyon gösterdiği ticari besleme prosedüründeki *Artemia* naupli’nin girişinden itibaren kullanımının bir risk oluşturmayaacağına, buna karşılık sindirim sistemi fonksiyonel olmuş 40. gündeki çipura larvalarına yalnız sunulduğunda, Gemma Micro (50-100 μ) ile birlikte sunulduklarından daha yüksek bir fizyolojik stres tepkisine (kortizol) yol açan Caviar (100-200 μ)’ın ise daha erken dönemlerde kullanımının riskli olacağına işaret etmektedir.

4.3. Canlı Yemlerin Proteaz Aktiviteleri

Ticari besleme prosedüründe 20. güne kadar yalnız, 25. gün sonrasında mikroyemlerle birlikte 30. gününe kadar kullanılan canlı yemlerin (zenginleştirilmiş Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli) proteaz aktivitelerinde gözlenen değişimler Şekil 4.4’de verilmiştir. Canlı yemlerin proteaz aktiviteleri istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde de, ortalamalar arasındaki farklılıkların önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). En düşük proteaz aktivitesini zenginleştirilmiş rotifer ($17,98 \pm 2,82$ U/mg protein) göstermiştir. *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli’nin proteaz aktivite değerleri sırasıyla $34,67 \pm 0,88$ U/mg protein ve $317,16 \pm 2,67$ U/mg protein şeklinde belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin proteaz aktivitelerinde gözlenen değişimler

Rotiferler (*Branchionus plicatilis*) ve *Artemia* naupli'leri dünyada ticari bir potansiyele sahip deniz balıklarının larval dönemlerinde canlı gıda kaynağı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bu yemler larva yetiştiriciliğinde vazgeçilmez gibi görünse de, günümüzde, bu tür canlı yemlerin yoğun üretimleri için laboratuvar ve enerji yatırımlarının çok yüksek olması ve besinsel kompozisyonlarının sabit tutulamaması gibi nedenlerden dolayı larva yetiştiriciliğinde mikro yemlere geçişi hızlandırmak için çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir (Roselund ve ark., 1997). Aynı zamanda *Artemia*'nında doğal populasyonlarının azalması ve buna bağlı olarak fiyatlarında gözlenen aşırı yükselmeler bu geçişin su ürünleri yetiştiriciliğinin devamlılığı açısından oldukça önemli olduğunu göstermektedir.

Naz ve ark. (2011), tarafından yürütülen bir çalışmada *Artemia* metanaupli, *Artemia* naupli, zenginleştirilmiş rotifer ve rotiferin proteaz aktiviteleri sırasıyla $481,31 \pm 22,10$ U/mg protein, $253,48 \pm 6,54$ U/mg protein, $139,42 \pm 18,38$ U/mg protein, $114,26 \pm 20,19$ U/mg protein olarak bulunmuştur. Rotifer ve zenginleştirilmiş rotifer arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Buna karşılık *Artemia* metanaupli, *Artemia* naupli ve rotifer grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). *Artemia* grubunda gözlenen proteaz aktivitesinin, rotifer grubuna göre daha yüksek olduğu ve bu farkların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Mevcut çalışmada, zenginleştirilmiş rotifer,

Artemia naupli ve *Artemia* metanaupli'nin proteaz aktiviteleri sırasıyla $17,98 \pm 2,82$ U/mg protein, $34,67 \pm 0,88$ U/mg protein, $317,16 \pm 2,67$ U/mg protein olarak bulunmuştur. Canlı yem grupları arasında istatistiksel olarak farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Naz ve ark. (2011), tarafından yapılmış olan çalışmada elde edilen canlı yemlerin proteaz aktivite değerleri ile mevcut çalışmada elde edilen değerler arasında farklılıklar bulunmuştur.

Toplam spesifik enzim aktivitesinin balık larvalarında hem doku ağırlığında hem de doku proteinlerinin her gramında ki enzim aktivitesinde gözlenen artıştan dolayı yaşa bağlı olarak artış gösterdiği bildirilmiştir (Martinez ve ark. 1999; Ribeiro ve ark. 1999; Zambonino Infante ve Cahu, 2001). *Artemia*'nın sindirilebilirliği *Artemia*'nın yaşıyla, balığın türü ve yaşıyla değişkenlik gösterebilir. *Artemia*'nın çıkıştan 12 saate kadar (Instar II metanaupli) sindirim sistemi açık olmayıp, *Artemia*'dan larvalara dışsal sindirim enzimlerinin girişinin sınırlı olduğu görülür. Bu durum *Artemia*'yı bazı deniz balıklarının erken dönemleri için daha az sindirilebilir yapmaktadır. Bu dönemden sonra, *Artemia*'nın sindirim enzimlerinde çıkışta gözlenen miktarının yaklaşık 5 katı kadar artış görülmektedir (Pan ve ark., 1991). Diğer taraftan dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtalarının sindirilebilirlik açısından dirençli olduğu bildirilmiştir (Dendrinis ve Thorpe, 1987).

Bu konudaki mevcut literatürler, *Artemia* metanaupli ve *Artemia* naupli arasındaki proteaz aktivitelerindeki farklılıkların gelişim dönemlerinden kaynaklanabileceği görüşünü desteklemektedir. Gelişimsel dönemlerin etkisinin dışında, *Artemia*'nın biyokimyasal kompozisyonları üzerine global iklimsel değişimlerin etkisi olduğu bilinmektedir. Global iklimsel değişimlerin *Artemia*'nın enzimatik aktiviteleri üzerindeki etkilerinin de araştırılması gerekmektedir. Rotifer grubunda bu enzimatik değişimler üzerinde besleme ve zenginleştirme işlemlerinin etkili olabileceği tahmin edilmektedir.

4.4. Canlı Yemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri

Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin (zenginleştirilmiş Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli), çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde (sadece 10. gün) zenginleştirilmiş rotifer dışında pozitif katkısı olduğu belirlenmiştir

(Şekil 4.5). 10. günde zenginleştirilmiş rotiferin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde % 15,19'luk bir inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir.

5. gün ve 40. gün arasında protein kaynağı olarak rotifer düşünüldüğünde, en düşük ve en yüksek proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 11,78, 25. günde % 81,92 olarak gözlenmiştir. Rotiferin çipura larvalarının en düşük proteaz aktivitesine sahip olduğu 25. günde en yüksek katkıyı sağladığı gözlenmiştir.

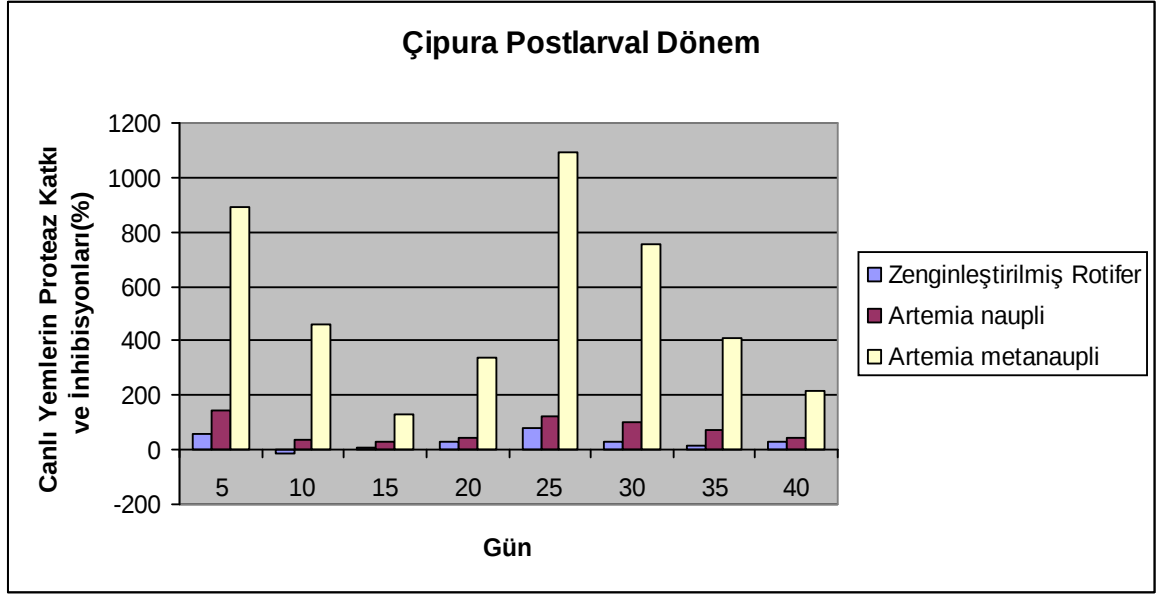
5. gün ve 40. gün arasında protein kaynağı olarak *Artemia* naupli düşünüldüğünde, en düşük ve en yüksek proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 29,95, 5. günde % 145,13 olarak gözlenmiştir. *Artemia* naupli'nin çipura larvalarının en düşük proteaz aktivitesine sahip olduğu 25. günde % 122,59 gibi bir katkı sağladığı bulunmuştur.

5. gün ve 40. gün arasında protein kaynağı olarak *Artemia* metanaupli düşünüldüğünde, en düşük ve en yüksek proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 130,66, 25. günde % 1093,22 olarak tespit edilmiştir. *Artemia* metanaupli'nin çipura larvalarının en düşük proteaz aktivitesine sahip olduğu 25. günde en yüksek katkıyı sağladığı gözlenmiştir. *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli'nin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerine olan pozitif katkı oranlarındaki dalgalanmaların benzer olduğu, *Artemia* metanauplinin hem rotifer hem de *Artemia* naupli'den daha yüksek katkı sağladığı gözlemlenmiştir.

Canlı yemlerin (zenginleştirilmiş Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli), çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde pozitif katkılarının olduğu tespit edildikten sonra, canlı yemlerin bireysel katkıları ve inhibisyon yüzdeleri hesaplanarak Şekil 4.6'da verilmiştir.

Canlı yemlerin, çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde sadece 10. gün zenginleştirilmiş rotifer dışında pozitif bireysel katkısı olduğu belirlenmiştir. 10. günde zenginleştirilmiş her bir rotiferin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde % 0,006 'lık bir inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir.

5. gün ve 40. gün arasında protein kaynağı olarak rotifer düşünüldüğünde, en düşük ve en yüksek bireysel proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 0,005, 25. günde % 0,034 olarak gözlenmiştir. Rotiferin çipura larvalarının en düşük proteaz aktivitesine sahip olduğu 25. günde en yüksek bireysel katkıyı sağladığı gözlenmiştir.

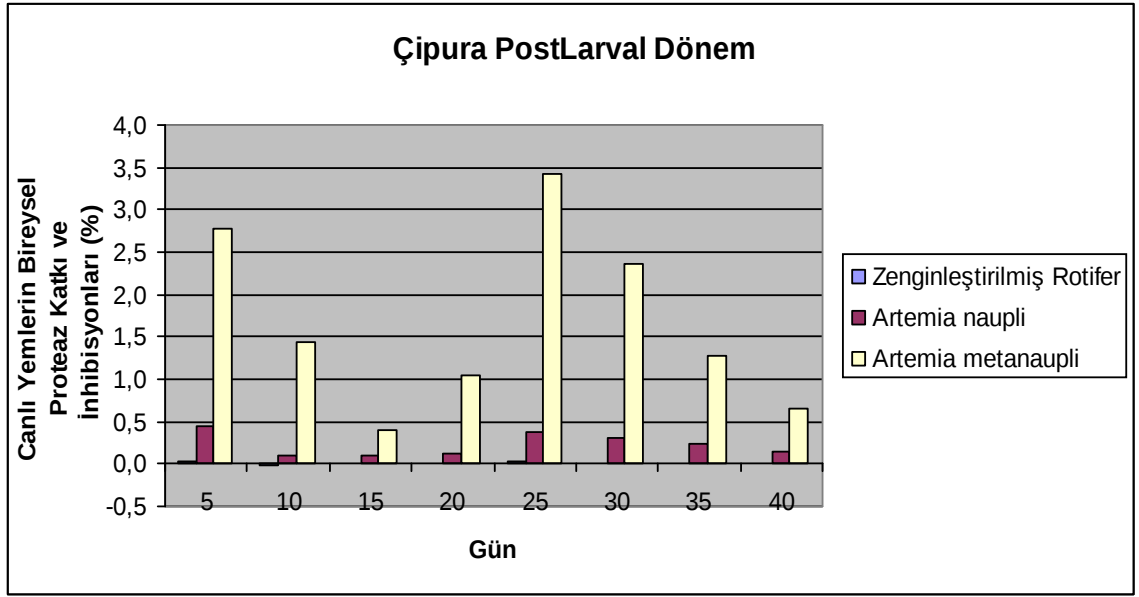


Şekil 4.5. Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin proteaz katkı ve inhibisyonları

5. gün ve 40. gün arasında protein kaynağı olarak *Artemia* naupli düşünüldüğünde, en düşük ve en yüksek bireysel proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 0,094, 5. günde % 0,454 olarak gözlenmiştir. *Artemia* naupli'nin çipura larvalarının en düşük proteaz aktivitesine sahip olduğu 25. günde % 0,383 gibi bir bireysel proteaz katkı sağladığı bulunmuştur.

5. gün ve 40. gün arasında protein kaynağı olarak *Artemia* metanaupli düşünüldüğünde, en düşük ve en yüksek bireysel proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 0,408, 25. günde % 3,416 olarak tespit edilmiştir. *Artemia* metanaupli'nin çipura larvalarının en düşük proteaz aktivitesine sahip olduğu 25. günde en yüksek bireysel katkıyı sağladığı gözlenmiştir. *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli'nin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerine olan pozitif katkı oralarındaki dalgalanmaların benzer olduğu, *Artemia* metanauplinin hem rotifer hem de *Artemia* naupli'den daha yüksek bireysel katkı sağladığı gözlemlenmiştir.

Larvaların beslenmesinde *Artemia* ve mikro yemlerin beraber kullanımı sırasında dolaylı olarak kimyasal ve görsel uyarım ile *Artemia*'nın sindirim enzimi katkısının mikro yemlerin sindiriminde etkili olduğu bildirilmiştir (Kolkovski ve ark., 1993). Araştırmacılar, deniz balıkları larvalarında mikro yemlerin performansının, canlı yemlerle birlikte kullanıldıkları zaman arttığını ortaya koymuşlardır (Cahu ve Zambonino Infante., 2001; Koven ve ark., 2001).



Şekil 4.6. Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin bireysel proteaz katkı ve inhibisyonları

Şimdiye kadar yürütülen çalışmalar, canlı yemlerin, sindirim sistemi tam olarak fonksiyonel olmayan balık larvalarının sindirimine katkı sağladığını, aynı zamanda larvalara mikroyemlerle beraber verildikleri zaman mikro yemlerin sindirilebilirliğini önemli ölçüde düzenlediğini göstermektedir. Türler arasında sindirim sisteminin gelişimlerinde gözlenen farklılıklardan dolayı canlı yemlerin katkı oranları konusunda şimdiye kadar yapılan çalışmalarda net bir değer ortaya konamamıştır. Sindirim sistemi larval dönemde iyi gelişen larvalar için canlı yemlerin düşük bir enzimsel katkısından bahsedilirken, ilkel bir sindirim sistemine sahip bir larva için canlı yemlerin enzimsel katkısının hayati önem taşıdığı konusunda bir fikir birliği ortaya çıkmıştır.

Canlı gıdaların ringa (*Clupea harengus*) larvalarında dışsal tripsin salgısına ilaveten içsel tripsin salgısının da artışında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Pedersen ve Hjelmeland, 1987). Munilla-Moran ve ark. (1990), 3 günlük kalkan balığının sindirim enzimlerine canlı yemlerin katkılarını, % 15-27 amilaz, % 43-60 proteaz ve % 89-94 esteraz şeklinde bildirmişlerdir. Kurokawa ve ark. (1998), yaptıkları bir çalışmada rotiferlerin balık larvalarına proteaz katkısının % 0,6 olduğunu bildirmişlerdir. Garcia-Ortega ve ark. (2000), tarafından yapılan bir çalışmada dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtalarının larvaların proteaz aktiviteleri üzerine % 1'den daha az bir katkı yaptığı, buna benzer düşük katkı oranlarının levrek larvalarında

(Zambonino Infante ve Cahu, 1994a) ve çipura larvalarında (Moyano ve ark., 1996) gözlemlendiği bildirilmiştir. Cahu ve Zambonino Infante (1995a), *Artemia* katkısının % 5 olduğunu bildirmiştir.

Canlı yemlerin sahip olduğu enzimlerin, sindirim sistemi tam olarak fonksiyonel olmayan larvalarda sindirime yardımcı olduğu bilinmektedir. Karabalık (*Clarias gariepinus*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) gibi bazı balıkların larval dönemde gerekli sindirim yeteneğine sahip olduklarından dolayı bir gıdanın sindirimi için canlı gıdadan gelen proteazlara ihtiyaç duymadıkları bildirilmiştir (Verreth ve ark., 1992; Zambonino Infante ve Cahu, 1994a; Moyano ve ark., 1996).

Warner ve ark. (1995), yaptıkları çalışmada, *Artemia* yumurtalarındaki proteazlarının çoğunun sistin proteaz grubundan olduğu, bu proteaz sınıfının alkalik pH'da aktif olmadıklarını bildirmişlerdir (Warner ve Shridhar, 1985). Garcia-Ortega ve ark. (1998), dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtaları ile yeni çıkmış *Artemia* naupli arasında da besinsel kompozisyon ve enzimsel aktivite arasında çok önemli farklılığın olmayacağını bildirmişlerdir. Naz ve ark. (2011), *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli arasında enzimsel farklılıkların istatistiksel olarak önemli olduğunu tespit etmişlerdir.

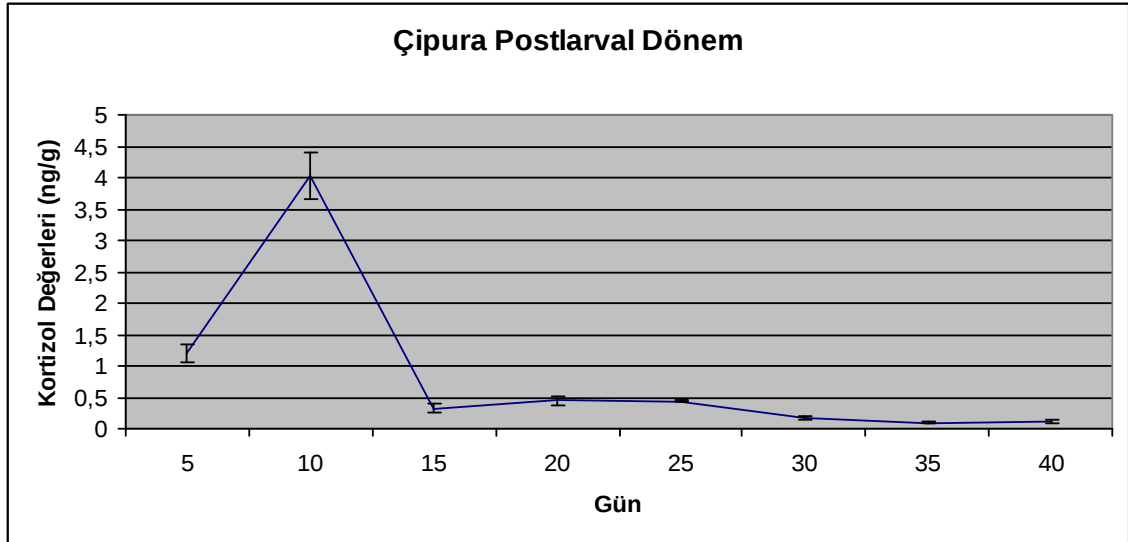
Canlı yemlerin larvaların proteaz aktiviteleri üzerindeki katkı oranları konusunda çok farklı değerler bildirilmiş olup, bu konuda bir netlik henüz sağlanamamıştır. Bu konuda literatürde verilen değerlerin farklı olmasına rağmen, canlı yemlerin sindirim sistemi tam olarak fonksiyonel olmayan larvaların kritik dönemlerinde önemli bir katkı sağladıkları konusunda fikir birliğinin ortaya çıktığı söylenebilir. Mevcut çalışma sonuçlarında bu katkının olduğunu desteklemektedir. Bu katkı oranlarının;

- Tür içi ve türler arasındaki sindirim sisteminin gelişiminde gözlenen farklılıklara göre,
- Beslenme programında kullanılan yemlerin proteaz aktiviteleri üzerindeki etkilerine göre,
- Rotiferlerin beslenmesi ve zenginleştirilmesi esnasındaki değişimlere göre,
- *Artemia*'nın gelişim dönemlerine göre,
- *Artemia*'nın tipine göre,
- *Artemia*'nın global iklimsel değişimlerden etkilenme derecesine göre değişiklik göstereceği dikkate alınmalıdır.

4.5. Kortizol Analizi

Bu çalışmada, ticari besleme prosedürünün çipura larvalarının 5. günden 40. güne kadar her 5 günlük dönemdeki kortizol seviyelerinin değişimleri belirlenmiştir (Şekil 4.7). Özellikle ticari besleme prosedürü esnasında kullanılan canlı yemlerin (zenginleştirilmiş Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli) ve mikroyemlerin (Gemma Micro (50-100 μ) ve Caviar (100-200 μ)), çipura larvaları üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen kortizol değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 35. gün, 40. gün, 30. gün, 15. gün, 25. gün ve 20. gün kortizol değerlerinin istatistiksel olarak birbirlerinden farklı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$). Buna karşılık 5. gün ve 10. güne ait çipura larva kortizol değerlerinin birbirlerinden ve diğer yaş gruplarından istatistiksel olarak önemli farklılıklara sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). En düşük ve en yüksek kortizol seviyeleri sırasıyla 35. günde $0,099\pm0,009$ ng/g ve 10. günde $4,033\pm0,38$ ng/g olarak belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen kortizol değerleri incelendiğinde, prelarval dönemden postlarval döneme yüksek bir kortizol geçişinin olduğu gözlenmektedir ($1,199\pm0,15$ ng/g). Bu kortizol değerini etkileyen faktörler; ağız açılımı gerçekleşmiş olan çipura larvalarının ilk yem alma gayretleri ve alınan yemin besin gereksinimleri karşılayabilme potansiyelinin olup olmamasıdır.



Şekil 4.7. Çipura larvalarının 5. günden ve 40. güne kadar olan her beş günlük dönemdeki kortizol seviyeleri

Ağız açılımının gerçekleşmesiyle birlikte postlarvalara canlı yem olarak zenginleştirilmiş rotifer verilmektedir. Zenginleştirilmiş rotiferin çipura larvaları üzerinde 5. günde pozitif yönde bir proteaz katkısı olduğu gözlenmektedir. Buna karşılık 10. günde zenginleştirilmiş rotiferin çipura larvalarının proteaz aktivitesini negatif yönde etkilediği gözlenmektedir. Zaten 5. günde tüm çalışma periyoduna göre yüksek bir kortizol değerine sahip olan çipura larvalarının, besin olarak verilmiş olan zenginleştirilmiş rotiferinde proteaz aktivitesini negatif yönde etkilemesiyle birlikte kortizol değeri çalışma esnasında kaydedilen en yüksek değere ulaşmıştır ($4,033 \pm 0,38$ ng/g).

10. günden sonra larvanın sindirim sisteminin gelişimi ve ortama *Artemia* nauplinin girişi ile birlikte kortizol seviyelerinde önemli düşüşler kaydedilmiştir. 15. günde kortizol seviyeleri, 10. günde gözlenen yüksek kortizol değerlerinden $0,321 \pm 0,065$ ng/g değerine kadar düşmüştür. Bu düşüşte etkili olan faktörleri, çipura larvalarının proteaz aktivitelerindeki artış ve *Artemia* naupli'nin hem besinsel hem de proteaz katkısı bakımından rotiferden yüksek olması şeklinde sıralamak mümkündür.

15. günden 20. güne geçerken kortizol değerlerinde istatistiksel olarak önemli olmayan ($p > 0,05$) bir yükselme gözlenmiştir. Bu yükselmeye etkili olan faktörleri, çipura larvalarının proteaz aktivitelerinde gözlenen düşüş ve bu düşüşün istatistiksel açıdan önemli olmasını engelleyen hem besin değeri hem de proteaz katkısı yüksek olan *Artemia* metanaupli'nin girişi şeklinde sıralamak mümkündür.

25. günde çipura larvaları en düşük proteaz aktivitesine sahip olmasına rağmen 20. günden 25. güne geçişte kortizol seviyelerinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Bu aşamada etkili olan faktörün, hem besin değeri hem de proteaz katkısı yüksek olan *Artemia* metanaupli'nin girişi olduğu görülmektedir. *Artemia* metanaupli ile birlikte girilen Gemma Micro (50-100 μ)'nun % 37,28'lik bir inhibisyon yaratmasının ve çipura larvalarının proteaz aktivitelerinde gözlenen düşüşün, kortizol seviyeleri üzerinde önemli değişiklik yaratmadığı tespit edilmiştir.

25. günden, 30. güne geçişte kortizol seviyelerinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir düşüş gözlenmiştir. Bu dönemde Gemma Micro (50-100 μ)'nun % 45,58'lik bir inhibisyon yaratmasına karşılık, *Artemia* metanaupli'nin yüksek proteaz katkısının ve çipura larvalarının proteaz aktivitelerinde gözlenen artışı kortizol değerinin düşüşünde etkili faktör olarak sıralamak mümkündür.

30. günden sonra çipura larvalarının proteaz aktiviteleri sürekli bir yükselme eğiliminde olmuştur. 30. günden 35. güne geçişte kortizol seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. Canlı yemlerin verilmemesine rağmen, Gemma Micro (50-100µ)'nın % 30,95'lik inhibisyon ve Caviar (100-200µ)'ın % 14,62 lik bir inhibisyon yaratması kortizol değerlerinin yükselmesine neden olmamıştır. Bu dönemde elde edilen veriler üzerinde çipura larvalarının yüksek proteaz aktivitelerinin en önemli faktör olduğu görülmektedir.

35. günden 40. güne geçişte kortizol seviyelerinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış gözlenmiştir. Çipura larvalarının proteaz aktivitesi ve gücünün artmasına rağmen bu aşama larvalara sadece Caviar (100-200µ)'ın verilmiş olmasından kaynaklı bir stres cevabının etkisi olduğu görülmektedir.

Salmonid balıkların ilk kortikosteroid stres cevabını su sıcaklığına bağlı olarak kuluçka döneminin ikinci ve beşinci haftalarında gösterdikleri bildirilmiştir (Pottinger ve Mosuwe, 1994). Balıklarda yumurta çıkışı öncesi tiroid ve kortizol hormonlarının bulunduğu tespit edilmiştir. Bu hormonların fonksiyonel tiroid dokusu ve böbrekarası hücreler embriyogenesiste gelişmediği için anaç orjinli olduğu bildirilmiştir (Mylonas ve ark., 1994; Berry ve ark., 1995; Szisch ve ark., 2005). Bayrak (2013), gökkuşağı alabalığının stoklama oranları ve refahı üzerine yaptıkları çalışmada artan kortizol konsantrasyonlarının üreme hormonlarını baskıladığını böylece oogeneze ve spermatogeneze olumsuz etkileyerek gamet kalitelerini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada da prelarval dönemlerde kortizol değerlerine rastlanılması, sonuçların literatürler tarafından desteklendiğini göstermektedir.

Szisch ve ark. (2005), çipura larvaları üzerine yaptıkları çalışmada, kortizol değerini yumurtada $0,83 \pm 0,02$ ng/g, ilk beslemede $3,40 \pm 0,19$ ng/g olarak belirlemişlerdir. Bu aşamadan sonra kortizol değerlerinde sürekli bir artış gözlemlendiği, çıkıştan sonraki 23. günde $7,38 \pm 1,16$ ng/g, 29. günde $7,53 \pm 0,96$ ng/g ve 45. günde $14,55 \pm 2,82$ ng/g değerlerine ulaşıldığı bildirilmiştir. Mevcut çalışmada, ilk beslemede kortizol değeri $1,19 \pm 0,15$ ng/g, 25. günde $0,43 \pm 0,02$ ng/g, 30. günde $0,16 \pm 0,02$ ng/g ve 40. günde $0,12 \pm 0,03$ ng/g olarak bulunmuştur.

Çalışmadan elde edilen kortizol değerleri, Szisch ve ark. (2005), tarafından bulunan kortizol değerlerine göre daha düşük seviyelerdedir. Bu durum anaç besleme, prelarval dönem abiyotik faktörler ve postlarval besleme konularında sektörün son 10

yılda aşama kaydettiğini göstermektedir. Bu gelişmeye karşılık, larvalar üzerindeki anaç orijinli kortizol katkıları konusunda eksikliklerin giderilmesi, bilhassa postlarval dönemin başlangıcından itibaren ilk 10 günlük dönemdeki beslemeye bağlı eksikliklerin giderilmesi, kitle halinde larval ölümlerin önlenmesinde etkili olacaktır.

Çalışma sonuçlarından da görüleceği gibi prelarval dönemden yüksek bir stres yükü ile çıkmış çipura postlarvalarının, proteaz katkısı ve besin değeri düşük bir canlı yemle beslemenin sonuçları 10. gün kortizol değerlerinde kendini göstermektedir. Çipura larvalarında yüksek ölümlerin bu aşamalarda gerçekleştiği bilinmektedir. Prelarval dönemde stres sadece abiyotik faktörlerden kaynaklanmaktadır. Prelarvalar anaçlardan gelen kortizol yükünü bu dönemde abiyotik şartlar optimum tutulabildiği sürece tamamen postlarval döneme taşımakta, bu dönemde de sindirim sisteminin az gelişmiş olması, sunulan canlı yemin proteaz katkısının ve besin değerlerinin düşük olması gibi faktörler mevcut stres yükünü azaltmak yerine arttırmaktadır. Bu artan stres yükünü tolere edemeyen postlarvalarda kitlesel ölümler gerçekleşmektedir. Kitlesel ölümleri önlemek için;

- Anaçların strese girmesini önlemek için biyotik ve abiyotik faktörlere dikkat edilmelidir. Yani, anaçlardan prelarvalara geçen stres yükünü minimize etmek,
- Prelarval dönemde abiyotik şartları optimum seviyelerde tutmak,
- Postlarval dönemde abiyotik şartlarla birlikte, larvalara sunulan yemin besin kalitesine ve sindirim sistemi gelişmemiş olan larvaların sindirim gücünü arttırabilmesine dikkat edilmelidir.

Artemia naupli ve *Artemia* metanaupli ile besleme dönemlerinde çipura larvalarının kortizol seviyelerinde istatistiksel olarak önemli değişiklikler gözlenmemiştir ($p>0,05$). *Artemia* naupli'nin zenginleştirilmiş rotiferle besleme aşamasından gelen stres yükünün azaltılmasında etkili olduğu dikkat çekmiştir ($p<0,05$). *Artemia* naupli'nin bu stres yükünün azaltılmasında zenginleştirilmiş rotifere göre besin kompozisyonunun ve yüksek proteaz katkısının etkili olduğu söylenebilir. *Artemia* metanaupli'de stres yükünün *Artemia* naupli'ye göre istatistiksel olarak önemli olmasa da daha düşük seviyelere getirilmesinde etkili olmuştur ($p<0,05$). *Artemia* metanaupli'nin çipura larvalarının stres yükünü daha düşük seviyelere getirmesindeki

başlıca etkenin proteaz katkısının *Artemia* naupli ve zenginleştirilmiş rotiferden daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

Gemma Micro (50-100µ)'nun çalışmada elde edilmiş olan en yüksek inhibisyon değerinde (% 45,88) *Artemia* metanaupli ile birlikte verildiği zaman çipuranın stres tepkisi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmada 25. günde verilmeye başlanan Gemma Micro (50-100µ)'nun *Artemia* metanaupli'nin yüksek proteaz katkısı ile birlikte, çipura larvalarının proteaz aktivitelerinde düşüşler görülmesine rağmen iyi bir performans sergilediği tespit edilmiştir. Gemma Micro (50-100µ)'nun yine *Artemia* metanaupli gibi çipura larvaları üzerinde yüksek bir proteaz katkısına sahip olan *Artemia* naupli ile birlikte daha erken dönemlerde girilmesinin, mikroyemlere adaptasyonda etkili olabileceği görüşünü çalışma sonuçları desteklemektedir. Buna karşılık Caviar (100-200µ)'ın Gemma Micro (50-100µ) ile birlikte girilmesi önerilirken, tek başına 40. günden önce girilmesinin kortizol seviyeleri arttırma yönünde istatistiksel olarak önemli farklılıklar yaratma olasılığı dikkat çekmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemiz ticari olarak üretimi yapılmakta olan deniz balıklarından çipura ve levrek üretimi konusunda Akdeniz ülkeleri arasında söz sahibi konumdadır. Dünya genelinde doğal stoklarda meydana gelen azalmalardan dolayı avcılık üretiminin düşmesiyle birlikte, su ürünleri yetiştiriciliğinden elde edilecek üretimin önemi artmaktadır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinin larval dönemlerinde rotifer ve *Artemia*'ya ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir. Rotifer ve *Artemia* gibi canlı yemler konusunda dışa bağımlı oluşumuz, laboratuvar üretim maliyetlerinin yüksek olması, ülkemiz su ürünleri sektöründe faaliyet gösteren işletmecilerin dış pazarda rekabet gücünü azaltmaktadır. Bununla birlikte, *Artemia*'nın global iklimsel değişimlerden dolayı doğal üretim alanlarındaki stoklarının azalması ve fiyatlarında gözlenen yükselmeler üretim maliyetlerini günden güne artırmaktadır. *Artemia* stoklarının gelecekte su ürünleri yetiştiriciliğinin larval dönemlerinde istenen miktarı karşılayamaması ihtimali, su ürünleri yetiştiriciliğinin sürdürülebilirliğini tehlikeye sokmaktadır. Ülkemizin dış pazarda rekabet gücünün artırılması ve su ürünleri yetiştiriciliğinin sürdürülebilirliğini sağlamak için, canlı yemlere olan bağımlılığın en kısa zamanda ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bu nedenle araştırmacılar canlı yemleri ikame edebilecek mikroyemlerin üretimine yönelik çalışmalar üzerinde yoğunlaşmışlardır. Şimdiye kadar yürütülen çalışmalardan elde edilen sonuçlar, canlı yemleri tam olarak ikame edebilecek ve larvaların besin gereksinimlerini tam olarak karşılayabilen bir yemin üretimini sağlayamamıştır.

Mikroyemlerin üretimi esnasında temel yem hammaddelerinden biri olan balık ununa baskı artmakta, yakın gelecekte su ürünleri yetiştiricilik sektörünün talebini karşılamada yetersiz kalacağı tahmin edilmektedir. Bu nedenle çalışmalar balık ununu ikame edebilecek alternatif protein kaynakların bulunması yönünde yoğunlaşmıştır. Larvaların besin gereksinimleri karşılayabilen mikroyemlerin üretiminde, rasyonlarda kullanılacak yem hammaddelerinin seçimi, sağlıklı larvaların üretimi, yaşaması ve iyi bir büyüme performansının elde edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Mikroyemlerde kullanılan protein kaynaklarının larvaların proteaz aktiviteleri üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Buna karşılık canlı yemlerin, sindirim sistemi tam olarak gelişmemiş larvaların enzimsel aktiviteleri üzerine olan katkıları,

mikroyemlere göre önemli bir avantaj sağlamaktadır. Mikroyemlerde kullanılan yem hammaddelerinin doğru seçimi, doğru oranlarda kullanımı, yüksek bir performansa sahip bir yem hammaddesinin düşük bir performansa sahip yem hammaddesiyle birlikte kullanılmaması larva üretiminde başarıyı etkileyen temel unsurlardır. Protein kaynaklarının bireysel etkilerinin test edilmesi ve performansı yüksek olanların larva üretiminde başarı sağlayacağı düşüncesiyle hareket etmek, nedenleri tespit edilemeyen kitlesel ölümlere neden olmaktadır. Protein kaynaklarının rasyonda bulunan diğer protein kaynaklarıyla birlikte hareket edeceği gözden kaçırılmamalıdır. Bu nedenle bireysel etkiler test edildikten sonra son ürün olan mikroyemlerinde ticari boyutta yetiştiricilikte kullanılmadan önce test edilmesi işletmelerin kitlesel ölümlere yönelik ekonomik kayıp yaşamamaları açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışma kapsamında, ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı ve mikroyemlerin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Aynı zamanda bu yemlerle beslenen larvaların üzerindeki fizyolojik stres seviyeleri de (kortizol) belirlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, prelarval dönemden postlarval döneme yüksek bir kortizol geçişinin olduğunu göstermektedir. Bu yüksek kortizol geçişine ilaveten ilk ağız açılımında rotifer gibi besin değeri ve enzim katkısı düşük olan bir canlı yemin kullanımı 10. günde kortizol seviyelerinin postlarval dönemin en yüksek seviyelerine çıkmasına neden olmuştur. 10. güne kadar olan kritik dönemi atlatabilmek için prelarval dönemden daha düşük bir kortizol geçişinin olması gerekmektedir. Prelarval dönemde abiyotik faktörler dışında stres faktörü bulunmadığı bilinmektedir. Abiyotik parametreler optimum seviyelerde tutulduğu takdirde postlarval döneme kortizol geçişinin en düşük seviyelerde olması, ancak anaçlardaki stresin düşürülmesiyle mümkündür. Anaçlardan yumurta ve prelarvalara aktarılan stresin düşük olması, postlarval aşamaya daha düşük bir kortizol değeriyle geçişi sağlayacaktır. Buda kritik dönemdeki larvanın mukavemetini arttırabilecektir.

Artemia naupli ve *Artemia* metanaupli ile besleme dönemlerinde çipura larvalarının kortizol seviyelerinde önemli değişiklikler gözlenmemiştir. Çalışma sonuçları, *Artemia* naupli'nin zenginleştirilmiş rotiferle besleme aşamasından gelen stres yükünün azaltılmasında etkili olduğunu göstermiştir. *Artemia* metanaupli'de stres yükünün *Artemia* naupli'ye göre daha düşük seviyelere getirilmesinde etkili olmuştur.

Gemma Micro (50-100µ)'nün çalışmada elde edilmiş olan en yüksek inhibisyon değerinde (% 45,88), *Artemia* metanaupli ile birlikte verildiği zaman çipura larvalarının kortizol değerleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmada 25. günde vermeye başlanan Gemma Micro (50-100µ)'nün *Artemia* metanaupli'nin yüksek proteaz katkısı ile birlikte, çipura larvalarının proteaz aktivitelerinde düşüşler görülmesine rağmen iyi bir performans sergilediği tespit edilmiştir.

Çalışma sonuçları;

- Zenginleştirilmiş rotiferle beslemenin larvaların kortizol değerlerini arttırdığını,
- Prelarvadan postlarvalara geçen stresin düşük olması ile düşük besin ve enzim katkısına sahip zenginleştirilmiş rotiferle beslemenin yapıldığı ilk 10 günlük kritik dönemin daha rahat bir şekilde geçirileceğini ve bu sayede kitlesel larval ölümlerin önlenilebileceğini,
- *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli ile beslemenin kortizol değerleri üzerinde önemli değişiklikler yaratmadığını,
- *Artemia* metanaupli ile Gemma Micro (50-100µ)'nün birlikte kullanımının kortizol değerleri üzerinde önemli değişiklikler yaratmadığını,
- Gemma Micro (50-100µ)'nün yine *Artemia* metanaupli gibi çipura larvaları üzerinde yüksek bir proteaz katkısına sahip olan *Artemia* naupli ile birlikte daha erken dönemlerde girilmesinin, mikroyemlere adaptasyonda etkili olabileceğini,
- Gemma Micro (50-100µ) ve Caviar (100-200µ)'ın 35. günden sonra birlikte girilmesinin kortizol değerleri üzerinde önemli değişiklikler yaratmadığını,
- Caviar (100-200µ)'ın tek başına 40. günden önce girilmesinin kortizol değerlerini yükseltme eğiliminde olduğunu göstermiştir.

Öneriler;

- Anaçlardan, yumurta ve prelarvalara geçen stres yükünün minimize edilmesi,
- Prelarvalardan postlarvalara geçen stres yükünün optimum gelişimi teşvik eden abiyotik faktörlerin kültür ortamında sağlanması ile minimize edilmesi,
- *Artemia* metanaupli ile Gemma Micro (50-100µ)'nün birlikte kullanılabileceği,

- Gemma Micro (50-100µ)'nın yine *Artemia* metanaupli gibi ipura larvaları üzerinde yüksek bir proteaz katkısına sahip olan *Artemia* naupli ile birlikte daha erken dönemlerde kullanılabileceği,
- Gemma Micro (50-100µ) ve Caviar (100-200µ)'ın 35. günden sonra birlikte kullanılabileceği,
- Caviar (100-200µ)'ın tek başına 40. günden önce kullanılmaması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Akyurt, İ., 2004. Balık Besleme. **Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ders Kitapları**, 3, p.226, Hatay.
- Alarcon, F.J., Diaz, M. ve Moyano, F.J., 1997. Studies of digestive enzymes in characterization ve practical applications. **Cahiers Options Mediterr.**, 22, p.113-121.
- Alarcon, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J. ve Abellan, E., 1998. Characterization ve functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). **Fish Physiol. Biochem.**, 19: 257–267.
- Alarcon, F.J., Moyano, F.J., Diaz, M., Fernandez Diaz, C. ve Yufera, M., 1999. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques. **Aquaculture Nutrition**, 5: 107-113.
- Alderman, S.L. ve Bernier, N.J., 2009. Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in zebrafish, **Gen Comp Endocrinol.**, 164(1): 61-69.
- Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Dal Pai Silva, M. ve Alves-Junior, R., 2001. Environmental Cadmium Exposure and Metabolic Responses of the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environ. Pollut.**, 114(2): 169-175.
- Alpaz, A., 1996. Deniz Balıkları Yetiştiriciliği. **Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları**, 20, p.335, İzmir.
- Altan, Ö., 1998. The Course of Master International Programme, Session of Larvae Culture, Spain.
- Anonymous, 2014. **The State of World Fisheries and Aquaculture yearbook**.
- Barton, B.A., Schreck, C.B. ve Barton, L.D., 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. **Disease of Aquatic Organisms**, 2: 173-185.
- Barton, B.A. ve Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, 1: 3–26.
- Bayrak, H., 2013. Gökkuşığı Alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*) anaçlarında farklı stoklama oranları ve balık refahı arasındaki ilişkinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Egirdir Su Ürünleri Fakültesi, **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**, Isparta.
- Bentley, P.J., 1998. Comparative Vertebrate Endocrinology. **Cambridge Univ. Press**, 3rd edn, p.526, UK.
- Berry, T.P., Malison, J.A., Held, J.A. ve Parrish, J.J., 1995. Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**, 97: 57–65.
- Bisson, M. ve Hontela, A., 2002. Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed *in vitro*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 180: 110-117.
- Björnsson, B. ve Olafsdottir, S.R., 2006. Effects of water quality and stocking density on growth performance of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). **Ices Journal of Marine Science**, 63: 326-334.

- Blaxter, J. H. S., 1988. Pattern and variety of development. (W. S. Hoar ve D. J. Randall, Editors), In: **Fish physiology**, Acad. Press, 1-58, N.Y.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254.
- Buddington, R.K, Krogdahl, A. ve Bakke-Mckellep, A.M., 1997. The intestine of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiol. Scand.**, 161: 67-80.
- Cahu, C.L. ve Zambonino Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109: 213-222.
- Cahu, C.L. ve Zambonino Infante, J.L., 1995a. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. **Fish Physiology and Biochemistry**, 14: 209-214.
- Cahu, C.L. ve Zambonino Infante, J.L., 1995b. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. **Fish Physiol Biochem.**, 14: 431-437.
- Cahu, C.L. ve Zambonino Infante, J.L., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, 200: 161-180.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Peres, A., Quazuguel, P. ve Le Gall, M.M., 1998. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: effect on digestive enzymes. **Aquaculture**, 161: 479-489.
- Cano-Lopez, A., Simpson, B. ve Haard, N., 1987. Extraction of carotenoproteins from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. **Journal of Food Sciences**, 52, p.503-506.
- Caruso, G., Genovese, L., Maricchiolo, G. ve Modica, A., 2005. Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. **Aquaculture International**, 13, p.67-73.
- Chakrabarti, I., Gani, MdA., Chaki, K.K., Sur, R. ve Misra, K.K., 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. **Comp. Biochem. Physiol.**, 112: 167-177.
- Chey, W.Y., 1993. Hormonal control of pancreatic exocrine secretion. In the pancreas: Biology, Pathobiology and Disease. (Go, V.L.W., Gardner, J.D., Brooks, F.P., Lebenthal, E., DiMagno, E.P., Sheele, G.A., Editors), In: **The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease**, Raven Press, p. 403-424, New York.
- Chou, R.L., Su, M.S. ve Chen, H.Y., 2001. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, 193: 81-89.
- Chrousos, G.P. ve Gold, P.W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis. **Journal of the American Medical Association**, 267: 1244-1252.
- Costas, B., Arago, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T. ve Conceicao, L.E.C., 2008. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. **Aquaculture Research**, 39, p.1-9.
- Çelikkale, M.S., Düzgüneş, E. ve Okumuş, İ., 1999. Türkiye su ürünleri sektörü, potansiyeli, mevcut durumu ve çözüm önerileri. **İstanbul Ticaret Odası Yayınları**, 2: 414.

- Davis, K.B. ve Parker, N.C., 1986. Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warmwater fish to transportation. **Transactions of the American Fisheries Society**, 115, p.495-499.
- Davis, K.B. ve Peterson, B.C., 2006. The effect of temperature, stress, and cortisol on plasma IGF-I and IGFBPs in sunshine bass. **General and Comparative Endocrinology**, 149, p.219-225.
- Dendrinou, P. ve Thorpe, J.P., 1987. Experiments on the artificial regulation of the amino acid and fatty acid contents of food organisms to meet the assessed nutritional requirements of larval, post-larval and juvenile Dover sole (*Solea solea* L.). **Aquaculture**, 61, p. 121-154.
- De Silva, S.S. ve Anderson, T.A., 1998. Fish Nutrition in Aquaculture., **Chapman and Hall**, p.319,Sulfolk.
- El-Sayed, AFM., Nmartinez, I. ve Moyano, F.J., 2000. Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using in vitro assays. **Aquaculture International**, 8(5), p.403-415.
- Fernandez-Diaz, C. ve Yufera, M., 1997. Detecting growth in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae fed microcapsules. **Aquaculture**, 153, p.93-102.
- Foo, J.T.W. ve Lam, T.J., 1993. Retardation of ovarian growth and depression of serum steroid levels in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, by cortisol implantation. **Aquaculture**, 115(1), p.133-143.
- Gamperl, AK., Vijayan, M.M. ve Boutilier, R.G., 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 4, p.215-255.
- Garcia-Carreno, F.L., 1996. Proteinase inhibitors. **Trends Food Sci Technol.**, 7, p.197-204.
- Garcia-Ortega, A., Verreth, J., Coutteau, P., Segner, H., Huisman, E.A. ve Sorgeloos, P., 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. **Aquaculture**, 161, p.501-514.
- Garcia-Ortega, A., Verreth, J. ve Segner, H., 2000. Post-prandial protease activity in the digestive tract of African catfish *Clarias gariepinus* larvae fed decapsulated cysts of *Artemia*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 22, p.237-244.
- Halver, J.E., 1989. Fish Nutrition, **Academic Press**, San Diego.
- Hidalgo MC., Urea, E. ve Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habitus. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, 170, p.267-83.
- Hoehne-Reitan, K., Kjørsvik, E. ve Reitan K.I., 2001a. Bile salt-dependent lipase in larval turbot, as influenced by density and lipid content of fed prey. **J. Fish Biol.**, 58, p.746-754.
- Hoehne-Reitan, K., Kjørsvik, E. ve Gjellesvik D.R., 2001b. Development of bile salt-dependent lipase in larval turbot. **J. Fish Biol.**, 58, p. 737-745.
- Holmgren, S., Vaillant, C. ve Dimaline, R., 1982. VIP-, substance P-, gastrin /CCK-, bombesin-, somatostatin- and glucagon- like immunoreactivities in the gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Cell Tissue Res.**, 223 (1), p.141-153.
- Holst, J.J. ve Schmidt, P., 1994. Gut hormones and intestinal function. **Bailliere's Clin. Endocrinol. Metab.**, 8(1), p.137-164.

- Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R.B. ve Ackerman, P.A., 1999. Heat shock proteins and physiological in fish. **Am. Zool.**, 39, p. 901-909.
- Johnson, E.O., Kamilaris, T.C., Chrousos, G.P. ve Gold, P.W., 1992. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioural homeostasis. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, 16, p.115-130.
- Jorgensen, T.R. ve Buchmann, K., 2007. Stress response in rainbow trout during infection with *Ichthyophthirius multifiliis* and formalin bath treatment. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, 37 (1), p.25-28.
- Kamisaka, Y., Kurokawa, T., Suzuki, T., Tagawa, M., Tanaka, M., Totland, G. ve Ronnestad, I., 2001. Ontogeny of cholecystokinin immunoreactive cells in the digestive tract of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 123, p.31-37.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, W.G. ve Gertle, A., 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) larvae. **Fish Phys. and Biochem.**, 12(3), p.203-209.
- Kolkovski, S. ve Tandler, A., 1995. Why microdiets are still inadequate as viable alternative to live zooplankters for developing marine fish larvae. **Larvi'95 Fish and Shellfish Symposium**, 24, p.265-266.
- Kolkovski, S., Koven, W. ve Tandler, A., 1997a. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilisation of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture**, 155, p.193-205.
- Kolkovski, S., Arieli, A. ve Tandler, A., 1997b. Visual and Chemical cues stimuli microdiet ingestion in seabream larvae. **Aquaculture International**, 5, p.527- 536.
- Kolkovski, S., Yackey, C., Czesny, S. ve Dabrowski, K., 2000. The effect of microdiet supplementation of dietary digestive enzymes and a hormone on growth and enzyme activity in yellow perch juveniles. **North American Journal of Aquaculture**, 62, p.130-134.
- Kolkovski, S. ve Tandler, A., 2000. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture Nutrition**, 6, p.11-15.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E. ve Gamsiz, K.T.A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. **Aquaculture**, 194, p.107-121.
- Koven, W., Rojas-Garcia, C.R., Finn, R.N., Tandler, A. ve Ronnestad, I., 2002. The stimulatory effect of ingested protein and/or free amino acids on the secretion of the gastro-endocrine hormone, cholecystokinin (CCK) and the protease, trypsin, in first feeding herring larvae, *Clupea harengus*. **Marine Biology**, 140, p.1241-1247.
- Kumar, S., Srivastava, A. ve Chakrabarti, R., 2005. Study of digestive proteinases and proteinase inhibitors of *Daphnia carinata*. **Aquaculture**, 243, p.367- 372
- Kurokawa, T., Shiraishi, M. ve Suzuki, T., 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine *Sardinops melanotictus* larvae. **Aquaculture**, 161, p.491-499
- Kurokawa, T., Suzuki, T. ve Andoh, T., 2000. Development of cholecystokinin and pancreatic polypeptide endocrine systems during the larval stage of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 120 (1), p.8-16.
- Liddle, R.A., 1995. Regulation of cholecystokinin secretion by intraluminal releasing factors. **Am. J. Physiol.**, 269, p.319-327.

- Liddle, R.A., 2000. Regulation of cholecystokinin secretion in humans. **J. Gastroenterol.**, 35, p.181-187.
- Luizi, FS., Gara, B., Shields, R.J. ve Bromage, N.R., 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. **Aquaculture**, 176(1-2), p.101-116.
- Lundstedt, LM., Melo, J.F.B., Santos Neto, C. ve Moraes, G., 2002. Diet influences proteolytic enzyme profile of the South American catfish *Rhamdia quelen*. **International Congress on the Biology of Fish, Biochemical and Physiological Advances in Finfish Aquaculture**, Vancouver, Canada.
- Mackie, I., 1982. Fish protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, p.26-31.
- Marco, Di P., Priori, A., Finoia, M.G., Massari, A., Mandlich, A. ve Marino, G., 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. **Aquaculture**, 275, p.319-328.
- Martinez, I., Moyano, F. J., Fernandez-Diaz, C. ve Yufera, M., 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 21, p.317-323.
- Martins, CIM., Trenovski, M., Schrama, J.M. ve Verreth, J.A.J., 2006. Comparison of feed intake behaviour and stress response in isolated and non-isolated African catfish. **Journal of Fish Biology**, 69, p.629-636.
- Mommsen, TP., Vijayan, M.M. ve Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleost: Dynamics, mechanism of action, and metabolic regulation. **Rev. Fish Biol.**, 9, p.211-268.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robania, L. ve Vergar, J.M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. **Fish Physiology and Biochemistry**, 20, p. 53-60.
- Morgan, JD., Sakamoto, T., Grau, E.G. ve Iwama, G.K., 1997. Physiological and respiratory responses of the Mozambique tilapia 55 (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology A – Physiology**, 117, p.391-398.
- Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcon, F.J. ve Sarasquete, M.C., 1996. Characterization of digestive enzymes activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 15, p.121-130.
- Moyano, F.J., Diaz, I. M., Lopez, M. D. ve Alarcon, F.J., 1999. Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 122, p.327-332.
- Muhtaroglu, C.G., 1988. Çipura balığı (*Sparus aurata*, L.) yumurta ve larvalarında gelişim ve larval safhada canlı besin alımı. **Dokuz Eylül Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknoloji Enstitüsü**, İzmir.
- Munilla-Moran, R., 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, 88(3-4), p.337-350.
- Mylonas, CC., Sullivan, C.V. ve Hinshaw, J.M., 1994. Thyroid hormones in brown trout (*Salmo trutta*) reproduction and early development. **Fish Physiology and Biochemistry**, 13, p.485-493.
- Navarro, J.C., 1998. Aspect of larval physiology and larval nutrition, **Mediterranean Aquaculture New Techniques For Marine Hatcheries**. Macaroon, Spain.

- Naz, M., 2007. Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia naupli*'leri ile beslenen çipura balığı (*Sparus auratus*, L 1758)'nın sindirim hormonları ve enzimlerindeki değişimler. **Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı**, Hatay.
- Naz, M., Yılmaz, E., Töre, Y., Diken, G., Tanrıverdi, Z. ve Tekin, S. 2011. Canlı yemlerin proteaz aktivitelerinin belirlenmesi. **16. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu**, p.146, Antalya.
- Olli, J.J., Kroghdahl, A., Van Den Ingh, T.S.G.A. ve Brattas, L.E., 1994. Nutritive value of four soybean products in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) **Acta Agricultura Scandinavica**, 44, p.50-60.
- Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I. ve Del Rio, I.A., 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiol. Biochem.**, 40, p.521-551.
- Pan, B.S., Lan, C.C. ve Hung T.Y., 1991. Changes in composition and proteolytic enzyme activities of *Artemia* during early development. **Comp. Biochem. Physiol. A**, 100 (3), p.725-730.
- Pedersen, B.H., Nilssen, E.M., Hjeltnes, K., 1987. Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. **Mar. Biol.**, 94, p.171-181.
- Perez, A., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Le Gall, M.M., Quazuguel, P., 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, 15(3), p.237-242.
- Perez-Jimenez, A., Cardenete, G., Morales, A.E., Garcia Alcazar, A., Abellan, E. ve Hidalgo, M.C., 2009. Digestive enzymatic profile of *Dentex dentex* and response to different dietary formulations. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, 154, p.157-164.
- Pillay, T.V.R., 1995. Seabass and Seabream in Aquaculture. Principles and Practices, **WriteType Writers Ltd.**, p.398-407, Hongkong.
- Polo, A., Yufera, M. ve Pascual, E., 1990. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. **European Aquaculture Society Special Publication**, 10, p.207-208.
- Pottinger, T. G. ve Mosuwe, E., 1994. The corticosteroidogenic response of brown and rainbow trout alevins and fry to environmental stress during a "critical period". **General and Comparative Endocrinology**, 95, p.350-362.
- Pottinger, T.G. ve Carrick, T.R., 1999. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. **Aquaculture**, 175, p.351-363.
- Procarione, L.S., Barry, T.P. ve Malison, J.A., 1999. Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. **North American Journal of Aquaculture**, 61, p.91-96.
- Rafatnezhad, S., Falahatkar, B., Mohammad, H. ve Gilani, T., 2008. Effects of stocking density on haematological parameters, growth and fin erosion of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. **Aquaculture Research**, 39, p.1506-1513.
- Rawlings, N.D., Baret, A.J. ve Bateman, A., 2010. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.**, 38, p.227-260.
- Reinecke, M., Müller, C. ve Segner, H., 1997. An immunohistochemical analysis of the ontogeny, distribution and coexistence of 12 regulatory peptides and serotonin in

- endocrine cells and nerve fibers of the digestive tract of the turbot, *Scophthalmus maximus teleostei* . **Anat. Embryol.**, 195 (1), p.87–101.
- Riberio, L., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C. ve Dinis, M.T., 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. **Aquaculture**, 179, p.465-473.
- Rønnestad, I., Perez Dominguez, R. ve Tanaka, M., 2000a. Ontogeny of digestive tract functionality in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* studied by in vivo microinjection: pH and assimilation of free amino acids. **Fish Physiol. Biochem.**, 22, p.225–235.
- Rønnestad, I., Conceicao, L.E.C., Aragao, C. ve Dinis, M.T., 2000b. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole *Solea senegalensis* . **J. Nutr.**, 130, p.2809–2812.
- Roselund, G., Stoss, J. ve Talbot, C., 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. **Aquaculture**, 155, p.183-191.
- Rottlant, J., Arends, R.J., Mancera, J.M., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G. ve Tort, L., 2000. Inhibition of HPI axis response to stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) with physiological plasma levels of cortisol. **Fish Physiology and Biochemistry**, 23, p.13-22.
- Ruane, N.M., Huisman, E.A. ve Komen, J., 2001. Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. **Journal of Fish Biology**, 59, p.1-12.
- Sammouth, S., Dorbcastel, E.R., Gasset, E., Lemarie, G., Breuil, G., Marino, G., Coeurdacier, J.L., Fivelstad, S., Blancheton, J.P., 2009. The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. **Aquacultural Engineering**, 40, p.72-78.
- Santos, G.A., Schrama, J.W., Mamauag, R.E.P., Rombout, J. ve Verreth, J.A.J., 2010. Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The combined effects of fish crowding and water quality deterioration. **Aquaculture**, 299, p.73-80.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W. ve Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. **Mar. Biol.**, 119, p.471–486.
- Sloman, K.A., Metcalfe, N. B., Taylor, A. C. ve Gilmour, K. M., 2001. Plasma cortisol concentrations before and after social stress in rainbow trout and brown trout. **Physiological and Biochemical Zoology**, 74(3), p.383-389.
- SPSS, 1993. **SPSS for Windows Base System User's Guide**, release 8.0.2, Chicago, USA.
- Stefanson, G., 1988. Enzymes in the fishing industry. **Food Technology**, p.84-85.
- Stoltze, K. Ve Buchmann, K., 2001. Effect of *Gyrodactylus derjavini* infections on cortisol production in rainbow trout fry. **Journal of Helminthology**, 75, p.291-294.
- Sumpter, J.P., Pickering, A.D. ve Pottinger, T.G., 1985. Stress-induced elevation of plasma α -MSH and endorphin in brown trout, *Salmo trutta* L. **General and Comparative Endocrinology**, 59, p.257-265.
- Süzer, C., 1998. Çipura (*Sparus aurata* L.) prelarvalarında aydınlatmanın vitellüs kesesi ve yağ damlacığı absorpsiyonuna, sindirim tüpüne ve boyca gelişimi ile yaşamaya yüzdesine etkisi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**, İzmir.

- Szisch, V., Papandroulakis, N., Fanouraki, E. ve Pavlidisa, M., 2005. Ontogeny of the thyroidhormones and cortisol in the giltheadsea bream, *Sparus aurata*. **General and Comparative Endocrinology**, 142,186–192.
- Timur, G. ve Timur, M., 2003. Balık Hastalıkları, **İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları**, 5, p.538, İstanbul.
- Tseng, H.C., Grendell, J.H. ve Rothman, S.S., 1982. Food, duodenal extracts, and enzyme secretion by the pancreas. **Am.J.Physiol.**, 43, p.304-312.
- Tucker, J.W., 2000. Marine Fish Culture.**Kluwer Academic Publishers**, p.752, USA.
- Tuna Keleştemur, G. ve Özdemir, Y., 2008. Gökkuşluğu Alabalığı'nın (*Oncorhynchus mykiss*. W.1792) kortizol ve glikoz düzeylerine nakil işleminin etkisi. **Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi**, 4(1), p.11.
- Ueberschar, B., 1988. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analysing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. **Meeresforschung**, 32, p.144–154.
- Van Weerd, J.H. ve Komen, J., 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology**, 120, p.107-112.
- Verreth, J., Torreele, E., Spazier, E., Van Der Sluiszen, A., Rombout, J., Booms, R. ve Segner, H., 1992. The development of a functional digestive system in the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). **J.World Aquaculture Soc.**, 23, p.286-298.
- Walford, J. ve Lam, T.J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass *Lates calcarifer* larvae and juveniles. **Aquaculture**, 109, 187–205.
- Walter, H.E., 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. Bergmeyer, H.J. (Editor). **Methods of Enzymatic Analysis**, 5, p.270-277.
- Warner, A.H. ve Shridhar, V.,1985. Purification and characterization of a cytosol protease from dormant cysts of the brine shrimp *Artemia*. **J.Biol.Chem.**,260, p7008-7014.
- Warner, A.H., Pertz, M.J., Osahan, J.K. ve Zielinski, B.S., 1995. Potential role in development of the majorcysteine protease in larvae of the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Cell Tissue Resources**, 282, p.21-31.
- Wedemeyer, G.A., Barton, B.A. ve Mcleay, D.J., 1990. Stress and acclimation. (B. Schreck ve P. B. Moyle, Editors), In: **Methods for Fish Biology**, American Fisheries Society, 451- 489, Maryland, USA.
- Wendelaar Bonga,S.E.,1997. The Stres Response in Fish. **Physiol. Rev.**, 7, p.591–625.
- Xu, JY., Liu,Y., Cui, S.R. ve Miao, X.W., 2006. Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. **Aquacultural Engineering**, 35, p.207-217.
- Yufera, M., Fernandez Diaz, C., Pascual, E., Sarasquete, M.C., Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcon, F.J., Garcia Gallego, M. ve Para, G., 2000. Towards an inert diet for first feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. Larvae. **Aquaculture Nutrition**,6, p.143-152.
- Yufera, M., Sarasquete, M.C. ve Fernandez Diaz, C., 1996. Testing proteinwalled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream (*Spans auratu* L.1 larvae. **Mar. Freshwater Res.**, 47, p.211-216.

- Zambonino Infante, J.L. ve Cahu, C., 1994a. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, 12, p.399-408.
- Zambonino Infante, J.L. ve Cahu, C.L., 1994b. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109, p. 209-212.
- Zambonino Infante, J.L. ve Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. **Comp. Biochem. Physiol.**, 130, p.477-487.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Adana'nın Seyhan İlçesinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2007 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliğini kazandı. 2011 yılında mezun oldu. 2012 senesinde MKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı Yetiştiricilik Bölümünde Yüksek Lisans eğitime başladı. Eğitime halen burada devam etmektedir.