

APA BARAJ GÖLÜ'NDE (KONYA) YAŞAYAN *Cyprinus carpio* L.'NUN KAS DOKUSU YAĞ ASİDİ KOMPOZİSYONU

Sait BULUT¹, Ramazan MERT², Kemal SOLAK³ ve Cemal ÇEVİK⁴

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, AFYONKARAHİSAR

²Nevşehir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, NEVŞEHİR

³Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

⁴Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Bu çalışmada, Apa Baraj Gölü (Konya)'nde yaşayan ve ekonomik öneme sahip *Cyprinus carpio* (L., 1758)'nün kas dokusu yağ asidi kompozisyonu araştırılmıştır. Sazan örnekleri Apa Baraj Gölü'nden 3 erkek ve 3 dişi olarak Temmuz 2001'de alınmıştır. Numuneler kapiler kolon (SP-2330), FID dedektör ve mix standart kullanılarak gaz kromatografisinde analiz edilmiştir.

Yapılan çalışmada, sazanların kas dokusundaki toplam doymuş yağ asidi (SFA) erkeklerde %30,69 ve dişilerde %35,67 bulunmuştur. En yüksek SFA palmitik asit (%20,25 erkek; %23,70 dişi) ve stearik asittir (%4,88 erkek; %5,46 dişi). Toplam tekli doymamış yağ asidi (MUFA) erkeklerde %44,42 ve dişilerde %39,96 tespit edilmiştir. En yüksek MUFA oleik asit (%23,68 erkek; %20,82 dişi) ve palmitoleik asittir (%17,68 erkek; %15,36 dişi). Toplam çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) erkeklerde %8,48 ve dişilerde %7,24 bulunmuştur. En yüksek PUFA linoleik asit (%3,76 erkek; %4,23 dişi), linolenik asit (%2,06 erkek; %1,32 dişi) ve eikozapentaenoik asittir (%1,34 erkek; %0,58). Erkek ve dişi sazanların kas dokularındaki yağ asidi kompozisyonları farklılık göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Apa Baraj Gölü, *Cyprinus carpio*, yağ asidi kompozisyonu.

FATTY ACID COMPOSITION IN MUSCLE TISSUES OF *Cyprinus carpio* (L., 1758) IN LIVING APA DAM LAKE (KONYA)

ABSTRACT

In this study, fatty acid composition in muscle tissues of carp fish (*Cyprinus carpio*, L. 1758), which is having economical importance, and living in Apa Dam Lake (Konya), were investigated. 3 male and 3 female carp samples obtained from Apa Dam Lake in July 2001. The samples were analyzed by using capillary colon (SP-2330) FID detector and mixed standard in a gas chromatography.

In the present study, the total saturated fatty acids (SFA) in carp muscle tissues were 30.69% for males and 35.67% for females. The palmitic acid (20,25% male; 23,70% female) and stearic acid (% 4,88 male; %5,46 female) were the major SFAs. The level of total monounsaturated fatty acids (MUFAs) was 44.42% for males and 39.96% for females. Oleic acid (23,68% male; 20,82 female) and palmitoleic acid (17,68% male; 15,36% female) were the major MUFAs. The level of total polyunsaturated fatty acids (PUFAs) was 8,48% in males and %7,24% in females. The linoleic acid (3,76% male; %4,23 female), linolenic acid (2,06% male; %1,32 female) and eicosapentaenoic acids (1,34 % male; %0,58 female) were the major PUFAs. It was shown that the fatty acid composition in the muscle tissues of carp was significantly different between males and females.

Key Words: Apa Dam Lake, *Cyprinus carpio*, fatty acid composition

1.GİRİŞ

Balıkların kas dokusu EPA ve DHA gibi ω -3 yağ asitleri bakımından oldukça zengindir. Bu yağ asitlerinin kaynağı ise besin zincirinin ilk halkasını oluşturan planktonik organizmalardır. Uzun zincirli PUFA'ların önemi koroner hastalıkların önlenmesi, retina ve beyin gelişimini olumlu yönlerde etkilemesi, bunların yanı sıra gırtlak kanseri, romatit artrit, MS, sedef ve inflamasyonu önleyici etkisinden kaynaklanmaktadır [1-4].

Balıklarda yağ asidi profili tür içinde ve türler arasında farklılıklar göstermektedir. Suyun fiziko-kimyasal özellikleri ile mevsim, besin çeşidi ve miktarı, habitat, ergenlik, yaş ve üreme periyodu gibi faktörler bu çeşitliliği etkilemektedir. Aynı türün de farklı bireylerinin yağ asidi kompozisyonları diyet, lokasyon, cinsiyet ve çevre şartlarına bağlı olarak değişmektedir [5-10]. Balıklar, değişen sıcaklıklarda yağ asidi metabolizmalarını düzenleyebilmektedirler. Ortam sıcaklığının azalması uzun zincirli aşırı doymamış yağ asitlerinin artmasına, doymuş yağ asitlerinin de azalmasına neden olmaktadır [11].

Besinin lipit içeriği, balıkların yağ asidi bileşimlerini direkt olarak etkilemektedir.

Yapılan besleme denemelerinde besinsel yağ asitlerinin, balıkların yağ asidi bileşimine doğrudan yansımakta ve besinde bulunan temel yağ asitlerinin balık dokularında direkt olarak depolanmaktadır [8]. Tatlı su balıklarının ω -3 yağ asitleri beslenme şartlarının iyi olduğu durumlarda deniz balıklarındaki orana kadar yükselebilmektedir. Yağ asidi bileşenlerindeki farklar deniz ve tatlı su balıkları arasındakine nazaran düşük yağlı ve yüksek yağlı balıkların arasında daha fazla dikkate alınabilir [12].

Bütün balıklar üreme periyodundan sonra, üreme faaliyetlerinde kaybettikleri kondisyonlarını tamamlamak için yoğun bir beslenme periyoduna girerler. Kışa ve üremeye hazırlık için depolama faaliyetleri nedeniyle, yaz ve sonbahar aylarında metabolizma olayları daha hızlıdır. Yazın lipitlerin depo edilmeleri kış uykusuna yatma ve üreme faaliyetleri için gereklidir. Gonatların gelişmeye başlamasıyla birlikte kas, karaciğer ve diğer organlardaki depo lipitler gonatlara mobilize olmakta, gonatların lipit miktarı artarken kas ve karaciğer lipit içeriği de azalmaktadır [5,6,13-16].

Bu çalışmada, Apa Baraj Gölü (Konya)'nde yaşayan erkek ve dişi *Cyprinus carpio* (L., 1758)'nin kas dokusu yağ asidi kompozisyonu araştırılmıştır.

2.MATARYEL VE METOD

Apa Baraj Gölü Konya (İç Anadolu Bölgesi) il merkezine 45 km uzaklıkta yer almaktadır. Bu çalışmada kullanılan *Cyprinus carpio* örnekleri (3 erkek ve 3 dişi) 27 Temmuz 2001 tarihinde fanyalı ağlarla yakalanmıştır. Sazanın ağırlığı, çatal boyu, cinsiyeti ve yaşı belirlenmiştir [17]. Dorsal kısımlarından alınan kas dokuları alüminyum folyolara sarılmış ve analiz edilinceye kadar -20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Yağ ekstraksiyonu için kloroform : metanol (2:1) karışımı kullanılmıştır. Yağ örneklerinden yağ asidi metil esterleri ise Boron trifluoride (BF₃-%14'lük metanolde) kullanılarak elde edilmiştir. Daha sonra esterler izooktan içerisinde gaz kromatografisine verilmiştir [18]. Yapılan işlem iki kez tekrarlanmıştır.

Yağ asidi metil esterleri Trace GC (Termoquest) Gaz Kromatografisinde FID Ignition Threshold (PA) 2 dedektör, 30 m x 0,25 mm ID ve 0,20 µm film kalınlığına sahip Supelco (Sp 2330) kapiller kolon ve taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılarak analiz edilmiştir. Esterler, İnlet 240°C, Split flow 75 (ml/dk.) Taşıyıcı Gaz 0,5 ml/dk He, İlk fırın sıcaklığı 120 °C'de (2 dk.), Son fırın

sıcaklığı 220°C (8 dk.), Make-up 30 ml/dk. (He), Hava 350 ml/dk., H₂ 35 ml/dk.'da ayrılmıştır [18]. Pik alanları, 37 yağ asidi bulunan mix standart kullanılarak hesaplanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan *C. carpio* numuneleri erkeklerin 6,00±1,00 ve dişilerin 6,33±0,58 yaşlarında olduğu belirlenmiştir. Sazanların eşeyssel olgunluğa erişme yaşı III-IV olarak kabul edildiğinden çalışmada kullanılan numunelerin tamamı olgun balıklardan oluşmuştur [17]. Balıkların ağırlıkları 914,5±93,3 g erkek ve 919,6±121,9 g dişi ile çatal boyları 372,0±11,1 mm erkek ve 368,7±18,8 mm dişi olarak belirlenmiştir.

Apa Baraj Gölü'ndeki *Cyprinus carpio*'nun yağ asidi kompozisyonu Tablo 1'de verilmiştir. Doymuş yağ asitleri (SFA) erkek ve dişide sırasıyla %30,69 ve %35,67 olarak saptanmıştır. Doymuş yağ asitlerinin büyük bir bölümü miristik asit, palmitik asit ve stearik asitten oluşmaktadır. Erkek-dişi arasında önemli fark gözlenmiştir (p<0,01). Bu ayda balıkların büyük çoğunluğu yumurtlama periyodunu tamamlamıştır. Toplam yağ asitlerinin miktarlarının azalmasına bağlı olarak özellikle çoklu doymamış yağ asitlerindeki azalmaların fazla olmasıyla toplam yağ asitlerindeki doymuş yağ asitlerinin %'leri yüksek bulunmuştur.

Tablo 1. Apa Baraj Gölü'ndeki erkek ve dişi *Cyprinus carpio*'nun yağ asidi kompozisyonu (%).

Yağ Asitleri	Erkek	Dişi
C12:0	0,33±0,08	0,92±0,21*
C13:0	0,10±0,03	0,07±0,02
C14:0	3,52±0,64	3,87±0,62
C15:0	0,44±0,12	0,53±0,15
C16:0	20,25±1,27	23,70±1,04*
C17:0	0,80±0,17	0,69±0,11
C18:0	4,88±0,69	5,46±0,91
C20:0	0,16±0,02	0,22±0,9*
C22:0	0,01±0,00	0,00± 0,00
C23:0	0,21±0,06	0,21±0,5
C24:0	0,00±0,00	0,00±0,00
Σ SFA	30,69±1,35	35,67±1,18*
C14:1	0,75±0,07	1,33±0,23*
C15:1	0,06±0,00	0,06±0,01
C16:1	17,68±1,07	15,36±1,09*
C17:1	0,60±0,05	0,80±0,08
C18:1 n9 t	0,17±0,05	0,29±0,04
C18:1 n9c	23,68±1,34	20,82±1,41
C20:1 n9	1,48±0,13	1,30±0,22
C24:1 n9	0,00±0,00	0,00±0,00
Σ MUFA	44,42±1,62	39,96±1,69*
C18:2 n6 t	0,13±0,02	0,19±0,06
C18:2 n6c	3,76±0,53	4,23±0,35
C18:3 n6 γ	0,08±0,01	0,08±0,01
C18:3 n3α	2,06±0,15	1,32±0,26*
C20:3 n3	0,13±0,05	0,09±0,01
C20:4 n6	0,66±0,08	0,37±0,04*
C20:5 n3	1,34±0,14	0,58±0,08*
C22:6 n3	0,32±0,09	0,38±0,07
Σ PUFA	8,48±0,68	7,24±0,63
ΣSFA/ΣMUFA	0,69	0,89
ΣSFA/ΣPUFA	3,62	4,93
ΣMUFA/ΣPUFA	5,24	5,52
Σn3/ Σn6	0,83	0,49
EPA/DHA	4,19	2,07

*önemli fark var (P<0,01).

Tekli doymamış yağ asitleri %44,42 erkek ve %39,96 dişi belirlenmiştir. Tekli doymamış yağ asitleri arasında en yüksek değere palmitoleik asit ve oleik asit sahiptir. Tekli doymamış yağ asitleri balıklar tarafından dışarıdan alındığı gibi eksikliğinde de metabolitik yolla dönüşüm yapabilmektedir. Oleik, palmitoleik ve araşidonik asitlerin en yüksek seviyeleri tatlısu balık yağlarında olduğu bildirilmiştir [19].

Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) %8,48 erkek ve %7,24 dişi olarak tespit edilmiştir. PUFA erkek-dişi arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır. Omega-3 yağ asitlerinden C18:3 n3 ∞ linolenik asit (LNA), C20:5 n3 eikosapentaenoik asit (EPA) ve C22:6 n3 dokosahekzaenoik asit (DHA) miktarları diğerlerinden yüksek bulunmuştur. Omega-6 yağ asitlerinden C18:2 n-6 cis linoleik asit (LA) ve C20:4 n-6 araşidonik asit (AA) değerleri yüksek bulunmuştur.

Analizleri yapılan balıklarda yumurta bırakma temmuz ayında bitmiştir. Balıklar yumurtlama dönemlerinde oldukça fazla enerji harcamaktadırlar. Bu enerjinin büyük bir kısmını PUFA'lar oluşturmuştur. Bu yüzden toplam yağda % olarak PUFA oranı düşerken SFA ve MUFA daha az tüketildiğinden dolayı %'leri daha yüksek bulunmuştur. Temmuz ayında sıcaklık en yüksek değerlere ulaşmıştır. Sıcaklık balıkların beslenmesini ve hareketlerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bir taraftan fazla enerji harcanması, diğer taraftan sıcaklığın olumsuz etkileri birleşmiş olabileceği söylenebilir [6,15,16].

Apa'daki *C. carpio*'nun ω-3/ω-6 oranı erkek ve dişide sırasıyla 0,83-1,29 olarak belirlenmiştir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oranının temmuz ayında düşük olması büyük çoğunlukla ω-3 yağ

asitlerinden kaynaklandığı ve ekolojik faktörlerin en önemli yağ asidi olan ω-3 oranını büyük ölçüde etkilediği düşünülebilir.

Mogan Gölü'nde yaşayan sazanlar üzerinde yapılan çalışmada ağustos ayında karaciğer ve kas dokusu toplam lipid ve toplam yağ asidi miktarları mayıs ayına göre önemli derecede düştüğü belirlenmiştir [14]. Karaciğerlerinde yapılan ölçümlerde ise ağustos ayında çoklu doymamış yağ asitleri mayıs'a göre düşüş göstermiştir. Tekli doymamış yağ asitlerinde ise yükselme görülmüştür. Doymuş yağ asitlerinin bazıları düşerken diğerleri yükselmiştir [20]. Coregonid'lerin yağ asitlerinin mevsimsel değişimleri incelenmiş ve sonuçta mayıs ayında çoklu doymamış yağ asidi yüksek iken eylül'de düşük olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık tekli doymamış yağ asitleri ve doymuş yağ asitleri yüksek bulunmuştur [16]. Baykal Gölü'nde yapılan çalışmada 2 balık türünde yağ asidi kompozisyonlarına bakıldığında üreme periyoduna bağlı olarak değişim gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca aynı göldeki 2 türün farklı besin almalarına rağmen aynı yağ asidi kompozisyonuna sahip olduğu görülmüştür [21]. Keban Baraj Gölü'ndeki *Capoeta* ve *Barbus* türleri üzerinde yapılan çalışmada dişi ve erkek bireylerin yağ asitleri ve lipid miktarları haziran ayında yüksek iken ağustos ayında düşmüştür [22].

Yağ asitlerindeki değişimlerin en belirgin olduğu zaman üreme mevsimidir. Yumurta bırakmaya başlamadan önce toplam yağ asidi miktarları yüksek olurken periyot sonunda azalmaktadır. Bu değişim balıkların hem karaciğerlerinde, hem de kaslarında paralellik göstermektedir [5,13,22-25]. Yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir [15,16,21,26,27].

Balıklar, değişen sıcaklıklarda yağ asidi metabolizmaları düzenleyebilmektedirler. Ortam sıcaklığının artması uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin azalmasına neden olmaktadır. Sıcaklığın değişimi yanında ortamdaki besinin az veya çok oluşunun, balıkların olgunlaşma yaşı ve üreme periyotları da bu değişimlerde etkili olmaktadır. Besin yoluyla alınan miristik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi yağ asitleri balık dokularında doğrudan doğruya depo edilmektedirler. Bu yağ asitlerindeki mevsimsel değişimler, besinsel fitoplanktonların ve zooplanktonların çeşit ve miktarına bağlı olarak değişmektedir [16,24,28]. Apa Barajı'nda hem fito ve zooplanktonların bol olması, hem de tür sayısının fazla olmasıyla doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin çok olması paralellik göstermiştir.

Yağları balıklar üreme periyotlarında enerji ve yapısal moleküller olarak kullandıkları önemli biyomoleküller olduğu görülmektedir [21,22].

KAYNAKLAR

1. Hessel, E., Agren, J.J., Paulitschke, M., Hanninen, O., Hanninen, A. And Lerche, D., 1990, Freshwater fish diet affects lipid composition, deformability and aggregation properties of erythrocytes, *Atherosclerosis*, 82: 37-42.
2. Stone, J., 1996, Fish consumption, fish oil, lipids and coronary heart disease, *American Heart Association*, 94: 2337-2340.
3. Simopoulos, A.P. 1999, Essential fatty acids in health and chronic disease, *American Journal of Clinical Nutrition*, 70 (3): 560S-569S.
4. Higgins PhD, S., McCarthy, S.N., et al, 2000, Measurement of free cholesterol, cholesteryl esters and cholesteryl linoleate hydroperoxide in copper-oxidised low density lipoprotein in healthy volunteers supplemented with a low dose of n-3 polyunsaturated fatty acids, *Nutrition Research*, 20 (8): 1091-1102.
5. Ackman, R.G., 1967, Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some fresh-water fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 22: 907-922.
6. Agren, J., Muje, P., Hanninen, O., Herranen, J., Penttila, I., 1987, Seasonal Variation of Lipid Fatty Acids of Boreal Freshwater Fish Species, *Biochem. Physiol.*, 88: 905-909.
7. Henderson, R. J., and Tocher, D. R., 1987, The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research*, 26 (4): 281-347.
8. Akpınar, M.A.ve Aksoylar, M.Y., 1988, Garra rufa Heckel, 1843'nın yağ asidi bileşimine sıcaklığın, besinsel yağ asitlerinin ve açlığın etkileri, *Doğa Türk Biyoloji Derg.*, 12, 1, 1-8.
9. Bandarra, N. M., Batista, I., Nunes, M. L., and Empis, J. M., 2001, Seasonal variation in the chemical composition of horse-mackerel (*Tachurus tachurus*), *European Food Research and Technology*, 212: 535-539.
10. Gökçe, A., M., Taşbozan, O., Çelik, M., Tabakoğlu, S.,Ş., 2004, Seasonal variations in proximate and fatty acid compositions of female common sole (*Solea solea*), *Food Chemistry*, 88: 419-423.
11. Farkas, T. 1984. Adaptation of fatty acid composition to temperature- a study on carp (*Cyprinus carpio* L.) liver slices. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B, 4: 531-535.
12. Ahlgren, G., Blomqvist, P. and Gustafsson, I.B. 1994, Fatty acid content of the dorsal muscle-an indicator of fat quality in freshwater fish, *J. of Fish Biology*, 4: 131-157.
13. Deng, J.C., Orthoefer, F.T., Dennison, R.A. and Watson, M., 1976, Lipids and fatty acids in Mullet (*Mugil cephalus*): seasonal and locational variations, *J. of Food Science*, 41: 1479-1483.

14. Akpınar, M. A., 1986a, *Cyprinus carpio* L. (Osteichthyes: Cyprinidae)'nın karaciğer ve kasında total lipid ve total yağ asidinin mevsimsel değişimi, C. Ü. Fen-Ed. Fak. Fen Bil. Derg., 4: 33-41.
15. Muje, P., Agren, J.J., Lindqvist, O.V. and Hanninen, O., 1989, Fatty acid composition of vendace (*Coregonus albula* L.) muscle and its plankton feed, Comp. Biochem. And Physiol., 92B: 75-79.
16. Luzzana, U., Serrini, G., Moretti, V. M., Grimaldi, P., Paleari, M.A. and Valfr, F. 1996, Seasonal variations in fat content and fatty acid composition of male and female coregonid 'bondella' from Lake Maggiore and landlocked shad from Lake Como (Northern Italy), Journal of Fish Biology, 48: 352-366.
17. Geldiay, R., Balık, S., 1996, Türkiye Tatlı Su Balıkları, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fak., Yayınları, Ders Kitabı, Dizi No: 16.
18. IUPAC, 1979, Standart methods for the analysis of oils, fats and derivatives. 6. Edition (Fift edition method II. D. 19), Pergamon Press, Oxford, 96-102.
19. Andrade, A. D., Rubira, A. F., Matsushita, M., & Souza, N. E. 1995, Omega-3 fatty acids in freshwater fish from South Brazil. Journal of the American Oil Chemists Society, 72 (10): 1207-1210.
20. Akpınar, M. A., 1986b, *Cyprinus carpio* L. (Osteichthyes: Cyprinidae)'nın karaciğer yağ asitlerinin mevsimsel değişimi, Doğa Tu. Bio. Derg., 10 (3): 232-239.
21. Kozlova, T. and Khotimchenko, S. 1993. Fatty acid composition of endemic Baikal Fish and Crustacea, Comp. Biochem. Physiol. 105B, 1: 97-103.
22. Konar, V., Canpolat, A., Yılmaz, O. and Gürsu, F. 1999. *Capoeta trutta* ve *Barbus rajanorum* mystaceus'in kas dokularındaki total lipit ve yağ asidi miktar ve bileşimlerinin üreme periyodu süresince değişimi, Tr. J. of Biology, 23: 319-330.
23. Dutta, H., Das, A., Das, A.B., and Farkas, T., 1985, Role of environmental temperature in seasonal changes of fatty acid composition of hepatic lipid in an air-breathing Indian teleost, *Channa punctatus* (Blonch), Comp. Biochem. Physiol. 81B, 2: 341-347.
24. Akpınar, M. A. 1987, *Cyprinus carpio* L. (Osteichthyes: Cyprinidae)'nın kas dokusu yağ asitlerinin mevsimsel değişimi, Tr. J. of Biology, 11 (1): 1-9.
25. Metin, K., ve Akpınar, M. A., 2000, *Cyprinion macrostomus* Heckel, 1843'un gonatlarında total lipid ve yağ asidi miktarının mevsimsel değişimi, Tr. J. of Biology, 24: 627-634.
26. Vang, Y.J., Miller, L.A., Perren, M. And Addis, P.B., 1990, Omega-3 fatty acids in Lake Superior Fish, Journal of Food Science, 55 (1), 71-73.
27. Navarro, J.C., Batty, R.S., Bell, M.V., Sargent, J.R., 1993, Effects of *Artemia* diets with different contents of polyunsaturated fatty acids on the lipid composition of larva of Atlantic herring (*Clupea harengus*), J. of Fish Biology, 43 (4): 503-515.
28. Tocher, D.R. and Dick, J.R., 2000, Essential fatty acid deficiency in a freshwater fish: the effects of linoleic, ∞ linolenic and stearidonic acids on the metabolism of [1-¹⁴C] 18:3 n-3 in a carp cell culture model, Fish Physiology and Biochemistry, 22: 67-75.