

**FARKLI ZAMANLARDA TOPLANMIŞ
MANDA SÜTÜNDE SERUM PROTEİNLERİNDEN
LAKTOFERRİNİN BELİRLENMESİ**

GÖKÇE KESER

Yüksek Lisans Tezi

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Dr Öğr. Üyesi Binnur KAPTAN**

2019

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI ZAMANLARDA TOPLANMIŞ MANDA SÜTÜNDE SERUM
PROTEİNLERİNDEN LAKTOFERRİNİN BELİRLENMESİ

Gökçe KESER

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman: Dr Öğr. Üyesi BİNNUR KAPTAN

TEKİRDAĞ-2019

Her hakkı saklıdır.

Bu tez NKÜBAP tarafından **NKUBAP.03.YL.17.106** numaralı proje ile desteklenmiştir.

Dr Öğr. Üyesi Binnur KAPTAN danışmanlığında, Gökçe KESER tarafından hazırlanan "Farklı Zamanlarda Toplanmış Manda Sütünde Serum Proteinlerinden Laktoferrinin Belirlenmesi" isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Bilal BİLGİN imza:
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Harun URAN imza:
Üye : Dr Öğr. Üyesi Binnur KAPTAN (Danışman) imza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI ZAMANLARDA TOPLANMIŞ MANDA SÜTÜNDE SERUM PROTEİNLERİNDEN LAKTOFERRİNİN BELİRLENMESİ

Gökçe KESER

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Binnur KAPTAN

Laktoferrin (Lf), benzersiz özelliklere sahip çok fonksiyonlu bir peynir altı suyu proteini olup, diğer birçok salgı sıvısında ve beyaz kan hücrelerinde bulunur. Bu çalışmada manda kolostrum ve laktasyon süt örneklerinde RP-HPLC yöntemi kullanılarak Laktoferrin konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Manda kolostrum ve laktasyon süt örnekleri Marmara Bölgesi'ndeki (İstanbul Silivri-Çatalca) manda çiftliğinden, 150 gün boyunca herhangi bir meme iltihabı belirtisi göstermeyen ve günlük süt üretimi kaydedilen mandalardan temin edilmiştir. Kolostrum sütü örnekleri doğumdan hemen sonra 7. güne kadar, laktasyon sütü örnekleri ise laktasyonun ilk 30. gününden sonra aylık olarak toplanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, kolostrum sütünde yüksek olan laktoferrin miktarı trans süte geçişten sonra, laktasyon günlerinin ilerlemesiyle daha da azalmıştır. Manda kolostrum sütündeki Lf konsantrasyonu $0,380 \text{ mg.mL}^{-1}$ ile $1,560 \text{ mg.mL}^{-1}$ arasında, laktasyon sütünde ise $0,207 \text{ mg.mL}^{-1}$ ile $0,305 \text{ mg.mL}^{-1}$ arasında değiştiği saptanmıştır. Ayrıca, manda kolostrum ve laktasyon sütlerinde kuru madde, protein, yağ ve laktoz tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Laktoferrin, HPLC, Manda sütü

2019, 52 sayfa

ABSTRACT

DETERMINATION OF LACTOFERRIN FROM SERUM PROTEINS IN BUFFALO MILK COLLECTED IN DIFFERENT TIMES

GÖKÇE KESER

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Binnur KAPTAN

Lactoferrin (Lf) is a multifunctional whey protein with unique properties, is present in many other secretory fluids and white blood cells. In this study was aimed to determined lactoferrin concentration in both colostrum and lactation milk of Anatolian Buffaloes by using an RP-HPLC method. Colostrum and lactation milk samples were collected (the buffaloes had shown no sign of mastitis during 150 day and daily milk production was recorded.) from buffalo farm in the Marmara Region (İstanbul Silivri-Çatalca), in the Turkey. Colostrum milk samples were collected immediately after parturition up to 7 days, and lactation milk samples were collected as monthly for the first 30. days of lactation. Lactoferrin was high in colostrum, then decreased with elapsing of lactation days and was very lower in lactation milk afterwards transit of milk. The Lf concentration in buffalo colostrum milk was determined from 0,380 mg.mL⁻¹ to 1,560 mg.mL⁻¹.The Lf concentration varied between 0,207 mg.mL⁻¹ and 0,305 mg.mL⁻¹ in normal lactation milk. Also, dry matter, protein, fat and lactose were determined in buffalo colostrum milk and lactation milk.

Key words: Lactoferrin, HPLC, Buffalo milk

2019, 52 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	vi
ŞEKİL DİZİNİ	vii
SİMGELER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Laktoferrin (Lf).....	4
2.2. Laktoferrinin Fiziko-Kimyasal Özellikleri.....	5
2.3.Laktoferrinin Fizyolojik Özellikleri	8
2.3.1. Laktoferrinin Antimikrobiyal Özellikleri	8
2.3.2. Laktoferrinin Antiviral Özellikleri	9
2.3.3 Laktoferrinin Antifungal Etkisi	10
2.3.4 Laktoferrinin İnflamatuar ve İmmun Sistem Üzerine Etkisi	10
2.3.5 Laktoferrinin Antiparazit Etkisi.....	11
2.3.6 Laktoferrinin Antitümör Etkisi.....	11
2.4. Farklı Sütlerdeki Laktoferrin Miktarı Üzerine Yapılan Araştırmalar	12
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Manda Kolostrum ve Laktasyon Süt Örnekleri.....	15
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Alet ve Ekipmanlar	15
3.1. 3. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	16

3.1.4.Laktoferrin Standardı.....	16
3.2. Metod.....	16
3.2.1. Kuru Madde Analizi	16
3.2.2. Protein Analizi.....	17
3.2.3. Yağ Analizi.....	17
3.2.4. Laktoz Analizi	17
3.2.5. Asitlik (pH) Analizi	17
3.2.6. Titre Edilebilir Asitlik (% LA) Analizi	18
3.2.7. Manda Kolostrum ve Laktasyon Sütünde Laktoferrin Miktarının HPLC ile Belirlenmesi	18
3.2.7.1.HPLC Şartları	18
3.2.7.2.Standart Laktoferrin Çözeltisinin Hazırlanması	19
3.2.7.3.Kalibrasyon kurvesinin hazırlanması	19
3.2.7.4.Laktoferrin Belirlenmesi ve Örneklerin Hazırlanması	19
3.2.8. Metod Validasyon Parametreleri	19
3.3.Verilerin Değerlendirilmesi.....	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	22
4.1. Kolostrum Sütü Analiz Sonuçları.....	22
4.1.1. Kolostrum Sütü Kuru Madde Analiz Sonuçları	22
4.1.2. Kolostrum Sütü Toplam Protein Analiz Sonuçları.....	23
4.1.3. Kolostrum Sütü Yağ Analiz Sonuçları	24
4.1.4. Kolostrum Sütü Laktoz Analiz Sonuçları.....	25
4.1.5. Kolostrum Sütü pH Asitlik Analiz Sonuçları	27
4.1.6. Kolostrum Sütü Titre Edilebilir Asitlik (% LA) Analiz Sonuçları.....	28
4.2. Laktasyon Dönemindeki Sütlerin Kimyasal Analizlerinin Değerlendirilmesi.....	29
4.2.1. Laktasyon Sütü Kuru Madde Analiz Sonuçları.....	29
4.2.2.Laktasyon Sütü Toplam Protein Analiz Sonuçları	31

4.2.3. Laktasyon Sütü Yağ Analiz Sonuçları	32
4.2.4. Laktasyon Sütü Laktoz Analiz Sonuçları	33
4.2.5. Laktasyon Sütü pH Asitlik Analiz Sonuçları	34
4.2.6. Laktasyon Sütü Titre Edilebilir Asitlik (% LA) Analiz Sonuçları	35
4.3. Laktoferrin Standartlarına Ait Değerler	37
4.3.1. Kalibrasyon Kurvesi	39
4.3.2. Metod Validasyon Parametreleri Değerleri	40
4.4. Kolostrum ve Laktasyon Sütündeki Laktoferrin Miktarının Sonuçları	41
4.4.1. Kolostrum Sütü Laktoferrin Analiz Sonuçları	41
4.4.2. Laktasyon Sütü Laktoferrin Analiz Sonuçları	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
6. KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	51

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Laktoferrinin bazı özellikleri.....	7
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan alet ve ekipmanlar.....	15
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	16
Çizelge3.3. HPLC mobil faz akış profili	18
Çizelge 4.1. Kolostrum sütü kuru madde sonuçları (%).....	22
Çizelge 4.2. Kolostrum sütü protein sonuçları (%)	23
Çizelge 4.3. Kolostrum sütü yağ sonuçları (%).....	24
Çizelge 4.4. Kolostrum sütü laktoz sonuçları (%).....	26
Çizelge 4.5. Kolostrum sütü pH asitlik sonuçları	27
Çizelge 4.6. Kolostrum sütü titre edilebilir asitlik sonuçları (% LA).....	28
Çizelge 4.7. Laktasyon sütü kuru madde sonuçları (%)	29
Çizelge 4.8. Laktasyon sütü protein sonuçları (%).....	31
Çizelge 4.9. Laktasyon sütü yağ sonuçları (%)	32
Çizelge 4.10. Laktasyon sütü laktoz sonuçları (%)	33
Çizelge 4.11. Laktasyon sütü pH asitlik sonuçları	34
Çizelge 4.12. Laktasyon sütü titre edilebilir asitlik sonuçları (%)	35
Çizelge 4.13. Laktoferrin kalibrasyon kurvesinin oluşturulmasında kullanılan laktoferrin konsantrasyonları ve pik alanları	37
Çizelge 4.14. Metod validasyon parametreleri.....	40
Çizelge 4.15. Kolostrum sütü laktoferin sonuçları (mg.mL ⁻¹)	41
Çizelge 4.16. Laktasyon sütü laktoferrin sonuçları (mg.mL ⁻¹).....	42

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. A: Laktoferrinin kimyasal yapısı B: Lf demir bağlama bölgesi.....	7
Şekil 4.1. Kolostrum sütü kuru madde değerleri	23
Şekil 4.2. Kolostrum sütü protein değerleri.....	24
Şekil 4.3. Kolostrum sütü yağ değerleri	25
Şekil 4.4. Kolostrum sütü laktoz değerleri	26
Şekil 4.5. Kolostrum sütü pH asitlik değerleri	27
Şekil 4.6. Kolostrum sütü titre edilebilir asitlik değerleri	29
Şekil 4.7. Laktasyon kuru madde değerleri	30
Şekil 4.8. Laktasyon sütü protein değerleri	31
Şekil 4.9. Laktasyon sütü yağ değerleri.....	33
Şekil 4.10. Laktasyon sütü laktoz değerleri.....	34
Şekil 4.11. Laktasyon sütü pH asitlik değerleri.....	35
Şekil 4.12. Laktasyon sütü titre edilebilir asitlik değerleri.....	36
Şekil 4.13. Laktoferrin standardı için kromatogram (10 mg.L^{-1}).....	38
Şekil 4.14. Laktoferrin standardı için kromatogram (50 mg.L^{-1}).....	38
Şekil 4.15. Laktoferrin (Lf) için kalibrasyon kurvesi.....	39
Şekil 4.16. Kolostrum sütü laktoferrin değerleri	42
Şekil 4.17. Laktasyon sütü laktoferrin değerleri.....	43

SİMGELER DİZİNİ

kg	: Kilogram
g	: gram
mg	: Miligram
L	: Litre
ml	: Mililitre
ppm	: Parts per million
Zn	: Çinko
Fe	: Demir
Al	: alüminyum
Mn	: Mangan
Co	: Kobalt
Cu	: Bakır
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
%	:Yüzde
⁰ C	: Celsius derecesi
dk	: Dakika

KISALTMALAR

DNA : Deoksiribonükleik asit

RNA : Ribonükleik asit

Lf : Laktoferrin

α -La : α laktoalbumin

β -Lg : β -laktoglobulin

GMP : Glikomakropeptid

PAS : Peynir altı suyu

Ig : İmmünoglobulin

LPS : Lipopolisakkarit

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında beni yalnız bırakmayan yoluma her zaman gerek bilgisi gerek deneyimleriyle ışık tutan danışmanım Sayın Dr Öğr. Üyesi Binnur KAPTAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, Namık Kemal Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Tez çalışmamdaki metod oluşturma sürecinde Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi ÇOBİLTUM-Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Öğr. Gör. Salih Can SUNER hocama teşekkür ederim.

Bu süreçte her zaman bana maddi manevi desteklerini esirgemeyen canım babam Hasan KESER'e canım annem Gülşen KESER'e ve canım kardeşlerime teşekkür ederim.

Çalışmamın en zorlu anlarında beni motive eden meslektaşım, Değerli arkadaşım Gıda Mühendisi Melike CİNİVİZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2019

GÖKÇE KESER

Gıda Mühendisi

1. GİRİŞ

Süt, tüm memelilerde ve özellikle yeni doğmuş memelilerde hızlı büyümenin ilk basamağında yer alan en temel besin ögesidir. Ayrıca, yeni doğanlarda ve erişkinlerde enfeksiyondan korunmak, vücut direncini arttırmak, ishal tedavisinde, diyet ve farmasötik uygulamalarda, hipertansiyon, diş hastalıkları, mineral malabsorpsiyonu gibi bozuklukların tedavisinde gerekli olan fizyolojik olarak aktif bileşikleri yüksek seviyelerde içermektedir (Çetinkaya ve ark. 2011, Metin 2013).

Buzağılamadan hemen sonra, sağlıklı tüm memeli hayvanlar, yavruların gereksinimini karşılamak için kolostrum üretirler. Kolostrum, doğumdan 24-36 saat sonra memeden salgılanan, renk ve bileşim bakımından normal süttten oldukça farklı bir sıvıdır. Kolostrum sütü büyüme, gelişme, immünolojik savunma (dolayısıyla hayatta kalma) ve yeni doğanın sağlıklı yaşamı için gerekli olan yüksek miktarda besin, antikor ve büyüme faktörleri içerir.

Kolostrum, yeni doğmuş yavrulara pasif bağışıklık sağlayan çok çeşitli antikorlar (immünoglobulinler, Igs) ve antimikrobiyal bileşenler (laktoferrin, lizozim ve laktoperoksidaz) içerir. İkinci ve sekizinci sağımlar arasındaki süt yapısının normal süte dönüşmesi nedeniyle "transit süt" olarak tanımlanmaktadır. Kolostrum yaklaşık 48 saat içinde transit süt, 72 saat içinde de normal süt halini almaktadır (Campana ve Baumrucker 1995).

Kolostrum, diğer sütlere göre daha fazla kuru madde, yağ ve yağsız kuru madde, protein içermekte ve süt kompozisyonunu hayvanın laktasyon, yaş, mevsim, sağlık durumu, cinsi ve genetik özelliklerini etkilemektedir. (Coroian ve ark. 2013).

Manda sütü dünya da beslenme açısından önemli bir yere sahip, kuru madde oranı % 17 civarında olup, % 7'si yağ % 3,5-4'ü protein, % 5-5,5'i laktoz ve % 0,8'i külden oluşmaktadır. Manda sütünün asitliği 6,7-10 °SH ve yoğunluğu 1.027-1.040 g/ml dir. Kompozisyon değerlerinden de anlaşıldığı üzere sığır sütü ile karşılaştırıldığında kuru madde, protein ve vitamin değerleri açısından daha zengin, kolesterol değeri daha düşük ve antimikrobiyal etkili laktoferrin proteini içermesi yönünden ise daha değerli olduğu yapılan birçok çalışmalarla kabul edilmiştir. (Çetinkaya ve ark. 2011, Metin 2013).

Bunlar, Laktoferrin, laktoperoksidaz, lizozim ve immünoglobulinler ve antimikrobiyal proteinler olarak kabul edilmektedir (Chatterton ve ark. 2006, Park 2009). Serum proteinlerinden, β-laktoglobulin, Peyniraltı suyu proteinlerinin yaklaşık olarak % 50-60'ını

oluşturmaktadır. Yeni doğanlar için önemli bir enerji kaynağı ve bunun yanı sıra yağ asidi veya lipid bağlayıcı protein olarak da rol oynamaktadır (Harper 2000).

α -laktalbumin 123 aminoasit kalıntısına sahip, toplam peyniraltı suyu proteinlerinin yaklaşık % 25'ini oluşturmaktadır. A, B ve C tipi olmak üzere 3 genetik varyans halinde tanımlanır ve a-1,4-galaktoziltransferaz için bir koenzim görevi görerek, yeni doğanlar için önemli bir enerji kaynağı olan, meme bezlerinde laktoz biyosentezi için galaktozu glikoza aktarmasıyla kritik bir öneme sahiptir (Billakanti 2009).

Immunglobulinler, kolostrumdaki toplam protein içeriğinin % 70-80'ini oluştururken laktasyon sütünde ise toplam proteinin sadece % 1-2'sini oluşturur. Antikorların biyolojik fonksiyonlarını taşırlar ve patojenlere karşı pasif bağışıklık sağlamak için tüm emzik türlerinin kolostrumunda bulunurlar (Park 2009).

Serum albumini, 582 aminoasit kalıntısına ve 66 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir. Toplam peynir altı suyu proteinlerinin yaklaşık % 8'ini oluşturmaktadır. Hidrofobik yapısı nedeniyle, sütteki serbest yağ asitlerine ve diğer küçük moleküllere bağlanır (Billakanti 2009).

Proteoz ve Pepton, fraksiyonları süt proteinlerinin yaklaşık % 3'ünü ve peyniraltı suyu proteinlerinin de yaklaşık % 20'sini oluştururlar (Metin 2013).

Dünyada manda popülasyonunun % 96'sı Asya kıtasında, özellikle de Hindistan başta olmak üzere, Çin ve Pakistan en yüksek değere sahiptir. Manda sayısındaki bu artışa rağmen, Türkiye'deki 1985 yılında manda yetiştiriciliği milyonlara ulaşırken günümüze bakıldığında 100 binin altına düşmüş ve manda yetiştiriciliği azalan bir seyir göstermiştir.

Çizelge 1.1. Manda sütü serum protein kompozisyonu (Pandya ve Khan 2006)

Protein	Konsantrasyon(g L⁻¹)
β -Laktoglobulin	3,9
α -Laktoalbumin	1,4
İmmunoglobulinler	10,66
Serum albumini	0,29
Laktoferrin	0,32
Laktoperoksidaz	5,2 - 9,8
Lizozim	0,000152
Proteoz - pepton	3,305

2000'li yıllara kadar devamlı azalan manda sayısı devletin verdiği teşviklerle son yıllarda tekrar artmaya başlamıştır. Büyükbaş hayvanlar arasında yer alan manda sayısı (baş) 2007 yılında 84 bin 705 süt (ton) 30,375 iken 2017 yılında 161 bin 439 baş manda süt (ton) 69 bin 401 olarak kayıtlara geçmiştir. Sağılan manda sayısı 69.496 baş olarak toplam süt üretiminin ise % 0,3'ünü manda sütü oluşturmaktadır. (TUİK)

Değişen dünya da sağlıklı beslenme konusundaki artan farkındalık, birçok ülkede beslenme bilimine yeni bir eğilim kazandırmıştır.

Süt endüstrisindeki analitik teknikler ve teknolojideki yeni gelişmeler, besin bileşenlerini biyolojik aktiviteyle izole etme ve konsantre etme ya da modifiye etme fırsatları sunmakta, böylece besin takviyeleri, nutrasötikler ya da tıbbi olarak faydalı gıdalar olarak diyet uygulamalarının mümkün olması bu çalışmaları daha da hızlandırmıştır (Park 2009).

Bu tezde serum proteini olan ve birçok yönden değerli laktoferrinin manda sütü ve kolostrumdaki miktarının saptanması hedeflenmiş ve daha sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Laktoferrin (Lf)

Laktoferrin (Lf), Geniş bir fonksiyon yelpazesine sahiptir ve şu anda nutrasötik bir protein olarak kabul edilmektedir. Günümüzde, immünomodülatör (Siqueiros-Cendón ve ark. 2014), antimikrobiyal (Legrand ve Mazurier, 2010), antioksidan (Kruzel ve ark. 2013), antikanser (Tsuda ve ark. 2010) gibi çoklu aktivitelere atıfta bulunulmuştur. Lf son zamanlarda obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi metabolik bozukluklardaki rolü tanımlanmıştır (Mayeur ve ark. 2016). Lf bağışıklık sistemi ile ilişkili olduğu bilinen (Soyeurt ve ark. 2012), sütte doğal olarak bulunan ve esas olarak meme epitel hücreleri tarafından salgılanan çok fonksiyonlu, demir bağlayıcı bir glikoproteindir (Shimazaki ve Kawai 2017).

Sığır sütünde laktasyon dönemine bağlı olarak 0,02 ila 0,35 mg.ml⁻¹ arasında bulunur (Madureira ve ark. 2007). Doğumdan sonra kolostrum sütünde, laktoferrin miktarı çok yüksektir ve daha sonra yavaş yavaş azalır (Shimazaki ve Kawai, 2017). Sütte yüksek Lf miktarı (2,3 g.L⁻¹ süt) klinik veya subklinik mastitise işaret edebilir (Kutilla ve ark. 2004).

Lf, ilk olarak 1939 yılında sığır sütünden Sørensen ve Sørensen (1940) tarafından izole edilmiş ve yirmi yıl sonra da insan sütünün temel demir bağlayıcı proteini olduğu tespit edilmiştir (Panella ve ark. 2016).

Laktoferrin inek, insan, kısrak, keçi, fare gibi birçok süt türünde bulunan bir glikoproteindir. İlk olarak inek sütünden izole edildiği için bu isimle anılan laktoferrin, sadece süte özgü bir protein değildir.

Lf, transferrin gen ailesinin bir üyesi olarak Fe⁺³ bağlayan (Yılmaz ve Tosun 2012), gözyaşı, pankreas salgıları, eklem sıvısı, safra ve tükürük gibi ekzokrin sıvılarda da bulunmaktadır. Polimorf çekirdekli nötrofillerde depolanan Lf enfeksiyon, yangı ve tümör gelişimi durumlarında nötrofillerden açığa çıkar (Steijns ve Van Hooijdonk 2000).

Sığır Lf ve insan Lf amino asit rezidüleri yaklaşık % 69 oranında benzerlik göstermektedir. İnsan sütü, en çok Lf miktarına sahiptir. Bu protein, insanların ve diğer memelilerin spesifik olmayan doğal bağışıklığının temel bir ögesidir (Billakanti 2009, Król 2011). Lf İnsanlarda, sığırlarda, ineklerde, keçilerde, atlarda, köpeklerde kemirgen ve çeşitli memeli türlerinde mukozal epitel hücrelerde ve nötrofiller tarafından üretilmektedir. Daha

ileriki çalışmalar da ise Gonzlez-Chvez ve ark. (2009) Lf'nin balıklarda da bulunduğunu tespit etmişlerdir.

2.2. Laktoferrinin Fiziko-Kimyasal zellikleri

Lf, trlar arasında yüksek homolojiye sahip olan yaklaşık 700 aminoasitten (aa) insan Lf (hLf) için 711 aa ve sığır Lf (bLf) için 689 aa oluşan 80 kDa molekül ağırlığına ve izoelektrik noktası 8,6 olan bazik, pozitif yüklü ve laktotransferrin ailesi olarak bilinen demir bağlayıcı bir glikoproteindir (Billakanti 2009, Giansanti ve ark. 2016).

Üç farklı Lf izoformu izole edilmiştir. Laktoferrin- α , demir bağlanma formudur, ancak ribonükleaz aktivitesine sahip değildir. Laktoferrin- β ve laktoferrin-rib, ribonükleaz aktivitesi gösterirler fakat demir bağlama yeteneğine sahip değillerdir. Üç boyutlu yapısında, birbiriyle homolog olan iki simetrik lob (N ve C lobları) i içe katlanmış tek bir polipeptit zincirinden oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu loblar ayrıca C (karboksil) ve N (amino) terminal bölgeleri olarak adlandırılmaktadır (Szwajkowska ve ark. 2011, Giansanti ve ark. 2016).

Her lob, C1, C2, N1 ve N2 olarak bilinen iki bölgeden oluşur. (şekil 2.1.) Bölgeler her lobda bir demir bağlama yeri oluşturur ve Lf molekülleri (türlere ve proteine göre), genelde molekülün yüzeyinde potansiyel glikozilasyon için farklı sayıda bölge içerir. Lf'nin demir bağlama kapasitesi, bazı durumlarda Lf için Fe^{+3} iyonları vericisi olarak kullanılabilen, transferrinden iki kat daha yüksektir (Rana ve ark. 2012, Garca-Montoya ve ark. 2012).

Lf'nin N-terminali katyonik ve hidrofobiktir. Elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler ise, laktoferrinin antimikrobiyal aktivitesini belirleyen en temel unsurlardır (Nibbering ve ark. 2001).

Lf'nin, düşük pH'larda demiri bağlama yeteneği vardır. Bu sayede bakterilerin metabolik aktiviteleri nedeniyle pH 4,5'in altına düşen ortamlarda inflamasyon ve enfeksiyon bölgelerinde büyük önem taşır. Lf, tripsin ve benzeri enzimler ile beraber proteolitik degradasyona karşı önemli bir direnç gösterir. Direnç seviyesi, demir doygunluk derecesi ile orantılıdır (Vasavada ve Cousin 2005).

Lf'nin içerdiği dört amino asit (histidin, tirozin ve aspartik asit) rezidüsü, demir bağlanması için nemliyen, bir arjinin zinciri karbonat iyonunun bağlanmasıyla sorumludur. Lf demirin yanında, lipopolisakritler, heparin, glikozaminoglikanlar, DNA veya Al^{+3} , Ga^{+3} , Mn^{+3} , Co^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} gibi metal iyonlar ile birçok bileşiği ve maddeleri

bağlayabilme yeteneğine sahiptir (García-Montoya ve ark. 2012). Bu durum da, Lf 'nin neden bu kadar önemli olup, çoğu araştırmaya konu olmasının açıklamasıdır (Rana ve ark. 2012, Panella ve ark. 2016).

Doğumdan sonra ilk sağımda en yüksek laktoferrin konsantrasyonu ($0,83 \text{ mg.mL}^{-1}$), ancak daha sonraki günlerinde keskin bir şekilde azaldığı bildirilmiştir. Sütteki laktoferrin konsantrasyonu, emzirme aşamasına ve memenin sağlık durumuna göre değişmektedir. Olgun sığır sütü nispeten düşük seviyelerde laktoferrin ($0,02-0,35 \text{ mg.mL}^{-1}$) içerirken, bu konsantrasyon, invazyon (enfeksiyon durumu) periyodunda ($20-100 \text{ mg.mL}^{-1}$) önemli ölçüde artmaktadır. Bu dönemde, meme bezi salgılanması, meme içi enfeksiyonlara direnciyle ilişkili olan fagositik hücreler, laktoferrin ve immünoglobülinler gibi doğal koruyucu faktörlerin konsantrasyonlarında büyük bir artışla değişikliklere uğrar (Galfı ve ark. 2016).

Laktoferrin miktarı aynı zamanda mastitis ile yakından ilişkili olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir. Mastitis (meme iltihabı), mikroorganizmaların ve genellikle bakterilerin memeye girmesi ve burada çoğalarak meme dokusunu tahrip etmesiyle ortaya çıkan, modern süt endüstrisinde ağır ekonomik kayıplara neden olan bir meme iltihabıdır. Memelerdeki bu iltihaplanma süreçleri sütte laktoferrin içeriğini arttırmaktadır. İnflamasyon sırasında, meme bezlerindeki epitel hücreler uyarılması ile laktoferrin üretimi yoğunlaşır (Stelwagen ve ark. 2014). Ayrıca yapılan çalışmalar göstermiştir ki, laktoferrin konsantrasyonunun subklinik ve klinik mastitisli ineklerde, sütte önemli ölçüde artmıştır (Hagıwara ve ark. 2003, Chaneton ve ark. 2013).

Laktasyon döneminde, Lf konsantrasyonu, kronik mastitli meme bezlerinde, sağlıklı emziren ineklere göre 7 kat daha fazla bulunmuştur. Akut mastitli ineklerden alınan süt örneklerinde laktoferrin konsantrasyonları, sağlıklı ineklerinkinden 13 kat daha fazla olabilmektedir (Komine ve ark. 2005). Lf konsantrasyonundaki artış bu yüzden mastitis habercisi olabilmektedir (GaLfi ve ark. 2016).

Yapılan bir çalışmada mastitisli olan sütlerdeki Lf ve yanı sıra lizozim, β -defensin ve katilisinler gibi antimikrobiyal peptitler ve proteinlerin konsantrasyonları hızla arttığını göstermiştir (Wheeler ve ark. 2007)

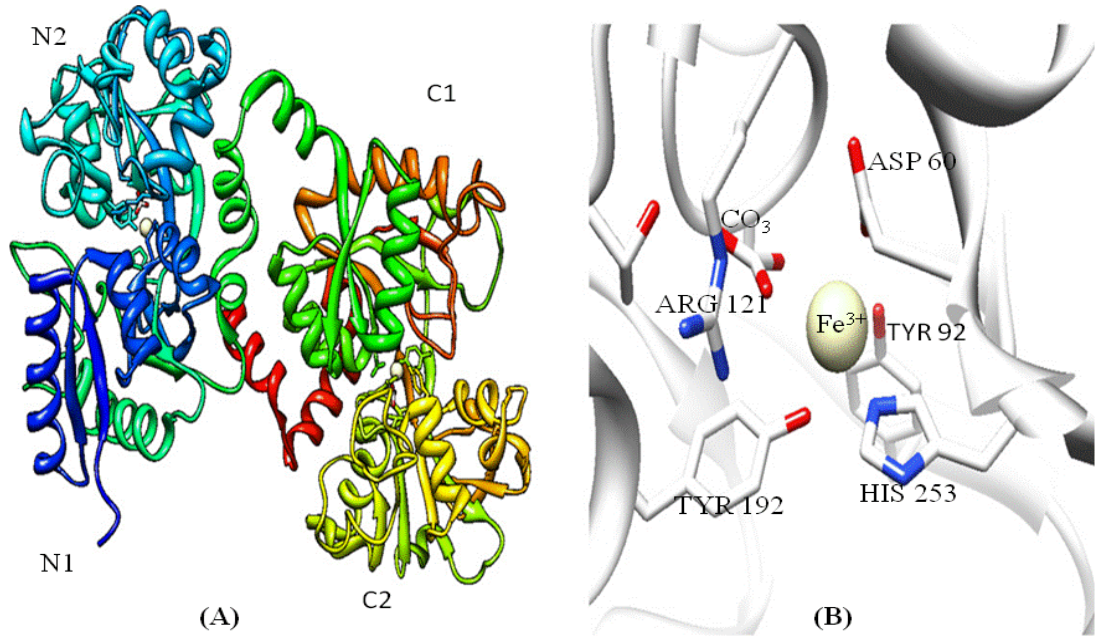
Lf bağışıklık düzenleyici özelliği nedeniyle vücudun savunma mekanizmasında da büyük bir role sahiptir (Levay ve Viljoen 1995). Lf bunların dışında antifungal, antiviral, antikanser gibi birçok özelliğe de sahiptir.(Çizelge 2.1.) Lf, ısı işlem ile denatüre olduğundan

pastörize süt, sığır laktoferrininin saflaştırılması için uygun bir kaynak değildir. Bu nedenle, ısıya maruz kalmamış yağsız süt ve peynir altı suyu Lf'nin kaynağı olarak kullanılabilir (Famaud ve Evans 2003).

Tüm bunların yanı sıra LF, saflaştırılmış sığır LF'si olarak, yeni doğan beslenmesi, yetişkinler için gıda takviye ürünleri, kozmetik ürünleri, fonksiyonel gıdalar, içecekler ve hayvan yemlerinde kullanılmaktadır. diğer yandan çabuk bozulan gıdalarda doğal koruyucu olarak kullanılabilir (Billakanti 2009).

Çizelge 2.1. Laktoferrinin bazı özellikleri (Brock 2002)

Laktoferrinin Bazı Özellikleri	
Antitümör	Demir absorpsiyonu
Antiviral	Antimikrobiyal
Antiinflamatuvar	Antiparazitik
İmmun düzenleyici	Antifungal
Proteaz inhibitörü	Ribonükleaz
Otoantikor	Promikrobiyal



Şekil 2.1. A: Laktoferrinin kimyasal yapısı **B:** Lf demir bağlama bölgesi (García-Montoya ve ark. 2012).

2.3.Laktoferrinin Fizyolojik Özellikleri

2.3.1. Laktoferrinin Antimikrobiyal Özellikleri

Lf mukozal yüzey üzerindeki konumu sebebi ile, organizmayı çoğunlukla mukoza dokuları yoluyla istila eden mikrobiyal ajanlara karşı ilk savunma sistemlerinden birini temsil eder. Lf, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler, virüsler, protozoalar ve mantarlara kadar geniş bir yelpazede enfeksiyöz ajanların büyümesini ve çoğalmasını olumsuz yönde etkilediği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Lf *in vitro* deneylerde ortamdaki demiri kendisine bağlayarak, enfeksiyon bölgesindeki bakteriler tarafından kullanımını sınırlar ve böylece mikroorganizma üremesini ve gelişmesini engellemiş olur. Bu özelliği ile, patojen bakterilerin uzaklaştırılması ve bakteriyel büyümeyi engelleme yeteneği ile ilk tespit edilen özelliklerinden olmuştur (García-Montoya ve ark. 2012).

Düşük pH değerlerinde dahi demirin tutulması, özellikle bakterilerin metabolik aktivitesine bağlı olarak pH'ın 4,5'in altına düşebileceği enfeksiyon ve inflamasyon bölgelerinde çok büyük bir öneme sahiptir (Rana ve ark. 2012). Son zamanlarda ise, demir bağlanma özelliğinden başka Lf'nin N-terminal (laktoferrisinler ve diğerleri; parçalanmamış proteinden daha güçlü) bölgesindeki reseptörler, bazı mikroorganizmaların yüzeyinde de keşfedilmiştir. Lf'nin bu reseptörlere bağlanması, hücre duvarındaki bozulmaya bağlı olarak, lipopolisakaridin (LPS) salınımı ile bozulmuş permeabiliteye ortamdaki lizozim ve diğer antimikrobiyal ajanların etkisini arttırarak daha yüksek bir duyarlılığa yol açar ve Gram-negatif bakterilerde hücre ölümüne neden olur. Bu Lf'nin ikinci bir antibakteriyel mekanizmanın varlığından bahsedilmiştir (Brock 2002, Ling ve Schryvers 2006).

Lf, 1977'de başlangıçta sadece *Streptococcus*'a karşı bakterisidal bir aktivite olarak tarif edilmiş olsa da daha sonra, laktoferrinin *Vibrio kolera*'nın, (Arnold ve ark. 1977) hücre zarını parçalayabildiğini ve hatta penetre ettiğini gösteren çalışmalarla bu durum daha da açığa kavuşturulmuştur. Antibakteriyel etkilerin *in vitro* şartlarda çok sayıda araştırmalar olmasına rağmen, *in vivo* çalışmalar ise halen tartışmalıdır. Diğer yandan Lf'nin oral yoldan verilmesinin, esas olarak mide de bakteriyel ve fungal enfeksiyonları azalttığı yönünde birçok deneysel gözlem vardır (Brock 2002). Bununla birlikte, yakın zamanda farelerde yapılan çalışmada, demir bağlama kabiliyetine dayalı olmamakla birlikte, *Helicobacter* enfeksiyonuna karşı koruyucu bir etki bildirilmiştir. *Helicobacter*'e karşı koruyucu etkisinden dolayı da, bu mikroorganizma ile ilişkili olan mide kanserinin gelişiminin önlenmesinde önemli etkileri vardır (Wang ve ark. 2001, Dial ve Lichtenberger 2002).

Ortamda ki demir eksikliği bakterileri hareket ettirmeye zorlar ve yüzeylere yapışamazlar. Böylece, *in vitro* ortamda Lf, *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu önleyebilir. Hedef hücre membran glikoaminoglikanı ve hedef hücrelere patojen yapışmasını önleyen bakteriyel istilaları bağlayarak, fakültatif hücre içi bakterilerin istilaya karşı savunmasına katkıda bulunabilir. Bu yetenek ilk olarak entero invaziv *E. coli* HB 101 ve daha sonra *Yersinia enterocolica*, *Yersinia pseudotüberküloz*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı bildirilmiştir. Lf'nin bakteriyostatik etkisi, *E. coli* gibi gelişebilmesi için demir gereksinimi olan bakterilerin gelişimini engeller (Rana ve ark. 2012, García-Montoya ve ark. 2012).

Diğer yandan Lf demir verici olarak görev yapabilir. Bununla birlikte, bazı bakterilerin ortama uyum sağlaması için ve Fe^{+3} iyonları için laktoferrin ile rekabet eden sideroforları (bakteri kaynaklı demir şelatlama bileşikleri) serbest bırakarak *Lactobacillus sp.* ve ya Bifido sp. bakterler gibi düşük demir ihtiyacı olan bakterilerin de gelişmesini destekler (Rana ve ark. 2012, García-Montoya ve ark. 2012, Giansanti ve ark. 2016). Lf antibiyotiklerle birlikte, sığır mastitininin tedavisinde de kullanılabileceğini belirtilmiştir (Komine ve ark. 2006, Petitclerc ve ark. 2007).

2.3.2. Laktoferrinin Antiviral Özellikleri

Laktoferrin, *in vitro* sistemlerde, birçok farklı virüsün enfektivitesini azaltabilir. Lf, belirli DNA ve RNA virüslerine bağlanarak antiviral özellik de göstermektedir. Bununla birlikte, antiviral savunmaya katkısı, hücre zarına glikozaminoglikanlara bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu şekilde, Lf virüslerin hücreye girmesini önler ve enfeksiyon erken bir aşamada durdurulmuş olur. Böyle bir mekanizmanın, sırasıyla Herpes simplex virüsü, sitomegalovirüsler ve insan immün yetmezlik virüsü'ne karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Rana 2012).

Lf çeşitli yollarla parazitlere karşı hareket eder. Örneğin, *Toxoplasma gondii* ve *Eimeria stiedai* sporozoitlerinin enfektivitesi, laktoferrisin B'nin inkübasyonundan sonra azaldığı kanıtlanmıştır (Rana 2012).

Konakçı hücreler üzerindeki demir bağlama yeteneğinden ziyade, laktoferrinin asidik moleküllere bağlanma eğiliminin bir sonucu olarak hücre-virüs etkileşimlerinin bloke etmesiyle sağlamaktadır. Örneğin, hem laktoferrin hem de laktoferrisin, sitomegalovirüsün

fibroblastlara girişini bloke ederken, parçalanmamış proteini, hepatit C'yi inhibe eder, bu da virüs nötralizasyonu ile elde edilir (Brock 2002).

İnsanlarda HIV virüsü önemli bir tıbbi sorun olmakla birlikte kesinleşmiş tedavi yönteminin olmaması halen büyük bir sorundur. Çünkü, neden olduğu sendromun güncel tedavileri tamamen etkili değildir. *İn vitro* çalışmalar insan plazma ve süt proteinleri arasında Lf'nin HIV'e karşı güçlü bir aktivite gösterdiğini kanıtlanmıştır. Bu etki, konak hücrede viral replikasyonun engellenmesinden kaynaklanmaktadır (García-Montoya ve ark. 2012).

2.3.3. Laktoferrinin Antifungal Etkisi

Candida, bireylerde mukozal yüzeyleri kolonize edebilir ve aynı zamanda fırsatçı bir patojene dönüşebilen bir komünal organizmaya benzerlik gösterir. İlk defa 1971' de *Candida* spp. ile yapılan bir çalışmada, Lf'nin antifungal etkisini keşfetmiş ve bunu demir bağlama yeteneğinden dolayı olduğunu belirtmişlerdir (Kirkpatrick ve ark. 1971).

İnsan Lf, sığır Lf'ni ve sığır Lf'den üretilmiş laktoferrisin peptidi, *Candida albicans* ve diğer *Candida* türlerine karşı *in vitro* çalışmalarla antifungal etkisi kanıtlanmıştır. Lf'nin hem *C. albicans* hem de *C. krusei*'nin hücre yüzey geçirgenliğini değiştirerek bakterilerde olduğu gibi gelişimlerinin inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

Ayrıca yapılan çalışmalar sığır Lf'nin, *C. glabrata*'nın Lf'ye neredeyse dirençli olduğu gösterilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, Lf demir bağlama özelliğinin *Aspergillus fumigatus*'a karşı konakçınsavunması için önemli olduğunu gösterdi. Ayrıca Lf, *Trichophyton mentagrophytes*'in neden olduğu deri lezyonlarının klinik iyileşmesini kolaylaştıran bir antifungal etki göstermiştir (Wakabayashi ve ark 1999, Zarembler ve ark. 2007).

2.3.4. Laktoferrinin İnflamatuar ve İmmun Sistem Üzerine Etkisi

Laktoferrinin bakteriyel enfeksiyonlarda enflamatuar yanıtların ana araçlarından biri olan bakteriyel endotoksine (lipopolisakkarit, LPS) bağlanabildiği çalışmalarla bildirilmiştir. Bu durumda LPS'nin reseptörler ile etkileşimi bozulur ve inflammatuar etkileri azalır. Laktoferrinin bir başka anti-enflamatuar etkisi, romatoid eklemler gibi iltihaplı hastalıklarda serbest demirin ayrılmasıyla, zararlı serbest radikallerin üretimini engelleme mekanizmasıdır. Sistemik bağışıklığın indüklenmesine ek olarak, Lf cilt bağışıklığını arttırabilir ve alerjik tepkileri önleyebilir. Böylece Lf, Langerhans (beyaz kan hücresi) hücrelerinin göçünü inhibe ederek deri inflamasyonunu azaltmış olur. Lf bu anti-enflamatuar etkileri, nötrofillerden

laktoferrinin salınmasını başlatığı içine, inflamasyondaki nötrofillerin rolünün neden önemli olduğunun kanıtı olabilir (Brock 2002, Baker ve Baker 2005).

Lf'nin pozitif yükü, bağışıklık sisteminin çeşitli hücrelerinin yüzeyindeki negatif yüklü moleküllere bağlanmasını sağlar ve bu ilişkinin, aktivasyon, farklılaşma ve çoğalma gibi hücrel tepkilere yol açan sinyal yollarını tetikleyebileceği de öne sürülmüştür (Brock 2002, Baker ve Baker 2005). Laktoferrin seviyesi, artrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, ülseratif kolit ve periodontitis gibi enflamatuvar hastalıklarda sürekli olarak yükseldiği bildirilmiştir (Fine 2015).

Hayvan deneylerinde, laktoferrinin koruyucu bir moleküldür. Deney farelerindeki oral mikrobiyal patojenlerin sebep olduğu enflamasyonlu hastalığı Lf takviyesi ile iyileştirebildiğini göstermişlerdir (Velusamy ve ark. 2013). Ayrıca, laktoferrin, *S. aureus*'u öldürerek ve enflamatuvar etkilerini modüle ederek ve bundan kaynaklı eklem inflamasyonunu azaltabilmiştir (Guillen ve ark. 2000).

2.3.5. Laktoferrinin Antiparazit Etkisi

Lf'nin antimikrobiyal aktivitelerinin açıkça ortaya koymak, Lf'nin etki mekanizması ve mikroorganizmaların ekolojik davranışlarının organizmalarda farklılıklar göstermesi nedeniyle hiç de kolay olmamıştır. Yapılan sayısız çalışmaya rağmen hala açıklanması gereken birçok durum mevcuttur. Lf antiparaziter aktivitesinin moleküler mekanizmaları daha da karmaşıktır.

Yapılan bir çalışmada, 5 yaşından küçük çocuklarda ishalin önde gelen nedenlerinden biri olan Entamoeba histolytica'ya karşı, Apo-Lf, *in vitro* ortamda en büyük amibisidal etkiye sahip süt proteini olduğu bildirilmiştir. Apo-Lf trofozoit membranındaki lipidlere bağlanarak parazitin gelişmesini inhibe eder (León-Sicairos ve ark. 2006).

Diğer *in vitro* çalışmalar, insan ve sığır Lf'nin yanı sıra serum transferrin'in de toksoplazmoza neden olan hem insanları hem de hayvanları etkileyen hücre içi parazit olan *Toxoplasma gondii*'yi bağlayarak hücre içi büyümesini engellediğini kanıtlamışlardır (García-Montoya ve ark. 2012).

2.3.6. Laktoferrinin Antitümör Etkisi

Lf'nin anti-tümör özellikleri ilk olarak sığır laktoferrinin kemirgenlere oral yoldan verildiğinde kimyasal olarak indüklenen tümörjenezini önemli ölçüde azalttığını gösteren çok

sayıda laboratuvar çalışması ile keşfedilmiştir. Bu durumda Lf bir takviye olarak alındığında kanseri önleme düşüncesini akıllara getirmiştir. İnflamasyondaki rolüne benzer şekilde Lf, kanserde sitokin (antikarsinojenik etki) üretimini modüle etme yeteneğine sahiptir. Son zamanlarda, hayvan modellerinde kolorektal kanser sığır Lf tarafından inhibe edildiği ve bir klinik çalışma ile kolon kanser riskini azalttığı gösterilmiştir (Nakajima ve ark. 2011).

Meme kanserinde Lfnin, kültür ortamına ekzojen eklenmesi ile tümör hücrelerinin büyümesini sınırlandırabilir ve G1/S geçişinde göğüs kanseri hücre dizilerinin (MDA-MB-231) hücre döngüsünün durdurduğu çalışmalarca kanıtlanmıştır (Damiens ve ark. 1999).

Oral olarak uygulanan holo-bLf, doza bağımlı olarak, kemoterapi ile birlikte önemli ölçüde daha yüksek kanser hücresi ölümü (apoptoz) ve farelerde sitotoksositeye yol açan meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçların kemoterapötik etkilerini geliştirdiği deneylerle gösterilmiştir (Sun ve ark. 2012). Kanser tedavisinde bu proteinin kullanımını içeren klinik deneyler devam etmektedir ve bilinen antikanser ilaçlarla karşılaştırıldığında Lf ve türevlerinin nispeten düşük sitotoksitesi, etki mekanizmaları hakkında veri eksikliği ile birlikte muhtemelen kanser tedavisinde klinik kullanımın teşvik edilmesine yol açmaktadır (Giansanti ve ark. 2016).

2.4. Farklı Sütlerdeki Laktoferrin Miktarı Üzerine Yapılan Araştırmalar

Roberts ve Boursnell (1975), izole edilen protein miktarına dayalı olarak laktoferrin miktarının, tüm süt konsantrasyonuna oranını 6 mg.mL^{-1} olarak tespit etmişlerdir.

Laurie ve Bo (1986), maymun ve insan sütünde rocket immunoelectrophoresis ile laktoferrin miktar belirlemesi amacıyla yaptıkları çalışmada, ortalama Lf değerini maymun sütünde $1,73 \text{ mg.mL}^{-1}$ ve insan sütünde ise $1,82 \text{ mg.mL}^{-1}$ düzeyinde belirleyerek maymun ve insan sütünün benzer laktoferrin konsantrasyonlarına sahip olduğunu göstermişlerdir.

Doğumdan sonra 30 gün boyunca manda, inek (yerel, friesian, Brown-swiss ırkları) keçi, koyun (rahmani ve ossemi ırkları) ve deve sütlerinin laktoferrin konsantrasyonları SDS-PAGE ile saflaştırılmış ve RP-HPLC'de incelenmiştir. Manda sütlerinde 0-2. gün arasında $2,10 \text{ mg.mL}^{-1}$ olarak belirlenirken 15-30. günler arasında ise bu değer $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. İnek sütlerinde ise bu değerlerin yerel ırkta $0,84 \text{ mg.mL}^{-1}$ (0-2. gün), $0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$ (15-30.gün), friesian ırkında $4,21 \text{ mg.mL}^{-1}$ (0-2.gün), $0,28 \text{ mg.ml}^{-1}$ (15-30.gün), Brown-swiss $0,64 \text{ mg.ml}^{-1}$ (0-2.gün), $0,07 \text{ mg.mL}^{-1}$ (15-30.gün) olarak; keçi sütlerinde $3,10 \text{ mg.mL}^{-1}$ (0-2.gün), $0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$ (15-30.gün) değerinde; Rahmani ırkı koyun sütlerinde $1,56$

mg.mL⁻¹ (0-2.gün), 0,14 mg.mL⁻¹ (15-30.gün), Ossemi ırkı koyun sütünde 0,8 mg.mL⁻¹ (0-2.gün), 0,09 mg.mL⁻¹ (15-30.gün); deve sütlerinde ise 5,10 mg.mL⁻¹ (0-2. gün), 2,48 mg.mL⁻¹ (15-30. gün) olarak bulunmuştur (El-Gawad ve ark. 1996).

Gicianti ve ark. (2013) Laktasyon periyodu süresince manda sütlerinde laktoferrin içeriğinin belirlenmesi amacıyla 225 manda sütü ile yaptıkları çalışmada laktoferrin konsantrasyonunu SDS-poliakrilamide jel elektroforezi ile 0,030 g.kg⁻¹ ile 0,813 g.kg⁻¹ arasında değiştiği ortalama olarak ise 0,332±0,165 g.kg⁻¹ olarak tespit etmişlerdir. İlk 50-60. günlerde de Lf miktarının en düşük düzeyde (0,207±0,173 g.kg⁻¹) olduğunu tespit etmişlerdir. Laktasyon sonunda ise en yüksek değerine ulaştığı (0,503±0,135 g.kg⁻¹) belirlenmiştir.

Ankara tiftik keçilerinde ELİSA yöntemi ile laktasyon süresince ortalama laktoferrin miktarları süte 39,43 ile 63,97 µg.mL⁻¹, seumda ise ve 2,17-3,08 µg.mL⁻¹ arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Avcı ve Sel 2004).

Adam ve ark.(2008), tarafından yapılan çalışmada ineklerin doğumdan sonraki belirli zaman aralıklarında (1, 6, 12, 24, 36, 48, 60 ve 72 saat) toplanan kolostrum süt örneklerine gerekli ön işlemler yapıldıktan sonra UV-VIS detektörü, ile birleştirilen sıvı kromatografi (LC-UV-VIS) ile analiz edilerek, laktoferrin konsantrasyonu kolostrum sütlerinde 0,5 g.L⁻¹ ile 1,1 g.L⁻¹ arasında olduğu rapor edilmiş ve ortalama konsantrasyonun ise 0,6 g.L⁻¹ olarak hesaplanmıştır. En yüksek laktoferrin konsantrasyonu ise doğumdan 24 saat sonra toplanan numunede belirlemiştir.

Dračková ve ark (2009),çiğ ve teknolojik işlem uygulanmış sütlerdeki değişimi incelemek amacıyla, laktasyon boyunca 24 adet çiğ keçi sütü örneği ve 24 adet pastörize keçi sütü örneği almış, PR-HPLC ile laktoferrin miktarları belirlemiştir. Yapılan çalışmada çiğ keçi süt örneklerinde en yüksek laktoferrin konsantrasyonu 149±19 µg.mL⁻¹ iken en düşük konsantrasyon 98±170 µg.mL⁻¹ ortalama laktoferrin konsantrasyonu 120±18 µg.mL⁻¹ olarak bildirilmiştir.. Pastörize (72°C, 20 s) edilmiş keçi sütlerinde ise en yüksek konsantrasyonun 103±17 µg.mL⁻¹ en düşük konsantrasyon 87±12 µg.mL⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada Laktasyonun 100. ve 200. günleri arasındaki farklı inek ırklarından alınan süt örneklerinin laktoferrin düzeyleri RP-HPLC ile belirlenmiş, laktoferrin konsantrasyonları Polish kırmızı ineklerin 128,7 mg.L⁻¹, beyaz sırtlı (Whitebacked) ineklerin 115,2 mg.L⁻¹, Polish Kızıl-beyaz ineklerin 120,9 mg.L⁻¹, beyaz Holstein-Friesian inek sütlerinde 91,4 mg.L⁻¹ olarak belirlemiştir (Król ve ark 2010).

Jersey ve Polish Holstein–Friesian ırklarına ait doğumdan sonraki 1 saat içinde ilk sağım yapılmış ve 256 kolostrum süt örneğinde ELISA ile belirlenen laktoferrin içeriği, Jersey ırkına ait sütlerde Lf miktarı $2,65 \text{ mg.mL}^{-1}$ olarak, Polish Holstein–Friesian da ise $1,36 \text{ mg.mL}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir (Sobczuk-Szul ve ark. 2013).

Yapılan bir başka çalışmada ise, sağlıklı ve enfekte olmuş hayvanlardaki değişim gözlenmek amacı ile, 20 sağlıklı koyun ile 23 mastitisli koyun sütlerinde ELISA ile laktoferrin içeriği belirlenmiştir. Kontrol grubunda Lf konsantrasyonu $16,84 \pm 1,29 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, mastitisli grupta ise $23,98 \pm 3,45 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, olarak belirlenmiştir (Nisbet ve ark 2013).

Keçi (Peranakan Etawah, Saanen ve jawarandu) kolostrum sütlerinde doğumu takiben ilk 8 gün (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7. ve 8. gün) süresince SDS-PAGE yöntemiyle laktoferrin miktarlarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, 1.ve 8. gün laktoferrin miktarları sırasıyla, Peranakan Etawah $156,36 \pm 107,66 \text{ mg.L}^{-1}$ - $41,24 \pm 1,22 \text{ mg.L}^{-1}$ Saanen $207,39 \pm 58,94 \text{ mg.L}^{-1}$ - $32,25 \pm 2,20 \text{ mg.L}^{-1}$ ve Jawarandu $197,39 \pm 58,94 \text{ mg.L}^{-1}$ - $25,22 \pm 2,21 \text{ mg.L}^{-1}$ olarak tespit etmişlerdir (Rachman ve ark 2015).

Hayvan beslenmesinin laktoferrin üzerine etkisi gösterilmek amacıyla İntensive sistem ve konvensiyonel sistem de laktasyon I(<120), II(121-200), III(201-305) süresince 1846 adet inek sütünde laktoferrin miktarı değişimi RP-HPLC ile belirlenmiştir. İntensive sistemde, I. laktasyonda $103,47 \text{ mg.L}^{-1}$, II. laktasyonda $110,92 \text{ mg.L}^{-1}$ ve III. laktasyonda $112,48 \text{ mg.L}^{-1}$ olarak, ortalama $109,5 \text{ mg.L}^{-1}$ olarak belirlenmiş olup, konvensiyonel sistemde I. laktasyonda $112,68 \text{ mg.L}^{-1}$, II. laktasyonda $122,13 \text{ mg.L}^{-1}$, III. laktasyonda $134,28 \text{ mg.L}^{-1}$ ortalama $123,05 \text{ mg.L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Brodziak ve ark 2015).

Mevsimlerin değişimlerinin etkisinin belirlemek amacıyla İlkbahar, yaz ve kış dönemlerinde 40'ar adet inek sütü laktoferrin miktarı ELISA ile yapılan çalışmada, ilkbahar, yaz ve sonbaharda laktoferrin miktarı sırası ile $0,12 \pm 0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,03 \pm 0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ve $0,03 \pm 0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Sağlıklı ve hasta hayvanlardan alınan süt örneklerinde ise Lf miktarı sırasıyla $0,03 \pm 0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,08 \pm 0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Museyeva 2016).

Yapılan bir başka çalışmada, ilk laktasyondan rastgele 10 inek sütü toplanarak HPLC ile laktoferrin miktarları tespit edilmiştir. kolostrum sütünde $732,78 \pm 28,03 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ 2. hafta $604,60 \pm 23,94 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ 4. hafta $541,11 \pm 19,20 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ 6. hafta $402,67 \pm 17,87 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ 8. hafta $350,31 \pm 16,24 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Alkudsi ve Hussein 2016).

3. MATERYAL VE METOD

3. 1. Materyal

3.1.1. Manda Kolostrum ve Laktasyon Süt Örnekleri

Araştırma materyali olan manda kolostrum sütü ile manda laktasyon sütü, İstanbul Silivri-Çatalca bölgesinde yetiştirilen bakım ve besleme koşulları bakımından benzer, doğumdan itibaren 150 gün takip edilen 20 baş mandadan temin edilmiştir. Kolostrum sütü mandanın doğumundan itibaren 7 gün süre ile, laktasyon sütü ise 30. günden itibaren ayda bir kez olmak üzere 150 gün (5 ay) düzenli olarak sabah sağımından 100 mL'lik kaplara alınarak soğuk zincir içinde Namık Kemal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Laboratuvarına getirilmiştir. Kolostrum ve laktasyon süt örnekleri iki kısma ayrılarak 1. Kısımda kimyasal analizler yapılmak üzere, sütler su banyosunda 40°C'de ısıtıldıktan sonra kuru madde, yağ, protein ve laktoz değerleri tespit edilmiştir. 2 kısım süt (50 mL) ise laktoferrin analizi yapılmak üzere -20°C'de dondurularak muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan alet ve ekipmanlar

pH Metre	Hanna Instruments
Derin dondurucu (-20°C)	Uğur
Manyetik Karıştırıcı-Isıtıcı	Heidolph/ MR-Hei-Standard
Vortex	Firlabo
Gerber Santrifüj	Funke
Soğutmalı Santrifüj	Universal 32R Hettich Centrifuge, Germany
Mikropipet	Microlit
Deiyonize su cihazı	Millipore
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi HPLC	Shimadzu Japonya
Otomatik numune örnekleyici	SIL-20AC
Dedektör Shimadzu UV dedektör	SN: L201353
C18 Analitik kolon	Intersil ODS-3, 4,6 × 250 mm, 5 µm ID
HPLC vialı	Amber renkli mavi kapaklı (2mL'lik)
Selüloz asetat membran filtre	porçapı 0,22µm, Millipore, Fransa

3. 1. 3. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Formülü	Firma	Katalog No.
Sülfürük asit (%98)	H ₂ SO ₄	Merck	0007664939
Sodyum Hidroksit	NaOH	Merck	0001310732
Asetonitril	CH ₃ CN	Merck	0000075058
Triflorasetikasit	CF ₃ COOH	Merck	0000076051
Hidroklorik asit (%37)	HCL	Merck	0007647010
Laktoferrin Standardı (L9507-50MG)		Sigma Adrich	146897689

3.1.4.Laktoferrin Standardı

Araştırmada laktoferrin miktarının belirlenmesinde kullanılan laktoferrin (L9507-50MG) standardı 50 mg olarak toz formda Sigma Aldrich'den temin edilmiş, analize alınıncaya kadar buzdolabı koşullarında (+4°C) muhafaza edilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Kuru Madde Analizi

Laktasyon ve kolostrum sütlerinin kuru madde içeriği, gravimetrik yöntemle sabit ağırlığa getirilen kaplara tartılan sütlerin 100±5 °C 'de 1 saat etüvde kurutulması ile aşağıdaki formül ile hesaplanarak % kuru madde olarak belirlenmiştir.

$$\text{Kurumadde (\%)} = \frac{\text{Kurumadde (g)}}{\text{Örnek ağırlığı (g)}} \times 100$$

3.2.2. Protein Analizi

Mikro kjeldahl metoduyla belirlenen % azotun 6,38 katsayısı ile çarpılarak % protein olarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\%N = \frac{[0,014 \times N \times (V1 - V2) \times 100]}{M}$$

V1 = Titrasyonda harcanan HCl asit çözeltilisi in hacmi (mL)

V2 = şahit deneyde titrasyonda harcanan HCl asit çözeltilisinin hacmi (mL)

N = Ayarı yapılan hidroklorik asit çözeltilisinin derişimi (mL)

M = Alınan örneğın ağırlığı (g)

3.2.3. Yağ Analizi

Manda sütlerinde % yağ miktarı gerber metoduna göre, bütirometre içerisine konulan 11 ml süt üzerine yoğunluğu 1,820 g/cm³ sülfürik asitten 10 mL ve 1 mL saf amil alkol ilave edilerek, 1200 devirde 5 dakika santrifüj edilerek bütirometre skalasından okunan yağ miktarı % olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. Laktoz Analizi

100 mL'lik balon jojeye 75 g manda sütü alınarak proteinleri çöktürmek amacıyla 2 mL karez 1 ve karez 2 çözeltilerinden ilave edilmiştir. Daha sonra 1 mL laktik asit ilave edilip su ile hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. İyice karıştırıldıktan sonra süzgeç kağıdından süzülen, süzüntüden 200 mm'de polarimetrede laktozun ortalama spesifik 52.53^o çevirme açısı kullanılarak aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$\text{Laktoz} = \frac{a \times 100}{52,53 \times 2}$$

a= okunan çevirme açısı

3.2.5. Asitlik (pH) Analizi

Manda süt örneklerinin pH değerleri oda sıcaklığında dijital pH-metre (HANNA tipi HI 211, Microprocessor pH meter, Germany) kullanılarak pH elektrodunun süt örneklerine daldırılması ile belirlenmiştir.

3.2.6. Titre Edilebilir Asitlik (% LA) Analizi

Manda süt örneklerinin titre edilebilir asitliği, % laktik asit cinsinden fenolftalein indikatörü eşliğinde 0,1N NaOH ile titre edilerek AOAC 945.46 (2007)'ye göre belirlenmiştir.

$$\text{Asitlik (\%)} = \frac{V \times N \times 0,09}{\text{Önek Miktarı}} \times 100$$

V: Titrasyonda harcanan alkali (mL),

N: Alkalinin normalitesi,

E: Laktik asidin miliekivalan ağırlığı,

M: Alınan örnek miktarı (mL)

3.2.7. Manda Kolostrum ve Laktasyon Sütünde Laktoferrin Miktarının HPLC ile Belirlenmesi

3.2.7.1.HPLC Şartları

Laktoferrinin kromatografik analizi UV dedektörlü (Shimadzu UV dedektor SN: L201353), otomatik enjektörlü (SIL-20AC) ters fazlı Yüksek Performanslı Sıvı kromatografisi (Reversed-Phase High-performance liquid chromatography (RP-HPLC)) (Shimadzu, Japonya) sistemi ile Inertsil ODS-3 C18 RP-HPLC kolon (4,6 cm x 250 mm x 5 µm patikül büyüklüğü) kullanılarak 40°C'de 205 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Mobil faz olarak; Mobil faz A: % 90 ultra saf su,% 10 asetonitril ,% 0,1 trifloroasetik asit (TFA), Mobil faz B: % 90 asetonitril,% 10 ultra safsu ve % 0,1 TFA kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi standart ve numune çözeltileri için 20 µl, akış oranı 1,0 mL.dk⁻¹ olarak ayarlandı HPLC mobil faz akış profili Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge3.3. HPLC mobil faz akış profili

Zaman (dk)	Mobil faz A (%)*	Mobil faz B (%)*	Akış hızı (mL.dk ⁻¹)
0-1	80	20	1
5	70	30	1
10	50	50	1
15	30	70	1
20	50	50	1

*A: water/acetone/trifluoroacetic acid (90:10:0.1)
*B: water/acetone/trifluoroacetic acid (10:90:0.1)

3.2.7.2.Standart Laktoferrin Çözeltisinin Hazırlanması

Laktoferrin tayini için kromatografik sistemin kalibrasyonu dış standart yöntemle (external standard method) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, sığırlar laktoferrin standardı (L 9507-50 MG) Sigma Adrich (USA) temin edilmiştir. Bu standarttan ultra saf su ile çözündürülerek 10, 50, 75, 100 ve 125 mg.L⁻¹ olmak üzere 5 farklı konsantrasyonlarda hazırlanan laktoferrin çözeltileri şırınga yardımıyla 0,22 µm' lik selüloz asetat membran filtreden geçirilerek standart kalibrasyon kurvesi için HPLC'ye verilmeye hazır hale getirilmiştir.

3.2.7.3.Kalibrasyon kurvesinin hazırlanması

Laktoferrin kalibrasyon kurvesinin çizilmesi, hazırlanan standartlardan 20 µl, HPLC enjektörü ile çekilerek cihaza 3'er kez verilmesi sonucu alıkonma zamanları ve her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanları cihazın yazılımı (Yazılım Labsolution) aracılığı ile belirlenerek hazırlandı.

3.2.7.4.Laktoferrin Belirlenmesi ve Örneklerin Hazırlanması

Manda kolostrum ve laktasyon süt örneklerinin hazırlanması ve UV detektörlü ters faz Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) ile laktoferrin miktar tayini için örnek hazırlanması Krol ve ark (2012) göre modifiye edilerek yapıldı. Bu amaçla -20°C'de depolanan kolostrum ve laktasyon süt örnekleri bir gece boyunca 4°C'de bekletilerek çözümleri sağlandı. Daha sonra yağın ayrılması için 50 ml'lik falkon tüpüne 40 ml süt örneği alınarak 4000 rpm' de 20 dk 4 °C de santrifüj (Universal 32R Hettich Centrifuge, Germany) edildi, oluşan yağ tabakası spatula ile ayrıldı. Elde edilen yağsız kolostrum ve laktasyon süt örneklerinde kazeinin çöktürülmesi için pH 4,6'ya kadar kademeli olarak 1 N HCL ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek kazeinin çökmesi sağlandı. Daha sonra süpernatantdan (serum) 20 mL alınarak 10.000 rpm de 4 °C de 30 dk santrifüj edildi. pH'sı 1N NaOH ile pH 7'ye ayarlanarak 0.22 µL selüloz asetat filtrelerden (Millex, Millipore Millex, Bedford, MA, USA) geçirildi, viallere alınarak enjeksiyon aşamasına kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.8. Metod Validasyon Parametreleri

Metodun validasyonu doğruluk, geri kazanım, kesinlik, doğrusalılık, tespit (LOD) limiti ve tayin (LOQ) limiti parametreleri göz önünde bulundurularak yapılmıştır (FDA, 2014)

Doğrusallık (Linearity): Metodun doğrusallığı ve aralığı değerlendirmek için, laktoferrinin beş farklı konsantrasyonları (10, 50, 75, 100 ve 125 mg.L⁻¹) hazırlanan ve her bir standart üçer tekrar ve her bir tekrar üçer defa okutularak ardışık olmayan üç farklı günde konsantrasyona karşı alan grafiği elde edilerek doğrusallık test edilmiştir.

Doğruluk (Accuracy): Metodun tespit limitinde ve daha yüksek düzeyde olmak üzere iki doğruluk seviyesi belirlenerek her bir konsantrasyon için ortalama, standart sapma ve bağıl hata değerleri hesaplanarak belirlendi. (n=10)

Geri kazanım (Recovery): Standart laktoferrin ve örneğin zenginleştirilmesi ile yapılan % geri kazanım değeri olan % R aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$R(\%) = \frac{L_T - L_S}{L_A} \times 100$$

L_T=Standart eklendikten sonraki toplam Laktoferrin konsantrasyonu

L_S=Süt örneğindeki Laktofeerin konsantrasyonu

L_A=İlave edilen Laktoferrin konsantrasyonu

Kesinlik (Precision): Beş farklı konsantrasyondaki laktoferrin standart solusyonunun üç'er kez cihaza enjekte edilmesiyle kaydedilen pik alanlarından her bir konsantrasyon için %RSD (Relative Standard Deviation) değeri aşağıdaki formül ile hesaplanarak belirlendi.

$$\%RSD = \frac{\text{Standart sapma}}{\text{Ortalama}} \times 100$$

Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ): Tespit limiti LOD ve tayin limit LOQ'ları laktoferrinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri analiz edilerek ve sinyal-gürültü oranı (S/G) ölçülerek belirlenmiştir. LOD için S/G oranını 3 katı alınarak, LOQ için S/G oranının 10 katı alınarak aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır

$$LOD = 3 \times \frac{\text{Sinyal}}{\text{Gürültü}}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{\text{Sinyal}}{\text{Gürültü}}$$

Hesaplama: Manda kolostrum ve laktasyon süt örneklerinden 0,22-µl selüloz asetat filtrelerden geçirilerek hazırlanan süzüntüde laktoferrin miktarı, standart çözelti ve numunelerin pik alanları karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Örnekteki laktoferrin pikinin alanı,

standart ile oranlanarak miktar tayini yapıldı. Laktoferrin miktarı örneklerde mg.L⁻¹ cinsinden aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Laktoferrin (mg. L}^{-1}\text{)} = \frac{A_N}{A_S} \times C_S$$

A_N= Süt örneğine ait laktoferrin pikinin alanı

A_S= Standart laktoferrin çözeltisine ait laktoferrin pikinin alanı

C_S= Standart laktoferrin çözeltisinin konsantrasyonu

3.3.Verilerin Değerlendirilmesi

Analiz verilerinin ortalama ± standart sapma değerleri 15.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Kolostrum Sütü Analiz Sonuçları

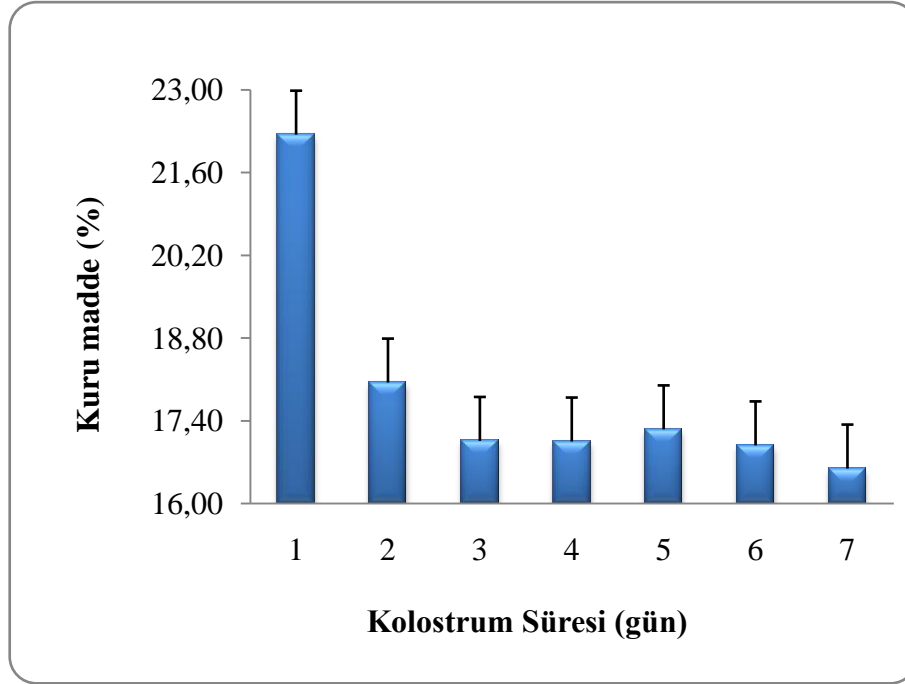
4.1.1. Kolostrum Sütü Kuru Madde Analiz Sonuçları

1-7 gün arasında alınan manda kolostrum sütleri % kuru madde içeriğindeki değişimi Çizelge 4.1. 'de, grafik ise e Şekil 4.1. 'de verilmiştir. Kolostrum süt örneklerinin en yüksek ortalama kuru madde değeri 1. günde bulunurken (% 22,24), en düşük 7. günde % 16,59 olarak belirlenmiştir. Genel olarak manda sütü örnekleri kuru madde içeriği % 15,00 ile % 25,20 arasında değişim göstermiştir.

Coroian ve ark. (2013), kolostrum sütlerinde (1.-7. gün) yaptığı çalışmada, yaz mevsiminde kolostrum sütünün 1. gününde kuru madde miktarı % 25,31 olarak bulurken 7. gününde % 19,01 olarak tespit etmişlerdir. Kış mevsiminde ise bu değerler kolostrumun 1. gününde % 25,25 bulunurken 7. gününde % 18,97 olarak belirlemişlerdir. Yaptığımız analiz sonuçları benzer bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Kolostrum sütü kuru madde sonuçları (%)

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
1	25,20	20,01	22,24±1,77
2	20,36	15,90	18,04±1,65
3	18,90	15,00	17,06±1,09
4	18,52	15,69	17,05±0,92
5	19,42	16,14	17,25±0,98
6	18,97	15,61	16,98±1,01
7	18,02	15,18	16,59±0,96



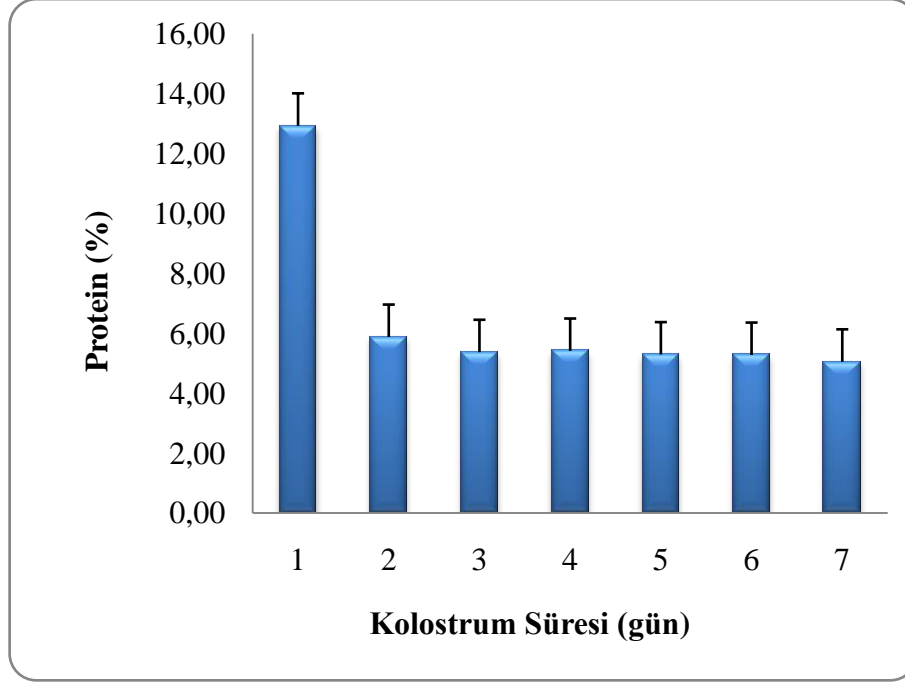
Şekil 4.1. Kolostrum sütü kuru madde değerleri

4.1.2. Kolostrum Sütü Toplam Protein Analiz Sonuçları

1-7 gün arasında alınan manda kolostrum sütlerinin % toplam protein içeriğindeki değişimi Çizelge 4.2. 'de verilmiştir. Kolostrum süt örneklerinin en yüksek ortalama toplam protein değeri 1. günde bulunurken (% 12,92), en düşük 7. günde (% 5,04) belirlenmiştir. Genel olarak kolostrum süt örnekleri toplam protein içeriği % 14,57 ile % 4,41 arasında değişim göstermiştir. Kolostrum süt örneklerinin % toplam protein içeriklerine ait grafik ise Şekil 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kolostrum sütü protein sonuçları (%)

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
1	14,57	11,30	12,92±1,30
2	6,45	5,37	5,87±0,38
3	5,85	4,76	5,36±0,38
4	5,91	4,83	5,40±0,36
5	5,86	5,02	5,28±0,27
6	5,83	5,01	5,27±0,26
7	5,86	4,41	5,04±0,46



Şekil 4.2. Kolostrum sütü protein değerleri

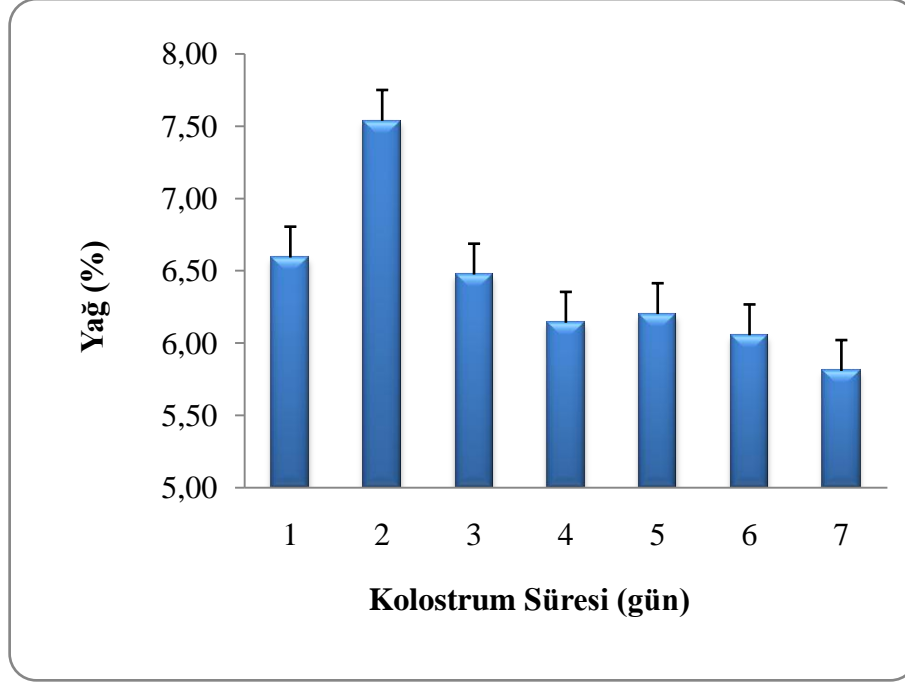
Yapılan çalışmalarda, Abd El -Fattah ve ark. (2012), Manda sütü kolostrumunda ilk 14 günü incelemişler ve incelemeler sonucunda toplam protein miktarını ortalama olarak % 13,46 olarak bildirmişlerdir. Muhammed (2009)'in yaptığı çalışmada, kolostrum 1. gününde toplam protein % 17,36 iken 7. Gününde, % 4,84 olarak tespit etmiştir.

4.1.3. Kolostrum Sütü Yağ Analiz Sonuçları

1-7 gün arasında alınan manda kolostrum sütlerinin % yağ içeriğindeki değişimi Çizelge 4.3. 'de verilmiştir. Kolostrum sütlerindeki % yağ değerleri % 8,90 ile % 5,17 arasında değişim göstermektedir.

Çizelge 4.3. Kolostrum sütü yağ sonuçları (%)

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
1	7,34	5,88	6,59±0,46
2	8,90	6,78	7,54±0,84
3	7,58	5,28	6,47±0,65
4	6,60	5,57	6,14±0,39
5	6,80	5,64	6,20±0,39
6	6,58	5,24	6,05±0,48
7	6,49	5,17	5,81±0,50



Şekil 4.3. Kolostrum sütü yağ değerleri

Kolostrum süt örneklerinin en yüksek ortalama yağ değeri 2. günde bulunurken (% 7,54), en düşük 7. günde (% 5,81) olarak belirlenmiştir. Kolostrum süt örneklerinin ortalama % yağ içeriklerine grafik ise Şekil 4.3. 'de verilmiştir.

Ashmawy (2015)'in yaptığı çalışmada, 1.gün kolostrum sütünde toplam yağ % 6,32 bulunurken doğumdan 1 hafta sonra toplam yağ miktarı % 6,61 olarak tespit etmiştir. Singh ve Pathak (2013)'in yaptığı çalışmada sabah sütününün 1. günde toplam yağ % 5,53 olarak bulunurken 7. günde % 6,76 olarak tespit edilmiş, genel olarak ortalama yağ miktarı % 4,54 - % 8,76 olarak bildirilmiştir.

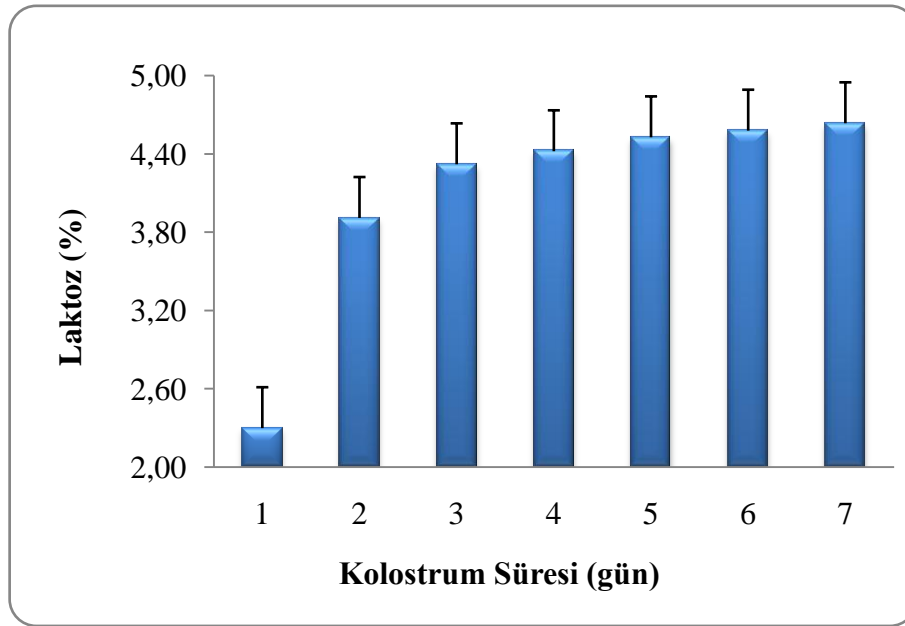
4.1.4. Kolostrum Sütü Laktoz Analiz Sonuçları

Manda kolostrum süt örneklerinin 1-7 gün arasında % laktoz içeriğindeki değişimi Çizelge 4.4. 'de verilmiştir. % laktoz miktarları % 4,97 ile % 1,73 arasında değişmektedir. Kolostrum süt örneklerinin en yüksek ortalama % laktoz değeri 7. günde bulunurken (% 4,63), en düşük 1. günde (% 2,30) olarak belirlenmiştir. Genel olarak manda sütü örnekleri laktoz içeriği % 4,97 ile % 1,73 arasında değişim göstermiştir. Manda kolostrum süt örneklerinin ortalama % laktoz içeriklerindeki değişime ait grafik ise Şekil 4.4. 'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kolostrum sütü laktoz sonuçları (%)

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
1	3,12	1,73	2,30±0,45
2	4,19	3,50	3,91±0,24
3	4,69	3,94	4,32±0,23
4	4,68	4,09	4,42±0,20
5	4,75	4,35	4,53±0,15
6	4,82	4,33	4,58±0,15
7	4,97	4,22	4,63±0,25

Yapılan çalışmalar doğrultusunda; Abd El -Fattah ve ark. (2012) Manda sütü kolostrumunda ilk 5. güne kadar laktoz miktarının arttığı 14. güne doğru ise azalarak normal süt konsantrasyonuna ulaştığını belirtmişlerdir. Singh ve Pathak (2013)'ün yaptığı çalışmada kolostrum sütünde ortalama olarak % laktoz miktarı % 2,54 ile % 4,90 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Muhammed (2009)'ün yaptığı çalışma sonucu % laktoz miktarı kolostrum sütünün 1. gününde % 3,26 bulunurken 7. gününde % 4,89 olarak tespit etmişlerdir.



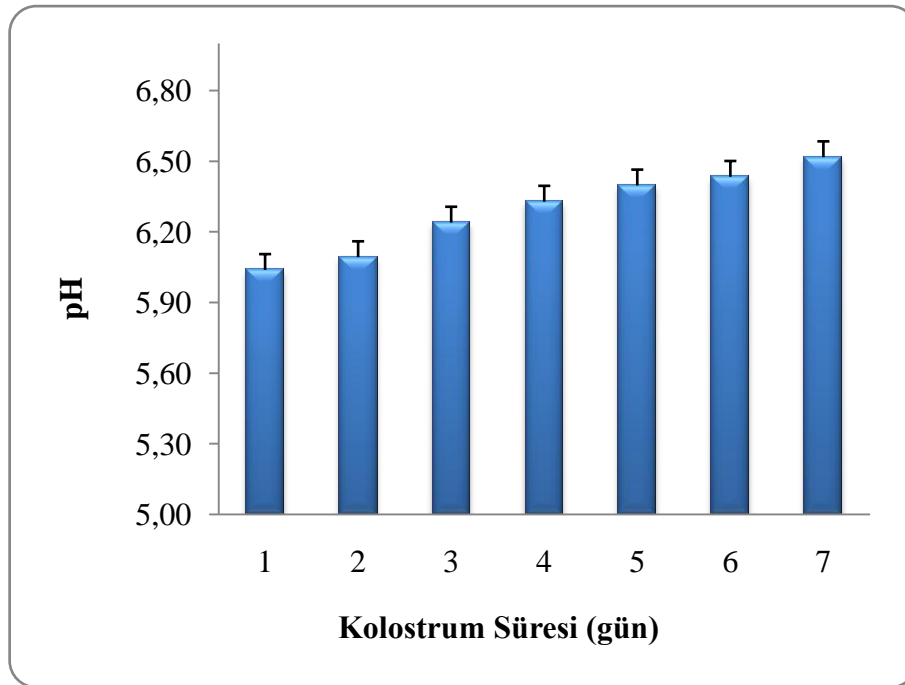
Şekil 4.4. Kolostrum sütü laktoz değerleri

4.1.5. Kolostrum Sütü pH Asitlik Analiz Sonuçları

Çizelge 4.5. Kolostrum sütü pH asitlik sonuçları

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
1	6,10	6,0	6,04±0,03
2	6,17	6,03	6,09±0,04
3	6,28	6,14	6,24±0,04
4	6,38	6,26	6,33±0,04
5	6,47	6,35	6,40±0,04
6	6,51	6,39	6,43±0,04
7	6,55	6,45	6,52±0,03

Manda kolostrum süt örneklerinin 1-7 gün arasında pH içeriğindeki değişimi Çizelge 4.5. 'de verilmiştir. Kolostrum süt örneklerinin en yüksek ortalama pH değeri 7. günde bulunurken (6,52), en düşük 1. günde (6,04) olarak belirlenmiştir. Genel olarak manda sütü örnekleri pH 6,0 ile 6,55 arasında değişim göstermiştir. Manda sütü örneklerinin pH değerleri değişimine ait grafik ise Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Kolostrum sütü pH asitlik değerleri

Yaz kolostrum sütünde yapılan çalışmalarda, en düşük pH değeri 1. gün 6,01 olarak bulunurken en yüksek 7. gün 6,63 olarak tespit edilmiştir Coroian ve ark. (2013). Yine aynı çalışmada kış mevsiminde ise kolostrum sütlerinde en düşük pH değeri 1. gün 6,00 olarak bulunurken en yüksek 7. gün 6,55 olarak tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçları değerlendirildiğinde benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

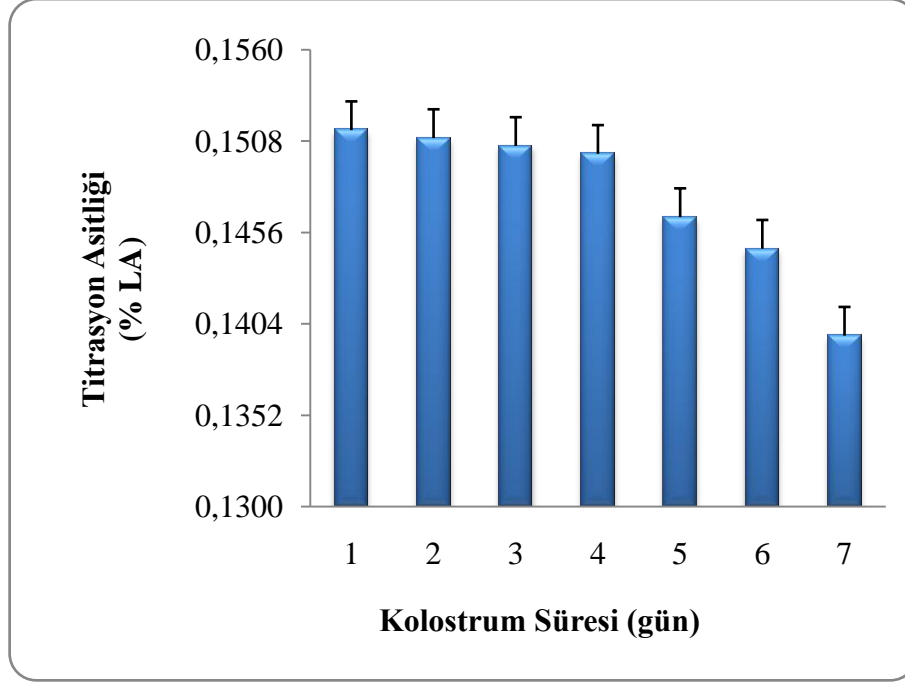
4.1.6. Kolostrum Sütü Titre Edilebilir Asitlik (% LA) Analiz Sonuçları

1-7 gün arasında alınan manda kolostrum sütlerinin titrasyon asitliği içeriğindeki değişimi Çizelge 4.6. 'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Kolostrum sütü titre edilebilir asitlik sonuçları (% LA)

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
1	0,1511	0,1510	0,1514±0,003
2	0,1517	0,1508	0,1510±0,0025
3	0,1513	0,1501	0,1505±0,002
4	0,1508	0,1498	0,1501±0,0027
5	0,1472	0,1451	0,1465±0,002
6	0,1450	0,1430	0,1447±0,0018
7	0,1410	0,1350	0,1397±0,002

Süt örneklerinin titrasyon asitliği % 0,1517 ile % 0,1350 arasında bulunmuştur. Kolostrum süt örneklerinin en yüksek ortalama titrasyon asitlik değeri 1. günde bulunurken (% 0,1514) en düşük 7. günde (% 0,1397) olarak belirlenmiştir. Genel olarak manda kolostrum süt örnekleri titrasyon asitliği içeriği % 0,1517 ile % 0,1350 arasında değişim göstermiştir. Manda sütü örneklerinin % titrasyon asitliği içeriklerine ait grafik ise Şekil 4.6. 'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Kolostrum sütü titre edilebilir asitlik değerleri

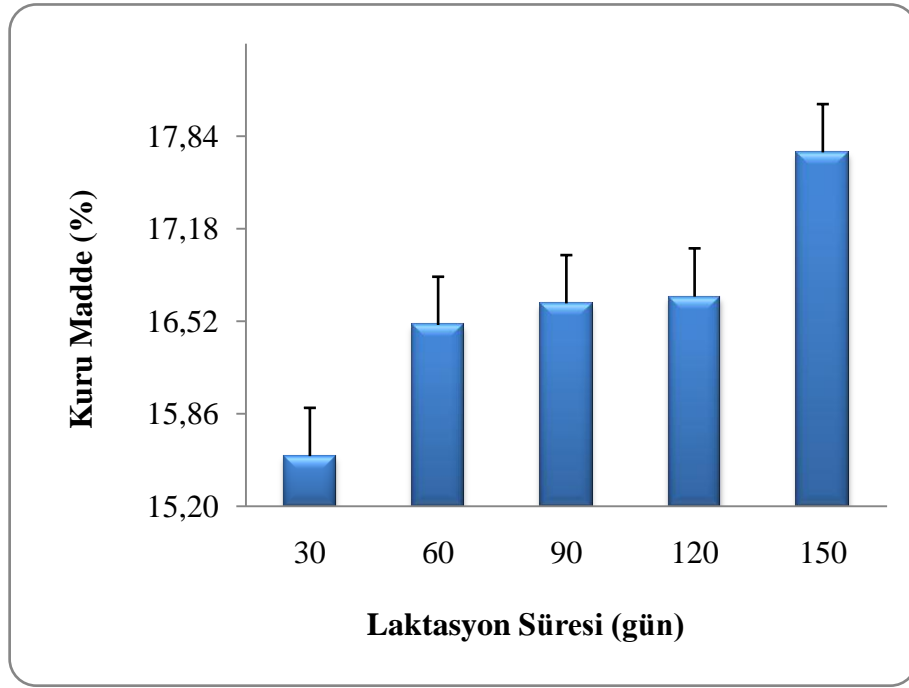
4.2. Laktasyon Dönemindeki Sütlerin Kimyasal Analizlerinin Değerlendirilmesi

4.2.1. Laktasyon Sütü Kuru Madde Analiz Sonuçları

Laktasyon süresince (30-150. gün) toplanan sütleri% kuru madde sonuçları Çizelge 4.7 'de görüldüğü gibi, toplam kuru madde en düşük 30. günde (% 15,56) en yüksek 150. günde (% 17,73) olarak belirlenmiştir. Ortalama % kuru madde değerleri değişimi ise Şekil 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Laktasyon sütü kuru madde sonuçları (%)

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
30	17,06	14,14	15,56±1,06
60	18,25	15,32	16,49±0,97
90	17,86	15,26	16,65±0,98
120	18,03	15,11	16,70±0,97
150	20,13	16,33	15,56±1,06



Şekil 4.7. Laktasyon kuru madde değerleri

Güven (2014), laktasyon dönemindeki (çalışmadaki mandalar içinde en kısa laktasyon süresi 150 gün, en uzun laktasyon süresi 355 gün ortalama laktasyon süresi 270 gün) olan manda sütlerinde toplam kuru madde % 18,19 olarak bulmuşlardır. Patpanda ve ark. Erken (<100), orta (100-200) ve geç (>200) laktasyon süresince kuru madde değerlerinin sırasıyla % 18,7, % 19,02 ve % 19,85 olarak tespit etmişlerdir.

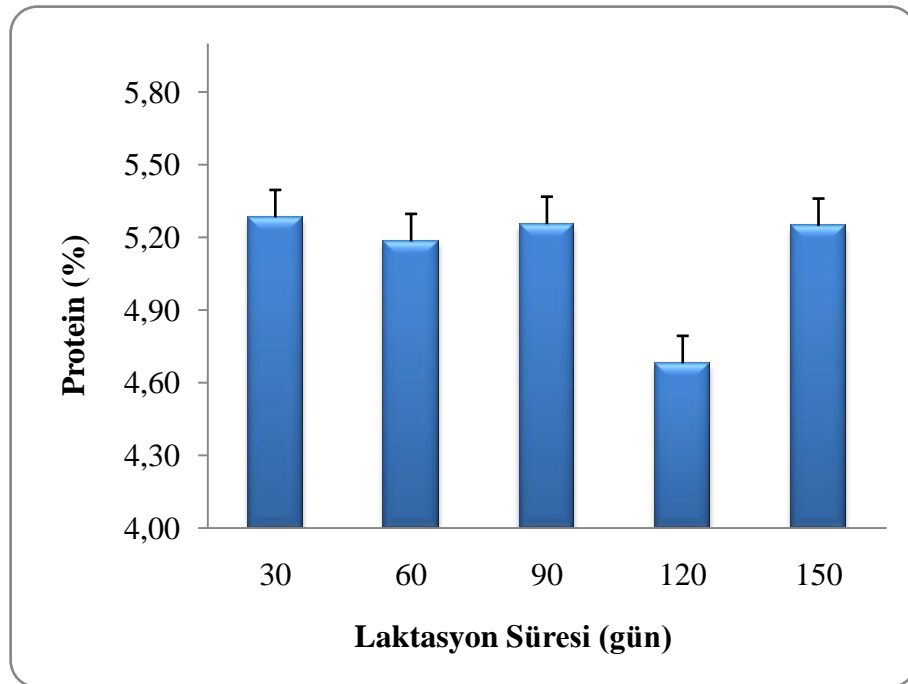
Cerón-Muñoz ve ark. (2002) laktasyonun değişik aylarında bulunan 222 baş Murrah mandasına ait süt kuru madde içeriği % 16,94 olarak bulmuşlar ve sonuçlar bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Şekerden ve ark. (1999), Anadolu mandalarında laktasyon süresince toplam kuru madde ortalama miktarını % 16,6 olarak belirtmişlerdir ve çalışmamızın sonucuyla benzer özellik göstermektedirler.

4.2.2.Laktasyon Sütü Toplam Protein Analiz Sonuçları

Çizelge 4.8. Laktasyon sütü protein sonuçları (%)

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
30	5,37	5,12	5,29±0,09
60	5,28	5,06	5,18±0,06
90	5,33	5,22	5,26±0,03
120	4,82	4,54	4,68±0,08
150	5,37	5,12	5,25±0,07

Laktasyon sütü maksimum, minumum ve ortalama % protein değerler Çizelge 4.8. 'de verilmiştir grafik ise Şekil 4.8'de verilmiştir. 150 günlük laktasyon süresince manda sütü % toplam protein değerleri % 5,37 ile % 4,54 arasında belirlenmiştir. Laktasyon sütündeki ortalama % toplam protein değeri, en yüksek 30. günde % 5,29 olarak, en düşük ise 120. günde % 4,68 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. Laktasyon sütü protein değerleri

Laktasyon süresince manda sütlerinin bileşiminin belirlenmesine yönelik Pathbandha ve ark.(2015) tarafından yapılan çalışmada, erken laktasyonda % 4,25 orta laktasyonda % 4,24 ve geç laktasyonda % 4,44 olarak tespit etmişler ve ayrıca protein konsantrasyonunun yaz, kış ve yağışlı hava durumlarında miktarının etkilendiğini belirtmişlerdir.

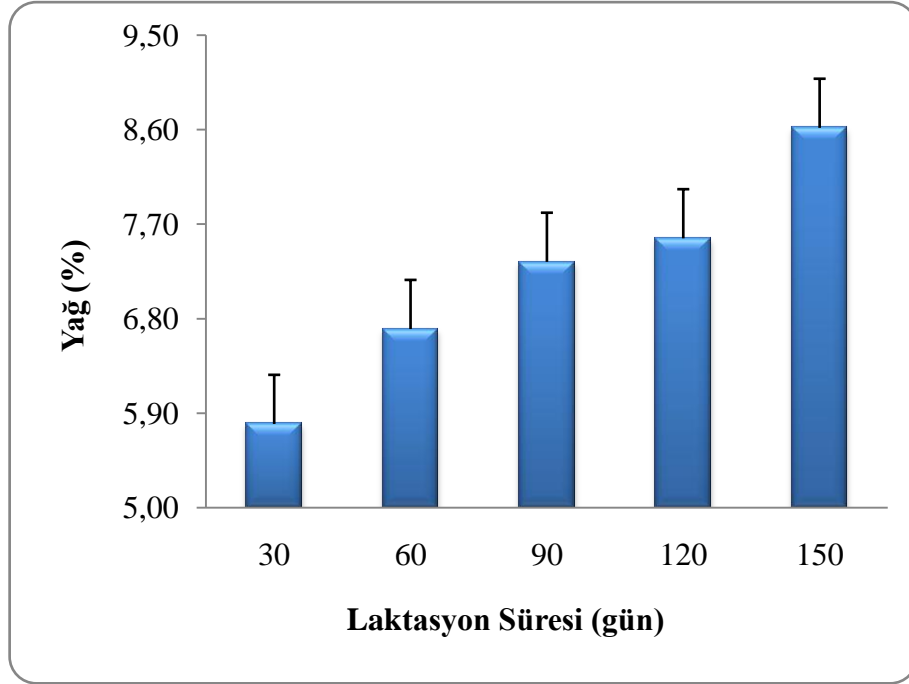
4.2.3. Laktasyon Sütü Yağ Analiz Sonuçları

Çalışmada kullanılan manda laktasyon sütlerinin ortalama % yağ değerleri Çizelge 4.9 'da, ortalama % yağ değerlerine ait grafik ise Şekil 4.9'da verilmiştir. Buna göre, manda laktasyon sütlerinde yağ oranı en düşük 30. günde % 5,80 olarak tespit edilirken en yüksek 150. günde % 8,62 olarak tespit edilmiştir.

Pathbandha ve ark. (2015) erken, orta ve geç laktasyondaki manda sütlerinin % yağ miktarını sırası ile % 7,65, % 8,36 ve % 8,92 olarak tespit etmişlerdir. Yılmaz ve ark. (2017) Anadolu mandalarında yaptığı çalışmada laktasyon başı laktasyon ortası ve laktasyon sonu % manda süt yağ oranını sırası ile % 7,65, % 5,91 ve % 8,15 olarak tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.9. Laktasyon sütü yağ sonuçları (%)

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
30	6,79	5,17	5,80±0,42
60	8,20	6,20	6,70±0,57
90	7,92	6,50	7,34±0,43
120	7,86	7,30	7,57±0,20
150	9,50	7,56	8,62±0,63



Şekil 4.9. Laktasyon sütü yağ değerleri

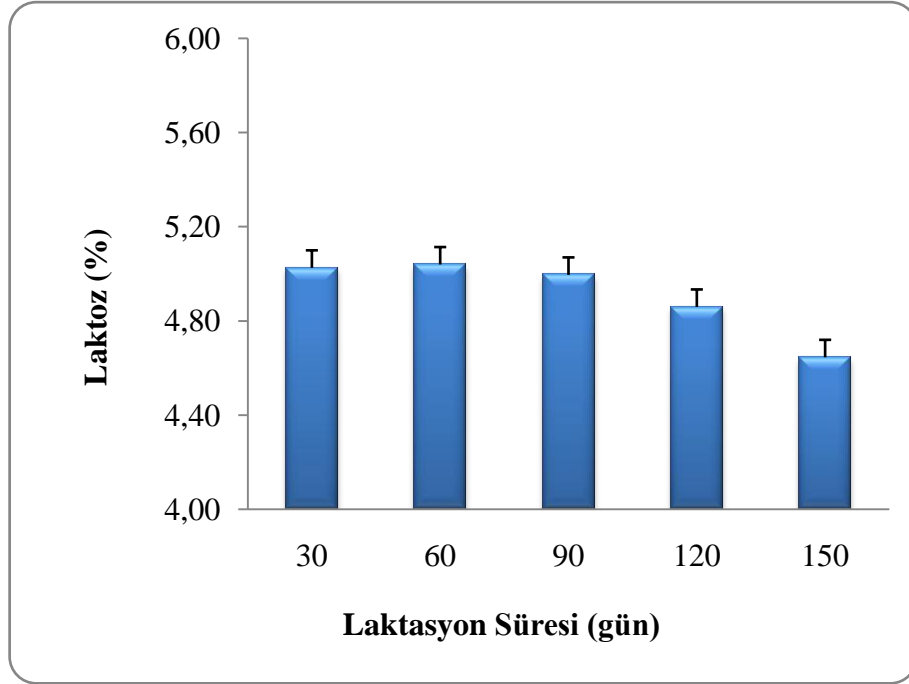
4.2.4. Laktasyon Sütü Laktoz Analiz Sonuçları

Laktasyon dönemindeki manda sütlerinde % laktoz miktarı Çizelge 4.10. 'da verilmiştir. Laktasyon dönemi manda sütlerinde % laktoz miktarı en düşük 150. günde % 4,65 olarak bulunurken en yüksek 60. günde % 5,04 olarak tespit edilmiştir. Ortalama olarak % laktoz değerlerine ait değerler Şekil 4.10.'da verilmiştir.

Patbandha ve ark. (2015) jaffrabadi mandalarında erken orta ve geç laktasyonda laktoz miktarını % 5,83, % 5,65 ve % 5,51 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. Laktasyon sütü laktoz sonuçları (%)

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
30	5,38	4,44	5,03±0,29
60	5,38	4,78	5,04±0,20
90	5,47	4,67	5,00±0,27
120	5,34	4,67	4,86±0,22
150	4,92	4,15	4,65±0,25



Şekil 4.10. Laktasyon sütü laktoz değerleri

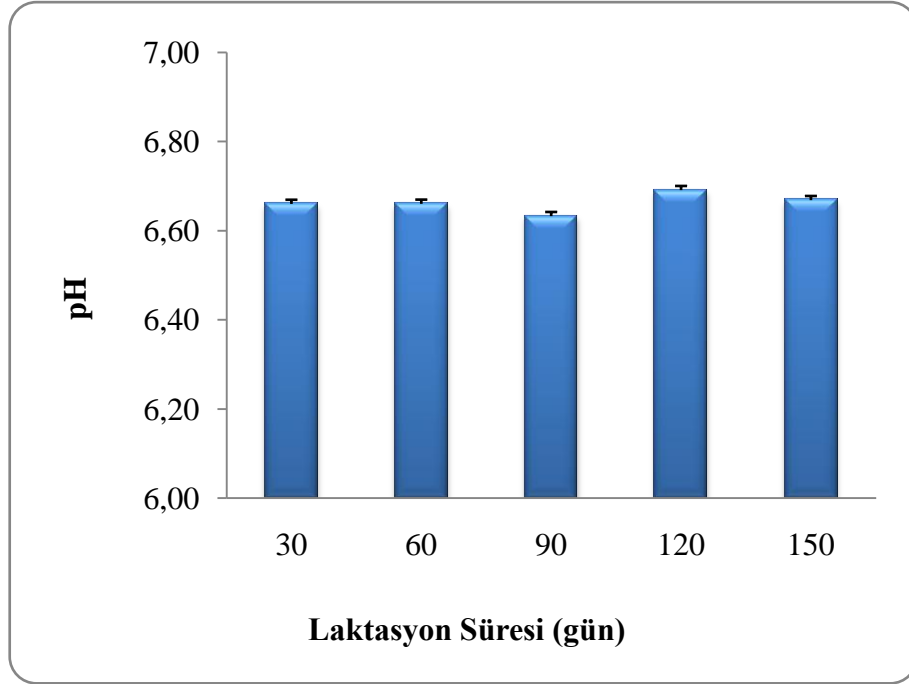
Yılmaz ve ark. (2017) Anadolu mandalarında laktasyon başı laktasyon ortası ve laktasyon sonu manda sütlerinde ortalama % laktoz miktarını sırası ile % 4,65 % 4,57 ve % 4,45 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamız sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

4.2.5. Laktasyon Sütü pH Asitlik Analiz Sonuçları

Laktasyon dönemindeki (30., 60., 90., 120. ve 150. gün) manda sütlerinde pH değerleri Çizelge 4.11.'de, ortalama pH değerlerine ait grafik ise Şekil 4.11'de verilmiştir. Manda laktasyon sütlerinde ortalama en düşük pH değeri 90. günde 6,63 olarak bulunurken en yüksek pH değeri 120. günde 6,69 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11. Laktasyon sütü pH asitlik sonuçları

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
30	6,67	6,65	6,66±0,01
60	6,68	6,64	6,66±0,01
90	6,65	6,62	6,63±0,01
120	6,71	6,66	6,69±0,01
150	6,70	6,63	6,67±0,02



Şekil 4.11. Laktasyon sütü pH asitlik değerleri

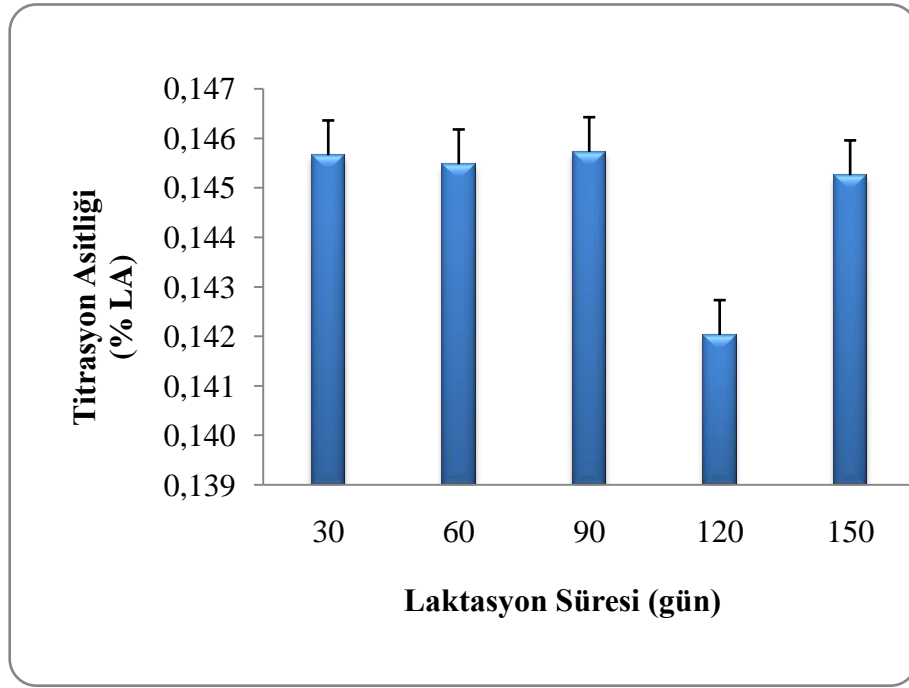
Yapılan çalışmalara göre, Yılmaz ve ark. (2017) Anadolu mandalarında laktasyon başı laktasyon ortası ve laktasyon sonu sırası ile ortalama pH değerlerini 6,53, 6,76 ve 6,79 olarak tespit edilmiştir. Çalışmalarımız sonucunda bulunan sonuçlar karşılaştırıldığında benzer sonuçlar bulunmuştur.

4.2.6. Laktasyon Sütü Titre Edilebilir Asitlik (% LA) Analiz Sonuçları

Laktasyon dönemindeki (30., 60., 90., 120. ve 150. gün) manda sütlerinde titrasyon asitliği miktarları Çizelge 4.12.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Laktasyon sütü titre edilebilir asitlik sonuçları (%)

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
30	0,148	0,144	0,146±0,001
60	0,149	0,143	0,145±0,017
90	0,152	0,141	0,146±0,003
120	0,148	0,140	0,142±0,0011
150	0,149	0,142	0,145±0,006



Şekil 4.12. Laktasyon sütü titre edilebilir asitlik değerleri

Laktasyon süresince en düşük titrasyon asitliği değeri 120. günde % 0,142 olarak bulunurken en yüksek titrasyon asitliği değeri 30. günde % 0,146 olarak tespit edilmiştir. Ortalama titre edilebilir asitlik değerleri ait grafik ise Şekil 4.12.'de verilmiştir.

4.3. Laktoferrin Standartlarına Ait Değerler

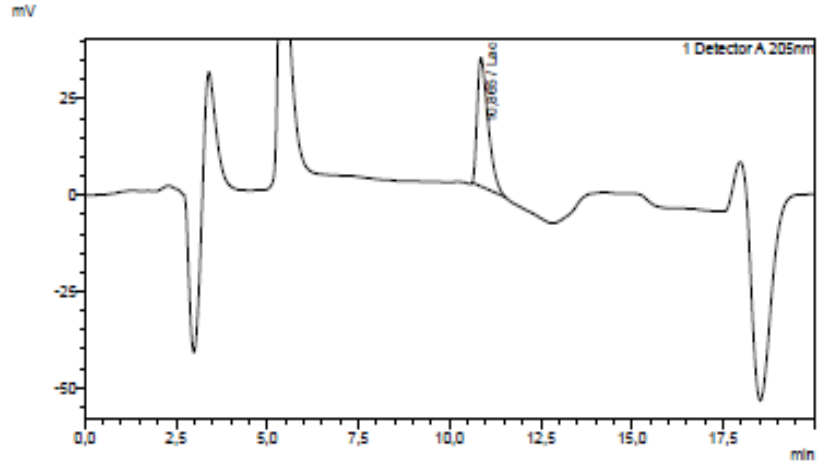
Sığır laktoferrin standartının 5 farklı konsantrasyonda (10, 50, 75, 100 ve 125 mg.L⁻¹) hazırlanan laktoferrin standart çözeltilerinin her biri şırınga yardımıyla 0,22 µm' lik selüloz asetat membran filtreden geçirilerek standart kalibrasyon kurvesi için HPLC enjektörü ile çekilerek cihaza 3'er kez verildi. Cihazın yazılımı (Yazılım Labsolution) aracılığı ile ölçülen alıkonma zamanları ve her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanlarına ait ölçümlerin ortalamaları Çizelge 4.13.'de verilmiştir.

Laktoferrin pikinin 1 ml.dk⁻¹ akış hızında alıkonma zamanı 10.86 dk'da tutarlı bir kromatografik pik gösterdiği belirlenmiştir. Laktoferrinin standart 10 ve 50 mg.L⁻¹ konsantrasyonlar için belirlenen kromotogram Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Laktoferrin kalibrasyon kurvesinin oluşturulmasında kullanılan laktoferrin konsantrasyonları ve pik alanları

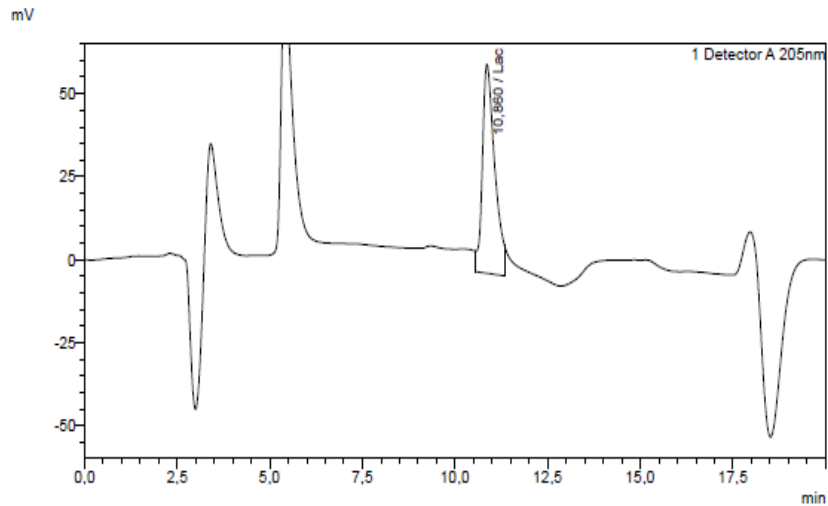
Standart	Standart Laktoferrin Konsantrasyonu (mg.L ⁻¹).	Standart Laktoferrin Pik Alanı
1	10	698.289
2	50	1.450.823
3	75	2.117.218
4	100	2.716.101
5	125	3.403.052

Sample Name : 10 ppm
Sample ID : 10 ppm
Data Filename : 10 ppm.lcd
Method Filename : Lactoferrin.lcm
Batch Filename : cal.lcb
Vial # : 1-2
Injection Volume : 20 uL
Date Acquired : 05.12.2017 11:12:42
Date Processed : 05.12.2017 13:28:21
Sample Type : Standard
Level : 2
Acquired by : System Administrator
Processed by : System Administrator



Şekil 4.13. Laktoferrin standardı için kromatogram (10 mg.L^{-1})

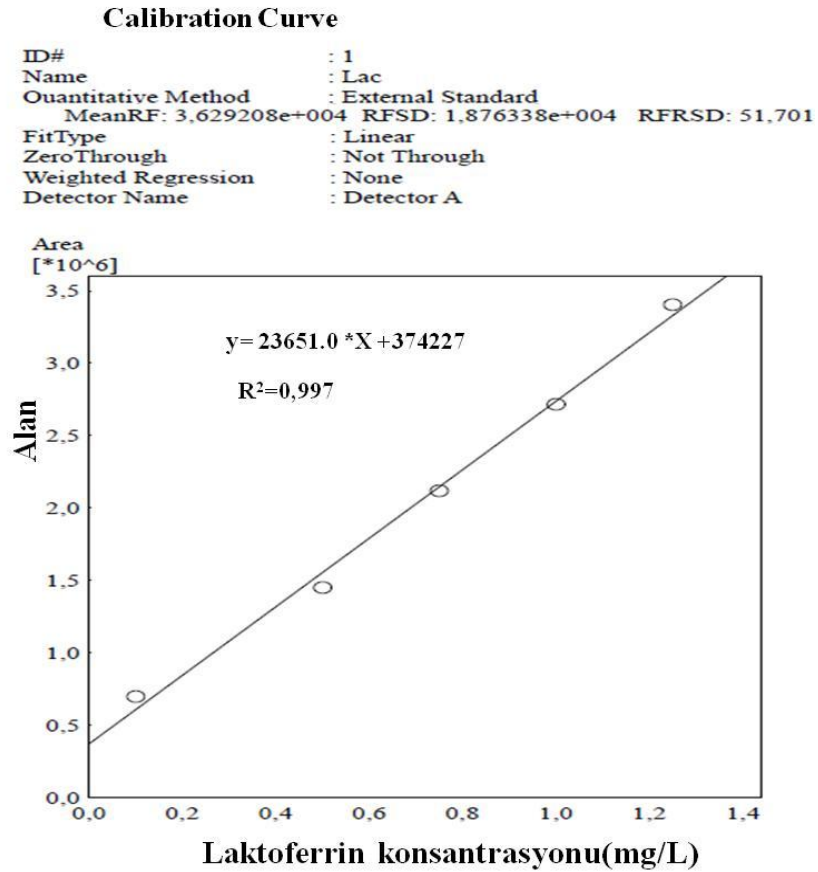
Data Filename : 50 ppm.lcd
Method Filename : Lactoferrin.lcm
Batch Filename : cal.lcb
Vial # : 1-4
Injection Volume : 20 uL
Date Acquired : 05.12.2017 11:53:54
Date Processed : 05.12.2017 13:28:22
Sample Type : Standard
Level : 4
Acquired by : System Administrator
Processed by : System Administrator



Şekil 4.14. Laktoferrin standardı için kromatogram (50 mg.L^{-1})

4.3.1. Kalibrasyon Kurvesi

Sığır laktoferrin standartının beş farklı konsantrasyonda (10, 50, 75, 100 ve 125 mg.L⁻¹), hazırlanan, aynı koşullarda her konsantrasyondan üç enjeksiyon yapılarak her bir standart konsantrasyona karşı alan grafiği elde edilerek doğrusallık test edilmiştir. Doğrusal olan kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi, x eksenine konsantrasyonlar, y eksenine pik alanı ortalamaları kromatogramdan okunarak belirlenen doğru regresyon denklemi $y = 23651 \times X + 374227$ (n=3) olarak belirlenmiştir. Elde edilen doğrudan korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0.997 olarak belirlenirken 10-125 mg.L⁻¹ aralığında doğrusal ilişki gözlenmiştir. Her bir konsantrasyona karşı elde edilen kromatogram alanından oluşturulan standart kalibrasyon kurvesi Şekil 3.3.'de verilmiştir



Şekil 4.15. Laktoferrin (Lf) için kalibrasyon kurvesi

4.3.2. Metod Validasyon Parametreleri Değerleri

Metodun validasyonu doğruluk, geri kazanım, kesinlik, doğrusallık, tespit (LOD) limiti ve tayin (LOQ) limiti parametre değerleri Çizelge 4.14.'de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Metod validasyon parametreleri

Standart Laktoferrin Konsantrasyonu (mg.L ⁻¹).	Doğruluk (%)	Kesinlik (%)RSD	LOD	LOQ	Geri Kazanım (%)	Doğrusallık (R ²)
	98,3	1,89	1,196	3,624	98,4	0,997

Doğruluk (Accuracy): Yöntemle elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığını ifade eden doğruluk oranı kabul edilebilir sınırlar içinde % 98,3 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14.).

Kesinlik (Precision): Yöntemin kesinliği, “belirlenmiş koşullar altında aynı homojen numunenin çoklu örneklemesinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki anlaşmanın yakınlığı” olarak tanımlanan ve normal olarak görel standart sapma olarak ifade edilen kesinlik, tekrarlanabilirlik ve ara hassasiyet testlerinin sonucu olarak % 1,89 değeri ile (Çizelge 4.14.) yöntemin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu belirlenirken bu değer % 2’den fazla olması istenmemektedir.

Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ): Laktoferrinin tespit ve tayin belirlenmesi için üç farklı günde yapılan tekrar enjeksiyonları sonucunda elde edilen ortalama LOD için S/G oranını 3 katı alınarak, LOQ için S/G oranının 10 katı alınarak hesaplanan değerler LOD için 1,196 mg.L⁻¹, LOQ için ise 3,624 mg.L⁻¹ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14.).

Geri Kazanım (Recovery): Geri kazanım standart laktoferrin çalışma çözeltileri üzerinden yapılarak hesaplanan geri kazanım değerleri % 98,4 olarak belirlenmiştir. (Çizelge 4.14.)

Doğrusallık (Linearity): Bir analitik yöntemin doğrusallığı, yöntemin, belirli bir aralık dahilinde, analit konsantrasyonu ile doğru orantılı olan test sonuçlarını elde etme yeteneği olarak tanımlanan yöntemin doğrusallığı laktoferrin için 10-125 mg.L⁻¹ aralığında R² 0,997 olarak belirlenmiştir. (Çizelge 4.14)

4.4. Kolostrum ve Laktasyon Sütündeki Laktoferrin Miktarının Sonuçları

4.4.1. Kolostrum Sütü Laktoferrin Analiz Sonuçları

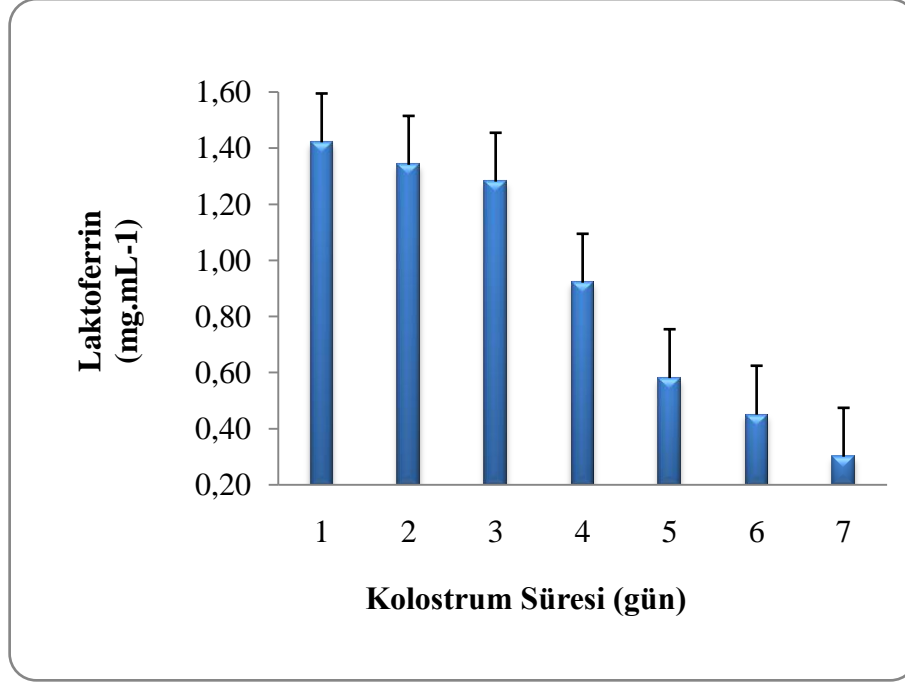
Çizelge 4.15. Kolostrum sütü laktoferin sonuçları (mg.mL⁻¹)

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
1	1,560	1,250	1,421±0,096
2	1,440	1,020	1,341±0,0135
3	1,360	1,190	1,280±0,074
4	1,020	0,850	0,916±0,061
5	0,670	0,490	0,580±0,060
6	0,550	0,380	0,454±0,065
7	0,380	0,220	0,303±0,055

Bağışıklık geliştirici minör bir protein olan laktoferrinin kolostrum sütlerinde HPLC ile tespit edilen sonuçları Çizelge 4.14'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, manda kolostrum sütlerinde Lf miktarı 1,560 mg.mL⁻¹ ile 0,220 mg.mL⁻¹ arasında değiştiği gözlenmiştir. En yüksek Lf değeri 1. günde 1,421 mg.mL⁻¹, en düşük değer ise 7. günde 0,303 mg.mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

Kolostrum sütlerinde Lf miktarı 7. güne doğru bir azalma göstererek normal sütteki değerine ulaştığı belirlenmiştir. Lf miktarındaki 7 gün süresince değişimi gösteren grafik Şekil 4.16'da sunulmuştur.

Yapılan benzer çalışmalar incelendiğinde sonuçlar arasında doğrusal bir korelasyon belirlenmiştir. Abd El-Gawad ve ark. (1996), RP-HPLC ile inek, koyun, keçi, manda ve develerden alınan, kolostrum ve normal sütlerde (0-12. saat, 1, 2, 4, 7, 15 ve 30. gün) Lf değişimini incelemişler, kolostrum manda sütünde 0-12. saatte Lf miktarını 4,8 mg.mL⁻¹, 1. gün 1,18 mg.mL⁻¹ olarak tespit etmişler 30. güne doğru kolostrum sütündeki Lf düzeyinin normal süt oranına yaklaştığını ve 30. gün 0,30 mg.mL⁻¹ olarak tespit etmişlerdir.



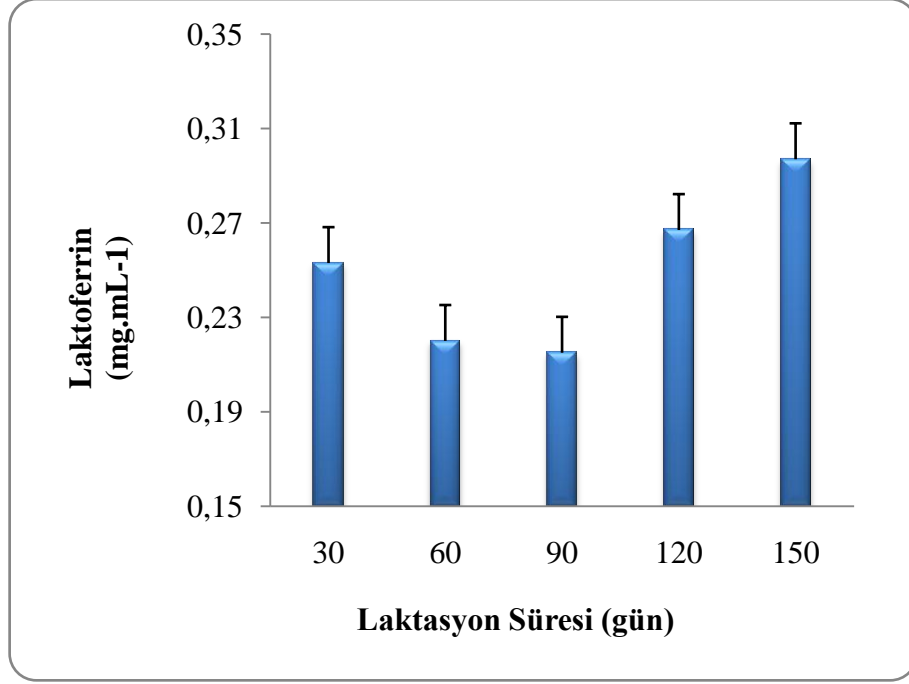
Şekil 4.16. Kolostrum sütü laktoferrin değerleri

Abd El -Fattah ve ark. (2012), mısır mandalarında doğumdan sonra 6.,12., 24., 48., 72., 96., 120. saat ve 14. gün Lf miktarını ELISA ile belirlemiş doğumun 1. gününde $1,085 \text{ mg.mL}^{-1}$, doğumdan sonra 14. Güne doğru önemli bir şekilde azalışını ve 14 günde Lf miktarını $0,123 \text{ mg.mL}^{-1}$ olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca manda sütünde doğumun 5. gününden sonra Lf miktarının % 96,70 oranında azaldığını belirtmişlerdir.

4.4.2. Laktasyon Sütü Laktoferrin Analiz Sonuçları

Çizelge 4.16. Laktasyon sütü laktoferrin sonuçları (mg.mL^{-1})

Günler	Maksimum	Minimum	Ortalama
30	0,261	0,240	$0,261 \pm 0,008$
60	0,228	0,211	$0,228 \pm 0,006$
90	0,223	0,207	$0,223 \pm 0,006$
120	0,276	0,259	$0,276 \pm 0,006$
150	0,305	0,290	$0,305 \pm 0,005$



Şekil 4.17. Laktasyon sütü laktoferrin değerleri

Laktasyon sütlerindeki Lf miktarları Çizelge 4.16.'da verilmiştir. Lf miktarları 0,305 mg.mL⁻¹ ile 0,207 mg.mL⁻¹ aralığında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek Lf miktarı 150. günde 0,305 mg.mL⁻¹ bulunurken, en düşük 90. günde 0,223 mg.mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Lf miktarındaki değişimi gösteren değerler ait grafik Şekil 4.17.'de verilmiştir.

Giacinti ve ark. (2016) Laktasyon dönemindeki 225 adet mandadan süt örnekleri toplanıp incelemişler ve bu incelemeler sonunda 1., 2., 3., 4., ve 5. laktasyon da sırası ile 0,333 g.kg⁻¹, 0,319 g.kg⁻¹, 0,335 g.kg⁻¹, 0,342 g.kg⁻¹, ve 0,335 g.kg⁻¹ olarak tespit etmişler ve ortalama olarak Lf miktarını 0,332 g.kg⁻¹ olarak belirtmişlerdir. Çalışma sonuçlarımız benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında benzer koşullarda yetiştirilen manda sütlerinden hem kolostrum (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7. gün) hem laktasyon (30, 60, 90, 120, 150. gün) döneminde toplanmak suretiyle protein, yağ, kuru madde, laktoz ve pH kimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir. Kolostrum sütü ortalama protein (% 12,92±1,30-5,04±0,46), yağ (% 5,81±0,50-7,54±0,84), kuru madde (% 22,24±1,77-16,59±0,96), laktoz (% 4,63±0,25-2,30±0,45), pH (% 6,52±0,03-6,04±0,03) ve titrasyon asitliği (% 0,1397±0,002- 0,1514±0,003) olarak tespit edilirken, laktasyon sütünde ise, ortalama protein (% 4,68±0,08-5,29±0,09), yağ (% 5,80±0,42-8,62±0,63), kuru madde (% 15,56±1,06-16,70±0,97), laktoz (% 4,65±0,25-5,04±0,20), pH (% 6,63±0,01- 6,69±0,01) ve titrasyon asitliği (% 0,142±0,0011- 0,146±0,003) olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında benzer sonuçlar tespit edilmiştir.

Lf miktarı ise laktasyon sütünde en yüksek 150. günde 0,305 mg.mL⁻¹ bulunurken, en düşük 90. günde 0,223 mg.mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir. En yüksek Lf değeri 1. günde 1,421 mg.mL⁻¹, en düşük değer ise 7. günde 0,303 mg.mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

Farklı hayvanlarda yapılan çalışmalarda laktoferrin miktarları farklılık göstermektedir. Dračková ve ark (2009), Keçi sütlerinde yaptıkları bir çalışmada en yüksek Lf miktarı 149 µg.mL⁻¹ en düşük Lf konsantrasyonu 98±170 µg.mL⁻¹ olarak tespit etmişlerdir. Król ve ark (2010) Polish kırmızı ineklerin 128,7 mg.L⁻¹, beyaz sırtlı (Whitebacked) ineklerin 115,2 mg.L⁻¹, Polish Kızıl-beyaz ineklerin 120,9 mg.L⁻¹, beyaz Holstein-Friesian inek sütlerinde 91,4 mg.L⁻¹, olarak belirlemişlerdir.

Yapılan çalışmalarda laktoferrin miktarındaki değişimlere, analiz için alınan örneklerin koşulları, alındığı zamanlar, hayvanın kaçınıcı doğumu olduğu, yaz ya da kış aylarına denk gelen doğumlar gibi faktörlerin neden olabileceği belirtilmiştir.

Bu çalışmada diğer büyükbaş hayvanlarla karşılaştırıldığında besleyici yönü daha fazla olan manda sütü seçilmiş ve Lf miktarı tespit edilmeye çalışılmıştır. Lf kaynağı bakımından tespit edilen değerlerle yola çıkıldığında laktasyon sütüne göre kolostrum sütü bunu sağlamaktadır. Bu çalışma aynı zamanda, Lf'nin daha çok çalışmada yer alması amacıyla ve de ileride yapılacak olan çalışmalara konu olması için ışık tutmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Abd El -Fattah A M, Abd Rabo F HR, EL-Dieb S M, El-Kashef H A 2012. Changes In Composition Of Colostrum Of Egyptian Buffaloes And Holstein Cows. BMC Veterinary Research, 8:19.
- Abd El-Gawad I A, El-Sayed E M, Mahfouz M B, Adb El-Salam A M 1996. Changes lactoferrin concentration in colostrum and milk from different species. Egyptian journal dairy science, 24:297-308.
- Adam V, Zitka O, Dolezal P, Zeman L, Horna A, Hubalek J, Sileny J, Krizkova S, Trnkova L, Kizek R 2008. Lactoferrin Isolation Using Monolithic Column Coupled with Spectrometric or Micro-Amperometric Detector. Sensors, 8:464-487.
- Alkudsi N H, Hussein D A 2016. The concentration of lactoferrin and its relationship with minerals and amino acids in cows milk. Scientific papers series d. animal science Volume LIX, 157-163
- Arnold R R, Cole M F, McGhee J R 1977. A bactericidal effect for human lactoferrin. Science Washington, D.C. 197:263-265.
- Ashmawy N A 2015. Chemical Composition, Hormonal Levels and Immunoglobulin G Concentration in Colostrums, Milk and Blood Plasma of Egyptian Buffaloes Following Calving. International Journal of Advanced Research, Volume 3, Issue 7:471-478.
- Avcı G, Sel T 2004. Laktasyon periyodundaki Ankara keçilerinde süt ve serum laktoferrin düzeyleri. Ankara üniversitesi veterinerlik fakültesi dergisi, 51:181-187.
- Avcı G. Laktoferrinin Biyolojik Özellikleri ve Hastalıklarla İlişkisi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2007;7(1): 23-34
- Baker E N, Baker H M 2005. Lactoferrin molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. Cell Mol. Life Sci. 62 2531-2539.
- Billakanti J 2009. Extraction Of High Value Minor Proteins From Milk. Doktora Tezi, Canterbury University, New Zealand.
- Brock J H 2002. The physiology of lactoferrin. minireview United Kingdom Biochem. Cell Biol. Vol. 80.
- Brodziak A, Król J, Litwińczuk Z 2015. Whey protein content and fatty acids profile in milk of cows used in intensive and conventional production systems with regard to stage of lactation. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 39: 745-750.
- Campana W.M, Baumrucker C.R 1995. Hormones and growth factors in bovine milk. İçinde R.G. Jensen (Ed.), Handbook of Milk Composition. San Diego, CA: Academic Press; 467-494.
- Cerón-Muñoz M, Tonhati H, Duarte J, Muñoz-Berrocal M, Jurado-Gámez H, 2002. Factors Affecting Somatic Cell Counts And The Irrelations With Milk And Milk Constituent Yield İn Buffaloes. J Dairy Sci, 85, 2885-2889.
- Chaneton, L, Bontá M, Pol M, Tirante L, Bussmann L E 2013. Milk lactoferrin in heifers: Influence of health status and stage of lactation. J. Dairy Sci. 96, 4977-4982.

- Chatterton D E W, Smithers G, Roupas P, Brodkrob A 2006. Bioactivity of β - lactoglobulin and α - lactalbumin —Technological implications for processing. *Int. Dairy J.* 16(11):1229 – 1240.
- Coroian A, Erler S, Matea C T, Mireşan V, Răducu C, Bele C, Coroian C O 2013. Seasonal Changes of Buffalo Colostrum: Physicochemical Parameters, Fatty Acids and Cholesterol Variation. *Chemistry Central Journal*, 7:40.
- Çetinkaya N, Genç B, Salman M, 2011. Samsun İli Manda Yetiştiriciliği. Samsun Ondokuz Mayıs Üniveristesi Veteriner Fakültesi Samsun Sempozyumu.
- Damiens E, Yazidi I, Mazurier J, Duthile I, Spik G, Boilly-Marer Y 1999. Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells, *J. Cell. Biochem.* 74 486–498.
- Dial E J, Lichtenberger L M, 2002. Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis. *Biochem. Cell Biol.* 80:113–117.
- Dizaji N F, Ray A K 2016. Minor Whey Protein Purification Using Ion- Exchange Column Chromatography. The University of Western Ontario, Graduate Program in Chemical and Biochemical Engineering
- Dračková M, Borkovcová I, Janštová B, Naiserová M, Přidalová H, Navrátilová P, Vorlová L 2009 Determination of Lactoferrin in Goat Milk by HPLC Method. *Czech Journal Food Science*, 27:102-104.
- Farnaud S ve Evans R 2003. Lactoferrin-A Multifunctional Protein with Antimicrobial Properties. *Molecular Immunology* 40: 395–405.
- FDA 2014 Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, FDA, Rockville, MD, Available at <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>
- Fine D.H. 2015. Lactoferrin: A Roadmap to the Borderland between Caries and Periodontal Disease. *Journal of Dental Research*, Vol. 94(6) 768– 776.
- Galfi A L, Radinović M Z, Boboš S M, Pajić M J, Savić S S, Milanov D S 2016. Lactoferrin concentrations in bovine milk during involution of the mammary glands with different bacteriological findings. *Vet. arhiv* 86, 487-497.
- García-Montoya I A, Cendón T S, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q 2012. Lactoferrin a multiple bioactive protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820 226–236.
- Giacinti G, Basiricò L, Ronchi B, Bernabucci U 2013. Lactoferrin concentration in buffalo milk. *Italian Journal of Animal Science*, 12:e23.
- Giansanti F, Panella G, Leboffe L, Antonini G 2016. Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. Review, Ministero della Salute of Italy to LL.
- Gonzalez-Chavez S, Arevalo-Gallegos S. ve Rascon-Cruz Q, 2009. ‘Lactoferrin: Structure, Function and Applications’, *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 301.e1–301.e8.
- Guillen C, McInnes IB, Vaughan D, Speekenbrink AB, Brock JH. 2000. The effects of local administration of lactoferrin on inflammation in murine autoimmune and infectious arthritis. *Arthritis Rheum.* 43(9):2073–2080.

- Hagiwara S, Kawai K, Anri A, Nagahata H 2003. Lactoferrin Concentration In Milk From Normal And Subclinical Mastitic Cows. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 319-323.
- Harper W J 2000. Biological Properties of Whey Components. A Review, The American Dairy Products Institute, Chicago IL.
- Kawasaki, Y, Isoda K, Shinmoto, H, Tanimoto, M, Dosako, S, Idota, T, Nakajima, I 1993. Inhibition by κ -casein glycomacropeptide and lactoferrin of influenza virus hemagglutination. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57: 1214-1215.
- Kawasaki Y, Isoda H, Tanimoto M, Dosako S, Idota T, Ahiko K 1992. Inhibition by lactoferrin and κ -casein glycomacropeptide of binding of cholera toxin to its receptor. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56: 195–198.
- Kirkpatrick C H, Green I, Rich R R, Schadeet L A 1971. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis, *J. Infect. Dis.* 124 539–544.
- Komine K, Komine Y, Kuroishi T, Kobayashi J, Obara Y, Kumagai K, 2005. Small molecule lactoferrin with an inflammatory effect but no apparent antibacterial activity in mastitic mammary gland secretion. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 667-677.
- Komine Y, Komine K, Kenzou K, Itagaki M, Kuroishi T, Aso H, Obara Y, Kumagai K 2006. Effect of combination therapy with lactoferrin and antibiotics against staphylococcal mastitis on drying cows. *J. Vet. Med. Sci.* 68:205–211.
- Król J, Brodziak A, Litwińczuk Z, Barłowska J 2011. Selected Factors Determining the Content of Lactoferrin, Lysozyme and Immunoglobulins G in Bovine Milk. University of Life Sciences in Lublin,
- Król J, Brodziak A, Litwinczuk Z, Barłowska J. 2012. Selected factors determining the content of lactoferrin, lysozyme and immunoglobulins G in bovine milk. In: Bobbarala V, editor. A search for antibacterial agents. InTech. P. 107–124.
- Król J, Litwińczuk Z, Brodziak A, Zugaj W S 2010. Bioactive protein content in milk from local breeds of cows included in the genetic resources conservation programme. *Ann. Animal Science*, 10:213–221.
- Kruzel M L, Actor J K, Zimecki M, Wise J, Płoszaj P, Mirza S, Kruzel M, Hwang S, Ba X, Boldogh I 2013. Novel recombinant human lactoferrin: Differential activation of oxidative stress related gene expression, *Journal of Biotechnology*, 168,(4) 666-675.
- Kuttila T, Suojala L, Lehtolainen T, Saloniemi H, Kaartinen L, Tahti M, Seppala K. and Pyorala S. 2004. The efficacy of bovine lactoferrin in the treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 27. P. 197–202.
- Laurie A D and Bo L 1986. Isolation and Characterization of Rhesus Monkey Milk Lactoferrin. *International Pediatric Research Foundation*, 20-2.
- Legrand D, Mazurier J 2010. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals*, 23: 365-376.
- Levay P ve Viljoen M 1995. Lactoferrin: A General Review. *Haematological* 80: 252-267.
- Ling J M, Schryvers A B 2006. Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria. Department of Microbiology and Infectious Diseases, 274 Heritage Medical Research Building, Faculty of Medicine, University of Calgary, 3330 Hospital Dr. N.W, Calgary, AB T2N 4N1, Canada. *Biochem. Cell Biol.* 84: 275–281.

- Madureira A R, Pereira C I, Gomes A M P, Pintado M E, Xavier Malcata F 2007. Review. Bovine whey proteins—Overview on their main biological properties. Food Research International. Vol. 40. P. 1197– 1211
- Markus C R, Olivier B, Pamhuysen G E, Van der Gugten, J Alles M S, Tuiten A 2000. The bovine protein α - lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration and improves mood under stress. American Journal of Clinical Nutrition 75: 1051–1056.
- Marshall K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. Alternative Medicine Review 9:136-156.
- Mayeur S, Spahis S, Pouliot Y, Levy E 2016. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease Antioxidants and Redox Signaling, 24:813-836.
- Metin M 2013. Süt Teknolojisi - Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları No: 33, E.Ü. Basımevi, Bornova, İzmir, 802s.
- Muhammed A 2009. The Animal of Future. Idara Matbuat-E-Sulemani. Lahore, Pakistan.
- Musayeva K, Sederevičius A, Želvytė R, Monkevičienė I, Beliavska-Aleksiejūnė D, Kerzienė S, Bliznikas S 2016. quantitative analysis of whey proteins in relation to health status of the udder quarters and season. veterinarija ir zootechnika, 73:95.
- Nakajima K, Kanno Y, Nakamura M. Gao X D, Kawamura A, Itoh F, Ishisaki A 2011. Bovine milk lactoferrin induces synthesis of the angiogenic factors VEGF and FGF2 in osteoblasts via the p44/p42 MAP kinase pathway. BioMetals 23 1- 10.
- Nibbering PH, Ravensbergen E, Welling MM, van Berkel LA, van Berkel PH, Pauwels EK, Nuijens JH. 2001. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. Infect Immun. 69(3):1469–1476.
- Nidia León-Sicairos, DSc; Fernando López-Soto, MSc; Magda Reyes-López, BSc; DeLfino Godínez-Vargas, MSc; Cynthia Ordaz-Pichardo, DSc; and Mireya de la Garza, DSc 2006. Amoebicidal Activity of Milk, Apo-lactoferrin, sIgA and Lysozyme. Clinical Medicine & Research Volume 4, Number 2:106-113.
- Nisbet C, Yarım G F, Çiftci G, Gültiken N, Çenesiz S 2013. Investigation of blood and milk lactoferrin concentrations in lactating ewes with subclinical mastitis. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 24:37-40.
- Park Y W 2009. Bioactive Components In Milk And Dairy Products. Fort Valley State University, Georgia.
- Patbandha T K, Ravikala K, Maharana B R, Marandi S, Ahlawat A R, Gajbhaye P U 2015. Effect of Season and Stage of Lactation on Milk Components of Jaffrabadi Buffaloes.
- Petitclerc D, Lauzon K, Cochu A, Ster C, Diarra M S, Lacasse P 2007. Efficacy of a lactoferrin-penicillin combination to treat β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* mastitis. J. Dairy Sci. 90:2778–2787.
- Rachman A B, Maheswari R R, Bachroem M S 2015. Composition and Isolation of Lactoferrin from Colostrum and Milk of Various Goat Breeds. Procedia Food Science, 3:200-210.
- Rana S, Sharma S And Singh R 2012. Iron Binding And Receptor: Lactoferrin And Tonb Receptors International Journal Of Biomedical Research 3-07.

- Roberts T K and J C Bournsnel 1975. The isolation and characterization of lactoferrin from sow milk and boar seminal plasma. *J. Reprod. Fertil*, 42:579.
- Shimazaki K, Kazuhiro Kawai K, 2017. Advances in lactoferrin research concerning bovine mastitis. *Biochem. Cell Biol.* Vol. 95. P. 69–75.
- Singh V P, and Pathak V 2013. Physico-Chemical Changes Observed During Conversion of Murrah Buffalo Colostrum to Milk. *Asian Journal of Science and Technology* Vol. 4, Issue 03, pp.013-015.
- Siqueiros-Cendón T, Arévalo-Gallegos S, Iglesias-Figueroa B F, García-Montoya I A, Salazar-Martí-nez J, Rascón-Cruz Q 2014. Immunomodulatory effects of lactoferrin, 35 (5) 557-566.
- Sobczuk-szul M, wielgosz-groth Z, Wroński M, Rzemieniecki A 2013. Changes in the bioactive protein concentrations in the bovine colostrum of Jersey and Polish Holstein–Friesian cows. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37:43-49.
- Sørensen M, Sørensen SPL 1940. The proteins in whey. *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg, Ser. Chimique.* 23 (7) 55-99. 1938-41.
- Soyeurt H, Bastin C, Colinet F G, Arnould V M R, Berry D P, Wall E, Dehareng F, Nguyen H N, Dardenne P, Schefers J, Vandenplas J, Weigel K, Coffey M, Theron L, Detilleux J, Reding E, Gengler N, McParland S 2012. Mid-infrared prediction of lactoferrin content in bovine milk: potential indicator of mastitis. *Animal.* Vol. 6(11). P. 1830–1838.
- Steijns J M, Van Hooijdonk ACM 2000. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br J Nut*, 84,11-17.
- Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler T T 2014. Immune components of bovine colostrum and milk. *American Society of Animal Science.* 1:3–9.
- Sun X, Jiang R, Przepiorski A, Reddy S, Palmano K P, Krissansen G W 2012. “Iron-saturated” bovine lactoferrin improves the chemotherapeutic effects of tamoxifen in the treatment of basal-like breast cancer in mice. *BMC Cancer*, 12, 591.
- Szwajkowska M, Wolanciuk A, Barłowska J, Król J, Litwinczuk Z 2011. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers’ immune system. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 29, 269–280.
- Şekerden Ö, Erdem H, Kankurdan B ve Özlü B 1999. Anadolu Mandalarında Süt Kompozisyonunu Etkileyen Faktörler ve Süt Kompozisyonunun Laktasyon Dönemlerine Göre Değişimi. *Tr. J. of Veterinary and Sciences*, 23. 505-509.
- Tasakali E, Petrotos K, Chatzilazarou A, Stamatopoulos K, D'Alessandro A G, Goulas P, Massouras T, Van Impe J F M 2014. Determination of lactoferrin in feta cheese whey with reversed-phase high-performance liquid chromatography. *American Dairy Science Association*, 97:4832-4837.
- Tsuda H, Kozu T, Iinuma G, Ohashi Y, Saito Y, Saito D, Akasu T, Alexander D B, Futakuchi M, Fukamachi K, Xu J, Kakizoe T, Iigo M 2010. Cancer prevention by bovine lactoferrin: From animal studies to human trial. *BioMetals*, 23 (3), 399-409.
- Turner S-A, Thomson N A, Auldism M J 2010. Variation of lactoferrin and lactoperoxidase in bovine milk and the impact of level of pasture intake. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 50:1, 33-40.

- Vasavada P ve Cousin M 2005. Dairy Science and Technology Handbook, Volumes 13. John Wiley & Sons, 978-1-56081-078-0. Edited by: Hui YH.
- Velusamy SK, Ganeshnarayan K, Markowitz K, Schreiner H, Furgang D, Fine DH, Velliyagounder K. 2013. Lactoferrin knockout mice demonstrates greater susceptibility to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease. J Periodontol. 84(11):1690–1701.
- Wakabayashi H, Abe S, Okutomi T, Tansho S, Kawase K, Yamaguchi H 1996. Cooperative anti-Candida effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agent. Microbiol. Immunol. 40 821–825.
- Wheeler T T, Hodgkinson A J, Prosser C G, Davis S R 2007. Immune components of colostrum and milk - A historical perspective. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 12:237–247.
- Yılmaz A, Ocak E, Kose S 2017. A Research on Milk Yield, Milk Composition and Body Weights of Anatolian Buffaloes, Indian J. Anim. Res., 51 (3):564-569.
- Yılmaz B. Tosun H. 2012. Sütte Bulunan Doğal Antimikrobiyal Sistemler ve Bunların Gıda Sanayinde Kullanımı. C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi.;8(1):11-20.
- Zarembek K A, Sugui J A, Chang Y C, Kwon-Chung K J, Gallin J I 2007. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. J. Immunol. 178 6367–6373.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Tekirdağ'da doğdu. İlkokul ve ortaokulu Safiye Osman Çeliker İlköğretim okulunda tamamladı. Lise öğrenimini Tekirdağ Lisesinde tamamladı. 2011 yılında Gümüşhane Üniversitesi Gıda mühendisliği bölümüne başladığı lisans eğitimini 2015 yılında tamamladı.