



**TÜRKİYE EŞEK POPULASYONLARINDA
KAPPA KAZEİN (CSN3) VE LAKTOFERRİN
(LTF) GEN POLİMORFİZMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Hasan BULUT

Yüksek Lisans

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL
2020**

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRKİYE EŞEK POPULASYONLARINDA KAPPA KAZEİN (CSN3) VE
LAKTOFERRİN (LTF) GEN POLİMORFİZMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Hasan BULUT

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİMDALI

Danışman: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

TEKİRDAĞ-2020

Her Hakkı Saklıdır



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Hasan BULUT



Bu tez çalışması (TÜBİTAK TOVAG) tarafından 215O555 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Prof. Dr. Fulya ÖZDİL danışmanlığında, Hasan BULUT tarafından hazırlanan “Türkiye Eşek Populasyonlarında Kappa Kazein (CSN3) ve Laktoferrin (LTF) Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından 17.01.2020 tarihinde Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

İmza:

Üye : Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

İmza:

Üye : Doç. Dr. Emel ÖZKAN ÜNAL

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans

TÜRKİYE EŞEK POPULASYONLARINDA KAPPA KAZEİN (*CSN3*) VE
LAKTOFERRİN (*LTF*) GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hasan BULUT

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

Bu çalışmada, Türkiye eşek populasyonlarında kappa kazein (*CSN3*) ve laktoferrin (*LTF*) genlerinde varyasyon, PCR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Türkiye'nin farklı bölgelerinden 108 bireye ait genomik DNA'lar materyal olarak kullanılmıştır. *CSN3* (235 bp) ve *LTF* (750 bp) genlerindeki polimorfizmlerin belirlenmesi amacıyla, *Pst*I, *Eag*I, *Dra*II, *Mbo*I restriksiyon enzimleri kullanılarak RFLP analizi yapılmıştır. *CSN3/Pst*I, *LTF/Dra*II ve *LTF/Mbo*I lokusları tüm örnekler için monomorfik bulunmuştur. *LTF* geninin *Eag*I restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda; GG homozigot (666, 84 bp), AG heterozigot (750; 666, 84 bp) ve AA homozigot (750 bp) olmak üzere üç genotip belirlenmiştir. *LTF* geninin 89. nükleotidinde Guaninden Adenine olan tek nükleotid değişimi farklı genotiplerin oluşmasını sağlamıştır. Bu tek nükleotid polimorfizmi eşeklerde ilk kez tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, çalışılan tüm eşek populasyonlarında G alleli, *LTF/Eag*I lokusunda dominant bulunmuştur. Bu çalışmada, ele alınan populasyonlar *LTF-Eag*I lokusu bakımından Hardy-Weinberg genetik dengesinde bulunamamıştır ($P < 0,05$). *CSN3* ve *LTF* genleri Türkiye'deki eşek populasyonlarında daha önce çalışılmadığından dolayı bu sonuçlar ilk olma özelliğindedir.

Anahtar kelimeler: Eşek, *CSN3*, *LTF*, PCR-RFLP, Polimorfizm

ABSTRACT

MSc. Thesis

INVESTIGATION OF KAPPA CASEIN (*CSN3*) AND LACTOFERRIN (*LTF*) GENE POLYMORPHISMS IN TURKISH DONKEY POPULATIONS

Hasan BULUT

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

In this study, genetic variation of *CSN3* and *LTF* genes in Turkish donkey populations were determined using PCR-RFLP and DNA sequencing methods. Genomic DNAs of 108 individuals from different regions of Turkey were used as material. *Pst*I, *Eag*I, *Dra*II, *Mbo*I restriction enzymes were used to determine polymorphisms in *CSN3* (235 bp) and *LTF* (750 bp) genes. *CSN3* / *Pst*I, *LTF* / *Dra*II and *LTF* / *Mbo*I loci were found monomorphic for all of the studied samples. The digestion of *LTF* gene with *Eag*I restriction enzyme produced three different genotypes as GG homozygous (666, 84 bp), AG heterozygous (750; 666, 84 bp) and AA homozygous (750 bp). A single nucleotide polymorphism (SNP) from Guanine to Adenine in the 89th position of the *LTF* gene, resulted the formation of different genotypes. This single nucleotide polymorphism was determined in donkeys for the first time. According to the results, G allele was found dominant in *LTF* / *Eag*I locus in the studied Turkish donkey populations. In this study, the studied populations were not found in Hardy-Weinberg genetic equilibrium in terms of *LTF* / *Eag*I genotype distributions ($P < 0.05$). As *CSN3* and *LTF* genes have not previously been studied in Turkish donkeys, these results are the first of a kind.

Key words: Donkey, *CSN3*, *LTF*, PCR-RFLP, Polymorphism

2020, 75 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Sütün Bileşimi ve Önemi.....	3
2.2. Süt Proteinleri Önemi ve Özellikleri	11
2.3. Serum Proteinleri	16
2.3.1. Laktoferrin	18
2.4. Kazeinler.....	21
2.4.1. Kappa kazein	23
2.5. Moleküler Markerler.....	24
2.5.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism-SNP).....	25
2.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Kesim Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP).....	25
3. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	27
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
4.1. Materyal	34
4.1.1. Materyal ve Örneklem	34
4.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	34
4.1.3. Çalışmada Kullanılan Tampon Çözeltiler	36
4.2. Yöntem	36
4.2.1. Genomik DNA İzolasyonu	36
4.2.2. <i>LTF</i> ve <i>CSN3</i> Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması.....	36
4.2.3. DNA Dizi Analizi ve Verilerin Analizi	40
4.2.4. <i>LTF</i> ve <i>CSN3</i> Gen Bölgelerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	40
5. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	42
5.1. <i>LTF</i> Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltımı	42

5.1.1. <i>LTF</i> Gen Bölgesi <i>DraII</i> ve <i>MboI</i> Restriksiyon Enzimleri ile Kesim Sonuçları	42
5.1.2. <i>LTF</i> Gen Bölgesinin <i>EagI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesim Sonuçları	43
5.1.3. <i>LTF</i> Gen Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu	47
5.2. <i>CSN3</i> Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltım Sonuçları	48
5.2.1. <i>CSN3</i> Gen Bölgesinin <i>PstI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesim Sonucu	49
5.2.2. <i>CSN3</i> Gen Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ	66



ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Eşek sütü kompozisyonunun bazı süt türleriyle karşılaştırılması	4
Çizelge 2.2. Farklı türlere ait yağ asit profilleri (min.-mak. değerler)	7
Çizelge 2.3. Farklı türlere ait sütlerin vitamin içeriklerinin karşılaştırılması.....	9
Çizelge 2.4. Farklı türlerde temel süt makro mineralleri ve iz elementler	10
Çizelge 2.5. Süt proteinlerinin biyolojik fonksiyonları	12
Çizelge 2.6. Farklı türlerden elde edilen süt proteinlerinin amino asit içeriklerinin karşılaştırılması.....	15
Çizelge 2.7. Farklı türlere ait sütlerde bulunan serum proteini miktarları	16
Çizelge 2.8. Eşek sütünün bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi	17
Çizelge 3.1. <i>LTF</i> ve <i>CSN3</i> genleri bakımından atgiller (<i>Equidae</i>) familyasında yapılmış bazı genetik çalışmaların özeti	28
Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında incelenen bireylerin kan örneklerinin toplandığı bölgeler, iller ve örnek sayıları	34
Çizelge 4.2. Tez çalışmasında kullanılan alet ve cihazların listesi.....	35
Çizelge 4.3. Tez çalışmasında kullanılan stok ve tampon çözeltiler	36
Çizelge 4.4. PCR-RFLP işleminde kullanılan primerler ve restriksiyon enzimleri	38
Çizelge 4.5. <i>LTF</i> gen bölgesi için PCR reaksiyonu ve konsantrasyonları	38
Çizelge 4.6. <i>CSN3</i> gen bölgesi için PCR reaksiyonu ve konsantrasyonları	39
Çizelge 4.7. PCR sıcaklık ve döngüleri	39
Çizelge 4.8. <i>DraII</i> , <i>EagI</i> , <i>MboI</i> ve <i>PstI</i> restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu	41
Çizelge 4.9. Kullanılan restriksiyon enzimleri, tanıma dizileri ve fragment büyüklükleri	41
Çizelge 5.1. <i>LTF</i> gen bölgesi <i>EagI</i> restriksiyon enzimi kesim sonucu oluşan genotipler ve fragment büyüklükleri	44
Çizelge 5.2. Çalışılan örneklerin <i>LTF/EagI</i> lokusunda genotip dağılımları.....	45
Çizelge 5.3. Çalışılan tüm örneklerin ve bölgeler bazında ele alınan örneklerin <i>LTF/EagI</i> lokusunda genotip ve allel frekansları	46

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Eşek sütünün temel fonksiyonel özellikleri.....	6
Şekil 2.2. Laktoferrinin bazı fonksiyonel özellikleri.....	18
Şekil 2.3. Laktoferrinin antibakteriyel etki mekanizması.....	20
Şekil 2.4. Laktoferrinin antiviral etki mekanizması	21
Şekil 2.5. Kazeinin misel yapısı	22
Şekil 2.6. Nükleotid dizisi üzerinde nokta mutasyonun (SNP) gösterimi	25
Şekil 2.7. PCR-RFLP ve allellerin tespiti.....	26
Şekil 4.1. Çalışılan <i>LTF</i> gen bölgesinin nükleotid dizisi. İleri-geri primerler, 14. ekzon (kırmızı renk) ile 14. intron (siyah renk) bölgeleri dizi üzerinde gösterilmiştir.....	37
Şekil 4.2. Çalışılan <i>CSN3</i> gen bölgesinin nükleotid dizisi. İleri-geri primerler, promotor bölge (siyah renk) ile 1. ekzon bölgesi (kırmızı renk) dizi üzerinde gösterilmiştir	37
Şekil 5.1. <i>LTF</i> gen bölgesi PCR ürünleri (750 bç), M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder.....	42
Şekil 5.2. <i>LTF</i> gen bölgesinin <i>DraII</i> restriksiyon enzimi ile kesimi, M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder	43
Şekil 5.3. <i>LTF</i> gen bölgesinin <i>MboI</i> restriksiyon enzimi ile kesimi, M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder	43
Şekil 5.4. <i>LTF</i> gen bölgesi <i>EagI</i> restriksiyon enzimi ile kesimi, M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder	44
Şekil 5.5. Bir örneğe ait <i>LTF</i> gen bölgesinin kısmi kromotogram görüntüsü.....	47
Şekil 5.6. <i>LTF</i> gen bölgesine ait 22 bireyin hizalanmış görüntüsünün bir bölümü.....	48
Şekil 5.7. G→A transisyonunu gösteren <i>LTF</i> gen bölgesinin kısmi sekansı. (a) <i>EagI</i> heterozigot genotip (AG); (b) homozigot genotip (GG)	48
Şekil 5.8. <i>CSN3</i> gen bölgesinin PCR ürünleri (235 bç), M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder	49
Şekil 5.9. <i>CSN3</i> gen bölgesinin <i>PstI</i> restriksiyon enzimi ile kesimi M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder	49
Şekil 5.10. Bir örneğe ait <i>CSN3</i> gen bölgesinin kısmi kromotogram görüntüsü.....	50
Şekil 5.11. <i>CSN3</i> gen bölgesine ait 7 bireyin hizalanmış görüntüsünün bir bölümü	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin nükleotidi
AFLP	: Amplified fragment length polymorphisms (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)
ALP	: Amplicon length polymorphism (Amplikon uzunluk polimorfizmi)
bç	: Baz çifti
bdH ₂ O	: Bidestile su
C	: Sitozin nükleotidi
Ca	: Kalsiyum
CAPS	: Cleaved amplified polymorphic sequence (Kesilip çoğaltılmış polimorfik diziler)
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
Fe	: Demir
G	: Guanin nükleotidi
ISSR	: Inter simple sequence repeat (Baz dizilimi arası tekrarlamalar)
IU	: International unit (Uluslararası birim)
K	: Potasyum
kDa	: Kilodalton
M.Ö	: Milattan önce
Mg	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mM	: Milimolar
Mn	: Manganez
Na	: Sodyum
NCBI	: National Center for Biotechnology Information (Ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi)
ng	: Nanogram

P	: Fosfor
pmol	: Pikomol
RAPD	: Random amplified polymorphic DNA (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
RFLP	: Restriction fragment length polymorphisms (Kesim parçacık uzunluk polimorfizmi)
RNA	: Ribonükleik asit
SA	: Serum albumin
SCAR	: Sequence characterized amplified region (Sekansı karakterize edilmiş çoğaltılmış bölgeler)
SSR	: Simple sequence repeat (Basit dizi tekrarları)
T	: Timin nükleotidi
TBE	: Tris borikasit edta
Zn	: Çinko
β -LG	: Betalaktoglobulin

TEŞEKKÜR

Bana bu tez çalışmasını yapma olanağı sağlayan, bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren, yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Fulya ÖZDİL'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana yardımcı olan ve yol gösteren kıymetli hocam Arş. Gör. Dr. Raziye IŞIK'a, bilgi ve tecrübeleriyle bana kıymetli katkılar sağlayan Doç. Dr. Emel ÖZKAN ÜNAL ve Prof. Dr. Kemal KARABAĞ hocama ve bana emeği geçen herkese teşekkürü borç bilirim.

Eğitimim boyunca vermiş olduğu desteklerden dolayı aileme teşekkür ederim.

Ocak, 2020

Hasan BULUT
Ziraat Mühendisi

1. GİRİŞ

Eşeklerin (*Equus asinus*) Kuzeydoğu Afrika'da yaklaşık 6.000–7.000 yıl önce evcilleştirildiği düşünülmektedir. Eşeklerin, eski dünya'daki ticaret faaliyetlerinin yanı sıra insan nüfusunun da genişlemesinde önemli bir rolü bulunmaktadır (Camillo vd., 2018). Evcil eşeğin atalarının (*Equus asinus*) Afrika Yaban Eşekleri olduğu düşünülmekte olup ve üç alt türe ayrıldıkları bildirilmektedir. Bunlar; Kuzey Afrika Yaban Eşeği (*Equus asinus atlanticus*), Nubya Yaban Eşeği (*Equus asinus africanus*) ve Somali Yaban Eşeğidir (*Equus asinus somalicus*) (Kugler, Grunenfelder ve Broxham, 2008). Afrika kıtasına özgü yaban eşeklerin (*Equus africanus*), Atlas Dağları'nın doğusundan Nubya'ya, Kızıl Deniz'in aşağısına ve günümüzdeki Kuzey Kenya sınırına kadar yayılan alanda farklı alt türleri bulunmaktadır. Nubya yabani eşeğinin (*Equus asinus africanus*), evcil eşeklerin atası olduğu birçok kaynakta yer almaktadır. Eşeklerin yabani akrabalarından ayrılma ölçüsü Antik Mısır'daki duvar resimleriyle izlenebilmektedir. Antik Mısır'daki Eski Krallık'tan Orta Krallık'a geçişte (M.Ö. 2500-1500 arası) eşeklerde siyah omuz şeridinin yavaşça kaybolduğu bildirilmektedir (Blench, 2004).

Günümüzde eşekler, Kuzey Afrika göçebe bedevileri tarafından sıkça kullanılmaktadır. Mezopotamya'da ise eşekler çeki ve yük hayvanı olarak kullanılmaktadır. Avrupa'da, İkinci Dünya Savaşı'ndan önce eşekler tarımda; süt, saman gibi ürünlerin taşımada insanların kullanımına hizmet etmişlerdir. Tarımda mekanizasyonun iyileştirilmesi, otomobil endüstrisinin gelişmesi ve insanların köyden kente hareketi ile eşeklerin önemi ve sayısı zaman içerisinde önemli ölçüde azalmıştır (Camillo vd., 2018). Evcil eşeğin Avrupa'ya Yunanlılar tarafından M.Ö. 2000'de Akdeniz'in kuzey kıyılarındaki kolonilerle getirildiği, daha sonra Romalıların eşekleri imparatorluklarının sınırlarına kadar yaymaya devam ettiği bildirilmektedir (Vilá, Leonard ve Beja-Pereira, 2006). İber ve İtalya yarımadalarında, M.Ö. 2000 yılından kalma kaya resimleri bulunmakta olup, üzerlerinde evcil hayvan olarak kullanılan eşekler görülmektedir. Yunanistan'da katır ve eşekler tarım, ulaşım ve askeri alanlarda birçok iş için kullanılmıştır. Eşeklerin ticarete kullanımı, Suriye'nin kuzeydoğusundaki yaklaşık 4300 yıllık Tel Brak ve İran'daki yaklaşık 4800 yıllık Tal-e Malyan'da eşek kalıntılarının bulunmasıyla ortaya çıkarılmıştır (Zeder, Emshwiller, Smith ve Bradley, 2006). Bu hayvanların önemi bölgeden bölgeye farklılık göstermekle beraber bazı yerlerde eşekler özenli bir şekilde yetiştirilmiş, bazı bölgelerde ise eşek önemsiz bir hayvan olarak kabul edilmiştir. Antik çağda eşekler tarım, ticaret ve orduda iş gücü olarak

kullanılmalarının yanı sıra süt, deri ve et üretimi için de kullanılmıştır (Kugler vd., 2008). Tarihte ise eşekler, yüzyıllar boyunca Çin ile Avrupa arasındaki Asya İpek Yolu üzerinde başlıca taşıma ve ulaşım aracı olarak kullanılmışlardır (Yılmaz, Saim ve Mehmet, 2012).

Eşeğin evcilleştirilmesi, insan toplulukları için, tarımda çekiş gücü ile ticaret ve hareketlilik açısından yararlı olmasından dolayı önem arz etmektedir. Eşeklerin ekolojik ihtiyaçları atlarınkinden farklı olduğu için özellikle Avrasya ve Kuzey Afrika'nın güney ve daha kurak bölgelerinde daha etkin kullanılmışlardır. Kurak bölgelerde, evcil eşekler, diğer bölgelerdeki atlara benzer bir rol oynamışlardır (Vilá vd., 2006). Eşekler, sert çöl şartlarına adapte olmuş hayvanlardır ve kurak topraklarda ağır yükleri taşıma kabiliyetleri ile göçebe çobanların daha uzaklara ve daha sık hareket etmelerine, sürülerini taşımalarına olanak sağlamıştır. Eşeklerin evcilleştirilmesi, Mısır'da büyük ölçekli gıda dağıtımını sağlayarak Afrika ve Batı Asya'daki kara ticaretini genişletmiştir. Bugün dünyanın en kurak, engebeli ve daha yoksul bölgelerinde eşekler ve katırlar ulaşım için hala kullanılmaya devam etmektedir (Rossel vd., 2008). Diğer kullanım alanları arasında süt üretimi (insan beslenmesinde ve kozmetik endüstrisinde), et üretimi (bazı ülkelerde çok sınırlı), onkoterapi ve son olarak binicilik ve ekoturizm gibi rekreasyon amaçlı kullanımlar yer almaktadır (Aspri, Economou ve Papademas, 2017).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Sütün Bileşimi ve Önemi

Süt, büyüme ve gelişme periyodu süresince, immünolojik olarak olgunlaşmamış yeni doğanların beslenmesi için dişi memelilerin meme bezinin epitel hücreleri tarafından üretilen bir sıvıdır (Walzem, Dillard ve German, 2002). Bir yaşam mucizesi denilebilecek kadar önemli besin değerine sahip olan sütün, insan yaşamındaki yerinin insanlık tarihi kadar eski olduğu bilinmektedir. Sütle ilgili ilk veriler 5000 yıl önce Dicle ve Fırat ırmakları arasında kurulan Sümer Uygarlığı'nın Ur kentinde ortaya çıkmıştır (Özdemir ve Acar Tek, 2015).

Süt, tarım devriminden bu yana insan beslenmesinin temel bir parçası olarak vücuda önemli besin maddeleri sağlayarak hem beslenmede hem de sağlık açısından kritik bir öneme sahiptir (Aspri vd., 2017). İnsan beslenmesi için gerek duyulan besin maddeleri bitkisel ve hayvansal gıdalarda değişen oranlarda bulunmakla beraber süt, özellikle gelişme çağında gerekli olan mineral maddeler, protein ve vitaminleri diğer gıdalara göre daha yeterli seviyede içermektedir. Ayrıca özellikle kalsiyum, fosfor, riboflavin, vitamin B12 ve yüksek kaliteli proteine sahip olduğu bilinmektedir (Andiç, Şahin ve Koç, 2002).

Sütün toplum beslenmesinde ve sağlığının korunmasında çok önemli yeri olmakla beraber, her yeni doğan yavrunun ilk ve temel besin maddesidir. İnsanın doğumundan ölümüne kadar geçen yaşam sürecinin her evresinde, başlangıçta anne sütü ve daha sonra diğer sütler önem arz etmektedir. Süt ayrıca içme sütü, yoğurt, peynir, tereyağı, kaymak, süt tozu, kazein gibi birçok ürünün ana maddesini oluşturmakta; birçok gıdanın hazırlanmasında zenginleştirici, besin değerini ve kalitesini arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Süt, doğal haliyle doğrudan tüketilebildiği gibi; süt tozu, kazein, serum proteinleri, süt yağı, bebek mamaları, dondurma, bisküvi, çorba, tarhana, tatlı gibi gıdaların üretiminde de yararlanılmaktadır (Metin, 2001). Sağlıklı yaşam için her gün yetişkin bireylerin 200-400 ml, çocuklar, gençler, gebe ve emziren kadınların ise 600-800 ml süt ve süt ürünleri tüketmeleri önerilmektedir (Sayın, Taşcıoğlu ve Mencet, 2011). Süt, ayrıca çocuklarda, içerdiği kalsiyum nedeniyle boy ve kemik gelişimine katkıda bulunmaktadır. Çocukluğunda bol süt tüketen yetişkinlerin yeterli süt tüketmeyenlerle kıyaslandığında daha yüksek kemik yoğunluğuna sahip olduğu görülmüştür (Black, Williams, Jones ve Goulding, 2002). Süt ve süt ürünleri tüketiminin arttırılması, yeterli ve dengeli besin ögesi ve enerji alınımının sağlanması sağlık alanındaki uzmanlar tarafından önerilmektedir. Süt ve süt ürünlerine özellikle kalsiyum ve fosfor başta

olmak üzere bazı önemli mineraller, protein ve riboflavin gibi bazı B grubu vitaminlerin kaynağı olarak bakıldığında halk sağlığı açısından önemli bir besin grubu olduğu hemen anlaşılmaktadır (Ünal ve Besler, 2008). Ayrıca süt, laktoferrin, immünoglobulinler, glikoproteinler, hormonlar ve enzimler gibi çok sayıda protein içermektedir (Roncada vd., 2012). Süt türleri arasında besin bileşenlerinin miktarları değişkenlik göstermektedir (Çizelge 2.1). Eşek sütü, protein çeşitliliği, laktoz, kül miktarı gibi özellikleri nedeniyle insan sütüne yakın içeriğe sahiptir (Budak ve Gürsel, 2012).

Çizelge 2.1. Eşek sütü kompozisyonunun bazı süt türleriyle karşılaştırılması (g/100g) (Vincenzetti, Pucciarelli, Polzonetti ve Polidori, 2017; Cunsolo vd., 2017; Yıldırım, 2014; Metin, 2001)

Süt türü	Su	Kuru madde	Yağ	Protein	Laktoz	Kül	Kazein/Serum proteini oranı
Eşek	90,39	9,61	1,21	1,74	6,23	0,43	1,30
Kısrak	90,48	9,52	0,85	2,06	6,26	0,35	1,10
İnek	87,62	12,38	3,46	3,43	4,71	0,78	4,60
Manda	82,50	17,50	7,40	4,40	5,00	0,80	5,28
Koyun	80,10	19,9	7,90	6,20	4,90	1,00	2,10
Keçi	86,77	13,23	4,62	3,41	4,47	0,73	3,50
İnsan	87,57	12,43	3,38	1,64	6,69	0,22	0,40

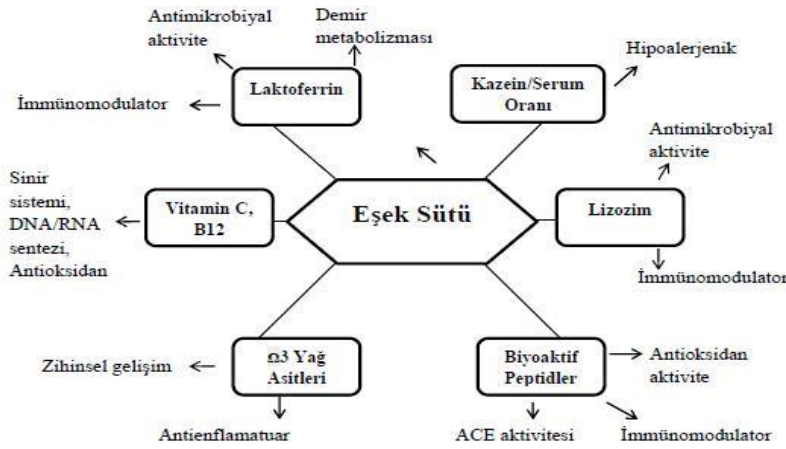
Geleneksel olarak eşek sütü, kozmetik ve tedavi edici özellikleriyle tanınmıştır. Roma döneminde eşek sütü ürünleri kullanılmış ve uzun bir süre eşek sütü yaygın bir ilaç olarak kabul edilmiştir (Madhusudan vd., 2017). Eski Roma'dan beri iyi bilinen eşek sütünün dermatolojide kullanımı, ciltte yatıştırıcı ve kafa derisi iltihaplarında etkili olan lizozim içeriği ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Vincenzetti, Polidori ve Vita, 2008). Eşek sütü cildin nemlendirilmesinde ve cilt yaşlanmasını önleyici olarak tanımlanan anti-aging, anti-oksidan ve rejenere edici aktif doğal bileşikleri içerdiği için yaygın olarak kullanılmaktadır (Cunsolo vd., 2017). Kraliçe Kleopatra ve Neron'un eşi Popea'nın pürüzsüz ve genç bir cilt için eşek sütü banyosu yaptığı, Yunan hekim Hipokrat'ın (M.Ö. 370-460), eşek sütünü karaciğer sorunları, bulaşıcı hastalıklar, ateş, zehirlenmeler, ödem gibi çeşitli rahatsızlıkların

tedavisinde kullandığı bildirilmektedir (Bidasolo, Ramos ve Gomez-Ruiz, 2012). Eşek sütünün geleneksel kullanımını nedeniyle 20. yüzyılın başlarında İtalya, Fransa, Belçika, İsviçre ve Almanya'da eşek çiftlikleri kurulmuştur (Aspri vd., 2017). Eşek sütünün besin değeri ve tedavi edici özelliği eski uygarlıklardan beri bilinmesine rağmen son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalarla; hipoalerjenik olması, insan sütüne benzerliği ve kozmetik sektöründe kullanılması nedeniyle önem kazanmıştır (Taşçı, 2011).

İnek sütü, bebeğin anne sütünden kesilmesinden sonra bebek beslenmesinde yaygın olarak insan sütünün yerini alır, ancak çocuklarda en yaygın gıda alerjilerinden biridir ve anormal bir immünolojik cevaba yol açabilmektedir. İnek sütü proteini alerjisi erken çocukluk döneminde görülen en yaygın gıda alerjisidir ve üç yaşından küçük çocuk nüfusunun %2 ila 5'ini etkilemektedir (Madhusudan vd., 2017). Ancak İnsanlarda sığır süt proteini alerjisi ve laktoz intoleransı karıştırılabilen durumlar olduğu için aralarındaki fark önemlidir. Sığır sütü proteini alerjisi bir gıda alerjisidir, yani bir gıda proteinine karşı alerjik olmayan birey için normalde zararsız olan ters bağışıklık reaksiyonudur. Laktoz intoleransı ise laktozu hidrolize etmek için gerekli olan β -galaktosidaz enziminin (laktaz) eksikliğine bağlı olarak alerjik olmayan bir gıda duyarlılığıdır. Laktaz eksikliği süt alımından sonra abdominal semptomlar ve kronik diyare olarak kendini göstermektedir. Laktoz intoleransı bir hastalık değildir. Laktoz intoleransının yan etkileri, süt alerjisine neden olandan daha yüksek bir süt tüketimi seviyesinde gerçekleşir. Sığır sütü proteini alerjisi önemlidir, çünkü sığır sütleri erken bebeklik döneminde büyük miktarlarda alınan ilk yabancı antijendir ve ölüme sebep olabilmektedir (Uniacke-Lowe, 2011). Eşek sütü, inek sütü alerjisi olan çocuklarda yapılan klinik çalışmalarda başarıyla kullanılmış olup besinsel yeterlilik ve iyi lezzet bakımından yeterli olduğu tespit edilmiştir On dokuzuncu yüzyılın sonlarında eşek sütünün Fransa'da yetim kalan bebekleri beslemek için kullanıldığı bildirilmektedir (Madhusudan vd., 2017). Bazı başka çalışmalar da eşek sütünü, inek sütüne karşı yeterli besin içeriğine sahip alternatif bir kaynak olarak önermektedir (Carroccio vd., 2000; Iacono vd., 1992; Monti vd., 2007). Bu nedenle, emzirmenin mümkün olmadığı ve çocukların inek sütü proteini alerjisi olduğu durumlarda eşek sütünün inek sütünün ikamesi olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Bidasolo vd., 2012).

Eşek ve kısrak sütünün inek sütüne kıyasla çok daha az alerjik olmasının nedeni, içerdiği kazein ve β -laktoglobulin miktarının inek sütünden düşük olması olarak gösterilmektedir (Taşçı, 2011). Ayrıca protein içeriğinin inek sütüne göre düşük olmasından

dolayı böbrekler üzerinde yorucu etki göstermemektedir (Polidori ve Vincenzetti, 2012). Eşek sütü verimi ırklara göre farklılık göstermekle birlikte 350 g ile 850 g arasında değişmektedir. Verimin düşük olması nedeniyle eşek sütü üretimi ekonomik olamamaktadır (Özdemir ve Tek, 2015). Eşek sütünün yüksek laktoz içeriği, tadını olumlu etkilediğinden, sütün lezzetli olmasını sağlamaktadır (Budak ve Gürsel, 2012). Yüksek laktoz içeriği osteogenez süreçlerini desteklemekte, kalsiyum ve fosfor mineralinin bağırsak emilimini kolaylaştırmakta ve kemik yapısında mineral birikimini etkileyerek osteoporozun önlenmesine yardımcı olmaktadır. Eşek sütünün çeşitli fonksiyonel özellikleri Şekil 2.1’de verilmiştir (Aspri vd., 2017).



Şekil 2.1. Eşek sütünün temel fonksiyonel özellikleri (Aspri vd., 2017)

Çiğ eşek sütünün mikrobiyolojik verilerinin oldukça düşük olduğu belirtilmektedir. Düşük mikrobiyal sayımın nedeninin, memenin doğal anatomik pozisyonu, küçük boyutu ve bu nedenle memelerin daha az bakteri kontaminasyonuna maruz kalmasının yanı sıra lizozim, immüoglobulinler, laktoferrin ve laktoperoksidaz gibi doğal antimikrobiyal bileşenlerin varlığına bağlı olduğu bildirilmektedir. Bu bileşenler eşek sütüne, geniş bir bakteri spektrumunun büyümesini önleme kabiliyeti sağlamıştır. Ayrıca, sindirim sisteminde gastrointestinal enfeksiyonların insidansını azaltma ve meme bezinin enfeksiyonlarına karşı savunma yapma becerisi katmaktadır (Aspri vd., 2017).

Eşek sütünün yağ içeriği, kısırak sütüninkine çok yakındır, fakat insan sütü de dahil olmak üzere diğer ruminant (inek, koyun, keçi) sütleriyle karşılaştırıldığında düşüktür. Sonuç olarak, eşek sütündeki ortalama enerji değeri (1939,4 kJ / kg), kısırak sütüne (1877,8 kJ / kg) benzer, ancak diğer ruminantların sütüne göre daha düşüktür. Eşek sütünü bebeklerin beslenmesinde alternatif olarak düşünersek bu düşük enerji değeri, bebeğin diyetinin sadece

eşek sütünden kaynaklanması durumunda bebeğin enerji alımı için bir sorun olabilmektedir ancak bu sorun süte orta zincirli trigliseritler veya ayçiçeği yağı ilavesiyle aşılabilmektedir (Vincenzetti vd., 2017). Lipit fraksiyonu, yüksek seviyelerde esansiyel yağ asitleri ve düşük doymuş yağ asitleri ile karakterize edilmektedir. Eşek sütünde bulunan doymamış yağ asitlerinin varlığı, kardiyovasküler, oto-immün ve inflamatuvar hastalıkların önlenmesinde çok yararlı olduğu bildirilmektedir (Cunsolo vd., 2017). Genel olarak, ruminant olmayanların sütlerinden elde edilen süt yağı (kısırak ve eşek), ruminantların sütlerinden daha düşük oranda doymuş yağ asitleri ve tekli doymamış yağ asitleri, daha yüksek miktarda ise C-18: 2 ve C-18: 3 içermektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri miktarına bakıldığında, en yüksek değer kısırak sütünde (%51'e kadar), ardından eşekler (%30'a kadar) ve daha sonra insan sütünde (%19'a kadar) görülmektedir. Kısırak ve eşek sütünden elde edilen yağ asitleri çoğunlukla doymamış veya kısa zincirlidir. Ruminant olmayanların sütlerinin bu özelliğine ek olarak, kısırak ve eşek sütlerinin, ruminant sütlerine kıyasla daha fazla linoleik (C-18: 2, ω -6) ve α -linolenik asit (C-18: 3, ω -3) konsantrasyona sahip olduğunu bildirilmiştir (Çizelge 2.2) (Gantner, Mijić, Baban, Škrtić ve Turalija, 2015). Süt yağı asidi bileşimlerinde gözlemlenen farklılıkların kısmen yemdeki farklılıklardan kaynaklandığı, ancak esas olarak yağ asidi sentezi mekanizmalarındaki farklılıklara bağlı olduğu belirtilmektedir. Ayrıca konjuge linoleik asit (KLA) izomerlerinin bağışıklık sistemini düzenlemesinin yanı sıra kardiyovasküler hastalıklar, karsinogenez, diyabet ve osteoporoz riskinin azalmasına neden olabileceği bildirilmiştir (Gantner vd., 2015).

Çizelge 2.2. Farklı türlere ait yağ asit profilleri (min.-mak. değerler) (Gantner vd., 2015; El-Salam ve El-Shibiny, 2011; Ahmad, Anjum, Huma, Sameen ve Zahoor, 2013)

Süt	DYA(%)	TDYA(%)	ÇDYA(%)	C-18: 2(%)	C-18: 3(%)	KLA(%)
Eşek	46-68	15-35	14-30	6-15,2	4,0-16,3	İz miktar
Kısırak	37-55	18-36	13-51	3,6-20,3	2,2-31,2	0,02-0,1
İnek	55-73	22-30	2,4-6,3	1,2-3,0	0,3-1,8	0,2-2,4
Manda	62-70	24-29	2,3-3,9	0,9	0,7	0,4-0,6
Keçi	59-74	22-36	2,6-5,6	1,9-4,3	0,3-1,2	0,3-1,2
Koyun	57-75	23-39	2,5-7,3	1,6-3,6	0,5-2,3	0,6-1,1
İnsan	36-45	33-45	8,0-19,0	6,0-17,7	0,6-3,4	0,2-1,1

Toplam yağ asitlerinin %'si

DYA: Doymuş yağ asitleri

TDYA: Tekli doymamış yağ asitleri

ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri

C-18:2: Linoleik asit

C-18:3: Alfa linoleik asit

KLA: Konjuge linoleik asit

Vitaminler önemli biyodüzenleyicilerdir ve yağda çözünen (A, D, E, K) ve suda çözünen (C ve B kompleksi) olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar, çeşitli işlevlerde yer aldıklarından beslenme için temel bileşiklerdir. Örneğin D vitamini hormon öncüsü olarak görev yapmakta, C ve E vitaminleri serbest radikalleri uzaklaştıran antioksidanlar olarak işlev görürken, B vitamini kompleksi prostetik enzim grubunu oluşturmaktadır (Vincenzetti vd., 2017). Eşek sütündeki yüksek vitamin içeriği, insan beslenmesi ve sağlığı üzerine olumlu etkisi olan mükemmel bir besindir. Sütün toplam vitamin içeriği, annenin diyetine (suda çözünen vitaminler annenin diyetinden yağda çözünen vitaminlerden daha fazla etkilenir) bağlı olarak değişebilmektedir (Aspri vd., 2017). C vitamini demirin emilimine yardımcı olup, antioksidan etkiye sahiptir ve kollajen oluşumu için gereklidir. Ayrıca, C vitamini alımının yüksek riskli bebeklerde atopik dermatit gelişiminde koruyucu bir etkisi olduğu görülmektedir. B vitaminleri, sekiz adet suda çözünür vitamin grubunu içermekte olup hücrel fonksiyonda önemli bir rol oynamaktadır. Vücutta bazı katabolik ve anabolik enzimatik reaksiyonlarda koenzim olarak işlev görmektedir. B vitaminlerinin içeriği ile ilgili olarak, literatürdeki değerler oldukça değişkendir (Altomonte, Salari, Licitra ve Martini, 2018).

Eşek sütü, sığır ve insan sütlerinden çok daha yüksek konsantrasyonda B12 (kobalamin) içermektedir. Spesifik olarak, B12 vitamini, sağlıklı sinir hücrelerinin korunmasından sorumludur ayrıca DNA ve RNA'nın üretilmesine yardımcı olmaktadır. Eşek sütü, B3 (niasin) hariç, B kompleksinin diğer vitaminleri olan B1 (tiamin), B2 (riboflavin) vitaminini insan sütünden daha yüksek miktarda içermektedir (Çizelge 2.3). A vitamini özellikle büyüme, gelişme, bağışıklık sistemi, epitel hücreleri ve göz sağlığı açısından önemli olmasının yanında gastrointestinal ve solunum yolu enfeksiyonlarına karşı önemli koruma sağlamaktadır. E vitamini temel olarak süt membranında bulunan, antioksidan aktiviteye sahip dört tokoferol (doymuş izoprenoid yan zincir) ve dört tokotrienol (doymamış izoprenoid yan zincir) ile temsil edilen sekiz biyolojik olarak aktif formdan oluşmaktadır (Altomonte vd., 2018).

Eşek sütü, sığır ve insan sütü ile karşılaştırıldığında daha düşük miktarda A ve E vitamini içermekte ve toplam C vitamini içeriği, 6-12 aylık çocuklar için önerilen günlük C vitamini alımını karşılamaktadır (Aspri vd., 2017). D vitamini, kalsiyum homeostazında ve kemik metabolizmasında önemli bir rol oynayan ve aynı zamanda bir hormon gibi davranan, antirahit aktiviteye sahip bir grup bileşiktir. D vitamininin eksikliğini önlemek için günde

bebeklerde 400 IU, çocuklarda 600 IU D vitamini alımı önerilmektedir (Altomonte vd., 2018). Amiata ırkı eşek sütünde, sığır ve insan sütü için literatürde bulunan ortalama değerlerden (0,03 µg / 100 mL) daha yüksek D vitamini içeriği (2,3 µg / 100 mL +0,86 920 IU) olduğu bildirilmektedir (Martini, Altomonte, Licitra ve Salari, 2018). Eşeklerdeki D vitamini miktarı, ineklerde bildirildiği gibi mevsimsel değişiklikler gösterdiği, yaz aylarında kış aylarında olduğundan daha yüksek bir D vitamini konsantrasyonu bulunduğu belirtilmiştir. Eşek sütünün antiinflamatuvar, antitümör, hipolipidemik etkileri ve D vitamini içeriği yanında deneysel modellerde kanıtlanmış vücut kompozisyonu üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, yaşlılar ve obezite tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Martini vd., 2018).

Çizelge 2.3. Farklı türlere ait sütlerin vitamin içeriklerinin karşılaştırılması (Uniacke-Lowe, 2011; Altomonte vd., 2018)

Vitamin (mg/L)	Keçi	Koyun	Manda	Sığır	Kısırak	Eşek	İnsan
B ₁ (Tiamin)	0,49	0,48	0,50	0,37	0,30	0,41	0,15
B ₂ (Riboflavin)	1,50	2,30	1,00	1,80	0,30	0,64	0,38
B ₃ (Niasin)	3,20	4,50	0,80	0,90	1,40	0,74	1,70
B ₁₂ (Kobalamin)	0,70	0,007	3,00	0,004	0,003	1,10	0,50
A & β-karoten	0,50	0,50		0,32-0,50	0,12	0,017-0,586	2,00
D ₃ (Kolekalsiferol)				0,003	0,003	0,000-0,023	0,001
E (α-Tokoferol)				0,98-1,28	1,128	0,059-0,807	6,60
K (Filokinon)				0,011	0,020		0,002
C (Askorbik asit)	9,00	220,00		21,00	17,20	12,00-57,00	43,00

Minerallerin insan beslenmesindeki önemi büyüme ve iskelet yapısı gelişiminde temel bir rol oynadıkları için iyi bilinmektedir (Aspri vd., 2017). At ve eşek sütünün içindeki temel makro mineraller göz önüne alındığında Ca ve P konsantrasyonları at ve eşek sütünde benzer iken, insan sütünden yaklaşık 3 kat daha yüksek olduğu, inek sütünden yaklaşık 1,5-2 kat daha düşük olduğu görülmektedir. At ve eşek sütündeki K, Na ve Mg konsantrasyonları, insan sütündekilere benzer görülmektedir (Çizelge 2.4) (Salimei ve Fantuz, 2012). Yeterli kalsiyum alımı, Ca/P oranı, ayrıca Mg ve D vitamini kemik sağlığı ve gelişimi için hayati öneme

sahiptir. Eşek ve insan sütünün önerilen Ca/P oranı (1-2: 1) aralığında olup ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından tavsiye edilen $Na/K \leq 1$ sınırın altındadır. Çocuklarda hipertansiyonun gelecekteki gelişimi ve ciddiyetinde önemli bir rol oynadığından düşük Na/K oranı önerilmektedir (Altomonte vd., 2018). At ve eşek sütündeki tüm makro mineraller laktasyon döneminde önemli ölçüde değişmektedir. Bununla birlikte, Fe ve Zn'nin insan sütündeki seviyelere benzer veya daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Salimei ve Fantuz, 2012). Eşek sütündeki ortalama toplam mineral içeriği, insan sütünden biraz yüksektir. Bebekler, çocuklar ve ergenler çinko için artan gereksinimlere sahiptir ve bu nedenle çinko eksikliği riski daha yüksektir. Büyüme dönemlerinde çinko eksikliği, gelişme zayıflığına neden olmaktadır. Epidermal, gastrointestinal, merkezi sinir, immün, iskelet ve üreme sistemleri klinik olarak çinko eksikliğinden en çok etkilenen sistemlerdir (Altomonte vd., 2018).

Çizelge 2.4. Farklı türlerde temel süt makro mineralleri ve iz elementler (Salimei ve Fantuz, 2012; Park, Juárez, Ramos ve Haenlein, 2007; Shakerian, Kiani ve Ehsani, 2016; Ahmad vd., 2013)

İçerik	Keçi ^a	Koyun ^a	İnek ^a	Manda ^a	At ^b	Eşek ^b	İnsan ^b
Na	410	440	580	475	167-200	100-268	180
P	1210	1580	1190	976	200-1200	320-650	140
K	1810	1360	1520	1581	300-800	240-747	530
Ca	1340	1930	1220	1850-1950	500-1300	330-1140	278
Mg	160	180	120	200	40-110	40-83	35
Ca/P	1,10	1,22	1,02	1,90-2,00	1,72	0,93-2,37	1,70
Fe	0,70	0,80	0,80	1262	0,22-1,46	0,43-2,64	0,72
Zn	5,60	5,70	5,30	1,47-7,28	0,90-6,40	1,23-3,19	1,00-3,00
Cu	0,50	0,40	0,60	216	0,20-1,00	0,08-0,30	0,20-0,40
Mn	0,30	0,07	0,20	0,382-0,658	0,01-0,05	İz miktarda	0,003-0,006

^amg/kg, ^bmg/L

Düşük protein miktarı, düşük kazein/serum proteini oranı ve protein olmayan azot fraksiyonunun yüksek seviyesi ile birlikte yüksek laktoz içeriği eşek sütünün inek, keçi ve koyun sütünden önemli ölçüde farklı olduğunu ortaya koymaktadır (Cunsolo vd., 2017). Eşek sütünün protein bileşiminin içeriği ırklar arasında; laktasyon evresi, beslenme, iklim, mevsim ve meme sağlığı gibi sebeplere bağlı olarak önemli ölçüde değişmektedir. Bu sütün protein

bileşimi inek sütünden önemli ölçüde farklı olmakla beraber, toplam içerik daha düşüktür (1,5-1,8 g / 100 g). Ayrıca insan ve kısrak sütüne oldukça benzemektedir. Laktoz, eşek sütüne iyi bir tat verirken aynı zamanda sinir sisteminin gelişimi için gerekli olan değerli bir galaktoz kaynağıdır (Madhusudan vd., 2017). Eşek sütünün protein fraksiyonunun sindirilebilirliği inek sütü proteinlerinden daha iyidir ve yağ globüllerinin daha küçük boyutlu olmasından dolayı daha hızlı ve daha iyi lipid sindirilebilirliğini sağlarken, toplam lipid içeriği insan ve inek sütününkinden daha düşüktür (Martini vd., 2018).

Eşek sütü, ruminant hayvanların sütleri ile kıyaslandığında geçmişte daha az çalışılmıştır ancak son yıllarda bileşimi insan sütünününe benzer olduğu için araştırmalar artmıştır (Madhusudan vd., 2017). Süt üretimi bakımından at ve eşek ırklarının genetik yapısı net olarak ortaya konmamıştır. Eşeklerde süt verimi ve laktasyonun uzunluğu bakımından çok farklı bireysel varyasyon bulunmaktadır. Dünyada, Moğolistan, Güney Rusya, Macaristan, Fransa ve Belçika gibi bazı ülkelerde at ve eşek önemli bir et ve süt kaynağıdır (Uniacke-Lowe, 2011).

2.2. Süt Proteinleri Önemi ve Özellikleri

Proteinler insanların büyüme ve gelişmeleri için gerekli olan temel maddelerin başında gelmektedir. Süt ise, kaliteli protein kaynaklarından birisidir. İnek sütü ortalama %3,4-3,8 protein içermektedir (Yardibi, 2008). Süt proteinlerinin doğal fonksiyonları, genç memelilere, kas ve diğer protein içeren dokuların gelişimi için gerekli olan esansiyel amino asitleri sağlamaktır. Bu işleve mükemmel bir şekilde hizmet etmek için süt proteinleri, yeni doğanın midesinde hemen pıhtılaşan nispeten büyük miktarda kalsiyum fosfat içeren kompleksler oluşturacak şekilde tasarlanmıştır. Birçok süt ürününün özellikleri esas olarak süt proteinlerinin özelliklerine bağlı olmakla beraber yağ, laktoz ve özellikle tuzlar da çok önemlidir (Phadungath, 2005). Yapılan çalışmalar sonucunda, süt proteinlerinin beslenmenin yanında insan sağlığı üzerinde yararlı biyoaktif peptidler bakımından da önemli bir kaynak olduğu bildirilmektedir (Gür, Güzel, Öncül, Yıldırım ve Yıldırım, 2010). Süt proteinlerinin büyüme ve gelişmeye katkısı, kalsiyum emilimi ve immün fonksiyonlar üzerine olumlu etkileri, kanser riskini azalttığı, diş çürüklerine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir (Ünal ve Besler, 2008). Bu proteinlerin bilinen bazı biyolojik özellikleri Çizelge 2.5'de verilmiştir (Korhonen, Pihlanto-Leppäla, Rantamäki ve Tupasela, 1998).

Çizelge 2.5. Süt proteinlerinin biyolojik fonksiyonları (Korhonen vd., 1998)

Protein	Fonksiyon
Kazein (α , β , κ)	İyon taşıyıcı (Ca, PO ₄ , Fe, Zn, Cu), biyoaktif peptidler için ön madde
β -Laktoglobulin	Retinol taşıyıcı, yağ asitlerini bağlar, antioksidan
α -Laktalbumin	Laktoz sentezinde rol oynar, Ca taşıyıcı, immünomodulatör, antikanserojen
İmmüoglobulinler	Bağışıklık koruyucu
Glikomakropeptit	Antiviral, bifidojenik
Laktoferrin	Antimikrobiyal, immünomodulatör, demir bağlayıcı, antikanserojen
Laktoperoksidaz	Antimikrobiyal
Lizozim	Antimikrobiyal, immüoglobulinler ve laktoferrin ile sinerjistik etki

İlk zamanlarda, süt proteinlerinin basit homojen protein yapısına sahip olduğuna inanılıyordu, ancak daha sonraki çalışmalarla süt proteinlerinin iki geniş sınıfa ayrıldığı görülmüştür (Phadungath, 2005). İnek sütlerinde ortalama %3,2 oranında yer alan ve süt kuru maddesinin de %27 'lik bölümünü teşkil eden süt proteini, homojen olmayıp farklı proteinlerin karışımından oluşmuştur. Süt proteinlerinin, sütü asitleştirilerek pıhtılaştırılan bölümüne "kazein" (kazein kompleksi), asitle pıhtılaşmayan bölümüne "serum" veya "peynir altı suyu proteini" denilmektedir. Aside dayanıklı, fakat sıcaklığa hassas olan süt serum proteinlerinden, yarı doymuş amonyum sülfat veya doymuş magnezyum sülfat çözeltilerinde çökmeyen fraksiyon "Laktalbumin", çöken fraksiyon ise "Laktoglobulin" olarak adlandırılmaktadır (Doğru, Dayıoğlu ve Aksoy, 1997).

Ruminant süt proteinlerinde genetik değişkenliğin iyi bilindiği ve bu değişkenliğin süt kompozisyonunu ve teknolojik kaliteyi etkilediği bilinmektedir (Yardibi, 2008). Süt proteini polimorfizmleri, ya bir amino asit değişimi ya da bunların bir kısmının silinmesiyle meydana gelmekte ve bunlar hem elektroforez yöntemleri hem de DNA analizi yoluyla tespit edilebilmektedir. DNA'yı sadece belirli bir DNA sekansından kesen restriksiyon enzimleri kullanılarak nokta mutasyonları, yani tek bir nükleotid değişimi belirlenerek bireyler arasındaki farklılıklar tespit edilebilmektedir (Moioli, Pilla ve Tripaldi, 1998).

Süt protein genotipleri, kodominant genler tarafından kontrol edilmekte ve Mendel kalıtımı göstermektedir (Mao vd., 2004). Süt proteinleri genetik varyasyonu üzerine yapılan çalışmalar, Aschaffenburg ve Drewry (1957) tarafından sığıır betalaktoglobulin ana varyantlarının saptanması ile uzun bir süre önce başlamıştır. Sonraki yıllarda, 6 yapısal süt protein geninde çok sayıda polimorfizm keşfedilmiş ve sığıır ırkları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Süt proteini polimorfizmlerinin ekonomik özellikler açısından önemli etkilerinden biri, sütlerin peynir yapım özellikleri ile olan ilişkileridir (Caroli, Chessa ve Erhardt, 2009).

Süt proteini polimorfizm çalışmaları üç alana odaklanmıştır. İlk olarak, genetik çeşitliliğin önemli bir bileşeni olarak hayvan ırklarının korunması amacıyla kullanılmaktadır. İkincisi, farklı hayvan ırklarının veya türlerinin akrabalığı ve kökeni tahmin edilebilir ve buradan yola çıkarak polimorfik süt proteinleri gen frekanslarından kümeleme analizleri ile akrabalık ilişkileri ortaya konabilmektedir. Son olarak, kaliteli damızlık hayvanları seçmek için süt proteini polimorfizmi ve sağım özellikleri arasındaki bağlantı ilişkilerine göre üretim ve sağım özelliklerinin kalitesi geliştirilebilmektedir (Mao vd., 2004). Süt protein varyantlarının az sayıda gen tarafından kontrol edilmesinden dolayı gen ve genotip frekanslarındaki değişim kolay takip edilebilmekte böylece belirli bir amaca yönelik yetiştirme kolaylaşmaktadır (Doğan ve Kaygısız, 1999). Son yıllarda DNA'ya dayalı moleküler teknikler hayvanların çok erken yaşlarda genotiplerinin tanımlanmasını sağlayarak yüksek verimli hayvanların erkenden seçilmesini mümkün kılmaktadır. Moleküler teknikler sayesinde belirlenen genotipler verim özellikleri, büyüme performansı gibi özelliklerin belirlenmesinde kullanılabilir (Doğru ve Özdemir, 2002). Süt proteinlerinde tespit edilen genetik polimorfizmler seleksiyon kriteri olarak da kullanılabilir. Süt protein polimorfizminin verim özellikleri ve sütün ekonomik özellikleri arasındaki ilişkileri birçok çalışmada araştırılmış ve tanımlanmıştır (Hu ve Mao, 1995; Messina, Vrech, Prandi ve Pezzi, 1999; Özdemir, 2001; Strzalkowska, Krzyzewski, Zwierzchowski ve Ryniewicz, 2002).

Çizelge 2.6'da farklı türlerden elde edilen süt proteinlerinin amino asit içerikleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. İnek, keçi ve koyundaki kazeinlerin birbirleriyle yüksek oranda benzerlik gösterdiği, eşek ve insan kazein benzerliğinin ise inek, koyun ve keçiye göre daha benzer olduğu görülmektedir. Bu durum inek sütüne alerjisi olan hastaların çoğunun keçi ya da koyun sütünü tolere edemediğini de açıklamaktadır. Benzer şekilde, bu ruminant hayvanlarda en çok bulunan serum proteinleri, birbirleriyle sıkı bir şekilde ilişkili

bulunmaktadır. Öte yandan kazein bileşenlerinin aksine, eşek ve insan sütünün serum proteini olan α -laktalbumin, serum albümin, laktoferrin sığır homologları ile yüksek düzeyde benzerlik ($> \%70$) göstermektedir. Bildirilen bu karşılaştırma, eşek sütü kazeinlerinin ana yapısının diğer türlere göre önemli farklılıklar gösterdiğini ama her zaman insan kazeini ile daha yakından ilişkili olduğunu da göstermektedir (Cunsolo vd., 2017).



Çizelge 2.6. Farklı türlerden elde edilen süt proteinlerinin amino asit içeriklerinin karşılaştırılması (Cunsolo vd., 2017)

Proteinler		Sekans karşılaştırma (% benzerlik)			
	Erişim No	Sığır Homoloji	Keçi Homoloji	Koyun Homoloji	İnsan Homoloji
α1-kazein					
Eşek (202 AA)	P86272	40	42	40	41
İnek (199 AA)	P02662	100	87	87	29
Keçi (199 AA)	P18626	87	100	97	30
Koyun (199 AA)	P04653	87	97	100	29
İnsan (170 AA)	P47710	29	30	29	100
α2-kazein					
Eşek (221 AA)	B7VGF9	56	57	57	-
İnek (207 AA)	P02663	100	87	88	-
Keçi (208 AA)	P33049	87	100	98	-
Koyun (208 AA)	P04654	88	98	100	-
İnsan	-	-	-	-	-
β-kazein					
Eşek (226 AA)	P86273	53	55	55	56
İnek (209 AA)	P02666	100	91	91	50
Keçi (207 AA)	P33048	91	100	99	51
Koyun (208 AA)	P11839	91	99	100	51
İnsan (211 AA)	P05814	50	51	51	100
κ-casein					
Eşek (162 AA)	F0V6V5	52	55	55	64
İnek (169 AA)	P02668	100	83	83	49
Keçi (171 AA)	P02670	83	100	95	50
Koyun (171 AA)	P02669	83	95	100	51
İnsan (162 AA)	P07498	49	50	51	100
α-Laktalbumin					
Eşek (123 AA)	P28546	71	72	72	76
İnek (123 AA)	P00711	100	94	97	76
Keçi (123 AA)	P00712	94	100	98	76
Koyun (123 AA)	P09462	97	98	100	76
İnsan (123 AA)	P00709	76	76	76	100
β-Laktoglobulin					
Eşek β-LG I (162 AA)	P13613	56	56	56	-
Eşek β-LG II (163 AA)	P19647	50	50	51	-
	P02754	100	96	96	-
İnek (162 AA)	P02756	96	100	99	-
Keçi (162 AA)	P67976	96	99	100	-
Koyun (162 AA)	-	-	-	-	-
İnsan	-	-	-	-	-
Serum albumin					
Eşek (583 AA)	Q5XLE4	74	75	75	76
İnek (583 AA)	P02769	100	92	92	76
Keçi (583)	B3VHM9	92	100	98	74
Koyun (583 AA)	P14639	92	98	100	75
İnsan (585 AA)	P02768	76	74	75	100
Laktoferrin					
Eşek (689 AA)	O77811 ^a	73	73	74	75
İnek (689 AA)	P24627	100	92	92	70
Keçi (689 AA)	Q29477	92	100	98	71
Koyun (689 AA)	P24627	92	98	100	71
İnsan (691 AA)	P02788	70	71	71	100

a: UniProt Erişim Numarası at laktoferrinden bildirilmiştir

2.3. Serum Proteinleri

Toplam süt proteininin yaklaşık %20'sini oluşturan serum proteinleri, hem fonksiyonel hem de besleyici proteinlerin mükemmel bir kaynağını temsil etmektedir. Ana serum proteinleri bileşenleri, toplam serum proteininin %70- %80'ini oluşturan iki küçük globüler protein olan β -laktoglobulin ve α -laktalbumindir. Küçük serum protein bileşenleri, immünoglobulinler, glikomakropeptit, serum albümini, laktoferrin, proteozeptonlar ve çok sayıda enzimi içeren %20'lik bir kısmını oluşturmaktadır (Korhonen vd., 1998). Serum proteinleri β -laktoglobulin, α -laktalbumin, immünoglobulinler, glikomakropeptit, laktoferrin gibi fiziksel, kimyasal ve fonksiyonel açıdan farklı proteinlere sahiptir. Serum proteinlerinin esansiyel amino asitlerinin yanı sıra farklı spesifik fizyolojik fonksiyonlarada sahip olduğu bilinmektedir. Kazein miselleri kalsiyum, fosfat ve amino asit kaynağı olarak daha çok beslenme açısından önem arz ederken, serum proteinleri laktoz sentezinde görev almakta, koruyucu görevde bulunmaktadır. Ayrıca iz elementler, vitaminler gibi besin maddelerinin emilimi ve taşınımını teşvik etmektedir (Gür vd., 2010). Toplam serum proteini içeriği eşek sütünde yaklaşık 4,9-8,0 g/L bulunmakta ve diğer süt türleriyle karşılaştırılması Çizelge 2.7' de verilmiştir (Claeys vd., 2014). Serum proteinleri esas olarak β -laktoglobulin, α -laktalbumin, lizozim, immünoglobulinlerden , serum albümini ve laktoferrinden oluşur (Brumini vd., 2016).

Çizelge 2.7. Farklı türlere ait sütlerde bulunan serum proteini miktarları (Claeys vd., 2014; Vincenzetti vd., 2008)

İçerik (g/L)	Keçi	Koyun	İnek	Manda	Kısrak	Eşek	İnsan
Toplam Serum proteini	6,0	10,02-11,0	5,5-7	6	7,4-9,1	4,9-8,0	6,2-8,3
Serum albumin	0,5	0,4-0,6	0,3-0,4	0,29	0,37	0,4	0,4-0,5
İmmünoglobulinler	1,0	0,7	0,5-1	10,6	1,63	1,3	0,9-1,3
β -laktoglobulin	3,1	6,5-8,5	3,2-3,3	3,9	2,5	3,3	-
α -laktalbumin	1,2	1,0-1,9	1,2-1,3	1,4	2,3	1,9	1,9-3,4
Lizozim	İz miktar	100 x 10 ⁻⁶	(70-600) x 10 ⁻⁶	(120-152) x 10 ⁻⁶	0,5-1,3	1,0-1,4	0,1-0,8
Laktoferrin	0,02-0,2	0,28	0,02-0,5	0,03-3,4	0,1-2,0	0,07-0,37	1,5-2,0

Eşek sütündeki antimikrobiyal aktivitenin esas olarak laktoferrin, lizozim, immüoglobulinler ve laktoperoksidaz gibi küçük serum proteinleri ile ilgili olduğu belirtilmektedir. Eşek sütü serum proteinlerinin bazı gram pozitif ve gram negatif bakterilere ve virüslere karşı antimikrobiyal özellikleri Çizelge 2.8’de gösterilmektedir (Brumini vd., 2016).

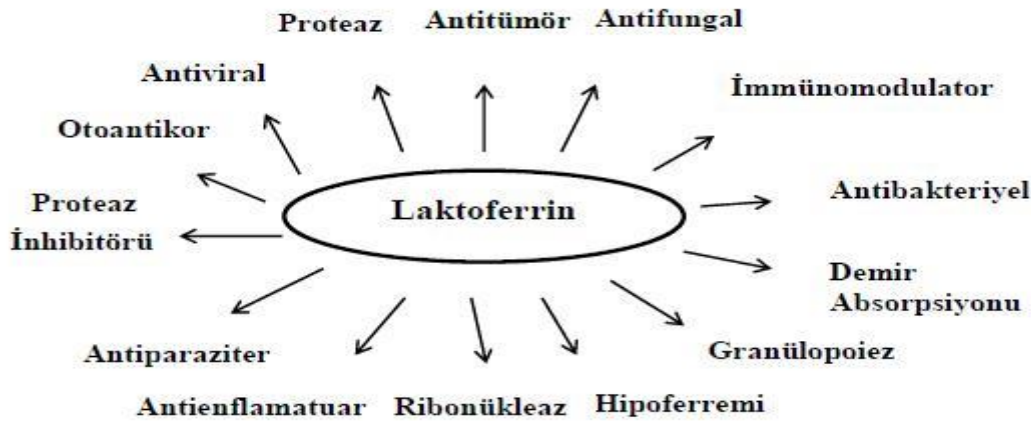
Çizelge 2.8. Eşek sütünün bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi (Brumini vd., 2016)

Mikroorganizma	Örnek Tipi
<i>Bacillus cereus</i> DSM4384	Hidrolize eşek sütü
<i>Bacillus cereus</i> RT INF01	Sindirime uğramış eşek sütü
<i>Echovirus tip 5</i>	Eşek sütünün serum proteinleri
<i>Enterococcus faecalis</i> DSM2352	Hidrolize eşek sütü
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	Eşek sütü
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Eşek sütü
<i>Escherichia coli</i> (EPEC) 10208355	Sindirime uğramış eşek sütü
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	Eşek sütü
<i>Listeria monocytogenes</i> 2230/92	Sindirime uğramış eşek sütü
<i>Salmonella choleraesuis</i> (CGMCC1.1859)	Eşek sütü
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	Eşek sütü
<i>Salmonella livingstone</i>	Eşek sütü
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Eşek sütü
<i>Shigella dysenteriae</i> (CGMCC 1.1869)	Eşek sütü
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Eşek sütü
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM25923	Hidrolize eşek sütü

2.3.1. Laktoferrin

Laktotransferrin olarak da adlandırılan laktoferrin ilk kez 1939 yılında sığır sütünden, 1960'da ise Johannson (1960) tarafından insan sütünden izole edilmiştir. Laktoferrinin yapısı ve büyüklüğü diğer demir bağlayıcı protein grubu olan transferrin ile benzerdir. Sıçan ve köpek dışında, araştırılan tüm memeli türlerinin sütünde bulunan laktoferrin birçok araştırmacı tarafından transferrin ailesinin üyesi olarak kabul edilmektedir (Levay ve Viljoen, 1995).

Laktoferrin, 80-kDa büyüklükte, sütte bulunan demir bağlayıcı bir glikoproteindir ve az miktarda safra ve gözyaşı gibi ekzokrin sıvılarda da bulunmaktadır. İki küresel loblu tek zincirli bir polipeptitten oluşmakta ve proteolize karşı nispeten dirençlidir (Lee vd., 1997). Laktoferrin birçok biyolojik işlevi bulunmaktadır, bunlardan bazıları; demir homeostazının düzenlenmesi, hücrel büyüme, antimikrobiyal ve antiviral fonksiyonlar, kanser gelişimi ve metastazına karşı koruma gibi görevlerdir (Şekil 2.2) (Polidori ve Vincenzetti, 2012).



Şekil 2.2. Laktoferrin'in bazı fonksiyonel özellikleri (Brock, 2002)

Laktoferrin'in hidrolizi ile N-terminal bölgesinden elde edilen, patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip LF1-11, laktoferrampin ve laktoferrisin peptitleri ortaya çıkmaktadır. En önemli peptid, birçok bakteri, virüs, fungal, patojen ve protozoaya karşı antibakteriyel aktivitesini uygulayan laktoferrisindir. Ayrıca bu peptidin, farelerde tümör metastazı inhibisyonu ve THP-1 insan monositik lösemik hücrelerinde apoptoz indüksiyonu gibi başka aktiviteler de gösterdiği bildirilmektedir (Vincenzetti vd., 2017). Günümüzde bilim

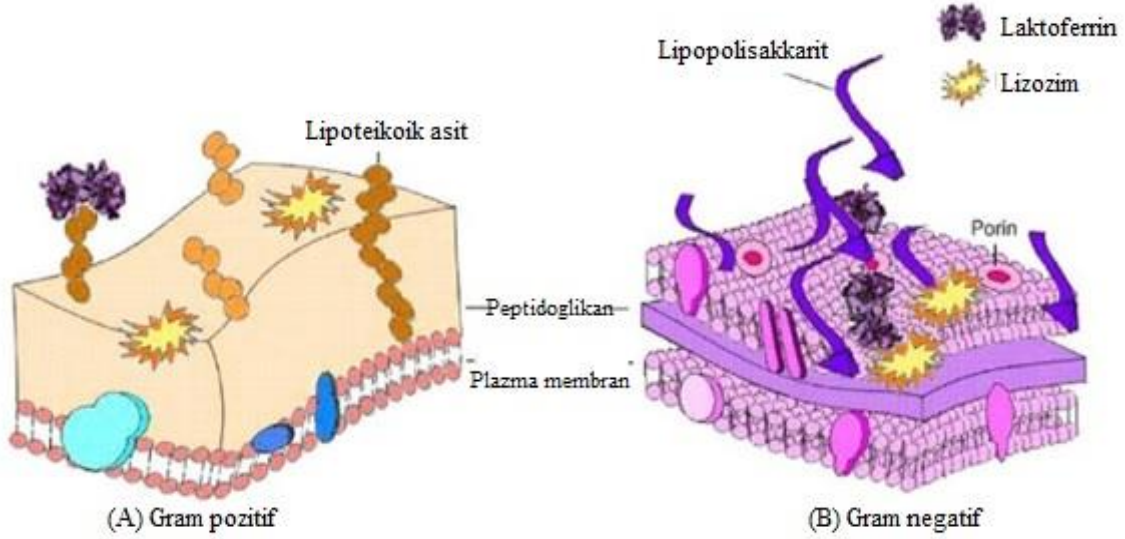
insanları laktoferrini hem insan hem de hayvanlarda bakteriyel, viral, fungal enfeksiyonların, sepsis, kanser, tümörlerin ve immünoşüpresyon hastalıklarının tedavisinde kullanmak için yeni yollar aramaktadırlar (Rahmani, 2011).

Laktoferrinin aktimikrobiyal aktivitesi çoğunlukla iki mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Birincisi enfeksiyon bölgesinde demiri alıkoyması ile bakteriyostatik etki oluşması, bir diğeri ise laktoferrin molekülünün enfeksiyöz ajanı ile doğrudan etkileşime girmesiyle laktoferrindeki pozitif amino asitlerin viral, fungal, bakteriyel ve parazit yüzeylerde anyonik moleküller ile etkileşerek hücre parçalanmasına neden olmasıdır (González-Chávez, Arévalo-Gallegos ve Rascón-Cruz, 2009). Laktoferrinin bakterisidal fonksiyonu, bakteriyel yüzeylerle doğrudan etkileşimine bağlanmıştır. Laktoferrin gram-pozitif bakterilerde lipoteikotik asit gibi hücre zarının negatif yüklü moleküllerine bağlanarak hücre duvarı yükünü nötr hale getirerek lizozim gibi diğeri antibakteriyel bileşiklerin hareketine izin verir. Gram-negatif bakterilerde ise, lipopolisakaritin lipit A'sına bağlanarak bu lipidin serbest kalmasına neden olarak hücre zarına zarar verebilmektedir (Şekil 2.3) (González-Chávez vd., 2009).

Laktoferrinin bakteriyostatik aktivitesi; pH, belirli iyonlar ve bakterilerin demir tutma mekanizmaları da dahil olmak üzere demir bağlanmasını etkileyen faktörlere bağlıdır. Laktoferrinin düşük pH değerlerinde demir bağlama kapasitesi kaybolmakta ve etkisi demir ile doyurularak elimine edilebilmektedir (Mazurier ve Spik, 1980). Shimazaki, Oota, Nitta ve Ke (1994), laktoferrini eşek sütünden saflaştırmış ve demir bağlama kabiliyetini insan laktoferrini ile, sığırın ise hem laktoferrin hem de transferrini ile karşılaştırmıştır. Eşek laktoferrinin demir bağlama kapasitesinin, insan laktoferrinine benzer, ancak sığır laktoferrin ve transferrininden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Uniacke-Lowe, 2011).

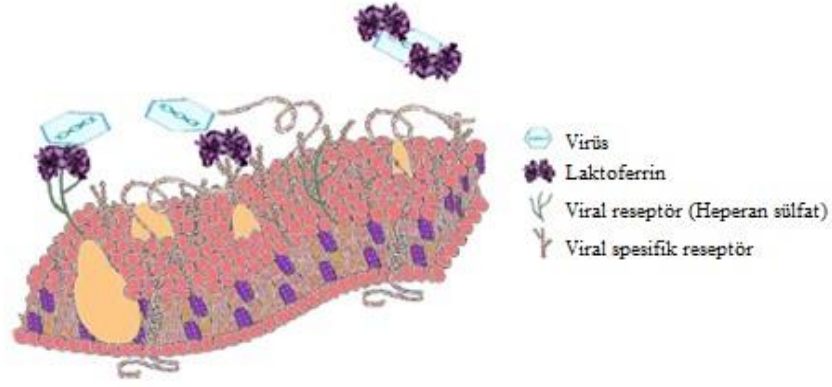
Laktoferrinin bakteriyostatik ve bakterisit aktivitelere ilave olarak, granülopoez, sitokin üretimi, in vitro antikor sentezi, doğal öldürücü hücre sitotoksitesi, lenfosit proliferasyonu, kompleman aktivasyonu gibi çeşitli immünolojik fonksiyonların güçlü bir aktivatörü ve regülatörü olduğu bilinmektedir. Laktoferrinin ayrıca antitümör savunmasına katıldığı (Tsuda, Sekine, Fujita ve Iigo, 2002), antiviral (Pawlik, Sender ve Korwin-Kossakowska, 2009), antifungal (Fernandes ve Carter, 2017), immünomodülatör özellikler (Wakabayashi, Yamauchi ve Takase, 2006; Pawlik vd., 2009) ve antiparaziter aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Omata vd., 2001). Laktoferrinin bir başka olası işlevi makrofajlardadır, yüksek konsantrasyonlarda laktoferrin, iltihaplanma sırasında aktif

nötrofillerde birikir ve bu nedenle fagositik öldürmeye yardımcı olabileceği belirtilmektedir (Rahmani, 2011). Ayrıca laktoferrin, osteoblastların çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarmakta, nörodejeneratif hastalık, artrit, alerjik cilt, enflamatuvar bağırsak hastalığı ve akciğer rahatsızlıkları gibi çeşitli enflamatuvar bozukluklarının düzeltilmesine katkı sağlamaktadır (Vincenzetti vd., 2017).



Şekil 2.3. Laktoferrinin antibakteriyel etki mekanizması (González-Chávez vd., 2009)

Laktoferrinin antiviral etkileri için çeşitli etki mekanizmaları önerilmiştir. En yaygın olarak kabul edilen hipotezlerden biri, laktoferrinin glikozaminoglikan viral reseptörlerine, özellikle heparan sülfata bağlanması ve bloke edilmesidir (Şekil 2.4). Laktoferrin ve heparan sülfatın bağlanması, virüs ve konakçı hücre arasındaki ilk teması önler ve bu da enfeksiyonun önlenmesine neden olur (González-Chávez vd., 2009). Bazı deneysel kanıtlar, eşek sütünde laktoferrin ve lizozim'in gram negatif bakterileri etkili bir şekilde ortadan kaldırmak için sinerjik olarak çalıştığını öne sürmektedir. Laktoferrin, dış bakteri zarındaki farklı bileşenleri bağlayabilmekte ve böylece peptidoglikanların iç kısmındaki glikozidik bağları bozarak lizozim için "gözenekler" açmaktadır (González-Chávez vd., 2009).



Şekil 2.4. Laktoferrinin antiviral etki mekanizması (González-Chávez vd., 2009)

Virüsün konakçı hücreye içine girmesini önlemek için laktoferrin viral partiküle ve glikozaminoglikanlara, spesifik viral reseptörlere veya heparan sülfata bağlanabilir (González-Chávez vd., 2009)

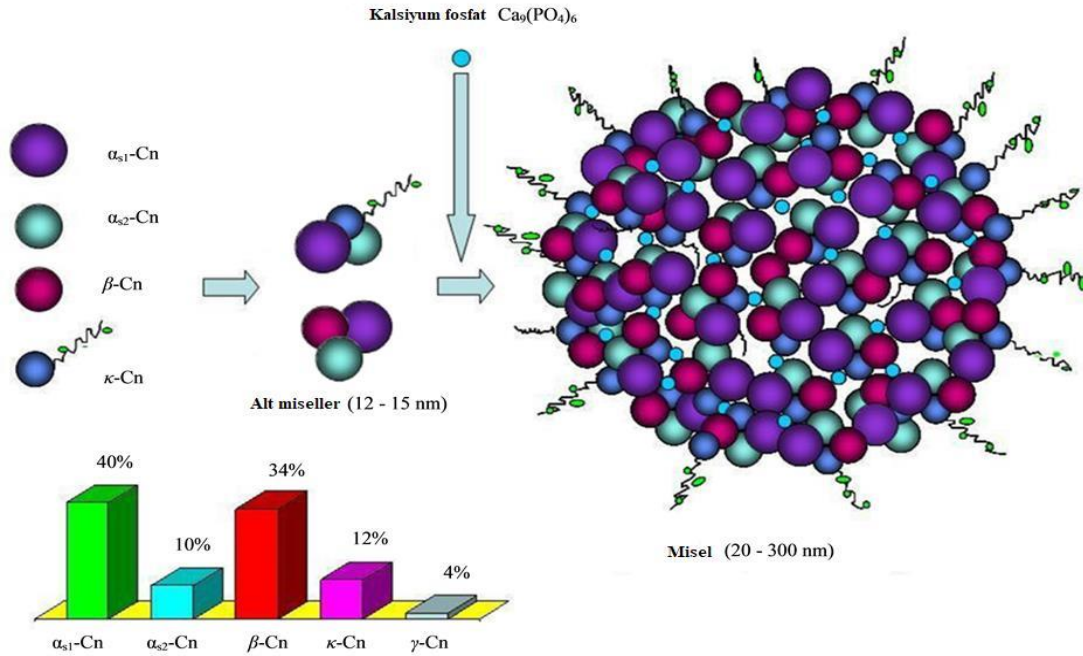
Brumini vd. (2013) eşek sütü ve onun serum proteininin insan mide-bağırsak sistemini enfekte eden bir enterovirüs olan Echovirus tip 5 üzerinde antiviral etkisini test ettikleri çalışmada tüm süt tiplerini (eşek sütü, yağsız eşek sütü, insan gastrointestinal suyu tarafından sindirilmiş eşek sütü ve eşek sütü serum protein fraksiyonu) incelemişler, virüs replikasyonunun ciddi bir inhibisyon gösterdiği, bunun muhtemelen laktoferrinin varlığı nedeniyle serum protein fraksiyonu için gözlenen en yüksek antiviral etki olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca keçi *LTF* (Laktoferrin) geninde genetik polimorfizm ile ilişkili olarak yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlenmiştir (González-Chávez vd., 2009).

2.4. Kazeinler

Kazeini ayırmanın ilk yöntemi 1814 yılında Berzelius tarafından tanımlanmıştır. Uzun zamandır tek bir protein olduğuna inanılan kazein fraksiyonunun heterojenitesi ilk olarak 1920'lerde gösterilmiş ve 1939'da Mellander tarafından elektroforez kullanılarak doğrulanmıştır (Hallén, 2008).

Süt proteinlerinin, sütün asitleştirilerek pıhtılaştırılan bölümüne "kazein" (kazein kompleksi) denir (Doğru vd., 1997). Kazeinler toplam süt proteininin yaklaşık %80'ini oluşturur (Metin, 2001). Kazeinler, laktojenik hormonlara ve diğer uyarıcılara tepki olarak meme bezinde sentezlenen ve sütün benzersiz fiziksel özelliklerinin çoğundan sorumlu olan misel adı verilen büyük kolloidal agregatlar olarak salgılanan bir fosfoprotein ailesidir.

Kazeinlerin süt endüstrisi için önemli oluşu bu proteinler üzerinde çalışılmasını teşvik etmiştir (Ginger ve Grigor, 1999). Kazein fraksiyonları içerisinde, kazeinin %50'sini alfa kazein (α -CN), %34'ünü beta kazein (β -CN), %12'sini kappa kazein (κ -CN) ve %4'ünü gamma kazein (γ -CN) oluşturmaktadır (Şekil 2.5) (Rebouillat ve Ortege-Requena, 2015).



Şekil 2.5. Kazeinin misel yapısı (Rebouillat ve Ortege-Requena, 2015)

Kazeinler birçok türdeki sütün başlıca protein fraksiyonudur ve görevleri sütte kalsiyum fosfat taşımak ve böylece yeni doğan yavrulara kemik oluşumu için kalsiyum ve fosfor kaynağı sağlamak aynı zamanda amino asit gereksinimine katkıda bulunmaktadır (Selvaggi, Laudadio, Dario ve Tufarelli, 2014). Ayrıca kazeinlerin, vücutta çinko, bakır, demir ve iyonlarının taşınması gibi biyolojik aktiviteleri sergiledikleri ve bir dizi farklı biyoaktif peptidin öncüsü olarak görev aldıkları belirtilmektedir (Korhonen vd., 1998). Eşek sütündeki kazein oranı toplam proteinin yaklaşık %50'sini sığır sütünde ise kazein, toplam proteinin %80'ini oluşturmaktadır. Sığır sütüne kıyasla düşük kazein konsantrasyonu ve gerekli amino asitlerin uygun yüzdesi bu sütü anne sütü yerine kullanılacak bir besin haline getirmektedir (Costanzo, 2013).

Kazeinlerin süt kalitesi, kompozisyonu ve peynir yapımı ile doğrudan ilişkili olmasından dolayı ekonomik olarak önem arz etmekte ve bu da sütteki kazeine olan ilginin artmasına sebep olmaktadır (Jann, Prinzenberg, Luikart, Caroli ve Erhardt, 2004). Yapılan çeşitli çalışmalar kazein polimorfizmleri ve süt üretim özellikleri arasındaki önemli ilişkiler

olduğunu göstermektedir (Bovenhuis ve Weller, 1994; Ikonen, Ojala ve Ruottinen, 1999; Velmala, Vilkki, Elo, De Koning ve Mäki-Tanila, 1999). Günümüzde, eşek kazeinlerinin karakterizasyonu sığırla veya diğer ruminantlarla karşılaştırıldığında çok az çalışıldığı görülmektedir ve eşek kazein genleriyle ilgili genetik polimorfizm çalışmaları da çok sınırlıdır (Cunsolo vd., 2017).

2.4.1. Kappa kazein

Kappa kazein (κ -CN), kazein misellerinin boyutunu ve özel fonksiyonunu belirleyen ve kimosin ile birleşerek sütün koagülasyonundan sorumlu süt proteindir (Hobor, Kunej, Lenasi ve Dovč, 2006). κ -CN ailesi, karbonhidrat içermeyen büyük bir bileşen ve en az 6 küçük bileşen içermektedir. Tüm κ -CN varyantlarının ana bileşeninin (~%50) genel olarak karbonhidratsız bileşen olduğuna inanılmaktadır. Genel olarak, minör κ -CN bileşenleri majör κ -CN'nin multiglikozile homojenleştirilmiş formlarıdır (Farrell vd., 2004). *CSN3* (Kappa kazein), "kalsiyum-duyarlı" kazein genleri ile evrimsel olarak ilişkili değildir, fakat fiziksel olarak bu gen ailesi ile bağlantılı olup misel içindeki Ca duyarlı kazeinlerin stabilize edilmesi için fonksiyonel olarak önemlidir (Selvaggi ve Dario, 2011). κ -CN esas olarak kazein miselinin yüzeyinde yer almakta ve misel büyüklüğünün belirlenmesine katkıda bulunmaktadır. *CSN3* geninin genetik varyasyonları, kazein miselleri oluşumu, yapısı ve stabilizasyonu ile ilgili olarak sütün teknolojik özellikleri ve peynir üretimi üzerine etkisi nedeniyle baskın bir rol oynamaktadır (Feligini vd., 2005).

κ -CN, kazein fraksiyonunun tek "kalsiyum-duyarsız" proteindir ve Ca^{2+} iyonları ile çökelmemektedir. Atgiller familyasına (*Equidae*) ait sütlerin kazein fraksiyonunda bu proteinin varlığı uzun yıllardır tartışılmaktadır. Günümüzde, eşek sütündeki κ -CN'nin çok küçük bir bileşeni temsil ettiği, konsantrasyonunun kısrak sütünden daha düşük, inek ve insan sütünden çok daha düşük görünen bir bileşiği temsil ettiği bilinmekte olup bu nedenle tespiti poliklonal antikolarla spesifik immüno-boyama olmadan çok zor olmaktadır (Cunsolo vd., 2017). *Equidae* familyasına ait κ -CN, karbonhidrat parçalarının varlığı ve kimozin II 'nin hidrolize duyarlılığı gibi, sığır ve insan κ -CN'e benzer birçok biyokimyasal özellik göstermektedir. Ekonomik önemi nedeniyle, κ -CN'ler ve genetik polimorfizmleri birçok ruminant türünde geniş çapta araştırılmıştır (Selvaggi, D'Alessandro ve Dario, 2015).

2.5. Moleküler Markerler

Moleküler markerler (belirteçler), farklı saptanabilir varyantları bulunan DNA bölgeleridir. Çiftlik hayvanlarında kullanılan ilk belirteçler, allozimlerdir. Ancak hem sayısının az olması hem de polimorfizm seviyelerinin düşük olmasından dolayı DNA teknolojileri gelişir gelişmez, DNA belirteçleri, genetik çeşitliliği değerlendirmek için allozimlerin yerini almışlardır. Moleküler belirteçler düzeyinde genetik çeşitlilik genellikle genotiplerin ve allellerin frekansları, polimorfik lokusların oranı, gözlenen ve beklenen heterozigotluk veya allelik çeşitlilik ile ölçülmektedir (Toro, Fernández ve Caballero, 2009). Her bir marker sistemi bazı avantajlar ve dezavantajlara sahiptir ve marker seçimi büyük ölçüde amaçlanan uygulama, kolaylık ve ilgili maliyet ile belirlenmektedir (Gupta, Varshney, Sharma ve Ramesh, 1999). Moleküler markerler; koruma programlarını geliştirmek, populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitlilik seviyesini tespit etmek, evcilleştirilme ve göç yollarının belirlenmesi gibi çalışmalar için de önemlidir (Özşensoy ve Kurar, 2012). Moleküler genetik ve bilgisayar uygulamalarındaki gelişmeler neticesinde kantitatif karakterlerdeki çeşitlilikte pay sahibi olan genleri belirlemek mümkün hale gelmiştir. Erkek ve dişi çiftlik hayvanlarının söz konusu genomik bölgeler bakımından erken dönemde genotiplendirilmesi yapılabileceğinden hayvan ıslahında kullanılabilir hale gelmesi seleksiyon ve ıslah çalışmalarının hızlı ve etkin olmasını sağlayacaktır (Şahin, Öner ve Elmacı, 2013).

DNA markerleri, hibridizasyona dayalı DNA markerleri (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP), Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (Polymerase Chain Reaction - PCR) dayalı DNA markerleri (CAPS, STS, RAPD, SCAR, AFLP, ALP, SSR, ISSR), DNA çip ve dizi analizine dayalı DNA markerleri (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) olarak üç sınıfta gruplandırmıştır (Gupta vd., 1999). Bu sınıflandırmada markerler analiz için kullanılan temel yöntemlere göre gruplandırılmıştır. İleri sürülen bu sınıflandırma, DNA markerlerinin gelişimini de göstermektedir. Birinci grup 1980'lerde kullanılan markerler, 1990'larda ikinci grup olan PCR'a dayalı DNA markerleri, 2000'lerden sonra ise mikroarray teknolojisine dayanan SNP markerlerinin yoğun şekilde kullanılmaya başlandığı bildirilmektedir (Khlestkina ve Salina, 2006).

2.5.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism-SNP)

Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNPs), genom sekansındaki, esas olarak biallelik olan ve genom boyunca bol miktarda bulunan nokta mutasyonlarıdır (Toro vd., 2009). Birkaç bireyin PCR ile çoğaltılmış DNA fragmentlerinin sekansı, SNP polimorfizmlerini tanımlamanın en doğrudan yoludur (Rafalski, 2002). SNP'ler; transisyonlar (pürin-pürin değişimi A↔G veya pirimidin-pirimidin C↔T değişimi) ve transversiyonlar (pürin-pirimidin A↔C, A↔T, G↔C, G↔T veya pirimidin-pürin değişimi) gibi baz değişimlerini içermektedir (Sönmezöglü, Yıldırım ve Güleç, 2010). Şekil 2.6'da SNP örneği gösterilmiştir.

```
GAGTGCTGCGGCCAGACTTCACGAGGATAGGGCTGTGT
GAGTGCTGCGGCCAGACTTCACGAGGATAGGGCTGTGT
GAGTGCTGCGGCCAGACTTCACGAGGATAGGGCTGTGT
GAGTGCTGCGGCCAGACTTCACGAGGATAGGGCTGTGT
```

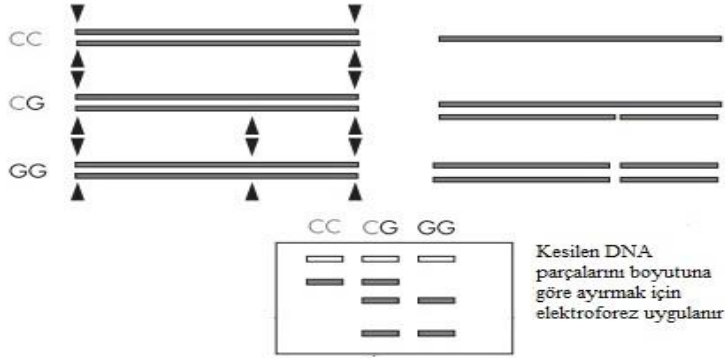
Şekil 2.6. Nükleotid dizisi üzerinde nokta mutasyonun (SNP) gösterimi

SNP'ler, bir genin kodlayıcı veya kodlayıcı olmayan bölgeleri içinde olabilmektedirler. Kodlayıcı bölge içinde yer alan SNP'ler, amino asit sekansındaki bir değişiklik yoluyla proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileme olasılığı daha yüksek olduğu için özellikle önemlidir. Bunlar eşanlamı olmayan mutasyonlar olarak adlandırılmakta olup, eğer SNP amino asit dizisinde herhangi bir değişikliğe neden olmuyorsa, bu SNP'ler sessiz veya eşanlamı mutasyonlar olarak tanımlanabilmektedir (Ahmad, 2011). DNA sekansındaki bu değişimin bir SNP olarak kabul edilmesi için, en az sıklıkta görülen allelin %1 veya daha fazla bir sıklıkta meydana gelmesi gerekmektedir (Vignal, Milan, SanCristobal ve Eggen, 2002).

2.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Kesim Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP)

RFLP yöntemi ve PCR işleminin birleştirilmiş hali olan bu yöntem, hibridizasyona dayalı RFLP yönteminin zorluğu ve fazla miktarda DNA ile çalışılması zorunluluğu gibi birçok dezavantajını ortadan kaldırmak için geliştirilmiştir (Toparslan, 2015). RFLP, SNP'lerin restriksiyon endonükleazların kesim yaptığı noktalar temelinde ayrımı yapılabilen bir tekniktir. Restriksiyon endonükleazlar, spesifik nükleotid dizilerinden DNA moleküllerini

kesen enzimlerdir. Enzim tanıma yerleri genellikle 4 ile 6 bç uzunluğundadır. SNP'lerde olduğu gibi, kesim noktalarındaki nükleotid sekanslarında farklılık görüldüğünde, farklı boyutlarda fragmentler elde edilip, jel elektroforezi ile ayırım yapılabilir (Chuang vd., 2008). Şekil 2.7'de PCR-RFLP işlemi ve allellerin tespiti gösterilmiştir.



Şekil 2.7. PCR-RFLP ve allellerin tespiti

CC homozigot genotip, GG homozigot genotip ve CG heterozigot genotip (Harding, 2007'den modifiye edilerek alınmıştır)

PCR-RFLP yönteminin kodominant kalıtım göstermesi, spesifik uzun primerler kullanıldığı için güvenilir bir çoğaltım yapması avantajları arasında görülmektedir. Her lokus için özel primerler tasarlamak için harcanan çaba ve masrafın yanında çoğaltılacak gen bölgesi hakkında önceden bilgi sahibi olunmasının gerekliliği ise dezavantaj olarak görülmektedir (Vicente ve Fulton 2003).

3. LİTERATÜR ÖZETLERİ

Bu tez çalışmasında Türkiye’de yetiştirilen eşeklerde *LTF* ve *CSN3* gen bölgelerinde genetik polimorfizmler araştırılmıştır. Bu nedenle çeşitli hayvan türlerinde *LTF* ve *CSN3* gen bölgelerine ait yapılmış genetik çalışmaların bir kısmı aşağıda özetlenmiştir.

Cieslak vd. (2016), 12 at ırkında yaptıkları çalışmada lizozim (*LYZ*) ve *LTF* geninin 5'-flanking bölgesinde toplam 13 farklı tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphisms-SNP) tespit etmişlerdir. Tanımlanan polimorfik bölgelerden dokuzu daha önce tespit edilmemiştir. 13 polimorfizmin gözlemlendiği iki ırk (Polonya Warmblood ve Polonya Coldblood) belirlenmiştir.

Işık (2019), Kırklareli, Tekirdağ ve İstanbul illerinden toplanan 77 eşek DNA örneğinde DNA dizi analizi yöntemiyle yaptığı çalışmada *LTF* gen bölgesi 14. intronda g.272719G>A olarak yeni bir genetik varyasyon tespit ettiğini bildirmiştir.

Hobor vd. (2006), üç at ırkında (Slovenian coldblood, Trotter ve Haflinger) yaptıkları çalışmada *CSN3* geni 1.ekzon ve 4.ekzon bölgesinde ikişer farklı SNP belirlediklerini bildirmişlerdir.

Hobor vd. (2008), altı at ırkında (Slovenian cold-blood, Ljutomer trotter, Slovenian haflinger, Posavina, Slovenian warm-blood, Lipizzan) *CSN3* geni 1.ekzonda iki, 4.ekzonda iki, promotor bölgesinde 15 SNP belirlemişlerdir.

Selvaggi ve Dario (2011), Martina Franca ırkı eşeklerde *CSN3* geninin 1. ekzonundaki varyasyonu polimeraz zincir reaksiyonu-kesim parçacık uzunluk polimorfizmi PCR-RFLP tekniği ile araştırmışlardır. *CSN3/PstI* ve *CSN3/BseYI* lokusları bakımında çalışılan popülasyondaki tüm hayvanlar monomorfik bulunmuştur.

Selvaggi vd. (2015), dört İtalyan at popülasyonunda (Italian Saddle, Italian Trotter, Italian Heavy Draught ve Murgese ırkı atlar) ve Martina Franca ırkı eşeklerde *CSN3* geni 1.ekzondaki genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada PCR-RFLP tekniğini kullanmışlardır. *PstI* ve *BseYI* lokuslarının atlarda polimorfik olduğu ve ırka bağlı olarak bazı farklılıkların bulunduğu, Martina Franca eşek ırkında ise genetik farklılığın bulunmadığını bildirmişlerdir.

Çizelge 3.1. *LTF* ve *CSN3* genleri bakımından atgiller (*Equidae*) familyasında yapılmış bazı genetik çalışmaların özeti

Kaynak	İrk (Birey sayısı)	Çalışılan Gen Bölgesi	Yöntem	SNP'ler ve Bulunduğu Bölge
Cieslak vd. (2016)	Polish Primitive (95) Polish Coldblood (89) Polish Warmblood (90)	<i>LTF</i> (5'flanking)	Sekans	<u>5'flanking</u> T→C G→A C→T T→C
Işık (2019)	Türkiye yerli eşek ırkları (77)	<i>LTF</i> (14.ekzon) (14.intron)	Sekans	<u>14.İntron</u> G→A
Hobor vd. (2006)	Slovenian coldblood (17) Trotter (17) Haflinger (17)	<i>CSN3</i> (1.ekzon) (4.ekzon)	PCR-RFLP Bİ-PASA/PIRA ASA-PCR/PIRA Sekans	<u>1.ekzon</u> A→G C→A <u>4.ekzon</u> A→T A→G
Hobor vd. (2008)	Slovenian cold-blood (20) Ljutomer trotter (20) Slovenian haflinger (20) Posavina (20) Slovenian warm-blood(15) Lipizzan (20)	<i>CSN3</i> (1.ekzon) (4.ekzon) (promotor)	PCR-RFLP Bİ-PASA/PIRA ASA-PCR/PIRA Sekans	<u>1.ekzon</u> A→G C→A <u>4.ekzon</u> A→T A→G <u>Promotor</u> G→C G→C A→G C→T T→C C→A A→G C→A T→C A→G C→A T→A G→C T→C C→G
Selvaggi vd. (2010)	Murgese ırkı (45)	<i>CSN3</i> (1.ekzon) (promotor)	PCR-RFLP	<u>1.ekzon</u> A→G C→A
Selvaggi ve Dario (2011)	Martina Franca (65)	<i>CSN3</i> (1.ekzon) (Promotor)	PCR-RFLP	Polimorfizm bulunamamıştır.
Selvaggi vd. (2015)	Italian Saddle (48) Italian Trotter (40) Italian Heavy Draught (42) Murgese (63) Martina Franca (75)	<i>CSN3</i> (1.ekzon) (Promotor)	PCR-RFLP	<u>1.ekzon</u> A→G C→A Eşeklerde polimorfizm bulunamamıştır.

Martina Franca eşek ırkı, diğerlerinin tamamı at ırkıdır

Çizelge 3.1’de *LTF* ve *CSN3* gen bölgeleri ile ilgili atgiller (*Equidae*) familyasında yapılmış bazı genetik çalışmalar genel hatlarıyla gösterilmektedir. Literatüre bakıldığında *LTF* ve *CSN3* genleri ile ilgili atgiller familyasında yapılmış az sayıda çalışma bulunmakta, daha çok büyükbaş ve küçükbaş hayvanlarla ilgili çalışmaların olduğu görülmektedir.

Kaminski, Oleński, Brym, Malewski ve Sazanov (2006), 358 adet Polanya Holstein-Friesian ineklerinde +32. pozisyonda mutasyon (G/C) içeren *LTF* geninin promotor bölgesi, PCR-SSCP (Single-strand conformational polymorphism) ve RFLP yöntemi ile incelenerek genotip frekansı GG, GC ve CC için sırasıyla; 0,628, 0,313, 0,059 olarak bildirilmiştir. Genel doğrusal model (General Linear Model-GLM) analizi, laktoferrinin somatik hücre sayısı da dahil olmak üzere süt performans özellikleri ile olan ilişkilerini değerlendirmek için uygulanmış, CC genotipine sahip olanların GG genotipli ineklere kıyasla sütte önemli ölçüde yüksek protein içeriğine ($p=0,01$) sahip olduğu bildirilmiştir. Diğer süt performans özelliklerinin (verim, yağ ve protein miktarı) değerleri de daha yüksek fakat anlamlı olmayan düzeylerde bulunmuştur. Sütte somatik hücre sayısının CC genotipli ineklerde en düşük olduğunu ancak istatistiksel açıdan anlam ifade etmediğini bildirmişlerdir.

Wojdak-Maksymiec, Kmiec ve Ziemak (2006), Holstein-Friesian ırkı 124 inekte *LTF* gen polimorfizmini *EcoRI* restriksiyon enzimi kullanarak PCR-RFLP yöntemiyle inceledikleri çalışmada iki allel (A ve B) ve üç genotip (AA, BB ve AB) bulmuşlardır. En yüksek somatik hücre sayısı AB genotipli ineklerin sütünde bulunurken, en düşük AA genotipli ineklerde bulunduğunu bildirmişlerdir.

Jemmali, Kamoun, Ksouri, Rekik ve Mhirsı (2011), 52 adet Holstein ineğinde *LTF* gen polimorfizmini *HinfI* restriksiyon enzimi kullanarak PCR-RFLP tekniği ile incelemişlerdir. Tüm örneklerde aynı bant modelinin görüldüğü monomorfik bir yapı olduğu ve *LTF* lokusu için sadece AA genotipinin belirlendiğini bildirmişlerdir.

Sharifzadeh ve Doosti (2011), 160 adet İran Holstein ırkı boğada yaptıkları çalışmada *LTF* gen bölgesinde *EcoRI* restriksiyon enzimi kullanarak PCR-RFLP yöntemiyle iki allel (A ve B) tespit etmişlerdir. AA genotipli hayvanlar daha az somatik hücre sayısına, AB genotipli hayvanlar ise daha yüksek somatik hücre sayısına sahip bulunmuştur ($P < 0,01$). Ayrıca *LTF* geninin Holstein sığırlarında somatik hücre konsantrasyonu için genetik belirteç olarak kullanılabileceğini ve bu genin A allelinin süt ineklerinde mastitis ve mikrobiyal enfeksiyonlara karşı duyarlılık veya direnç için uygun bir belirteç olduğunu bildirmişlerdir.

Anggraeni, Mumpunie, Misrianti ve Sumatri (2012)'de Holstein-Friesian (89), Limousin (14), Angus (5), Simmental (13) ve Brahman (5) ırklarından toplam 126 hayvanda, *LTF* gen bölgesinde *EcoRI* restriksiyon enzimi ile çalışılmış, A ve B allellerinin gözlemlendiği bildirilmiştir. A ve B allellerinin frekansları sırasıyla Holstein-Friesian ırkında %77 ve %23, Limousin ırkında %79 ve %21, Angus ırkında %50 ve %50, Simmental ırkında %62 ve %38, Brahman ırkında ise %80 ve %20 olarak bildirilmiştir.

Nanaei, Edriss, Mahyari, Rahmani ve Tabatabaei (2012), 404 adet Holstein ineğinde *LTF* gen bölgesinde *EcoRI* restriksiyon enzimi kullanarak yaptıkları PCR-RFLP analizi sonucunda iki allel (A ve B), iki genotip (AA ve AB) gözlemlerken, BB genotipine rastlamamışlardır. A allelinin sıklığı 0,775'ten 0,831'e, B allelinin sıklığı 0,169'dan 0,225'e kadar değişmektedir. AA ve AB genotiplerinin frekansı sırasıyla 0,606 ve 0,394 iken, BB genotipinin saptanmadığını bildirmişlerdir. Ki kare testinin sonucunda Hardy-Weinberg dengesine göre, incelenen popülasyonda gözlemlenen ve beklenen *LTF* genotipleri dağılımı istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,01$) bulunmuştur.

Maletić vd. (2013), 46 adet Holstein-Freisian ineğinde *LTF* gen bölgesinin genotip kompozisyonu ve bu dağılımın süt kalitesi ve meme bezi hastalıklarının oluşumunu ile bağlantısını *EcoRI* restriksiyon enzimi kullanarak incelemişlerdir. İki allel (A ve B) ve iki genotip (AA ve AB) belirlemişlerdir. Çalışmada BB genotipi tespit edilememiştir. Genotipler arasındaki farklılıkların derecesini belirlemek için, AA ve AB genotipleri arasında verim parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu gösteren diskriminant analizi kullanılmış, ayrı ayrı analiz edildiğinde, iki genotip arasında anlamlı farklılık gösteren tek parametrenin toplam süt üretimi olduğunu belirtmişlerdir ($p = 0,021$). Gözlenen genotiplerde bireyler en çok süt yağı miktarı bakımından benzer bulunmuş ($p = 0,271$), genotipler arasında süt örneklerinde somatik hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir.

Chopra, Gupta, Verma, Chakravarty ve Vohra (2015), 200 Sahiwal ve 150 Karan Fries ırkı sığırlarda yaptıkları çalışmada PCR-RFLP tekniği ile *LTF* geninin promotor bölgesindeki genetik varyasyonu inceleyip GG, GH ve HH olmak üzere üç genotip belirlemişlerdir. 25'inci pozisyonda guaninden adenine tek nükleotid değişiminin, yerli Sahiwal ve melez Karan Fries sığırlarında klinik mastitis ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu ($p < 0,05$) bildirmişlerdir. Genel olarak Sahiwal ve Karan Fries sığırlarında GG genotipine sahip hayvanlarda daha düşük klinik mastitis insidansı kaydedilmiştir. Promotor bölgesinde tanımlanan SNP'nin, laktoferrin

protein ekspresyonunu etkileyebileceğini, bunun da *LTF* geninin farklı antibakteriyel ve anti-inflamatuar aktivitesine yol açabileceğini bildirmişlerdir.

Dinesh vd. (2015), Murrah ırkı 200 mandada yaptıkları çalışmada *LTF* geninin 7. ve 12. ekzonlarındaki genetik varyantlar ile klinik mastitis insidansı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. *LTF* geni 7. ekzonunda *BccI* restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan PCR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Kesim Parçacık Uzunluk Polimorfizmi) sonucu AA, AB, BB genotipleri; 12. ekzonun *HpyI88I* restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan PCR-RFLP sonucunda ise CC, CD, DD genotipleri elde edilmiştir. Ki-kare (χ^2) analizi ile 7.ekzondaki genetik varyantları ile klinik mastitis arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ve 7.ekzonda AA genotipli hayvanların mastitise en az duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Sharma, Parmar, Thakur, Nauriyal ve Ranjan (2015), 30 adet Frieswal ırkı inekleri klinik ve subklinik mastitis için taradıktan sonra inekleri her gruba 10 inek gelecek şekilde sağlıklı, klinik ve subklinik mastitisten etkilenmiş olarak gruplara ayırmışlardır. İneklerde, *LTF* geni promotor bölgesindeki varyasyon *HinfI* restriksiyon enzimi kullanılarak incelemişler, G ve C olarak iki allel; GG, GC ve CC olarak üç genotip belirlemişlerdir. *LTF* geni promotor bölgesinin polimorfik olduğu ve bu polimorfizmin mastitis enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. CC genotipli bireylerin mastitis direnci gösterdiğini, GC ve GG genotipli bireylerin ise klinik ve subklinik mastitise yatkınlık gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca *LTF* geninin genotipleri ile somatik hücre sayısı arasındaki ilişkinin anlamlı olduğunu, GG ve GC genotipli bireylerin, CC genotipli olanlara göre daha yüksek somatik hücre sayısına sahip olduğunu bildirmişlerdir ($P < 0,01$).

Asadollahpour Nanaei, Ansari Mahyari ve Edriss (2016), *EcoRI* restriksiyon enzimi kullanarak PCR-RFLP tekniği ile 404 adet Holstein ırkı sığırdada yaptıkları çalışmada popülasyonda A ve B iki allel, AA ve AB olmak üzere iki genotip belirlemişlerdir. *LTF* gen bölgesinin süt üretimi (305 günlük süt verimi, yağ ve protein yüzdesi), üreme özellikleri (gebelik uzunluğu) ve somatik hücre sayısı ile ilişkisini değerlendirmek için GLM analizini uygulamışlardır. AB genotipli ineklerin AA genotipli olanlara kıyasla sütte anlamlı olarak daha yüksek ($P < 0,05$) yağ yüzdesi ve somatik hücre sayısına sahip olduğunu diğer özellikler bakımından anlamlı bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir.

Soria, Iglesias, Huguet ve Mirande (2003), 28 adet sığırdada (4 Aberdeen Angus, 1 Hereford, 2 Jersey, 1 Jersey x Holstein melezi ve 20 Holstein) *CSN3* gen bölgesinde *HindIII*,

HaeIII restriksiyon enzimleri kullanarak, A, B ve E allellerini ve AA, AB ve AE genotiplerini belirlemişlerdir. İncelenen sığırların 12 tanesi AA, 13 tanesi AB, 3 tanesi AE genotipli olduğunu bildirilmişlerdir.

Azevedo vd. (2008), 1316 adet hayvanda (55 Sindhi ırkı inek, 73 Gyr x Holstein F1 melezi, 182 Gyr damızlık boğa, 564 Gyr ırkı inek, 69 Guzerat damızlık boğa, 312 Guzerat ırkı inek ve 61 Nellore damızlık boğa) *CSN3* gen bölgesinde *HinfI* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleri kullanarak yaptıkları araştırmada A, B ve E allellerini ve AA, AB, BB, AE genotiplerini tespit etmişlerdir. B allelinin peynir verimi ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Sindhi ırkı hayvanlar B alleli için en yüksek frekansa (0,30) sahipken, bu allelin diğer ırklardaki frekansları 0,01 ile 0,18 arasında değişmekte olduğunu, E allelinin 0,05 gibi çok düşük bir frekansla yalnızca Gyr x Holstein F1 melezinde tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Rachagani ve Gupta (2008), 252 Sahiwal ve 56 adet Tharparkar ırkı sığırdada *CSN3* gen bölgesi için *HindIII*, *HhaI* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleri kullanarak PCR-RFLP tekniği ile yaptıkları çalışmada iki allel (A ve B) ve üç genotip (AA, AB ve BB) belirlemişlerdir. BB genotipli Sahiwal sığırlarında, aylık süt verimi, 305 günlük süt verimi, aylık yağsız kuru madde verimi ve aylık protein verimi bakımından diğer genotiplere kıyasla daha yüksek değerlere sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Riaz, Malik, Nasreen ve Qureshi (2008), 163 adet Nili-Ravi mandasında *CSN3* gen bölgesinde polimorfizm olup olmadığını araştırmak amacıyla *HinfI*, *HaeIII* ve *MaeII* restriksiyon enzimleri kullanılarak PCR-RFLP yöntemi ile tüm hayvanların BB genotipinde monomorfik olduğunu bildirmişlerdir.

Selvaggi, Pesce Delfino ve Dario (2010), Murgese ırkı atlarda *CSN3* geninin birinci ekzon bölgesini *PstI*, *BseYI* restriksiyon enzimleri ile incelemişler ve C.-66A>G transisyonunda A allelinin frekansını 0,80 ve G allelinin frekansını 0,20 olarak tespit etmişlerdir. Populasyonda GG genotipine sahip hayvan tespit edilemediği bildirilmiştir. C.-36C>A transversiyonunda allel frekansları, C alleli için 0,74 ve A alleli için 0,26 olarak belirlenmiş, ayrıca AA genotipinde birey gözlenmediği belirtilmiştir. Çalışılan populasyonda en sık görülen genotip AACC (0,49) iken AGCA frekansı 0,40 bulunduğu bildirilmiştir.

Ren vd. (2011), bildirdikleri çalışmada Jersey (57), Su mandası (48) ve Holstein (98) ırkı olmak üzere 203 hayvanda *CSN3* gen bölgesini *HinfI* restriksiyon enzimi kullanarak PCR-RFLP yöntemi ile incelemişlerdir. Holstein populasyonu, diğer iki grupta

karşılaştırıldığında A alleli daha yüksek, B alleli daha düşük bir frekansta bulunmuştur. Jersey'de *CSN3* lokusunda AA genotipi bulunamamış ayrıca tüm su mandalarının, BB genotipine sahip olarak monomorfik yapıda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Trakovická, Moravčíková ve Navrátilová (2012), 80 adet Simental x Holstein melezi sığırdada *CSN3* gen bölgesinde polimorfizm ve süt üretim özellikleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. *HindIII* restriksiyon enzimi kullanarak yaptıkları PCR-RFLP analizi sonucu iki allel (A ve B) ve üç genotip (AA, AB ve BB) belirlemişlerdir. AA genotipinin 0,575 frekans ile en sık görülen genotip olduğunu, *CSN3* genotipleri ile süt üretim parametreleri (süt verimi, protein ve yağ verimi) arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen AA genotipinin süt, protein ve yağ verimi üzerine pozitif etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Gouda, Galal ve Abdelaziz (2013), Holstein, Baladi sığırları ve mandalarda toplam 300 örnekte *CSN3* gen bölgesinde *HindIII* restriksiyon enzimi kullanarak iki allel (A ve B) ve üç genotip (AA, AB ve BB) tespit etmişlerdir. Mandalarda AA genotipi ve sığırlarda BB genotipinin tespit edilemediğini bildirmişlerdir.

Hristov vd. (2014), Rhodopean sığır ırkından on altı inekte kazein misel büyüklüğü, süt üretimi, yağ ve protein içeriğinin *CSN3/HinfI* genetik polimorfizmi ile ilişkisini PCR-RFLP tekniği ile incelemişlerdir. Üç adet *CSN3* genotipi (AB, AA ve BB) belirlenmiş ve bu genotipli hayvanlardan alınan süt örneklerinde Dinamik Işık Saçılım (Dynamic Light Scattering) yöntemi ile kazein misel boyutu belirlenmiştir. Sonuçlar, farklı genotiplere sahip ineklerin sütleri arasındaki kazein misellerinin boyutu ve polidispersitesinde farklılıklar gösterdiğini, AA genotipli hayvanların sütlerinde büyük boyutta kazein miselleri olduğunu belirtmişlerdir. Genotipler ve süt üretimi arasındaki ilişkiyi AB>AA>BB şeklinde bildirmişlerdir. Ayrıca yağ ve protein içeriği ile ilgili olarak, üç genotip arasında sadece küçük farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir.

Safronova, Babich, Ovchinnikova ve Ovchinnikov (2017), Karatomar Siyah-Beyaz ırkı melez 100 adet sığırdada *CSN3* gen bölgesi için *HindIII* restriksiyon enzimi kullanarak iki allel (A ve B) ve AA, AB ve BB genotiplerini belirlemişlerdir. AA genotipli sığırların sütte toplam yağ ve protein içeriği bakımından BB ile karşılaştırıldığında daha avantajlı olduğunu ancak süt verimi için önemli bir fark saptanmadığını bildirmişlerdir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Materyal ve Örnekleme

Araştırmanın materyalini, TÜBİTAK TOVAG 1001-2150555 numaralı proje kapsamında Türkiye'nin farklı yörelerindeki eşeklerden toplanan kanlardan izole edilmiş genomik DNA'lar oluşturmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, Türkiye coğrafyasını temsil edebilecek eşek popülasyonlarından toplam 108 adet genomik DNA örneği ile çalışılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında incelenen bireylerin kan örneklerinin toplandığı bölgeler, iller ve örnek sayıları

Bölge	Örnek Alınan İller	Örnek Sayısı (n)
Marmara	Tekirdağ	7
	Kırklareli	11
Ege / Akdeniz	Aydın	6
	Muğla	9
	Antalya	11
	Kahramanmaraş	9
Doğu Anadolu / Güneydoğu Anadolu / İç Anadolu	Kars	10
	Şanlıurfa	12
	Mardin	11
	Konya	10
Karadeniz	Amasya	12
	Toplam	108

4.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

PCR, RFLP ve elektroforez işlemleri sırasında kullanılan alet ve cihazların listesi aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Tez çalışmasında kullanılan alet ve cihazların listesi

Adı/Modeli	Çalışmada Kullanım Amacı
Bidistile Saf Su Cihazı	Tampon çözeltilerin hazırlanması
pH metre	Tampon çözeltilerin hazırlanması için gerekli pH' yı belirlemek
Nano Drop Spektrofotometre	İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonlarını ve saflık derecelerinin belirlenmesi
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Çözeltilerin hazırlanması
Vorteks	Çözeltilerin hazırlanması ve DNA izolasyonu
Santrifüj	DNA izolasyonu ve örneklerin kısa süreli santrifüj edilerek çöktürülmesi
Manuel Hassas Terazı Dijital Hassas Terazı	Tampon çözeltilerin hazırlanmasında sarf malzemelerinin tartılması
Gradient Thermal Cycler	PCR ile ilgili gen bölgesinin çoğaltılması
Çalkalayıcı Isıtıcı	DNA izolasyonu
Agaroz Jel Elektroforez Setleri	DNA, PCR ürünleri ve kesim sonucu elde edilen bant modellerinin belirlenmesi
Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi	DNA izolasyonu, PCR ürünleri ve kesim sonrası elde edilen bantların jelde görüntülenmesi ve bilgisayar ortamına aktarılması
Mikro Dalga Fırın	Agaroz jellerin hazırlanması
Derin Dondurucu (-20)	Örnek ve çeşitli sarf malzemelerin saklanması
Çeker Ocak	DNA izolasyonu
Otoklav	Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu

4.1.3. Çalışmada Kullanılan Tampon Çözeltiler

PCR ve RFLP analizi sonrasında elde edilen ürünlerin kontrolü amacıyla yapılan elektroforez ve agaroz jellerin hazırlanmasında kullanılan stok ve tampon çözeltilerin içerikleri aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Tez çalışmasında kullanılan stok ve tampon çözeltiler

Tampon Çözelti	Molarite/Miktar	İçerik
10 X TBE (Elektroforez/Jel Stok Tampon Çözeltisi)	108,0 g 55,0 g 9,3 g (1 litre)	Tris Borik Asit 0,5 M EDTA (pH 8.0)
1 X TBE (Elektroforez/ Jel Tampon Çözeltisi)	100 ml alınıp 1 litreye tamamlanır	10 X TBE bdH ₂ O

4.2. Yöntem

4.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu daha önce TÜBİTAK TOVAG 1001-2150555 numaralı proje kapsamında Yatkın (2019)'ın bildirdiği gibi Sambrook, Fritsch ve Maniatis, 1989'dan değiştirilen fenol kloroform ekstraksiyon yöntemine göre yapılmıştır. DNA miktar ve kalitesi %1'lik agaroz jellerinde kontrol edilmiştir. DNA miktarı ve kalitesi iyi olan 108 adet örnek seçilmiş ve bu tez çalışmasında materyal olarak kullanılmıştır.

4.2.2. *LTF* ve *CSN3* Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

LTF gen bölgesini çoğaltacak olan primerler, NCBI GenBankası veritabanında bulunan eşek tüm genom referans dizisi (Erişim No: NW_014636647) kaynak alınarak tasarlanmıştır. *CSN3* gen bölgesi için Selvaggi ve Dario (2011) tarafından bildirilen primerler referans alınmıştır. Özgün primerler kullanılarak PCR işlemi ile çoğaltılan gen bölgeleri, 28.611 bp'lik eşek *LTF* geninin (NW_014638067.1) 750 bp'lik (14. ekzon ve 14. intronun bir kısmı) bölgesi ve 5.423 bp'lik eşek *CSN3* geninin (NW_014637991.1) 235 bp'lik (Promotor bölgesinin ve 1.ekzonun bir kısmı) gen bölgeleridir. Şekil 4.1'de *LTF* ve Şekil 4.2'de *CSN3* gen bölgelerine ait DNA dizileri, ileri ve geri primerler ile çoğaltılan kısımlar dizi üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışılan *LTF* gen bölgesinin nükleotid dizisi. İleri-geri primerler, 14. ekzon (kırmızı renk) ile 14. intron (siyah renk) bölgeleri dizi üzerinde gösterilmiştir



Şekil 4.2. Çalışılan *CSN3* gen bölgesinin nükleotid dizisi. İleri-geri primerler, promotor bölge (siyah renk) ile 1. ekzon bölgesi (kırmızı renk) dizi üzerinde gösterilmiştir

PCR işleminin ardından *LTF* gen bölgesi, *DraII*, *EagI*, *MboI* restriksiyon enzimleri ile *CSN3* gen bölgesi ise *PstI* enzimi kullanılarak kesilmiştir. PCR-RFLP analizi sırasında kullanılan primerler, restriksiyon enzimleri ve kaynaklar Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. PCR-RFLP işleminde kullanılan primerler ve restriksiyon enzimleri

Gen Bölgeleri	Primerler (5'→3')	Enzim	Kaynak
<i>LTF</i> (750 bç) İleri primer Geri primer	GCAACAACGAGAATGAGAACAAGT ATTTCACCACCAGATGGCGT	<i>DraII</i> <i>EagI</i> <i>MboI</i>	-
<i>CSN3</i> (235 bç) İleri primer Geri primer	GATGACAACTCTATTTCC AGCAAGACCTGACCCTGGACA	<i>PstI</i>	Selvaggi ve Dario, 2011

LTF ve *CSN3* gen bölgelerinin çoğaltılması amacıyla kullanılan PCR reaksiyonları ve PCR konsantrasyonları Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da, sıcaklık döngüleri ise Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. *LTF* gen bölgesi için PCR reaksiyonu ve konsantrasyonları

Ana Stok	Son Konsantrasyon	Kullanılan Miktar
DNA	50-75 ng	3,00 µL
10X Buffer	1 X	3,00 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2,50 mM	1,50 µL
İleri primer (10 pmol)	0,41 pmol	1,25 µL
Geri primer (10 pmol)	0,41 pmol	1,25 µL
dNTP (1 mM)	0,20 mM	6,00 µL
Taq polimeraz (5U/µL)	1,25 U	0,25 µL
dH ₂ O	-	13,75 µL

PCR reaksiyonu toplam hacim 30 µL olacak şekilde laboratuvar koşullarında optimize edilmiştir

Çizelge 4.6. *CSN3* gen bölgesi için PCR reaksiyonu ve konsantrasyonları

Ana Stok	Son Konsantrasyon	Kullanılan Miktar
DNA	50-75 ng	1,5 µL
10X Buffer	1 X	1,0 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	0,3 µL
İleri primer (10 pmol)	0,5 pmol	0,5 µL
Geri primer (10 pmol)	0,5 pmol	0,5 µL
dNTP (1 mM)	0,2 mM	2,0 µL
Taq polimeraz (5U/µL)	0,5 U	0,1 µL
dH ₂ O	-	4,1 µL

PCR reaksiyonu toplam hacim 10 µL olacak şekilde laboratuvar koşullarında optimize edilmiştir

Çizelge 4.7. PCR sıcaklık ve döngüleri

PCR Programları	<i>LTF</i>		<i>CSN3</i>	
Ön denaturasyon	94°C 4dk		95°C 4 dk	
Denaturasyon	94°C	35 Döngü	95°C	35 Döngü
	30 sn		1 dk	
Bağlanma	68°C		63°C	
	1 dk		30 sn	
Uzama	74°C		74°C	
	1 dk		1 dk	
Son uzama	74°C 10 dk		74°C 5 dk	

Elde edilen PCR ürünlerinin kontrolleri %2'lik agaroz jel kullanılarak yapılmıştır. Agaroz jel hazırlamak için gerekli olan tampon çözeltiler ve bileşimleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. %2'lik agaroz jel hazırlamak için; hassas terazi kullanılarak 2 g agaroz tartılıp üzerine 100 ml 1X TBE konularak erlen içerisinde karıştırıldıktan sonra 3-5 dk mikrodalga fırında kaynatılarak çözünmesi sağlanır. Ardından yavaşça çalkalanarak 50-60 °C'ye kadar soğutulan çözelti içerisine 2 µL RedSafe Boya çözeltisi (Nucleic Acid Staining Solution (INTRON Biotechnology)) eklenmiştir. Bu karışım, tarak yerleştirilmiş jel tablasına

döküldükten sonra jelin donması beklenmiştir. Ardından jel tablayla beraber 1X TBE tampon çözeltisi bulunan yatay elektroforez ünitesine yerleştirildikten sonra tarak çıkarılmıştır. PCR ürünleri yükleme boyası (loading dye) ile karıştırılmış ve kuyulara yüklenerek 1-2 saat elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra PCR örnekleri, UV jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat Quantum) görüntülenerek boyutları baz çifti (bç) olarak belirlenmiş ve jel fotoğrafları bilgisayara kaydedilmiştir.

4.2.3. DNA Dizi Analizi ve Verilerin Analizi

Bu çalışmada PCR-RFLP yöntemi ile elde edilen genotiplerin doğrulanması amacıyla DNA dizi analizi işlemi, ticari bir firmadan hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir (MedSanTek Laboratuvar Malzemeleri San. ve Tic. Ltd. Şti.). *LTF* gen bölgesi için 22, *CSN3* gen bölgesi için 7 örneğin DNA dizi analizi yapılmıştır. PCR ürünlerinin saflaştırılıp ileri ve geri primer aracılığıyla çift yönlü dizileme işlemi kapiller elektroforez (ABI 3500XL Genetic Analyzer, USA) cihazında yapılmıştır. DNA dizi analizi sonucu elde edilen sekanslar, ChromasPro Version 1.7.4 programında (<http://www.techneysisium.com.au/ChromasPro.html>) alt alta konularak konsensus diziler elde edilmiştir. Piklerin hatalı okunma ihtimaline karşılık elektroferogramlar gözle kontrol edilmiştir. Elde edilen diziler BioEdit Version 7.0.4.1 (Hall, 1997) programı altında ClustalW Multiple Alignment (Thompson, Higgins ve Gibson, 1994) yazılımı ile hizalanarak nükleotid değişimlerinin saptanması yapılmıştır. *LTF/EagI* lokusunun allel frekansları ve Hardy–Weinberg dengesi POPGENE yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır (Yeh, Yang ve Boyle, 1999).

4.2.4. *LTF* ve *CSN3* Gen Bölgelerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

LTF ve *CSN3* gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldıktan sonra, Çizelge 4.8’de verilen reaksiyon koşullarına göre PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile inkübasyonu yapılmıştır. Kullanılan restriksiyon enzimleri, tanıma dizileri ve fragment uzunlukları Çizelge 4.9’da belirtilmiştir.

Çizelge 4.8. *DraII*, *EagI*, *MboI* ve *PstI* restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu

Gen	<i>LTF</i>			<i>CSN3</i>	Tüm enzimler 37°C'de 16 saat inkübe edildikten sonra 65°C'de (<i>PstI</i> 80°C'de) 20 dk inaktive edilmiştir.
Enzim Adı	<i>DraII</i>	<i>EagI</i>	<i>MboI</i>	<i>PstI</i>	
PCR Ürünü	4,0 µL	3,0 µL	3,0 µL	6,0 µL	
Enzim	1,0 µL	0,5 µL	0,3 µL	1,0 µL	
Buffer	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	
dH ₂ O	10,0 µL	11,0 µL	11,0 µL	8,0 µL	

Çizelge 4.9. Kullanılan restriksiyon enzimleri, tanıma dizileri ve fragment büyüklükleri

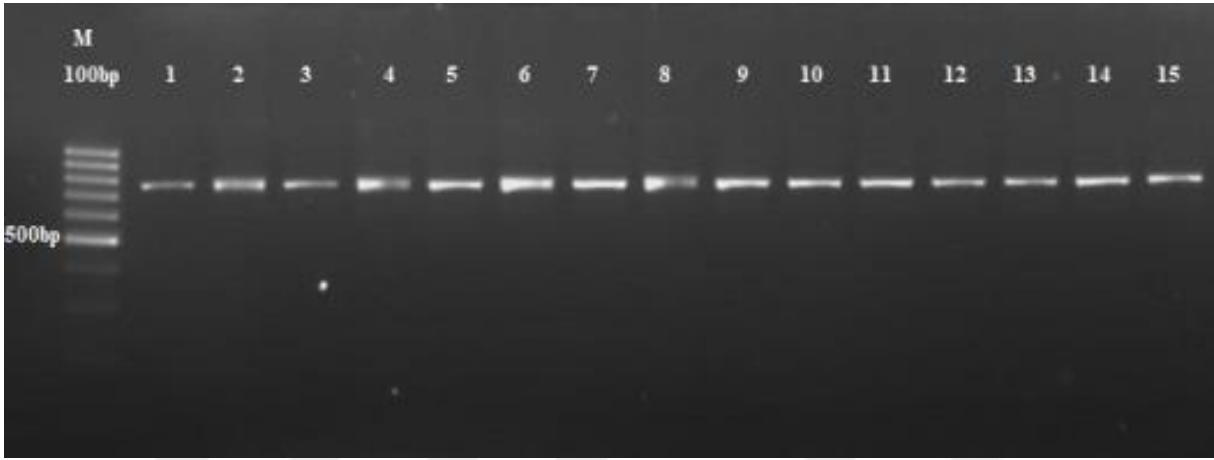
Restriksiyon Enzimi	Özgün Tanıma Dizisi (5'→3')	<i>LTF</i> Gen Bölgesi Kesim Sonucu Elde Edilen Fragment Büyüklüğü (bç)
<i>DraII</i>	5'....R/GGNCCY....3' 3'....YCCNG/GR....5'	406, 344
<i>EagI</i>	5'....C/GGCCG.... 3' 3'....GCCGG/C....5'	750, 666, 84
<i>MboI</i>	5'..../GATC....3' 3'....CTAG/....5'	608, 142
Restriksiyon Enzimi	Özgün Tanıma Dizisi (5'→3')	<i>CSN3</i> Gen Bölgesi Kesim Sonucu Elde Edilen Fragment Büyüklüğü (bç)
<i>PstI</i>	5'....CTGCA/G....3' 3'....G/ACGTC.... 5'	235

Restriksiyon enzimleri ile inkübasyondan sonra elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel elektroforezi ile sabit voltajda 1,5-2 saat yürütüldükten sonra UV jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat Quantum) jeller kontrol edilmiş ve jelde elde edilen bantların büyüklükleri görüntüleme sisteminde tespit edilerek jel fotoğrafları bilgisayara kaydedilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

5.1. *LTF* Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltımı

LTF gen bölgesinin PCR ile çoğaltımı sonucunda 750 bç'lik PCR ürünü elde edilmiş olup, bu PCR ürünlerinin kontrolü %2'lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak yapılmıştır. PCR işlemi sonucunda tüm örneklerde 750 bç uzunluğunda tek bant elde edilmiştir (Şekil 5.1). *LTF* gen bölgesinin PCR işleminde kullanılan primerler ve reaksiyon koşulları Çizelge 4.4 ve 4.5'te verilmiştir.

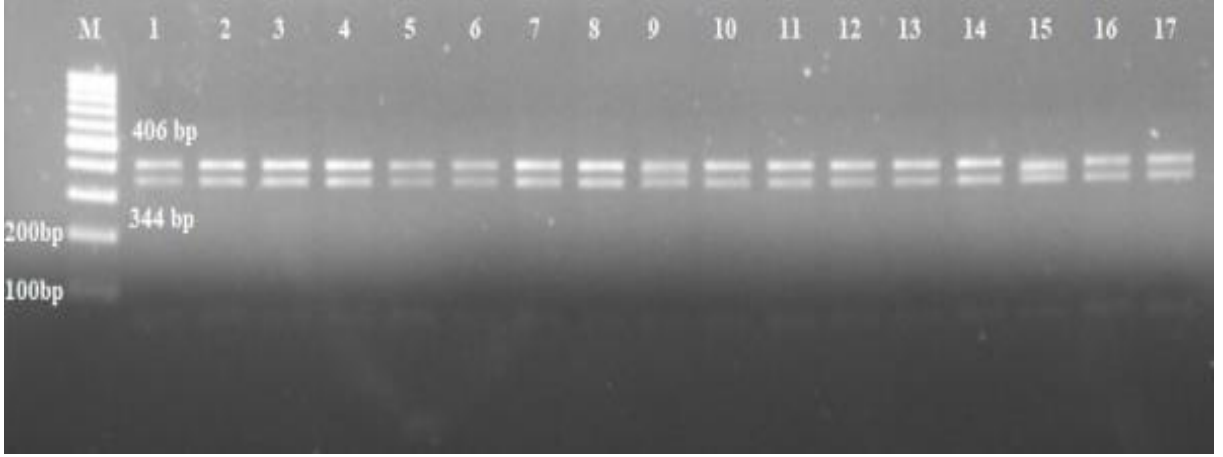


Şekil 5.1. *LTF* gen bölgesi PCR ürünleri (750 bç), M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder

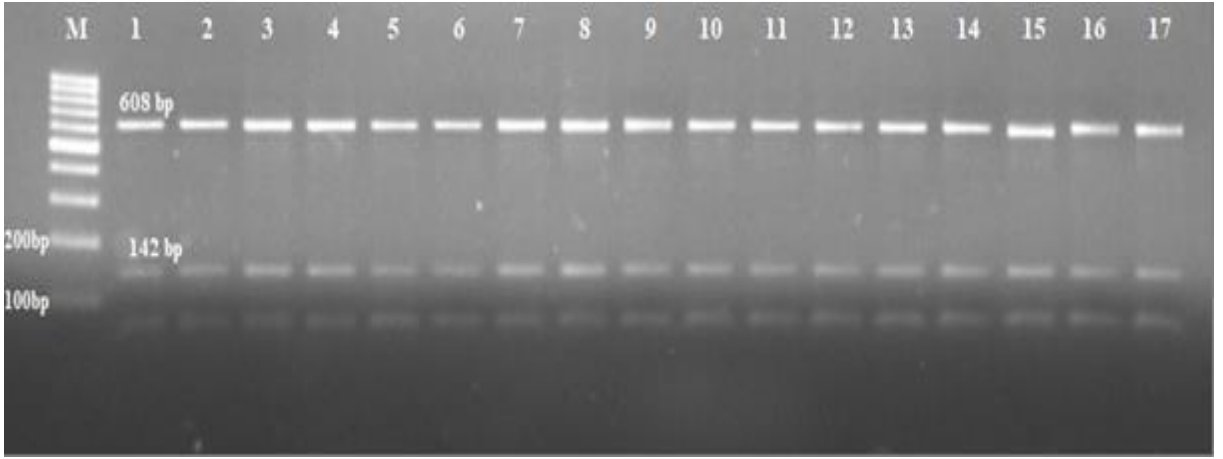
5.1.1. *LTF* Gen Bölgesi *DraII* ve *MboI* Restriksiyon Enzimleri ile Kesim Sonuçları

LTF gen bölgesinde kesim amacıyla *DraII*, *MboI* ve *EagI* (ER0261, ER0811, ER0331 Thermo Fisher Scientific) restriksiyon enzimleri kullanılmıştır.

LTF gen bölgesinin *DraII* (Şekil 5.2) ve *MboI* (Şekil 5.3) restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu tüm bireylerde tek kesim noktası bulunmuş ve çalışılan tüm populasyonların monomorfik olduğu görülmüştür.



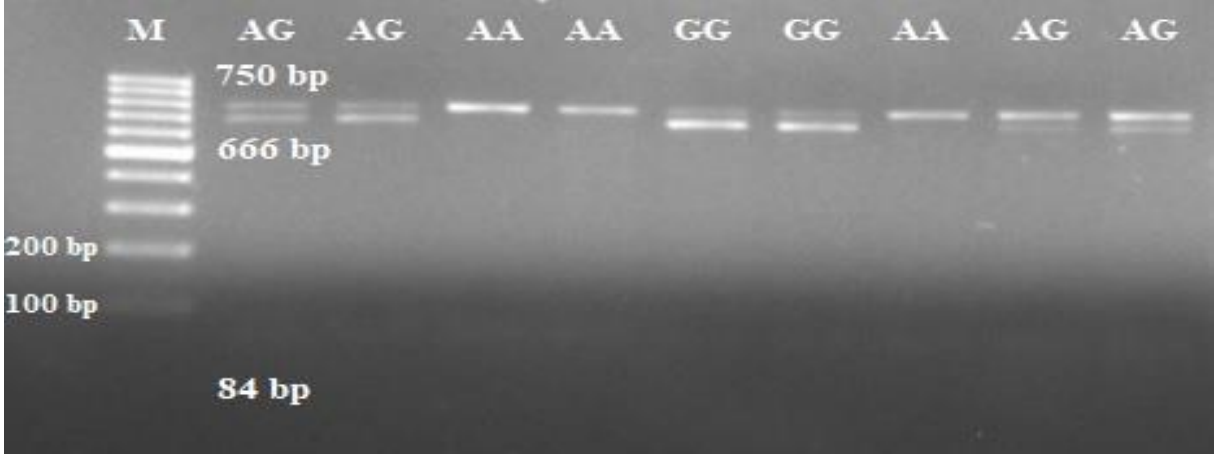
Şekil 5.2. *LTF* gen bölgesinin *DraII* restriksiyon enzimi ile kesimi, M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder



Şekil 5.3. *LTF* gen bölgesinin *MboI* restriksiyon enzimi ile kesimi, M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder

5.1.2. *LTF* Gen Bölgesinin *EagI* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Sonuçları

LTF (750 bç) gen bölgesi DNA dizi analizi sonrasında 89. pozisyonda guaninden adenine (G→A) olan bir transisyon tespit edilmiştir. PCR-RFLP işleminde bu nokta mutasyonunu tespit etmek amacıyla *EagI* restriksiyon enzimi (ER0331, Thermo Fisher Scientific), uygun enzim olarak seçilmiştir. *LTF* gen bölgesi *EagI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu oluşan fragmentler Şekil 5.4'de gösterilmiştir.



Şekil 5.4. *LTF* gen bölgesi *EagI* restriksiyon enzimi ile kesimi, M: İnvitrogen™ 100 bp DNA Ladder

Türkiye genelinde yetiştirilen eşek populasyonlarında *LTF* gen bölgesinde yapılan bu çalışma ilk olma özelliğindedir. Çalışılan eşek populasyonlarında AA genotipli bireyler 750 bç (kesim yok); GG genotipli bireyler (kesim var) 666+84 bç; heterozigot genotipli bireyler 750; 666+84 bç olmak üzere 3 farklı genotip elde edilmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. *LTF* gen bölgesi *EagI* restriksiyon enzimi kesim sonucu oluşan genotipler ve fragment büyüklükleri

PCR Ürünü	<i>LTF</i> Genotipleri		
	AA	AG	GG
750 bç	750 bç	750 bç	666 bç
		666 bç	84 bç
		84 bç	

Çalışılan örneklerin çoğunda, *EagI* restriksiyon enzimi *LTF* gen bölgesinin 14. intronunda 666 ve 84 bç fragmentleri oluşturan kesim noktasına sahiptir. AG heterozigotları, Kars ili hariç, 11 farklı örnekleme yapılan illerin hepsinde (%60,2) yüksek bulunmuştur. Heterozigot genotiplerin bu kadar yüksek oranda bulunmasının sebebi eşeğin atalarının bu genotipte ortaya çıktığı ve daha sonra evrimsel süreçte mutasyonlarla diğer genotiplerin oluşmuş olabileceğini düşündürmektedir. GG homozigotları sadece Kars ilinde (%80) yüksek oranda bulunmuştur. Öte yandan, Kahramanmaraş ve Muğla illerinde AA ve GG homozigotları bulunamamıştır. Bu durumun sebebi olarak populasyonun yeterince büyük olmamasından kaynaklı genetik sürüklenme veya doğal ya da yapay seleksiyon kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. Çalışılan tüm örneklerin *LTF/EagI* lokusunda genotip dağılımları

Bölge	Örnek Alınan İller (n=Birey Sayısı)	Genotip Sayısı		
		AA	AG	GG
Marmara	Tekirdağ (n=7)	2	4	1
	Kırklareli (n=11)	3	4	4
Ege / Akdeniz	Aydın (n=6)	1	4	1
	Muğla (n=9)	1	8	0
	Antalya (n=11)	1	7	3
	Kahramanmaraş (n=9)	0	8	1
Doğu Anadolu / Güneydoğu Anadolu/ İç Anadolu	Kars (n=10)	1	1	8
	Şanlıurfa (n=12)	2	9	1
	Mardin (n=11)	1	9	1
	Konya (n=10)	2	5	3
Karadeniz	Amasya (n=12)	2	6	4
	Toplam (n=108)	16	65	27

Çizelge 5.3. Çalışılan tüm örneklerin ve bölgeler bazında ele alınan örneklerin *LTF/EagI* lokusunda genotip ve allel frekansları

Bölgeler	n		<i>LTF</i> Genotipler			<i>LTF</i> Allel Frekansı		χ^2
			AA	AG	GG	A	G	
Marmara/ Ege/ Doğu Anadolu/ Güneydoğu Anadolu/ İç Anadolu/ Karadeniz	108*	Gözlenen	16,0	65,0	27,0	0,45	0,55	5,02
		Beklenen	21,9	53,5	32,6			
Marmara	18**	Gözlenen	5,0	8,0	5,0	0,50	0,50	0,22
		Beklenen	4,5	9,0	4,5			
Ege / Akdeniz	35**	Gözlenen	3,0	27,0	5,0	0,47	0,53	10,37
		Beklenen	7,7	17,5	9,8			
Doğu Anadolu/ Güneydoğu Anadolu/İç Anadolu	43**	Gözlenen	6,0	24,0	13,0	0,42	0,58	0,95
		Beklenen	7,6	20,9	14,5			
Karadeniz	12**	Gözlenen	2,0	6,0	4,0	0,41	0,59	0,01
		Beklenen	2,0	5,8	4,2			

*Çalışılan bireylerin toplam sayısı, **Çalışılan bireylerin bölgelere göre sayıları

LTF-A allel frekansı 0,45, *LTF*-G allel frekansı ise 0,55 olarak belirlenmiştir. Böylece çalışılan Türkiye eşek populasyonlarında *LTF/EagI* lokusunda G alleli baskın bulunmuştur (Çizelge 5.3). Çalışılan tüm örnekleri beraber incelediğimizde *LTF/EagI* lokusunun genotip dağılımları Hardy-Weinberg genetik dengesinde bulunamamıştır ($P < 0,05$). Ancak çalışılan örnekleri kendi içerisinde bölgelere ayırıp incelediğimizde Marmara, Doğu Anadolu/Güneydoğu Anadolu/İç Anadolu grubu ve Karadeniz bölgelerinin genotip dağılımlarının dengede olduğu, yalnızca Ege/Akdeniz grubunun Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadığı görülmüştür.

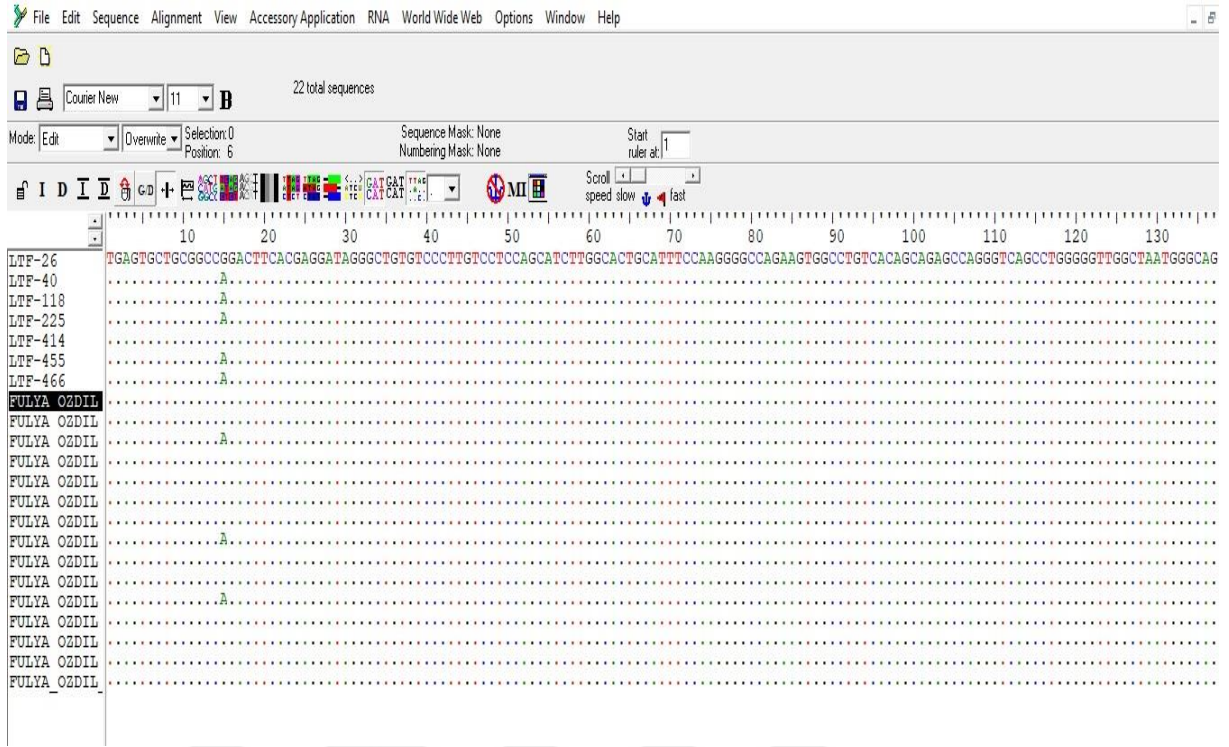
5.1.3. *LTF* Gen Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu

22 bireye ait *LTF* (750) gen bölgesinin DNA dizi analizleri, ileri ve geri primerler aracılığıyla çift yönlü dizilemesi kapiller elektroforez (ABI 3500XL Genetic Analyzer, USA) sisteminde yapılmıştır. Şekil 5.5’de *LTF* gen bölgesine ait kromotogram görüntüsünün bir parçası gösterilmektedir.



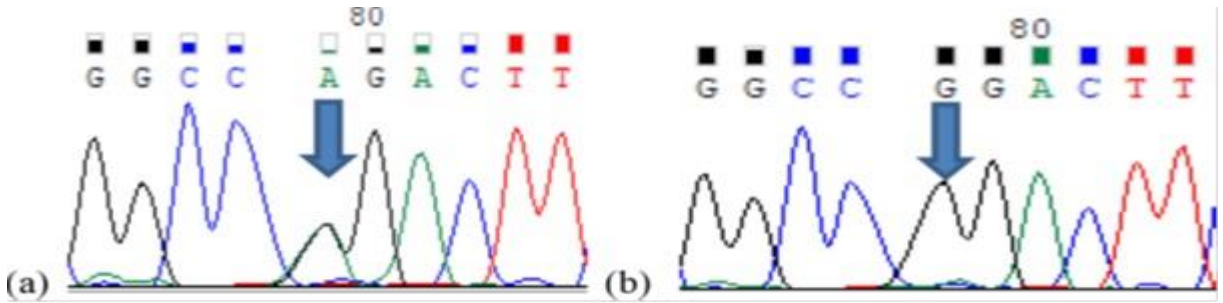
Şekil 5.5. Bir örneğe ait *LTF* gen bölgesinin kısmi kromotogram görüntüsü

İleri ve geri primerler ile elde edilen DNA dizilerinin birleştirilmesi sonucu elde edilen konsensus dizilerin hizalanması yapılmıştır. Hizalama sonrası mutasyonlar gözle kontrol edilerek teyit edilmiştir. *LTF* gen bölgesinin hizalanmış görüntüsünün bir parçası Şekil 5.6’da gösterilmektedir.



Şekil 5.6. *LTF* gen bölgesine ait 22 bireyin hizalanmış görüntüsünün bir bölümü

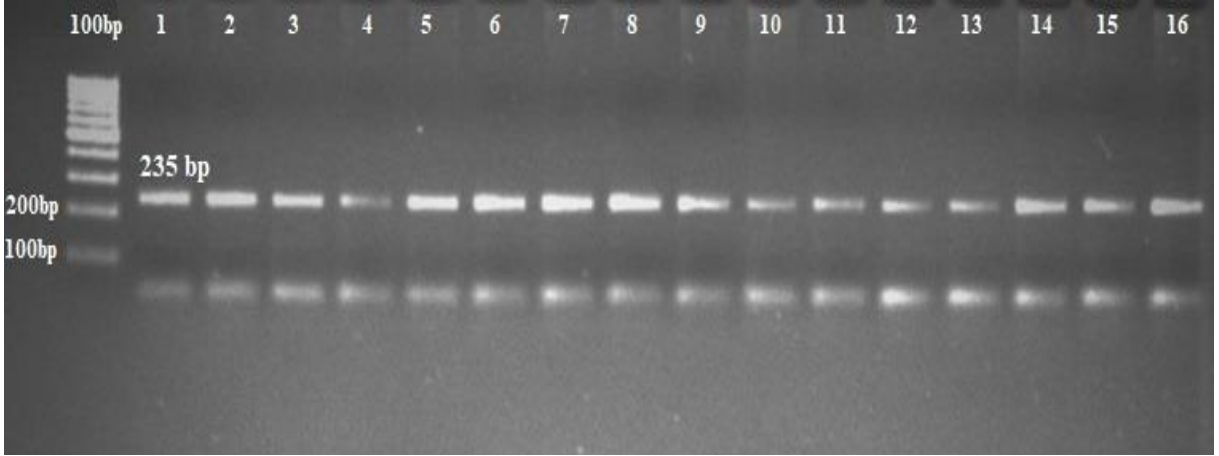
PCR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemi ile incelediğimiz bölge, *LTF* geninin 14. ekzon ve 14. intronun bir kısmını içermektedir. İncelenen *LTF* gen bölgesinin 89. pozisyonunda guaninden adenine (G→A) transiyon belirlenmiştir (Şekil 5.7).



Şekil 5.7. G→A transiyonunu gösteren *LTF* gen bölgesinin kısmi sekansı. (a) *EagI* heterozigot genotip (AG); (b) homozigot genotip (GG)

5.2. *CSN3* Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltım Sonuçları

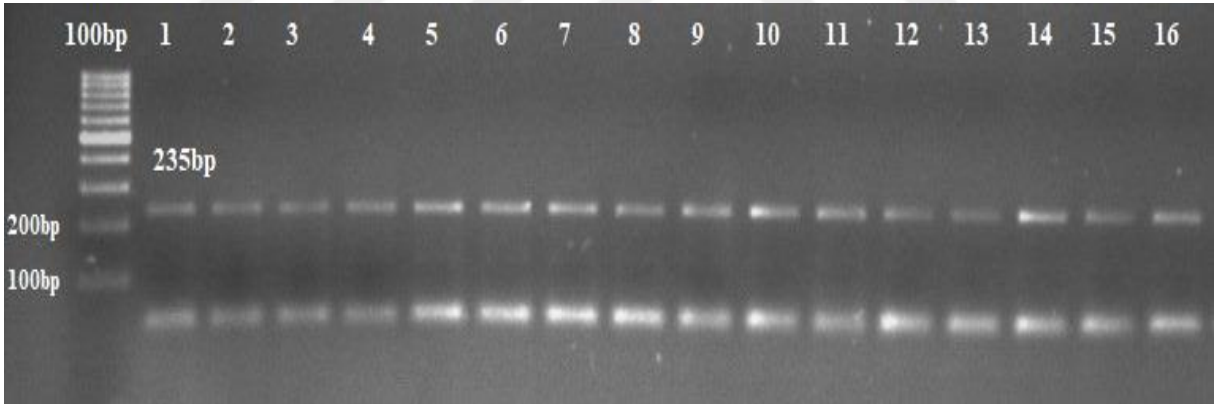
CSN3 gen bölgesi için özgün (Çizelge 4.4) primerler kullanarak 235 bp'lik gen bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra %2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve bu gen bölgesinin başarı ile çoğaltıldığı görülmüştür (Şekil 5.8).



Şekil 5.8. *CSN3* gen bölgesinin PCR ürünleri (235 bç), M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder

5.2.1. *CSN3* Gen Bölgesinin *PstI* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Sonucu

CSN3 (235 bç) gen bölgesi, daha önce Selvaggi ve Dario (2011) tarafından bildirilen *PstI* (ER0611, Thermo Fisher Scientific) restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. PCR ile çoğaltılan *CSN3* gen bölgesinin *PstI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda kesim noktası bulunamamış olup tüm populasyonların monomorfik yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 5.9)



Şekil 5.9. *CSN3* gen bölgesinin *PstI* restriksiyon enzimi ile kesimi M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder

CSN3 gen bölgesi Türkiye genelindeki eşek populasyonlarında ilk defa çalışılmıştır. Bu gen bölgesi ile ilgili diğer çiftlik hayvanlarında birçok çalışma bulunmasına rağmen at ve eşekte yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Selvaggi vd. (2015) dört İtalyan at populasyonu ve Martina Franca eşeklerinde *CSN3* geninin 1. ekzonunu analiz etmişlerdir. Çalışmalarında *CSN3* gen bölgesinde c.-66A > G ve c.-36C > A polimorfizminin varlığını belirlemek için sırasıyla *PstI* ve *BseI* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Bu gen bölgesinin her iki lokus

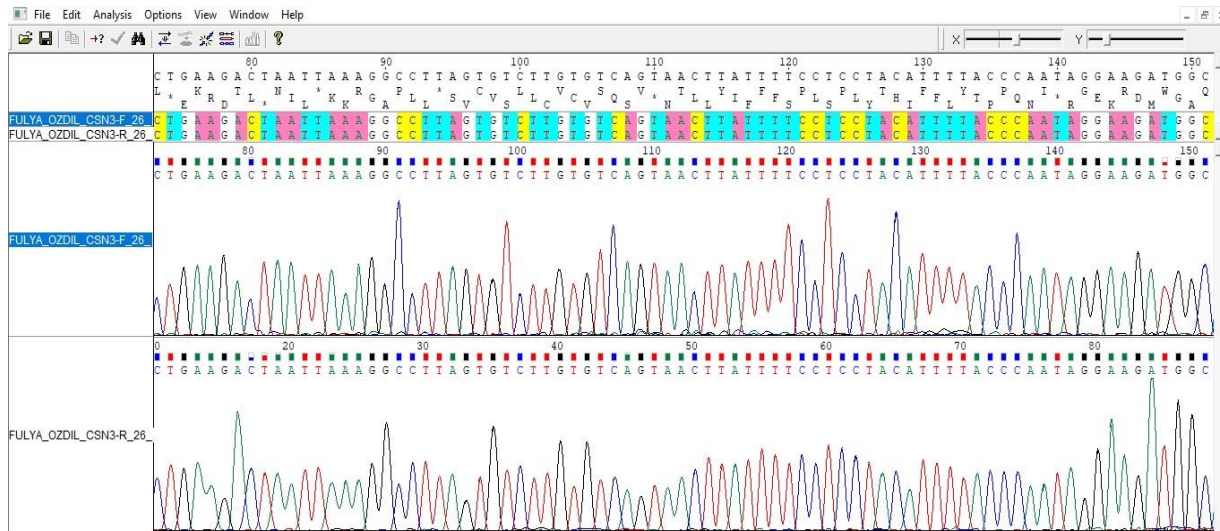
için atlarda polimorfik olduğu, ancak bu çalışmadaki sonuç ile benzer şekilde Martina Franca eşek ırkında monomorfik olduğu gözlenmiştir.

Selvaggi ve Dario (2011) tarafından yapılan başka bir çalışmada Martina Franca ırkı eşeklerde *CSN3* geninin 1. ekzonundaki varyasyonu PCR-RFLP tekniği ile araştırmışlardır. *CSN3* geninin *PstI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu çalışılan populasyondaki tüm hayvanların monomorfik bulunması bizim sonuçlarımızla yine paralellik göstermektedir.

Selvaggi vd. (2010) Murgese ırkı atlarda *CSN3* geninin ekzon 1 bölgesini *PstI*, *BseYI* restriksiyon enzimleri ile incelemişler ve ele alınan populasyonda her iki lokusun polimorfik olduğunu bildirmişlerdir. *CSN3* geninin *PstI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu c.-66A > G lokusundaki A allelinin frekansı 0,80 olarak belirlenirken, G allelinin frekansının 0,20 olarak tespit etmişler. Bu lokusun genotipik frekanslarını AA ve AG genotipleri için sırasıyla 0,60 ve 0,40 olarak bildirmişlerdir.

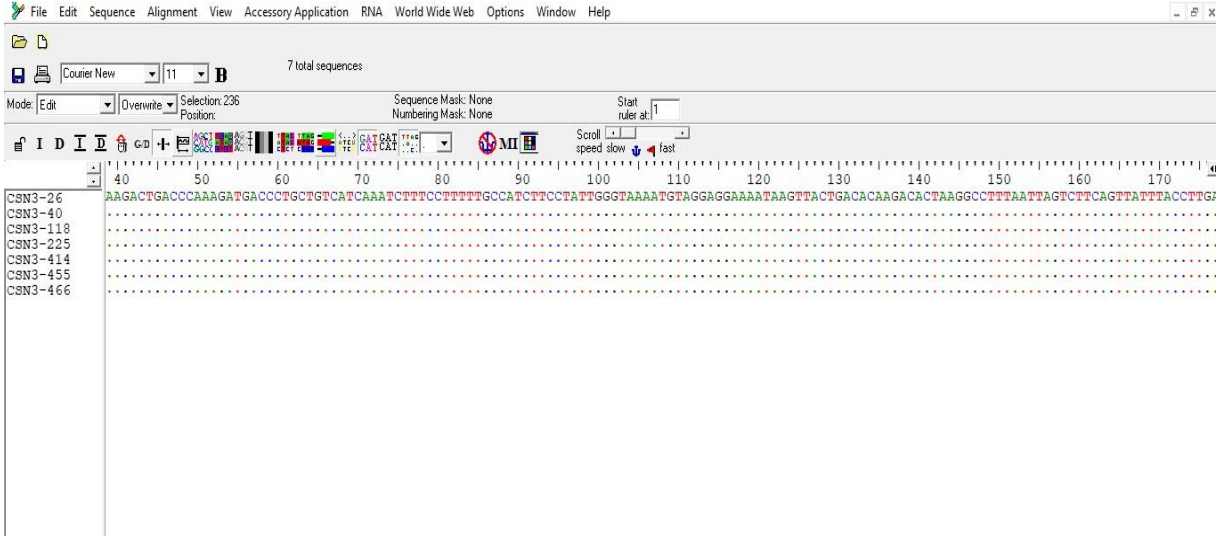
5.2.2. *CSN3* Gen Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu

7 bireye ait *CSN3* (235 bç) gen bölgesinin DNA dizi analizleri, ileri ve geri primerler aracılığıyla çift yönlü dizilemesi kapiller elektroforez (ABI 3500XL Genetic Analyzer, USA) sisteminde yapılmıştır. Şekil 5.10'da *CSN3* gen bölgesinin kromotogram görüntüsünün bir parçası gösterilmektedir.



Şekil 5.10. Bir örneğe ait *CSN3* gen bölgesinin kısmi kromotogram görüntüsü

Şekil 5.11'de elde edilen DNA dizilerinin hizalanmış görüntüsü verilmektedir.



Şekil 5.11. CSN3 gen bölgesine ait 7 bireyin hizalanmış görüntüsünün bir bölümü



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

20. yüzyılın ortalarında, tarımda sanayileşmenin ve seleksiyonla geliştirilmiş çeşitli ırkların yayılmasının bir sonucu olarak, birçok hayvan popülasyonunun nesli tükenmiştir ya da azalarak tehlikeye girmektedir. Birçok ülkede, kırsal alanlardaki yük taşıma hayvanı olarak kullanılan eşek ırklarının nesli tükenmiştir veya kritik seviyelere düşmüştür. Son yıllarda, eşek nüfusu Türkiye'de çarpıcı bir şekilde düşmüştür. Türkiye'nin eşek nüfusu 1990 yılında 1.084.000 baş iken, 2016 yılına kadar 155.158 başa düşerek %86 oranında azalmıştır (Anonim, 2019). Bazı illerde neredeyse tüm eşek nüfusunun kaybolduğu görülmektedir. Literatürü incelediğimizde sığır, koyun, keçi gibi çiftlik hayvanlarında çeşitli morfolojik ve verim özellikleriyle ilgili çok sayıda çalışma bulunmakta iken, eşeklerle ilgili yapılmış çalışmalar çok sınırlıdır. Ancak son yıllarda eşek sütünün kozmetik sektöründe kullanımı, yüksek antimikrobiyal özellikler göstermesi ve insan sütüne benzerliği gibi nedenlerden dolayı değerinin artmasıyla beraber yapılan çalışmalarda da artış görülmektedir. Bu nedenle, Türkiye yerli eşek ırkları üzerinde hem morfolojik hem de genetik çalışmalar yapmak önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, Türkiye'nin 11 farklı ilinden örnekleme yapılarak, eşeklerde süt özellikleri ile ilişkili olduğu bilinen genlerden *LTF* ve *CSN3* gen bölgeleri, PCR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemleri ile incelenmiştir. *LTF* ve *CSN3* gen bölgeleri Türkiye genelindeki yerli eşek popülasyonlarında ilk defa çalışılmıştır. *LTF* geninde, *MboI* ve *DraII* enzimleriyle kesim sonucu genetik polimorfizm tespit edilememiştir. Ancak *LTF* geninde *EagI* enzimi ile yapılan kesim sonucunda AA, AG ve GG olmak üzere üç genotip belirlenmiştir. Işık (2019), Kırklareli (29), Tekirdağ (21) ve İstanbul (27) illerinden toplam 77 bireyde eşek *LTF* gen bölgesinde DNA dizi analizi yöntemiyle yaptığı çalışmasında sonuçlarımızla benzer olarak 14. intronda g.272719G>A polimorfizmini belirlemiştir. Cieslak vd. (2016), Polish Primitive (90), Polish Coldblood (95), Polish Warmblood (95) at ırklarında 5'-flanking bölgesinde T>C, G>A, C>T, T>C olmak üzere dört farklı nokta mutasyonu belirlendiğini bildirmişlerdir. Laktoferrin çeşitli antimikrobiyal özellikler göstermesi ve bazı hastalıkların tedavisine olan katkısından dolayı değerli bir proteindir. *LTF* geniyle ilgili ruminantlarda çeşitli genetik çalışmalar bulunmasına rağmen at ve eşeklerdeki çalışmalar çok yetersiz seviyededir. *LTF* geni ile ilgili daha önce eşekler üzerinde genetik bir çalışma yapılmamıştır, bu nedenle bu sonuçlar eşeklerdeki bu gen bölgesinin ön ve ilk sonuçları olma özelliğindedir.

Bu çalışmada, yerli eşek populasyonlarında *CSN3* gen bölgesi de tanımlanmıştır. Her ne kadar *CSN3* gen polimorfizmlerinin diğer türlerdeki ekonomik kantitatif özellikler arasındaki ilişkileri ile ilgili birçok çalışma bulunsada, atgiller familyasında bu gen bölgesinde az sayıda çalışma yapılmıştır. Selvaggi vd. (2015) dört İtalyan at populasyonu ve Martina Franca eşeklerinde *CSN3* geninin 1. ekzonunu *PstI* enzimiyle analiz etmişlerdir. Bu gen bölgesinin atlarda polimorfik olduğunu, ancak Martina Franca eşek ırkında sonuçlarımıza benzer şekilde genetik farklılık gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Türkiye eşek populasyonlarının ve ırkların tespiti amacıyla daha fazla morfolojik ve genetik karakterizasyon çalışmalarına gereksinim bulunmaktadır. Ayrıca, eşeklerde diğer çiftlik hayvanlarında olduğu gibi, tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP'ler) tespiti ile bazı süt verim özellikleri arasındaki olası ilişkiler belirlenmelidir. Bu çalışma Türkiye genelinde yerli eşek populasyonlarında süt özellikleri ile ilişkili olduğu bilinen genlerden *LTF* ve *CSN3* gen bölgelerinin ilk kez çalışılmış olması yönünden öncü ve özgün bir çalışmadır. Daha fazla örnek sayısı ve farklı gen bölgelerinin çalışılması ile Türkiye eşek ırklarına ait genom düzeyinde daha fazla bilgi birikimine sahip olunacaktır.

KAYNAKLAR

- Ahmad, S. (2011). Application of BLUP in prediction of breeding values and estimation of SNP effects in dairy cattle (Doctoral Thesis), University of Nottingham.
- Ahmad, S., Anjum, F. M., Huma, N., Sameen, A. Ve Zahoor, T. (2013). Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins. *J Anim Plant Sci*, 23(Suppl 1), 62-74.
- Altomonte, I., Salari, F., Licitra, R. ve Martini, M. (2018). Donkey and human milk: Insights into their compositional similarities. *International Dairy Journal*. 89, 111-118:
- Andiç, S., Şahin, K. ve Koç, Ş. (2002). Van merkez ilçe kentsel alanda süt tüketimi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 12(2), 33-38.
- Anggraeni, A., Mumpunie, G. E., Misrianti, R. ve Sumatri, C. (2012). Genetic polymorphism of the lactoferrin gene in dairy and beef cattles at national artificial insemination and embryo transfer stations. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 17(4), 251-257.
- Anonymous: Turkish Statistical Institute, Animal statistics database, available at: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=101&locale=tr>, last access: 20 February 2019.
- Asadollahpour Nanaei, H., Ansari Mahyari, S. ve Edriss, M. A. (2016). Single nucleotide polymorphism of the lactoferrin gene and its association with milk production and reproduction traits in Iranian Holstein cattle. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 4(1), 71-76.
- Aschaffenburg, R. ve Drewry, J. (1957). Improved method for the preparation of crystalline β -lactoglobulin and α -lactalbumin from cow's milk. *Biochemical Journal*, 65(2), 273-277.
- Aspri, M., Economou, N. ve Papademas, P. (2017). Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects. *Food Reviews International*, 33(3), 316-333.
- Azevedo, A. L. S., Nascimento, C. S., Steinberg, R. S., Carvalho, M. R. S., Peixoto, M. G. C. D., Teodoro, R. L., Verneque, R.S., Guimarães, S.E.F. ve Machado, M. A. (2008). Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research*, 7(3), 623-630.

- Bidasolo, I. B., Ramos, M. ve Gomez-Ruiz, J. A. (2012). In vitro simulated gastrointestinal digestion of donkeys' milk. Peptide characterization by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *International Dairy Journal*, 24(2), 146-152.
- Black, R. E., Williams, S. M., Jones, I. E. ve Goulding, A. (2002). Children who avoid drinking cow milk have low dietary calcium intakes and poor bone health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3), 675-680.
- Blench, R. (2004). The history and spread of donkeys in Africa. *Wageningen: ACP-EU Technical Center for Agriculture and Rural Cooperation*. 22-30.
- Bovenhuis, H. ve Weller, J. I. (1994). Mapping and analysis of dairy cattle quantitative trait loci by maximum likelihood methodology using milk protein genes as genetic markers. *Genetics*, 137(1), 267-280.
- Brock, J. H. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1), 1-6.
- Brumini, D., Bø Furlund, C., Comi, I., Devold, T.G., Marletta, D., Vegarud, G.E. ve Monceyron Jonassen, C. (2013). Antiviral activity of donkey milk protein fractions on echovirus type 5. *International Dairy Journal*, 28(2), 109-111.
- Brumini, D., Criscione, A., Bordonaro, S., Vegarud, G. E. ve Marletta, D. (2016). Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. *Dairy Science & Technology*, 96(1), 1-14.
- Budak, Ş. Ö. ve Gürsel, A. (2012). Alternatif bir süt: Eşek sütü. *Gıda*, 37(4), 243-250.
- Camillo, F., Rota, A., Biagini, L., Tesi, M., Fanelli, D. ve Panzani, D. (2018). The current situation and trend of donkey industry in Europe. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 44-49.
- Caroli, A. M., Chessa, S. ve Erhardt, G. J. (2009). Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5335-5352.
- Carroccio, A., Cavataio, F., Montalto, G., D'amico, D., Alabrese, L. ve Iacono, G. (2000). Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clinical & Experimental Allergy*, 30(11), 1598-1603.

- Chopra, A., Gupta, I. D., Verma, A., Chakravarty, A. K. ve Vohra, V. (2015). Lactoferrin gene promoter variants and their association with clinical and subclinical mastitis in indigenous and crossbred cattle. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(3), 465-471.
- Chuang, L. Y., Yang, C. H., Tsui, K. H., Cheng, Y. H., Chang, P. L., Wen, C. H. ve Chang, H. W. (2008). Restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *Anticancer Research*, 28(4A), 2001-2007.
- Cieslak, J., Wodas, L., Borowska, A., Sadoch, J., Pawlak, P., Puppel, K., Kuczynska, B. ve Mackowski, M. (2016). Variability of lysozyme and lactoferrin bioactive protein concentrations in equine milk in relation to *LYZ* and *LTF* gene polymorphisms and expression. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(7), 2174-2181.
- Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K. ve Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42, 188-201.
- Costanzo, A. (2013). Characterization of donkey milk proteins by a proteomic approach (Tesi di Dottorato), Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli.
- Cunsolo, V., Saletti, R., Muccilli, V., Gallina, S., Di Francesco, A. ve Foti, S. (2017). Proteins and bioactive peptides from donkey milk: The molecular basis for its reduced allergenic properties. *Food Research International*, 99, 41-57.
- Dinesh, K., Verma, A., Gupta, I. D., Thakur, Y. P., Verma, N. ve Arya, A. (2015). Identification of polymorphism in exons 7 and 12 of lactoferrin gene and its association with incidence of clinical mastitis in Murrah buffalo. *Tropical Animal Health And Production*, 47(4), 643-647.
- Doğan, M. ve Kaygısız, A. (1999). Türkiye'deki İsviçre esmer sığırlarda süt protein polimorfizmi ile süt verim özellikleri arasındaki ilişkiler. *Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi*, 23(1), 47-49.
- Doğru, Ü. ve Özdemir, M. (2002). Sığırlarda süt protein polimorfizminin anlam ve önemi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(4), 457-464.
- Doğru, Ü., Dayıoğlu, H. ve Aksoy, A. (1997). Esmer, siyah-alaca, sarı-alaca sığır ırklarının süt proteinleri bakımından genetik yapısı. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(1), 12-20.

- El-Salam, M. H. A., ve El-Shibiny, S. (2011). A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Science & Technology*, 91(6), 663.
- Farrell Jr, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F. ve Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk-Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641-1674.
- Feligini, M., Vlaco, S., Curik, V. C., Parma, P., Greppi, G. ve Enne, G. (2005). A single nucleotide polymorphism in the sheep κ -casein coding region. *Journal of Dairy Research*, 72(3), 317-321.
- Fernandes, K. E. ve Carter, D. A. (2017). The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8(2),1-10.
- Gantner, V., Mijić, P., Baban, M., Škrtić, Z. ve Turalija, A. (2015). The overall and fat composition of milk of various species. *Mljekarstvo/Dairy*, 65(4): 223-231.
- Ginger, M. R.ve Grigor, M. R. (1999). Comparative aspects of milk caseins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 124(2), 133-145.
- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S. ve Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(4), 301.e1–301.e8.
- Gouda, E. M., Galal, M. K. ve Abdelaziz, S. A. (2013). Genetic variants and allele frequencies of kappa casein in Egyptian cattle and buffalo using PCR-RFLP. *Journal of Agricultural Science*, 5(2), 197.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C. Ve Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding*, 118(5), 369-390.
- Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M. (2010). Süt serum proteinleri ve türevlerinin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 8(1), 23-31.
- Hall, T. (1997). BioEdit: Biological sequence alignment editor. Carlsbad: Ibis Biosciences.

- Hallén, E. (2008) *Coagulation properties of milk – association with milk protein composition and genetic polymorphism* (Doctoral Thesis), Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Harding, D. (2007). Impact of common genetic variation on neonatal disease and outcome. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 92(5), F408-F413.
- Hobor, S., Kunej, T., Lenasi, T. ve Dovč, P. (2006). Kappa casein gene (*CSN3*) in horse: genetic variability in exon 1 and 4. *Acta Agriculturae Slovenica*, 88(2), 83-89.
- Hristov, P., Neov, B., Sbirikova, H., Teofanova, D., Radoslavov, G. ve Shivachev, B. (2014). Genetic polymorphism of kappa casein and casein micelle size in the Bulgarian Rhodopean cattle breed. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 30(4), 561-570.
- Hu, C. C. ve Mao, F. C. (1995). Kappa-casein genotyping and its correlation with milk producing ability of Holstein bulls. *Taiwan journal of Veterinary Medicine and Animal Husbandry*, 65(3), 247-254.
- Iacono, G., Carroccio, A., Cavataio, F., Montalto, G., Soresi, M. ve Balsamo, V. (1992). Use of ass' milk in multiple food allergy. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 14(2), 177-181.
- Ikonen, T., Ojala, M. ve Ruottinen, O. (1999). Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 1026-1033.
- Işık, R. (2019). The identification of novel single-nucleotide polymorphisms of equine beta-lactoglobulin and lactotransferrin genes. *Journal of Equine Veterinary Science*, 75, 60-64.
- Jann, O. C., Prinzenberg, E. M., Luikart, G., Caroli, A. ve Erhardt, G. (2004). High polymorphism in the κ -casein (*CSN3*) gene from wild and domestic caprine species revealed by DNA sequencing. *Journal of Dairy Research*, 71(2), 188-195.
- Jemmali, B., Kamoun, M., Ksouri, M., Rekik, B. ve Mhirsi, S. (2011). PCR-RFLP analysis of genetic polymorphism of the lactoferrin gene in Tunisian imported holsteins. *Wayamba Journal of Animal Science*, 170-173.
- Johanson, B. (1960). Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chemica Scandinavica*, 14(2), 510-12.

- Kaminski, S., Oleński, K., Brym, P., Malewski, T. ve Sazanov, A. A. (2006). Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the lactoferrin gene and its associations with milk performance traits in Polish Holstein-Friesian cows. *Russian Journal of Genetics*, 42(8), 924-927.
- Khlestkina, E. K. ve Salina, E. A. (2006). SNP markers: methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat. *Russian Journal of Genetics*, 42(6), 585-594.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppäla, A., Rantamäki, P. ve Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 9(8-9), 307-319.
- Kugler, W., Grunenfelder, H. P. ve Broxham, E. (2008). Donkey breeds in Europe. *St. Gallen, Switzerland: Monitoring institute for rare breeds and seeds in Europe*.
- Lee, T. H., Yu, S. L., Nam, M. S., Kim, S. J., Lee, K. K., Yu, D. Y. ve Shimazaki, K. (1997). Polymorphic sequence of Korean native goat lactoferrin exhibiting greater antibacterial activity. *Animal Genetics*, 28(5), 367-369.
- Levay, P. F. ve Viljoen, M. (1995). Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, 80(3), 252-267.
- Madhusudan, N. C., Ramachandra, C. D., Udaykumar, N. D., Sharnagouda, H. D., Nagraj, N. D. ve Jagjivan, R. D. (2017). Composition, characteristics, nutritional value and health benefits of donkey milk-a review. *Dairy Science & Technology*, EDP Sciences/Springer, hal-01538532.
- Maletić, M., Kanjac, S., Đelić, N., Lakić, N., Pavlović, M., Nedić, S. ve Stanimirović, Z. (2013). Analysis of lactoferin gene polymorphism and its association to milk quality and mammary gland health in Holstein-Friesian cows. *Acta Veterinaria*, 63(5-6), 487-498.
- Mao, Y. J., Zhong, G. H., Zheng, Y. C., Pen, X. W., Yang, Z. P., Wang, Y. ve Jiang, M. F. (2004). Genetic polymorphism of milk protein and their relationships with milking traits in Chinese yak. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17(11), 1479-1483.
- Martini, M., Altomonte, I., Licitra, R. ve Salari, F. (2018). Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 33-37.

- Mazurier, J. ve Spik, G. (1980). Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins: I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 629(2), 399-408.
- Messina, M., Vrech, E., Prandi, A., ve Pezzi, P. (1999). Genetic markers associated with somatotropic axe and milk proteins polymorphism [dairy cows]. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 50(3), 231-240
- Metin, M. (2001). Süt teknolojisi sütün bileşimi ve işlenmesi. *Genişletilmiş Üçüncü Baskı, Ege Üniv. Mühendislik Fak. Yay*, (33).
- Moioli, B., Pilla, F. ve Tripaldi, C. (1998). Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*, 27(3), 185-195.
- Monti, G., Bertino, E., Muratore, M. C., Coscia, A., Cresi, F., Silvestro, L., Fabris, C., Fortunato, D., Giuffrida, M. G. ve Conti, A. (2007). Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: an in vivo and in vitro study. *Pediatric Allergy and Immunology*, 18(3), 258-264.
- Nanaei, H. A., Edriss, M. A., Mahyari, S. A., Rahmani, H. R. ve Tabatabaei, B. E. S. (2012). Lactoferrin gene polymorphism of Holstein cows in Isfahan province. *Annals of Biological Research*, 3(5), 2365-2367.
- Omata, Y., Satake, M., Maeda, R., Saito, A., Shimazaki, K., Uzuka, Y., Tanebe, S., Sarashina, T., Mikami, T. ve Yamauchi, K. (2001). Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with bovine lactoferricin. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63(2), 187-190.
- Özdemir, M. (2001). *Çeşitli sığır ırklarında süt protein polimorfizmi ve verim özellikleri ile ilişkisi* (Yüksek Lisans Tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye.
- Özdemir, M. B. ve Acar Tek, N. (2015). Bileşimi ve sağlık üzerine etkileri açısından; eşek ve keçi sütü, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(4), 189-193.
- Özsensoy, Y. ve Kurar, E. (2012). Markör sistemleri ve genetik karakterizasyon çalışmalarında kullanımları/marker systems and applications in genetic characterization studies. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 10(2), 11-19.

- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M. Ve Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 88-113.
- Pawlik, A., Sender, G. ve Korwin-Kossakowska, A. (2009). Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance-a review. *Animal Science Papers and Reports*, 27(4), 263-271.
- Phadungath, C. (2005). Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(1), 201-212.
- Polidori, P. ve Vincenzetti, S. (2012). Protein profile characterization of donkey milk. In: *Milk Protein*. Ch 8, pp. 215-232.
- Rachagani, S. ve Gupta, I. D. (2008). Bovine kappa-casein gene polymorphism and its association with milk production traits. *Genetics and Molecular Biology*, 31(4), 893-897.
- Rafalski, A. (2002). Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(2), 94-100.
- Rahmani, S. F. (2011). *Studies on bovine lactoferrin gene and its association with mastitis in cattle* (Doctoral thesis), Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar.
- Rebouillat, S. ve Ortega-Requena, S. (2015). Potential applications of milk fractions and valorization of dairy by-products: A review of the state-of-the-art available data, outlining the innovation potential from a bigger data standpoint. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 6(03), 176-203.
- Ren, D. X., Miao, S. Y., Chen, Y. L., Zou, C. X., Liang, X. W. ve Liu, J. X. (2011). Genotyping of the k-casein and β -lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and water buffalo by PCR-RFLP. *Journal of Genetics*, 90, 1-5.
- Riaz, M. N., Malik, N. A., Nasreen, F. ve Qureshi, J. A. (2008). Molecular marker assisted study of kappa-casein gene in Nili-Ravi (buffalo) breed of Pakistan. *Buffalo Bull*, 27(3), 240-244.
- Roncada, P., Piras, C., Soggiu, A., Turk, R., Urbani, A., & Bonizzi, L. (2012). Farm animal milk proteomics. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4259-4274.

- Rossel, S., Marshall, F., Peters, J., Pilgram, T., Adams, M. D. ve O'Connor, D. (2008). Domestication of the donkey: Timing, processes, and indicators. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 105(10), 3715-3720.
- Safronova, O. S., Babich, E. A., Ovchinnikova, L. Y. ve Ovchinnikov, A. A. (2017). Polymorphism of kappa-casein, somatotropin, beta-lactoglobulin, prolactin, and thyreoglobulin genes of Black and White Cattle of North Kazakhstan. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(5), 568.
- Salimei, E. ve Fantuz, F. (2012). Equid milk for human consumption. *International Dairy Journal*, 24(2), 130-142.
- Sambrook J., Fritsch E.F. ve Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory manual*, vol. 3, cold spring harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, N.Y. ISBN:978-1-936113-42-2.
- Sayın, C., Taşcıoğlu, Y., Mencet, M. N. (2011). Seyyar sütçülere süt veren üreticilerin, seyyar sütçülüğe bakış açılarının değerlendirilmesi: Antalya ili örneği. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(2), 149-155.
- Selvaggi, M. ve Dario, C. (2011). Analysis of two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located in exon 1 of kappa-casein gene (*CSN3*) in Martina Franca donkey breed. *African Journal of Biotechnology*, 10(26), 5118-5120.
- Selvaggi, M., D'Alessandro, A. G. ve Dario, C. (2015). Comparative characteristics of DNA polymorphisms of κ -casein gene (*CSN3*) in the horse and donkey. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 14567-14575.
- Selvaggi, M., Laudadio, V., Dario, C. ve Tufarelli, V. (2014). Major proteins in goat milk: an updated overview on genetic variability. *Molecular Biology Reports*, 41(2), 1035-1048.
- Selvaggi, M., Pesce Delfino, A. R. ve Dario, C. (2010). Exon 1 polymorphisms in the equine *CSN3* gene: SNPs distribution analysis in Murgese horse breed. *Animal Biotechnology*, 21(4), 252-256.
- Shakerian, M., Kiani, H. ve Ehsani, M. R. (2016). Effect of buffalo milk on the yield and composition of buffalo feta cheese at various processing parameters. *Food Bioscience*, 15, 110-117.
- Sharifzadeh, A. ve Doosti, A. (2011). Study of Lactoferrin gene polymorphism in Iranian Holstein cattle using PCR-RFLP technique. *Global Veterinaria*, 6(6), 530-536.

- Sharma, P., Parmar, S. N. S., Thakur, M. S., Nauriyal, D. S. ve Ranjan, R. (2015). Association of bovine lactoferrin gene with mastitis in frieswal cattle. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5(4), 859-863.
- Shimazaki, K. I., Oota, K., Nitta, K. ve Ke, Y. (1994). Comparative study of the iron-binding strengths of equine, bovine and human lactoferrins. *Journal of Dairy Research*, 61(4), 563-566.
- Soria, L. A., Iglesias, G. M., Huguet, M. J. ve Mirande, S. L. (2003). A PCR-RFLP test to detect allelic variants of the bovine kappa-casein gene. *Animal Biotechnology*, 14(1), 1-5.
- Sönmezoğlu, Ö. A., Yıldırım, A. ve Güleç, T. E. (2010). Tek nükleotid farklılıkları (SNP) ve buğdayda kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3(2), 55-66.
- Strzalkowska, N., Krzyzewski, J., Zwierzchowski, L. ve Ryniewicz, Z. (2002). Effects of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci polymorphism, cows' age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield composition in Polish black-and-white cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 20(1), 21-35.
- Şahin, Ş., Öner, Y. ve Elmacı, C. (2013). Esmer ve siyah alaca ırkı sığırlarda bazı ekonomik özellikler ile ilişkili gen bölgelerinin PCR-RFLP tekniği ile incelenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 19, 235-244.
- Taşçı, F. (2011). Eşek sütünün özellikleri ve gıda alerjilerinde kullanımı. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 30(2), 39-44.
- Thompson J. D., Higgins, D. G. ve Gibson, J. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 11, 4673-4680.
- Toparslan, E. (2015). *Kızılırmak deltasında yetiştirilen Anadolu mandalarının PRL, CSN3 ve PIT-1 genleri bakımından genotiplerinin PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Toro, M. A., Fernández, J. ve Caballero, A. (2009). Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science*, 120(3), 174-195.
- Trakovická, A., Moravčíková, N. ve Navrátilová, A. (2012). Kappa-casein gene polymorphism (CSN3) and its effect on milk production traits. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 15(3), 61-64.

- Tsuda, H., Sekine, K., Fujita, K. I. ve Iigo, M. (2002). Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms a review of experimental and clinical studies. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1), 131-136.
- Uniacke-Lowe, T. (2011). *Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems* (Doctoral Thesis), The National University of Ireland, Cork University College School of Food and Nutritional Sciences, Ireland.
- Ünal, R. N. ve Besler, H. T. (2008). *Beslenmede sütün önemi*. Sağlık Bakanlığı Yayın, 727. Ankara: Klasmat Matbaacılık.
- Velkala, R. J., Vilkki, H. J., Elo, K. T., De Koning, D. J. ve Mäki-Tanila, A. V. (1999). A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. *Animal Genetics*, 30(2), 136-143.
- Vicente, M. C. ve Fulton, T. (2003). Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity. Illus. Nelly Giraldo. IPGRI, Rome, Italy and Institute for Genetic Diversity, Ithaca, New York, USA.
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M. ve Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34(3), 275-305.
- Vilá, C., Leonard, J. A., & Beja-Pereira, A. (2006). Genetic documentation of horse and donkey domestication. *Documenting domestication: New genetic and archaeological paradigms*, 342-354.
- Vincenzetti, S., Polidori, P. ve Vita, A. (2008). Nutritional characteristics of donkey's milk protein fraction. In: *Dietary Protein Research Trends*. Ch 8, pp. 207-225.
- Vincenzetti, S., Pucciarelli, S., Polzonetti, V. ve Polidori, P. (2017). Role of proteins and of some bioactive peptides on the nutritional quality of donkey milk and their impact on human health. *Beverages*, 3(3), 34.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K. ve Takase, M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16(11), 1241-1251.
- Walzem, R. L., Dillard, C. J. ve German, J. B. (2002). Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science And Nutrition*, 42(4), 353-375.

- Wojdak-Maksymiec, K., Kmiec, M. ve Ziemak, J. (2006). Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. *Veterinari Medicina*, 51(1), 14-20.
- Yardibi, H. (2008). Ruminantlarda st proteinleri ve polimorfizmi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 34(3), 29-35.
- Yatkın, S. (2019). *Türkiye eek (equus asinus) popülasyonlarının genetik karakterizasyonu* (Yüksek Lisans Tezi), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, Türkiye.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., ve Boyle, T. (1999). Popgene (v. 1.32), Microsoft Windows- Based Freeware For Population Genetic Analysis, available at: <https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf> (last access: 20 February 2019).
- Yıldırım, S. (2014). *Farklı orijinden sütlerin rennetlenme kinetiklerinin yüzey hidrofobisitesi yaklaşımla incelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Yılmaz, O., Saim, B. ve Mehmet, E. (2012). The domesticated donkey: I–species characteristics. *Canadian Journal of Applied Sciences*, 4(2), 339-353.
- Zeder, M. A., Emshwiller, E., Smith, B. D. ve Bradley, D. G. (2006). Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. *Trends in Genetics*, 22(3), 139-155.

ÖZGEÇMİŞ

Hasan BULUT 1991 yılında İstanbul'da doğmuştur. İlköğretim ve lise eğitimini İstanbul'da tamamlamıştır. Lisans öğrenimine 2012 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünde başlayıp 2016 yılında tamamlamıştır.

