

T. C.
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

LAKTASYON SÜRESİNCE İNSAN SÜTÜNÜN PROTEİN FRAKSİYONLARINDAKİ
DEĞİŞİMİN SODIUM DODECYL SULFAT-POLIAKRİLAMİD JEL
ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE) İLE ARAŞTIRILMASI

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Araş. Gör. Selahaddin TEKEŞ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali KELLE

PİŞLENDİRİLMİŞ

T.C.	
DICLE ÜNİVERSİTESİ	
KÜTÜPHANESİ	
Denetim No	1991/439
Tarih No	2
618-71	

616.075'83
734
1990

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Hakkında Genel Bilgiler	3
2.2. Süt Proteinleri	4
2.2.1. Kazeinler	5
2.2.2. Whey Proteinleri	7
2.2.2.1. Laktoferrin	7
2.2.2.2. α -Laktalbumin	9
2.2.2.3. Serum Albumin	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1. Gereç	11
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	11
3.1.2. Solüsyonlar	12
3.1.2.1. Stok Solüsyonlar	12
3.1.2.2. Çalışma Solüsyonları	14
3.1.3. Kullanılan Araçlar	15
3.2. Yöntem	16
3.2.1. Süt Örneklerinin Analize Hazırlanması..	16
3.2.2. Standart Protein Örneklerinin Analize Hazırlanması.....	18
3.2.3. Total Süt Protein Konsantrasyonunun Saptanması	19
3.2.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Uygulaması	20

	<u>Sayfa</u>
3.2.4.1. Jel Tüplerinin Temizlenmesi ..	21
3.2.4.2. Jel Tüplerinde Jellerin Hazırlanması	21
3.2.4.3. Jele Örnek Uygulanması	22
3.2.4.4. Jele Standart Protein Örneklerinin Uygulanması	23
3.2.4.5. Elektroforez İşlemi.....	24
3.2.4.6. Protein Bantlarının Tespit Edilmesi ve Boyanması	24
3.2.5. Değerlendirmeler	25
3.2.5.1. Kalitatif Değerlendirme.....	25
3.2.5.2. Kantitatif Değerlendirme	25
3.2.5.3. İstatistiksel Değerlendirme ..	26
4. BULGULAR	27
4.1. Total Protein Örneklerine Ait Elde Edilen Bulgular	27
4.2. Her Bir Süt Protein Fraksiyonlarına Ait Bulgular	29
4.3. Bulgulara Ait Tablo ve Şekiller	33
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ	51
7. ÖZET	53
8. KAYNAKLAR	54

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimim süresince devamlı yardım, ilgi ve alakasını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Sayın Prof.Dr. Turgay BUDAK'a,

Büyük bir özveride bulunarak Yüksek Lisans yöneticiliğimi üstlenen, tezimin hazırlanmasında gerekli ilgi, tenkit ve tavsiyelerle bana yol gösteren hocam Sayın Prof.Dr.Ali KELLE'ye,

Çalışmalarım süresince büyük yardım ve desteklerini gördüğüm Sayın hocam Yrd.Doç.Dr.M.Nail ALP'e, proje çalışmamızın içinde yer alan ve her zaman tam bir uyum içerisinde çalıştığımız, devamlı yardımını gördüğüm değerli büyüğüm Sayın Yrd.Doç.Dr.M.Emin ERDAL'a, Sayın Yrd.Doç.Dr.Yavuz ENSARI'ye,

İlgili projemizin jürisinde yer alan ve projemizi onaylayarak bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından Sayın Prof.Dr.Eşref DENİZ'e ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından Sayın Prof.Dr.Işık BÖKESÖY'a,

Tez çalışmalarım sırasında büyük emeği geçen Sayın Arş.Gör.Ömer SATICI'ya, Arş.Gör.Ayla ÇELİK (ATLI)'ya ve Anabilim Dalımızdaki bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Arş.Gör.Selahaddin TEKEŞ

1. GİRİŞ

Memelilerin yaşamında neonatal peryod, özellikle beslenme açısından hassas ve kritik peryodlardan biridir. Neonatal peryod boyunca meme sütünün, beslenme için tek kaynak olması ve eksikliklerin diğer besin maddeleri ile temin edilememesi nedeniyle bu dönemde çocuğun tüm gereksinimlerini karşılayan bir besi ögesi olduğu bilinen bir gerçektir (18,49). Dünya Sağlık Örgütü'nün ilk 4-6 ayındaki bebeklerin tek besi ögesi olarak anne sütü ile beslenmesini özendirici bir uluslararası yasa kabul etmiş olması ve tüm üye devletlerin bu yasaya uymaları kararını alması da (17,49) bu besi ögesinin ne denli önemli olduğunu vurgular niteliktedir.

İnsan sütü, yenidoğan için vücudun savunma faktörlerini ve sindirim enzimlerini oluşturmasından, aminoasitleri, lipidleri, karbonhidratları, mineralleri, dengeli ve yeterli miktarda vitaminleri sağlamasına kadar birçok üstün özelliğe sahiptir (17,21,30,41). İnsan sütüne has ve benzeri diğer besin maddelerinde olmayan bazı maddelerle ilgili çalışmalar yapılmış; sonuçta süte özgü olağanüstü özelliklerin birçoğunun sütün protein bölümünde bulunduğu gözlenmiştir (30). Proteinlerin hem besi, hem de yapı materyali olarak diğer besin öğeleri arasında özel önemleri vardır. Süt proteinleri, organizmada sentezi yapılamayan, gıdalarla alınması zorunlu olan esensiyel aminoasitlerini yeterli miktarda içerdiğinden bebek beslenmesinde fizyolojik bir öneme sahiptir (38).

İnsan sütü proteinlerinin fizyolojik önemi, işlevi ve kullanımı ile ilgili bilgilerimizi genişletmek amacıyla bu proteinlerin daha detaylı olarak araştırılması gerekir (30). İnsan sütündeki prote-

inlerin doğru ve tam analizinin yapılması, çocuğun beslenme taleplerine değer biçilmesi için önemlidir. Neonatal peryotta enzimatik, antibiyotik, immünolojik ve beslenme gibi çeşitli amaçlar için kullanılan proteinler, ayrıca süt sentezi ve salgılama mekanizmalarının işleyişini açıklığa kavuşturur ve süt salgılayan hücrenin fonksiyonunu yansıtır (34).

İnsan sütünün bazı major proteinleri ve bu proteinlerin özellikleri konusunda daha önce yayınlanmış birçok çalışma bulunmasına karşın, birçok minör proteinlerin insan sütünde bulunduğu enzimatik aktivite ile henüz gösterilebilmiştir. Bununla birlikte, inek sütünde bu konuda veya insan plazma proteinleri konusundaki bilgiler ile karşılaştırıldığında insan süt proteinleri konusundaki bilgilerin hala sınırlı olduğu görülmektedir (30,34). Anne sütünün yaygın olarak kullanılmasıyla süt veren annelerin ve onların çocuklarının metabolik ve nütrisyonel durumları kadar, anne sütünün kompozisyonu hakkında doğru bilgilere sahip olmak da büyük önem taşımaktadır (49).

Bu amaçla, sosyo-ekonomik koşulları çok iyi olmayan, kimi annelerin yetersiz beslendiği ve sık aralıklarla doğum yaptığı Diyarbakır yöresinde, insan kolostrum ve matüre sütlerinde proteinlerin jel elektroforetik analizini yaparak, değişik laktasyon dönemlerinde başlıca major proteinlerin kalitatif ve kantitatif durumlarını ortaya koymak için bu araştırma düzenlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez Hakkında Genel Bilgiler

Bilimde ve endüstrideki gelişmeler, değişik olumsuz etkisinin yanısıra, örneğin kanser olgusunu artırma gibi, hastalıkların tanısında ve tedavisinde kullanılan yeni yöntemlerin de gelişmesine yardımcı olmuştur. Bu yöntemlerden elektrofrez yöntemi; proteinlerin kantitatif ve kalitatif değerlendirmelerinde, kişinin sağlık durumunun ve proteinlerin genetik polimorfizmi bakımından yapısının öğrenilmesine yardımcı olması gibi birçok açıdan oldukça önemlidir (11, 12,47,48,52).

Sulu bir çözelti içinde çözülmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine "elektrofrez" (elektrikle göç) denir (11,50). Bu küçük parçacıklar bakteriler, virüsler, protein molekolleri (enzimler, hormonlar v.s.) olabilirler (9,11,28). Doğal olarak bu parçacıkların çoğu elektrik yükü taşırlar. Elektrikle yüklü kolloidal parçacıkların etrafında kurulan elektrik alanı, su moleküllerinin dipol yönelimine ve bazı su moleküllerinin kolloidal parçacığa dipol bağlarla bağlanmasına neden olabilir. Bu yolla parçacığın pozitif yük kazanması, bir miktar su molekülünün negatif yükle yüklenmesine neden olur. Böyle bir çözelti sistemine elektrik alanı uygulandığı zaman, elektrofrez olayı sonucu, sistemin elektrikle yüklü elemanları birbirinden ayrılır(11).

SDS - poliakrilamid jel elektrofrezinde kullanılan jel; akrilamid monomerleri ve metilen-bis-akrilamid ile birçok kimyasal maddelerin karışımı ve bu karışımın fotopolimerizasyonu ile elde edilir (2,6,8,9,37,43). Kullanılan maddeler çapraz bağlanmalar sonucu, üç

boyutlu bir ađ benzeri sistemin oluşmasını sağlarlar. Bu jel hazırlanırken kullanılan kimyasal maddelerin miktarları değiştirilerek, çeşitli por b¼y¼kl¼đ¼nde jeller elde edilebilir (43,44). Bu jeller, elektrik y¼kleri bakımından aynı olmalarına karşın, şekilleri ve por b¼y¼kl¼kleri bakımından farklı olmaları, uygulanan maddelerin molek¼l ağırlıklarının gerçeğe yakın bir şekilde saptanmasına yardımcı olurlar. B¼y¼lece SDS-ilaveli poliakrilamid jel elektroforezinde ayırımı yapılan maddelerin molek¼l b¼y¼kl¼kleri, molek¼llerin elektriksel y¼kleri ve molek¼l ağırlıkları saptanabilir (2,43,51). Protein molek¼llerinin molek¼ler ¼zelliklerinin ¼đrenilmesinde de poliakrilamid jel elektroforezi kullanılabilir (51).

İnsan s¼t¼, farklı molek¼ler ağırlığa, farklı molek¼ler b¼y¼kl¼đe ve farklı elektriksel ¼zelliđe sahip çok sayıda protein molek¼l¼ içerir. İnsan s¼t¼nde ki bu proteinlerin kantitatif ve kalitatif olarak değerlendirilmeleri, miktarı çok d¼ř¼k olan bazılarının dışında (Lizozim v.b.), elektroforez y¼ntemi ile sağlıklı bir şekilde yapılabilmektedir (34,41).

2.2. S¼t Proteinleri

İnsan s¼t proteinleri başlıca whey proteinleri ve kazein olmak ¼zere iki kısımdan oluşur (1,15,17,18,30,32,41,42). Whey proteinleri daha fazla eriyebilirlik ¼zelliđi olan, kolay sindirilebil¼n, biyolojik değerleri y¼ksek ve enfeksiyonlara karşı koruyucu ¼zelliđi olan proteinleri içerir. Kazein ise yalnız s¼tte bulunan ve s¼te ¼zg¼ beyaz rengini veren, beslenme için gerekli olan b¼t¼n aminoasitleri ihtiva eden protein kısmıdır (15,17,22,25,38). İnsan s¼t¼ inek s¼t¼ne karşılık daha az bir protein içeriğine sahiptir. İnek s¼t¼ ortalama olarak 3-3,5 gr/100 ml protein içeriğine sahipken, insan s¼t¼nde

bu oran 1-1,5 gr/100 ml'dir. Bu farklılık insan sütünün daha yüksek oranda protein olmayan (non-protein) nitrojen içermesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (15).

İnek sütünün başlıca proteini kazein olmasına karşın, insan sütünde whey proteinleri daha baskındır. İnsan sütünde kazein içeriği toplam proteinin %20-30 kadarını oluştururken, whey proteinleri ise toplam proteinin %70-80'ini oluşturmaktadır (1,15,30,41).

İnsan sütü daha öncede belirttiğimiz gibi, yenidoğan için vücudun savunma faktörlerini ve sindirim enzimlerini oluşturmasından, aminoasitleri, lipidleri, karbonhidratları, mineralleri, dengeli ve yeterli miktarda vitaminleri sağlamasına kadar birçok üstün özelliklere sahiptir (15,17,21,30,41). Bunlardan proteinlerin hem besi ögesi olarak hem de yapı materyali olarak besin öğeleri arasında özel önemleri vardır (38). Doğası gereği yavru bireyin beslenme talebine en iyi uyum sağlayan sütünü, kendi türünün sütü olduğu varsayılır. Bu nedenle insan sütünün bileşimi sağlıklı çocukların yetişmesi için örnek bir besi maddesi olarak değerlendirilir (33).

2.2.1. Kazéinler

Süt proteinlerinin önemli fraksiyonlarından olan kazein doğada yalnız sütte bulunur (38,25). Sütte gerçek eriyikler halinde bulunmayıp, sadece miseller halinde bulunan (1,15,18,25,30,32,36,53)kazeinler,insan sütünün toplam protein miktarının küçük bir bölümünü oluşturan glikoproteindir (15). Kazeinler süt için, eşsiz fosforlanmış proteinlerdir ve beslenmede önemli olan kalsiyumu bağlarlar.Kazein,bebeğin midesinde katı bir kısım oluşumuyla sonuçlanan, düşük bir pH değerinde (pH.4.6) çökmesiyle karakterize edilir(15,25,30,32).

Beslenme için gerekli olan bütün aminoasitleri ihtiva eden, sulu asit ve alkalilerde eriyen (25) kazeinler, yüksek bir prolin miktarı, yüksek ester bağlı fosfat içeriği, düşük sülfür aminoasit ve düşük sistein içeriğiyle karakterize edilen süte özgü bir protein grubudur (15,21,25). Kazeindeki yüksek prolin içeriği bebekte enzimatik sindirimi kolaylaştırıcı yönde rol oynamaktadır. İnsan sütü kazeini ile inek sütü kazeinleri arasında fiziko-kimyasal özellikler açısından farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin pH 4.6'da insan sütü kazeini ile oluşturulan tortunun inek sütü kazeini ile oluşturulan tortudan daha gevşek ve daha yumuşak olduğu görülür. Bu durum da bize anne sütünün kazeininin daha kolay sindirilebileceğini anlamamıza yardımcı olur (15,32).

İnsan sütü, iki tür kazein altbirimini içermektedir. Bunlar, major altbirim olan β -kazein ve minor altbirim olan k-kazeindir(1, 15,18,21,30,32,41,42). Aynı zamanda insan sütünde α -kazeinin varlığı bildirilmekle beraber, varlığı net olarak ispat edilememiştir(21, 30,32). İnsan sütündeki kazein içeriğini tatminkâr bir biçimde nicel olarak tayin etmek için henüz güvenilir bir metod geliştirilememiştir (32). Kazein alt birimlerinden β -kazeinler kalsiyuma karşı duyarlı, k-kazeinler ise kalsiyuma karşı duyarsız kesim olarak bilinir. İnek sütünde olduğu gibi, insan k-kazeini, kazein miselini kararlı hale getiren bir glikoproteindir (15). İnsan sütünde k-kazein, β -kazeinden oldukça düşük bir konsantrasyonda bulunur, proteolitik enzimlerce kolayca indirgenir ve büyük oranda karbonhidrat içerir. Diğer taraftan insan β -kazeini ve k-kazeinin kompleksler oluşturduğu gösterilmiştir. Bu olayın misel oluşumunda oldukça gerekli bir reaksiyon olduğu bildirilmektedir (30).

2.2.2. Whey Proteinleri

Whey proteinleri; insan sütündeki proteinler içerisinde en fazla dikkati çeken proteinlerdir. Bu proteinler, insan sütünün toplam protein içeriğinin yaklaşık %70-80'ini oluşturur (1,15,17,18,30,31,32,41,42). Whey proteinlerinin daha fazla eriyebilirlik özellikleri vardır. Bu proteinler kolay sindirilebilen, biyolojik değeri yüksek ve enfeksiyonlara karşı koruyucu özelliği olan proteinlerdir (17).

Whey proteinleri, α -laktalbumin, laktoferrin, lysozym, serum albumini, ve immunglobulinleri içermektedir (1,15,18,30,41,42).

Anne ve inek sütü whey proteinleri protein fraksiyonları ve immunoglobulinler yönünden farklılık göstermektedir. Anne sütünde alerjen bir protein fraksiyonu olan β -laktoglobulin yoktur. Bu nedenle inek sütü ile beslenen çocuklarda izlenen kronik gastroenterit ve akciğerlerde hemosiderozis ile giden klinik tablo, anne sütü ile beslenen bebeklerde görülmez (17).

2.2.2.1. Laktoferrin

İnsan sütünde whey kesiminde en fazla bulunan, kırmızı renkli demir bağlı bir protein olan laktoferrinin ilk olarak Johansson adlı bilim adamı tarafından izole edildiği bildirilmektedir.(30). Bu demir bağlayan protein, serumdaki transferrine benzer bazı özelliklere sahip olduğundan aynı zamanda laktotransferrin, laktosiderofilin olarak da ifade edilir. Buna karşılık, transferrinden farklı birkaç özelliğe sahip olduğundan laktoferrin daha uygun bir ad olarak kullanılmaktadır. Laktoferrin, demir bağlama özelliği ile kan serumu transferrinine benzemesine karşılık, aminoasid dizilişi ve antijenik

yapısı bakımından ikisi arasında herhangi bir benzerlik bulunmamaktadır (1,15,18,30,36,53).

Laktoferrin, molekül ağırlığı 77.000. Dalton ve elektroforetik mobilitesi 0,17 olan bir proteindir (1,30,34,36,41). Toplam süt proteininin %10-25'ini oluşturmaktadır (18,19,30,41).

Laktoferrin birçok vücut sıvısında; gözyaşı, tükürük, pankreas salgısı, bronşial mukus, seminal sıvı ve hücrelerde bulunmaktadır. Ancak sütteki konsantrasyonu diğerlerindeki göre çok daha yüksektir (30,36,53). Yapılan çalışmalarda (18,30,41,53) laktoferrinin demir bağlama bakımından bakterilerle yarıştığı, böylece vücudun çeşitli yerlerinde bakteriyostatik bir etki yaptığı, dolayısıyla sütteki laktoferrinin potansiyel fizyolojik fonksiyonunun dikkat çekici olduğu belirtilmektedir. Antibakteriyel etkiye sahip bu proteinin, bakteriyostatik bir fonksiyonunda olduğunun, ilk kez Bulken ve arkadaşları tarafından rapor edildiği bildirilmektedir (30,40).

Laktoferrinin ikinci bir olası işlevi demir absorpsiyonunu yükseltmektir. Anne sütünden demir absorpsiyonu, inek sütünden absorpsiyonla veya bebe formülünden absorpsiyonla karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. İnsan sütünde laktoferrin doymamış halde bulunur ve 7-7,3 pH aralığında *Escherichia coli*'nin invitro gelişimini engellediği gösterilmiştir. Laktoferrin doyurulduğunda bu invitro engelleme ortadan kalkar. Benzer invitro etkilerin *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı da sergilendiği araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (15,30). İnsan sütündeki laktoferrinin demirin yanında birkaç metal iyonunda bağladığı ileri sürülmüştür (30).

2.2.2.2. α -Laktalbumin

α -laktalbumin insan sütündeki başlıca proteinlerden biridir ve çocuk beslenmesinde gözönüne alınabilir bir öneme sahiptir. Bu proteinin çok yüksek bir besin değeri vardır; ve bir aminoasitle bileşimi yeni doğan bir bebeğin beslenme ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde uyarlanabilir (14,15,18,30).

İnsan sütündeki α -laktalbumin, molekül ağırlığı 14.100 Dalton, elektroforetik mobilitesi 0,84 olan bir proteindir (14,30,34,41,42). Normal düzeyi, total süt proteinlerinin %10-25'i arasındadır.

α -laktalbuminin besinsel rolü yanında, memeli bezlerinde laktoz sentezinden sorumlu enzim, laktoz synthase'nin bir parçasıdır. Laktoz synthase, galaktosiltransferaz ve α -laktalbumin gibi iki bileşenden oluşur. Bu iki bileşen birlikte glikozun UDP-galaktoza bağlanmasını katalizler. α -laktalbumin katalitik görevi yanında bir değiştirgen olarak glikozun enzim kompleksinin galaktosiltransferaz kısmına bağlanmasını hızlandırıcı olarak işlev görür (1,14,18,30). Lönnerdal (30) yaptığı çalışmada α -laktalbuminin laktoz içeren tüm memeli sütlerinde bulunduğunu ve karbonhidrat içermediğini ileri sürmektedir.

α -laktalbuminin anne sütü proteininin yüksek besleme kalitesine önemli derecede katkıda bulunmasından dolayı, sütteki α -laktalbumin ihtivasını annenin ve çocuğun beslenme durumuyla ilişkili olarak araştırmak oldukça önemlidir (14).

2.2.2.3. Serum Albumin

Molekül ağırlığı 66.000 Dalton ve elektroforetik mobilitesi

0,26 olan bir proteindir (30,34,41,53). Normal insan sütü total proteinlerinin %5-12'sini oluşturur (18,35,41).

İnsan sütündeki diğer proteinlerden farklı olarak serum albuminin memeli süt bezi tarafından sentezlenmediği, sütteki bu proteinin kan dolaşımındaki proteinle aynı özelliklere sahip olduğundan kanda yüksek konsantrasyonda bulunan serum albuminin çok küçük bir bölümünün geçirgen eklemler veya endositozis yoluyla süte taşındığı düşünülmektedir (1,30).

Serum albumin için aminoasit üreticisi olması dışında herhangi bir önemli fizyolojik işlev ne sürülmemiştir. Bununla birlikte çinko ve bakırın sütteki albuminle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Daha önceleri insan sütündeki laktoferrinin çinkoyu bağladığı ileri sürülüyordu. Knnerdal (30) yaptığı çalışmada çinkonun insan sütündeki serum albumine bağlandığını, insan sütünün jel filtrasyon kromatografisine maruz bırakıldığında çinko bağlı proteinin laktoferrinden kaçındığı gerçeği ile açıklamaktadır; yine serum albumin ve laktoferrin iyon değiş-tokuş kromatografisi ile çözüldüğünde serum albuminin çinkoyu ve laktoferrinin ise demiri bağladığını ileri srmştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde doğum yapan annelerden alınan 10 kolostrum süt örneği (0-5.günlük); Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğine hasta çocuklarının muayene ve tedavisi amacıyla başvuran annelerden alınan 10 transisyonel (6-15 günlük) süt; 10 matüre süt I (16.gün-3 aylık); 10 matüre süt II (4-6. aylık); 10 matüre süt III (7.ay ve sonrası) dönemlerini içeren toplam 50 süt örneği çalışmanın materyalini oluşturdu. Süt örnekleri 10'ar ml olacak şekilde steril, pompalı süt çecekleri ile her bir anneden birer kez alındı.

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- a) Acrylamide ; (Sigma A-8887)
- b) N-N-Methylenebisacrylamide (Sigma M-2022)
- c) Tris-Hydroxymethylaminomethane (Sigma T-1378)
- d) TEMED (N-N'-N'-Tetramethylethylenediamine (Sigma T-8133)
- e) Riboflavin (Gelman 51511)
- f) Ammonium persulphate (Sigma A-9164)
- g) Hidroklorik asit (HCL). (Merck)
- h) Glassial Acetic Acid (Merck)
- ı) Sucrose (Merck)
- i) Bromphenol Blue (Merck)
- j) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Gelman 51523)
- k) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Gelman 51522)
- l) Phosporic Acid (Merck)

- m) Ethil Alchol (Merck)
- n) Glycerine (Merck)
- o) MET- β -mercaptoethanol
- p) Sodium dodecyl sulfat (SDS). (Lauryl sulfat sodiumsalt)
(Sigma L-4509)
- r) di-Natriumhydrogenphosphat (Merck)
- s) Natriumhydrogenphosphat (Merck)
- ş) İsopropyl alchol (Merck)
- t) Standartlar
 - a) Laktoferrin (Sigma L-0520)
 - b) Serum albumin Bovine (Sigma A-7517)
 - c) β -kazein (Sigma C-6905)
 - d) α -laktalbumin (Sigma L-7269)
 - e) Serum albumin bovine (total protein ölçümü için) (Wom Rind/Bovine-Behring Werg A.G.Molburglahni)

3.1.2. Solüsyonlar

Çalışmada kullanılan bütün solüsyonlar distile suyla hazırlandı ve kahverengi cam şişelerde buzdolabında saklandı ($5 \pm 2^\circ\text{C}$). Buzdolabında saklandığı zaman birkaç hafta süreyle kullanılabilen bu solüsyonlar, gerektiğinde yeniden hazırlandı (8).

3.1.2.1. Stok Solüsyonlar

1. Nolu Solüsyonu

7.8 gr	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
38.6 gr	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
2 gr	SDS
1 lt	Distile su

2. Nolu Solüsyon

27.2 gr Acrylamide
500 mg Bisacrylamide
100 ml Distile su

3. Nolu Solüsyon

1.5 gr Ammoniumpersulphate
100 ml Distile su

4. Nolu Solüsyon

48 ml 1N HCl
5.98 gr TRIS
0.46 ml TEMED
100 ml Distile su

5. Nolu Solüsyon

10 gr Acrylamide
2,5 gr Bisacrylamide
100 ml Distile su

6. Nolu Solüsyon

4 mg Riboflavin
100 ml Distile su

7. Nolu Solüsyon

40 gr Sucrose
100 ml Distile su

3.1.2.2. Çalışma Solüsyonları

A Ayırıcı Jel Solüsyonu

15 ml 1 Nolu solüsyon
13,5 ml 2 Nolu solüsyon
1,5 ml 3 Nolu solüsyon
45-50 µl TEMED

B Ara Jel Solüsyonu

1. Hacım 4 Nolu solüsyon
2. Hacım 5 Nolu solüsyon
1. Hacım 6 Nolu solüsyon
4. Hacım 7 Nolu solüsyon

C Buffer (Tampon) Solüsyonu

1. Nolu solüsyonun 1/1 (V/V) distile su
ile seyreltilmesiyle elde edilir.

D Denatüre Solüsyonu

1.56 gr..... $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
5.68 gr Na_2HPO_4
100 ml Distile su

Bu karışımdan

85 ml alınır ve üzerine

2 gr SDS

10 ml Gliserine

5 ml MET

eklenerek denatüre solüsyonu hazırlanmış olur.

E-Boyama - Tespit Solüsyonu

50 mg	Coomassie Brilliant Blue R-250
10 ml	Glacial Asetik Asit
25 ml	İsopropyl alkol
65 ml	Distile su

F-Jel Yıkama-Jel Saklama Solüsyonu

100 ml	Glacial Asetik asit
1000 ml	Distile su

G-Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) pH:7,3

0,14 M	NaCl
0,01 M	phosphate,
1000 ml	Distile su

H-Total Protein Reaktif Solüsyonu

100 mg	Coomassie Brilliant Blue G-250
50 ml	%95'lik	Ethanol
100 ml	%85'lik	Phosphoric acid
1000 ml	Distile su

3.1.3. Kullanılan Araçlar

- Elektroforez aygıtı, jel tüpleri (80x5 mm boyutlarında), lastik tıkaçları, jel hazırlama aparatı ve floresans lambalı ışık düzeneği (Gelman Gelcell, Gel Column Electrophoresis Unit).
- Güç kaynağı (Gelman, Deluxe Regulated Power Supply).
- Dansitometre (Helena Laboratories Qick Scan ve Helena Laboratories Qick Quant II ile komple).

- d) Santrifüj (Hettich-Rotofix II)
- e) Etüv (Heraeus)
- f) Spektrofotometre (The Bausch-Lamb Spektronik 20)
- g) pH Metre (NEL Model 821 ingold Elektroduyla)
- h) Mikropipet (Helena Laboratories Microdispencer)
- ı) Mikroenjektör (Hamilton)
- j) Parafilm "M" (American Can Company Marathon Products Neenoh, Wisconsin).

3.2. Yöntem

3.2.1. Süt Örneklerinin Analize Hazırlanması

'Annelerden; 10. kolostrum süt (10-5 günlük)10 transisyonel süt (6-15 gün); 10 mature süt I (16.gün-3 aylık); 10 mature süt II (4-6 aylık) ve 10 mature süt III (7 aylık ve sonrası) örnekleri olmak üzere 50 süt örneği alındı. Sütler 10'ar ml olacak şekilde steril pompalı süt çekeceği ile alındı. Alınan sütler taze iken analiz işlemlerine tabii tutuldu.Süt örneklerinin analize hazırlanmasında bazı modifikasyonlarla; Lönnerdal (33); Montgomery (34), Sanchez-Pozo ve arkadaşlarının (41) yöntemi kullanıldı.

1- Her bir süt örneğinden mikroenjektörle 100 µl alındı, üzerine 1.9 ml (1900 µl) izotonik tuz solüsyonu bırakıldı. Bu, herbir süt örneğinin total proteinin (TÜM SÜT TOTAL PROTEİNİ) tayini için ayrıldı.

2- Geriye kalan sütün tamamı 15 ml'lik konik dipli santrifüj tüplerine alındı. 20 dakika süreyle 750 g'de santrifüj edildi.

3- Santrifüjden sonra üstteki yağ tabakasınının (fat globule tabakası) altında kalan kısım alınarak 15 ml'lik yeni bir santrifüj

tüpüne aktarıldı. Bundan 100 µl alınarak üzerine 1.9 ml izotonik tuz solüsyonu ilave edildi, bu total protein ölçümü (DECELLED SÜT TOTAL PROTEİNİ) için ayrıldı. Üstteki yağ tabakası daha sonra fosfat Buffer solüsyonla çözdürülmek üzere ayrıldı.

4- 15 ml'lik yeni bir santrifüj tüpüne alınan örnekler 15 dakika süreyle 2000 g'de yeniden santrifüjlendi. Santrifüjleme sonucu altta kalan tabaka SKİM FAZI olarak değerlendirildi.

5- Skim fazından 100 µl alındı üzerine 1.9 ml (1900 µl) izotonik tuz solüsyonu ilave edildi. Bu total protein ölçümü (SKİM SÜT TOTAL PROTEİNİ) için ayrıldı.

Yine skim fazından, 2 ml alınıp üzerine 2 ml denatüre solüsyonu eklenerek 90°C de 15 dakika süreyle etüvde inkube edildi. Bu şekilde denatüre örnekler elektroforez işlemlerine tabii tutulmak üzere ayrıldı.

6- ilk santrifüj işleminden sonra santrifüj tüpünde kalan yağ tabakası (fat globüle tabaka) 10 ml Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS) içinde çözdürüldü.

7-Fat globule tabakası 20 dakika süreyle 1500 g'de santrifüj edilerek alttaki tabaka alınıp atıldı. Üstteki tabaka tekrar 10 ml PBS ile çözdürülerek 20 dakika süreyle 1500 g'de tekrar santrifüj edildi. Altteki tabaka alınarak atıldı. Geriye kalan tabaka tekrar 10 ml PBS'de karıştırılarak çözdürüldü.

8- Bu solüsyondan 100 µl alındı üzerine 1.9 ml (1900 µl) izotonik tuz solüsyonu ilave edildi. Bu total protein ölçümü (FAT GLOBULE TOTAL PROTEİNİ) için ayrıldı.

3.2.2. Standart Protein Örneklerinin Analize Hazırlanması

1. Laktoferrin Standartının Hazırlanışı

5 mg Laktoferrin (Sigma)

1 ml Distile su

Bu solüsyondan 0,5 ml alınıp üzerine 0,5 ml denatüre solüsyonu eklenerek 90⁰C'de 15 dakika etüvde inkube edildi.

2. α -Laktalbumin Standartının Hazırlanışı

5 mg α -Laktalbumin(sigma)

1 ml Distile su

Bu solüsyondan 0,5 ml alınıp üzerine 0,5 ml denatüre solüsyon eklenerek 90⁰C de 15 dakika etüvde inkube edildi.

3. β -Kazein Standartının Hazırlanışı

10 mg β -Kazein (Sigma)

1 ml Distile su

Bu solüsyondan 0,5 ml alınıp üzerine 0,5 ml denatüre solüsyon eklenerek 90⁰C'de 15 dakika etüvde inkube edildi.

4. Albumin Standartının Hazırlanışı

10 mg S.Albumin

1 ml Distile su

Bundan 0,5 ml alınıp üzerine 0,5 ml denatüre solüsyon eklene- rek 90⁰C'de 15 dakika etüvde inkube edildi.

Her bir standarttan geriye kalan 0,5 ml'ye hiçbir işlem yapıl- maksızın jele uygulandı.

6. Standart Protein Miktarının Saptanmasında Kullanılan Albumin Standart Protein Solüsyonunun Hazırlanışı

10 mg S.Albumin
10 ml Distile su

3.2.3. Total Süt Protein Konsantrasyonun Saptanması

Tüm süt, Decelled, skim fazı ve fat globüle süt örneklerinin total protein miktarlarının saptanmasında spektrofotometrik (The Bauch-Lomb Spectronic 20) (5,7,24,31,33,39) yönteminden yararlanıldı.

Spektrofotometrik yöntemin esası, kimyasal maddelerin ışık yardımı ile analizinin yapılması prensibine dayanır. Herhangi bir maddenin absorbe edeceği ışığın dalga uzunluğu, o maddenin kimyasal yapısına bağlıdır. Bundan yararlanılarak, bir maddenin absorbe edeceği ışığın dalga uzunluğundan maddenin cinsini, absorbe edeceği ışık şiddetinden yararlanılarak maddenin ortamdaki miktarını saptamak mümkündür. Bu yolla total protein miktarı kolayca saptanabilmektedir (2).

Total süt protein miktarının saptanmasında, BRADFORD, M.M (7) un geliştirdiği ve daha sonra birçok araştırmacının kullandığı (5,10, 31,33), Dye-Binding metoduna uygun olarak hazırladığımız reaktif solüsyon kullanıldı. Örneklerin, total süt protein miktarının saptanmasında aşağıdaki yol izlendi.

1- Hazırlanan reaktif solüsyonundan 5 ml, spektrofotometre test tüpüne konularak, kör nümune hazırlandı ve spektrofotometrenin 595 nm dalga boyunda %100 transmitans ayarı yapıldı.

2- Hazırlanan reaktif solüsyonundan 5 ml, spektrofotometre test tüpüne kondu ve üzerine daha önceden izotonik tuz solüsyonu ile 1: 20

oranında sulandırılmış, total proteini saptanacak örnek süttten 100 µl eklenerek 2-30 dakika arasında kör nümuneye karşı 595 nm dalga boyunda deney optik dansitesi okundu.

3- Hazırlanan reaktif solüsyonundan 5 ml, spektrofotometre test tüpüne kondu ve üzerine standart serum albuminin solüsyonundan (Wom Rind/Bovine-Behringwey AG. Molburglahni 1 µg/ml konsantrasyonunda total protein içeren standart solüsyon) 100 µl bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan karışım 2-30 dakika arasında kör nümuneye karşı 595 nm dalga boyunda standart deney optik dansitesi okundu.

Aynı işlemler elde edilen tüm süt, decelled, skim süt, ve fat globüle örneklerinin total protein miktarlarının saptanmasında da uygulandı.

Spektrofotometreden elde edilen değerler aşağıdaki formüle uygulanarak total protein miktarı (gr/100 ml) olarak hesaplandı (2).

$$\text{Total Protein Miktarı (gr/100 ml)} = \frac{\text{Deney Optik Dansitesi}}{\text{Standart Deney Optik Dansitesi}} \times \frac{\text{standart protein konsantrasyonu (mg)}}{100} \times \frac{100}{\text{Analiz için Alınan Örnek Miktarı (ml)}}$$

3.2.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez Uygulaması

Elektrofrez yöntemi proteinlerin analizinde kullanılan birincil metodlardan biridir. Çalışmamızda herbir süt örneğinin değişik laktasyon dönemlerindeki protein fraksiyonlarındaki değişimleri belirlemede, Davis (8) ve Ornstein (37) tarafından ilk kez uygulanan ve son yıllarda birçok araştırmacının (3,4,6,11,13,14,20,23,27,34,43,44,45,46,51) tercih etmiş olduğu duyarlı yöntemlerinden biri olan "SDS- Poliakrilamid Jel Elektrofrez Yöntemi" Kullanıldı. Bu yöntemin aşamaları aşağıda belirtilmiştir.

3.2.4.1. Jel Tüplerinin Temizlenmesi

Jel tüpleri (80x5 mm boyutlarındaki) bol deterjanlı su ile yıkandı. Bu işlem ucuna bir miktar pamuk veya bez sarılmış tel yardımıyla yapıldı. Bu şekilde deterjanlı su ile yıkanmış olan jel tüpleri, içerisinde kimyasal temizleyicilerin bulunduğu petri kabına alındı. Böylece jel tüplerinin iç yüzeylerinde bulunabilecek tüm kirlerin uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra birçok kez distile su ile yıkandı ve etüvde kurutuldu.

3.2.4.2. Jel Tüplerinde Jellerin Hazırlanması

Temizlenmiş ve etüvde kurutulmuş jel tüpleri, jel hazırlama aparatına alt taraflarına parafilm kapatılarak yerleştirildi. Jelleşmenin daha verimli olması için hazırlanan bu düzenek buzdolabına kaldırıldı. Bu sırada ayırıcı jel solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon stok solüsyonların aşağıdaki oranlarda karıştırılmasıyla hazırlandı.

15 ml	1 Nolu Solüsyon
13,5 ml	2 Nolu Solüsyon
1,5 ml	3 Nolu Solüsyon
50 µl	TEMED

Bu şekilde hazırlanmış jel solüsyonu, buzdolabından çıkarılan jel tüplerine önce bir defa doldurulup boşaltılarak, jel tüplerinin iç yüzeylerinin yıkanması sağlandı. Bu yıkama işleminden sonra her jel tüpünün yaklaşık 6 cm'lik bölümüne bu solüsyondan dolduruldu. Bu solüsyonun üzerine ince uçlu bir pasteur pipetiyle tüpün bir kenarından damla damla su akıtılarak solüsyonun hava ile temasını kesmek üzere alttaki jel solüsyonunun üzerinde 4-5 mm'lik bir su tabakası

oluşturuldu. Yaklaşık 60 dakika süreyle floresans lambasından 3-5cm uzaklıkta fotopolimerizasyona bırakıldı. Bu süre sonunda önceki su-jel sınırınının 1-2 mm daha altında yeni bir sınırın oluştuğu gözlemlendi. Bu durum fotopolimerizasyonun tamamlandığının göstergesidir. Jelin üstündeki su dikkatlice alındı. Bu işlem önce bir enjektör yardımıyla, su miktarı azaldığı zaman ise bir absorban kağıt yardımıyla yapıldı. Suyu alınmış jel üzerine daha geniş porlu ikinci bir jel yani "Ara jel Solüsyonu" bırakıldı. Bu jel solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan stok solüsyonların karıştırılma oranları aşağıdaki şekildedir.

1 Hacım	4 Nolu Solüsyon
2 Hacım	5 Nolu Solüsyon
1 Hacım	6 Nolu Solüsyon
4 Hacım	7 Nolu Solüsyon

Bu şekilde hazırlanan ara jel solüsyonu ilk önce ayırıcı jelin üzerine biraz bırakılarak tekrar alındı ve bubölgenin ana jel solüsyonuyla yıkanması sağlandı. Daha sonra her bir jel tüpüne yaklaşık 1 cm yüksekliğe kadar bu jel solüsyonundan bırakıldı. Bir önceki jelde olduğu gibi üzeri tekrar su tabakasıyla kaplandı ve 45 dakika süreyle floresans lambadan 3-5 cm uzaklıkta fotopolimerizasyona bırakıldı. Bu sürenin bitiminde yine, belirgin bir sınır oluştuğu gözlemlendi. Üstteki su tabakası daha önce tarif edildiği şekilde alındı. Jel böylece hazırlanmış oldu.

3.2.4.3. Jele Örnek Uygulanması

Süt örneklerinin analize hazırlanması bölümünde anlatıldığı

şekilde, denatüre solüsyon ile 90°C de 15 dakika süreyle etüvde bırakılarak örneklerin denatürasyonu sağlandı. Böylece, örnekler jele uygulanabilir duruma getirildi. Bu şekilde hazırlanan her skim süt örneğinden mikropipet yardımıyla 20 µl alındı ve jel üzerine bırakıldı. Bu işlem mikropipetin ucu jel yüzeyinden 1-2 mm mesafede ve jelin tam merkezine gelecek şekilde tutularak, örneğin yuvarlak bir damla şeklinde, jelin üzerine bırakılmasıyla gerçekleştirildi. Bu şekilde özen gösterilmediği durumlarda meydana gelecek bantların düzgün olmadığı görülür.

Jele uygulanan 20 µl skim süt örneği üzerine Bromphenol Blue boyasından (%1'lik) 5 µl, bunların üzerine daha düzgün bir yapı oluşturmaları için 20-30 µl sucrose solüsyonu (7.nolu solüsyon) bırakıldı. Daha sonra üzerileri taşıncaya kadar Buffer Solüsyon (Tampon Solüsyon) ile dolduruldu. Bu şekilde jel ve örnek elektroforez uygulamasına hazırlanmış oldu.

3.2.4.4.Jele Standart Protein Örneklerinin Uygulanması

Standart protein örneklerinin analize hazırlanması bölümünde anlatıldığı şekilde, elde edilerek jele uygulanmaya hazır duruma getirilen, albumin ve kazein (her biri 1 ml/10 mg konsantrasyonunda) standart proteinlerinden, denatüre solüsyon ile muamele edilenlerden 10 µl, (10 µl/50 µg), herhangi bir işleme tabi tutulmayanlardan 5 µl (5 µl/50 µg) jele uygulandı. Aynı şekilde elde edilen α-laktalbumin ve laktoferrin (herbiri 1 ml/5 mg konsantrasyonunda) standart proteinlerinden yine denatüre solüsyon ile muamele edilenlerden 20 µl (20 µl/50 µg), herhangi bir işleme tabi tutulmayan standart protein

örneklerinden 10 µl (10 µl/50 µg) jele uygulandı. Diğer işlemler jele örnek uygulama işlemlerinin aynısı uygulandı.

3.2.4.5. Elektroforez İşlemi

Skim süt örnek proteinlerini içeren jel tüpleri ve standart protein örneklerini içeren jel tüpleri dikkatlice jel hazırlama aparatından çıkarıldı. Bu sırada, jel tüplerinin alt yüzeyini kapatan parafilm çıkarıldı. Daha sonra jel tüpleri elektroforez işlemi yapılmak üzere elektroforez aygıtına yerleştirildi. Önceden hazırlanmış ve buzdolabında saklanmış olan Buffer Tampon (pH 7,3) solüsyondan 750 ml'si aygıtın alt kompartımanına, 250 ml'si de üst kompartımanına boşaltıldı, Buffer Tampon solüsyonun akım geçirecek olan alt ve üst elektrotlarla teması sağlandı. Aynı şekilde, jel tüplerinin alt ve üst uçlarının Buffer Tampon solüsyona temas etmesi ve uçlarında hava kabarcığının kalmamasına özen gösterildi.

Her bir jel için yaklaşık 8 mA'lık bir akım uygulandı. Çeşitli zaman aralıklarında Bromphenol Blue boyasının ilerleyişi kontrol edilerek, elektroforez işleminin ilerleyişi sürekli izlendi. Bromphenol Blue boyası jel tüpünün alt kısmına 2 mm yaklaşınca akım kesildi. Jel tüpleri aygıttan çıkarıldı. Bu şekilde ayrımları yapılmış olan jellerin tüplerden çıkarılması gerekir. Bu işlem, bir enjektörle jel ile jel tüpü arasına su sıkılarak, aynı anda tüpü sağa sola çevirmekle gerçekleştirildi. Aynı işlemler standart süt proteinleri içeren jel tüpleri için de uygulandı.

3.2.4.6. Protein Bantlarının Tespit Edilmesi ve Boyanması

Fairbanks ve arkadaşları (13) yöntemine göre, daha önceden

hazırlanan Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası, protein bantlarının hem boyanmasını hem de tespit edilmesini sağlar. Bu boyanın hazırlanışı şu şekildedir.

50 mg	Coomassie Brilliant Blue R-250
10 ml	Glassial Asetik Asit
25 ml	Isopropyl Alkol
65 ml	Distile su

Jeller bu boya içerisinde bir gece tutularak boyama ve tespit işlemi gerçekleştirildi. Bu süre sonunda protein bantlarıyla birlikte jeller tümünden boyandığı için fazla boyanın çıkarılması gerekir. Bunun için jeller %10'luk Glassial Asetik Asit içerisinde bir kaç defa değiştirilmek suretiyle 1-2 gün bekletildi. Bu süre sonunda protein bantları gözle görünür duruma geldi. Fazla boyaları çıkarılmış jeller diğer işlemleri yapılmak üzere %10'luk Glassial Asetik Asit içerisinde buzdolabında saklandı.

3.2.5. Değerlendirmeler

3.2.5.1. Kalitatif Değerlendirme

Jeldeki hangi bandın hangi süt proteinini karşıladığı jele uygulanan standart proteinlerinin bantlarıyla karşılaştırılarak ve literatür bilgilerinin ışığında saptandı (34,35,36,41).

3.2.5.2. Kantitatif Değerlendirme

Jeldeki protein bantlarının kantitatif değerlendirilmesi belirli bir düzeyde göz ile yapılsa da, esas kantitatif analizler (560-580) nm dalga boyundaki ışık şiddetinden (50) yararlanılarak Dansitometre ile (Helena Laboratories Quick Scan) ve buna bağlı olarak çalışan ve

her bir protein fraksiyonunun miktarını % olarak saptayan bir yardımcı alet (Helena Laboratories Quick Quant II) aracılığıyla yapıldı (50).

Bu şekilde, laktoferrin, serum albumin, kazein, α -laktalbumin ve globulinlerin düzeyleri yüzde olarak saptandı.

3.2.5.3. İstatistiksel Değerlendirme

Kolostrum, transisyonel süt, mature süt I, mature süt II ve mature süt III gruplarının total protein, laktoferrin, serum albumin, kazein α -laktalbumin ve globulinlerin yüzde ortalamalarının birbirinden farklı olup olmadığı, ikiden fazla grubun bir arada karşılaştırılması için kullanılan "Tek Yönlü Varyans Analizi" istatistik yöntemiyle kontrol edildi (26).

4- BULGULAR

10 klostrum süt (0-5 günlük); 10 transisyonel süt (6-15 günlük); 10 mature süt I (16 gün-3 aylık); 10 mature II süt (4-6 aylık); 10 mature süt III (7 ay ve sonrası) olmak üzere toplam 50 süt örneğinin, tüm süt, decelled, skim süt, ve fat globule örneklerinin total protein miktarları "Dye Binding" yöntemine göre spektrofotometrik olarak, laktoferrin; serum albumin, kazein, α -laktalbumin ve globulinlerin yüzde düzeylerinin kantitatif ve kalitatif analizleri "Sodium Dodecyl Sulphate-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)" ile yapılarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.1. Total Protein Örneklerine Ait Elde Edilen Bulgular

Tablolardan izlenebileceği gibi, gruplar ortalama total protein miktarı açısından değerlendirildiğinde; kaymağı alınmamış, herhangi bir işleme tabi tutulmamış (tüm süt) örneklerinin total protein miktarlarının ilerleyen laktasyon periyodu boyunca azalma gösterdiği gözlemlendi. Ortalama total protein miktarı gr/100 ml olarak, kolostrumda 1,444 (1,96-0,87); transisyonel süt grubunda 1,208 (1,67-1,07); mature süt I grubunda 1,096 (1,41-0,77); mature süt II grubunda 0,974 (1,12-0,77); mature süt III grubunda 0,908 (1,16-0,67) düzeyinde bulunmuştur.

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde; kolostrum grubu ile mature süt III grubu ($p < 0,001$); kolostrum grubu ile mature süt II grubu ($p < 0,01$), kolostrum grubu ile mature süt I grubu ($p < 0,01$); transisyonel süt grubu ile mature süt III grubu ($p < 0,05$) ve transisyonel süt grubu ile mature süt II grubu ($p < 0,05$) ortalamaları arasındaki farklılığın önemli olduğu saptanmıştır.

Kaymağı alınmış (decelled süt) örneklerinin total protein ortalamaları değerlendirildiğinde, kolostrum grubunun ortalamasının diğer bütün grupların ortalamalarından önemli bir farklılık gösterdiği gözlemlendi. Transisyonel süt grubu ortalamasının da mature süt III ve mature süt II grupları ortalamalarından önemli bir farklılık gösterdiği saptandı. Ortalama total protein miktarı gr/100 ml olarak, kolostrumda 1,367 (1,93-0,83); transisyonel süt grubunda 1,108 (1,64-0,99); mature süt I grubunda 0,958 (1,23-0,67); mature süt II grubunda 0,820 (1,26-0,64); mature süt III grubunda 0,780 (0,99-0,61) düzeyinde bulunmuştur.

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde; kolostrum grubu ile mature süt III grubu ($p < 0,001$), kolostrum grubu ile mature süt II grubu ($p < 0,05$), kolostrum grubu ile mature süt I grubu ($p < 0,01$), kolostrum grubu ile transisyonel süt grubu ($p < 0,05$) ortalamaları ve transisyonel süt grubu ile mature süt III grubu ($p < 0,001$), transisyonel süt grubu ile mature süt II grubu ($p < 0,05$) ortalamaları arasındaki farklılığın önemli olduğu saptanmıştır.

Kaymağı alınmış (skim süt) örneklerinin total protein ortalamaları değerlendirildiğinde; kolostrum grubunda ilerleyen laktasyon periyodu boyunca azalma gösterdiği gözlemlendi. Ortalama total protein miktarı gr/100 ml olarak, kolostrumda 1,264 (1,90-0,80); transisyonel süt grubunda 1,037 (1,48-0,90); mature süt I grubunda 0,862 (1,16-0,54); mature süt II grubunda 0,739 (1,13-0,57); mature süt III grubunda 0,695 (0,87-0,54) düzeyinde bulunmuştur.

Kolostrum grubu ile mature süt III grubu ($p < 0,001$); kolostrum grubu ile mature süt I grubu ($p < 0,001$); kolostrum grubu ile mature

süt II grubu ($p < 0,001$); kolostrum grubu ile transisyonel süt grubu ($p < 0,05$) ortalamaları ve transisyonel süt grubu ile mature süt III grubu ($p < 0,01$); transisyonel süt grubu ile mature süt II grubu ($p < 0,05$) ortalamaları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde birbirlerinden farklı olduğu gözlenmiştir.

Kaymağı alınmış (fat globule) örneklerinin total protein ortalamaları değerlendirildiğinde; laktasyon periyodu ilerledikçe iniş çıkışlar gösterdiği gözlemlendi. Ortalama total protein miktarı gr/100 ml olarak, kolostrumda 0,045 (0,09-0,01); transisyonel süt grubunda 0,109 (0,29-0,06); mature süt I grubunda 0,070 (0,12-0,03); mature süt II grubunda 0,105 (0,22-0,03); Mature süt III grubunda 0,073 (0,22-0,03) düzeyinde bulunmuştur.

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kolostrum grubu ile mature süt II grubu ve kolostrum grubu ile transisyonel süt grubu ortalamaları arasındaki farklılığın önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).

4.2. Herbir Süt Protein Fraksiyonlarına Ait Bulgular

Tablolardan izlenebileceği gibi, ortalama laktoferrin yüzdesi değerlendirildiğinde; laktasyon periyodunun başlangıcındaki kolostrum periyodu ile laktasyonun son periyodu olan mature süt III grubu, kolostrum grubu ile transisyonel süt grubu, kolostrum grubu ile mature süt I grubu laktoferrin yüzdelerinin ortalamaları arasındaki farklılığın önemli olduğu gözlemlendi. Laktoferrin yüzdesinin laktasyonun ilerleyen periyodu boyunca azalma gösterdiği saptandı. Ortalama laktoferrin yüzdesi kolostrumda 19,1 (25,9-13,9); transisyonel süt grubunda 14,47 (24,1-1,1); mature süt I grubunda 14,72 (19,6-11,7); mature süt II grubunda 15,56 (22,4-7,1); mature süt III grubunda 13,45 (20,5- 10,4) düzeyinde bulunmuştur.

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, kolostrum grubu ile mature süt III grubu ($p < 0,01$), kolostrum grubu ile transisyonel süt grubu ve kolostrum grubu ile mature süt I grubu laktoferrin yüzdesi ortalamaları ($p < 0,05$)'nin birbirinden önemli düzeylerde farklı olduğu saptanmıştır.

Ortalama serum albumin yüzdesi değerlendirildiğinde; laktasyon periyodu boyunca grup ortalamaları arasında önemli farklılık gözlenmedi. Ortalama serum albumin yüzdesi kolostrum grubunda 16,1(23,2-9); transisyonel süt grubunda 14,37 (23,7-1,2); mature süt I grubunda 16,27 (22,6-5,8); mature süt II grubunda 16,49(23,4-6,6); mature süt III grubunda 13,41 (19,1-7,6) düzeyinde bulunmuştur.

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, grup ortalamaları arasındaki farklılığın önemli olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$).

Ortalama kazein yüzdesi değerlendirildiğinde; laktasyon periyodunun ilk periyodu olan kolostrum grubu ile laktasyonun son periyodu olan mature süt III grubu arasındaki ve laktasyon periyodunun ikinci periyodu olan transisyonel süt grubu ile laktasyon periyodunun üçüncü periyodu olan mature süt I grubu, dördüncü periyodu olan mature süt II periyodu ve beşinci periyodu olan mature süt III grubu kazein yüzdesinin ortalamaları arasındaki farklılığın önemli olduğu gözlemlendi. Kazein yüzdesinin bu gruplarda ilerleyen laktasyonla birlikte artma gösterdiği saptandı. Ortalama kazein yüzdesi kolostrumda 23,29 (30,0-15,3); transisyonel süt grubunda 20,0 (24,7-14,6); mature süt II grubunda 25,18 (30,6-16,7); mature süt III grubunda 29,48 (37,3-18,1)düzeyinde bulunmuştur.

Kolostrum grubu ile mature süt III grubu ($p < 0,05$),transisyonel

süt grubu ile mature süt I grubu ($p < 0,05$), transisyonel süt grubu ile mature süt II grubu ($p < 0,05$), transisyonel süt grubu ile mature süt III grubu ($p < 0,01$) kazein yüzdesi ortalamalarının istatistiksel olarak birbirinden önemli düzeylerde farklı olduğu saptanmıştır.

Ortalama α -laktalbumin yüzdesi değerlendirildiğinde; laktasyon periyodunun ilk periyodu olan kolostrum grubu ile laktasyon periyodunun üçüncü periyodu olan mature süt I grubu, kolostrum grubu ile dördüncü periyodu olan mature süt II ve kolostrum grubu ile beşinci periyod olan mature süt III grubu ayrıca laktasyon periyodunun ikinci periyodu olan transisyonel süt grubu ile üçüncü periyodu olan mature süt I ve transisyonel süt grubu ile beşinci periyod olan mature süt III grubu α -laktalbumin yüzdelerinin ortalamaları arasındaki farklılığın önemli olduğu gözlemlendi. α -laktalbumin yüzdesinin bu gruplar arasında ilerleyen laktasyonla birlikte artma gösterdiği saptandı. Ortalama α -laktalbumin yüzdesi kolostrumda 16,46 (25,6-9,6); transisyonel süt grubunda 18,69 (26,3-11,1); mature süt I grubunda 24,37 (31,1-20,2); mature süt II grubunda 22,22 (28,6-17,3); mature süt III grubunda 23,55 (34,7-15,4) düzeyinde bulunmuştur.

Kolostrum grubu ile mature süt I grubu ($p < 0,01$), kolostrum grubu ile mature süt II grubu ($p < 0,05$), kolostrum grubu ile mature süt III grubu ($p < 0,01$), transisyonel süt grubu ile mature süt I grubu ($p < 0,05$), ve transisyonel süt grubu ile mature süt III grubu ($p < 0,05$) α -laktalbumin yüzdesi ortalamalarının istatistiksel olarak birbirinden önemli düzeylerde farklı olduğu saptanmıştır.

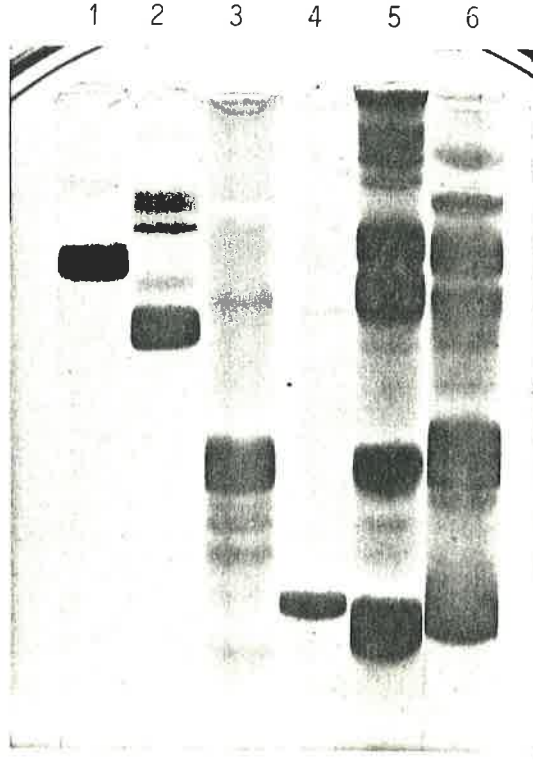
Ortalama globulin yüzdesi değerlendirildiğinde; laktasyon periyodu boyunca grup ortalamaları arasında önemli bir farklılık gözlemlenmedi.

Ortalama globulin yüzdesi kolostrum grubunda 2,75 (9,9-0,3); transisyonel süt grubunda 1,81 (7,7-0,2); mature süt I grubunda 2,36 (4,8-0,6); mature süt II grubunda 1,6 (2,9-0,9); mature süt III grubunda 2,36 (5,0-1,0) düzeyinde bulunmuştur.

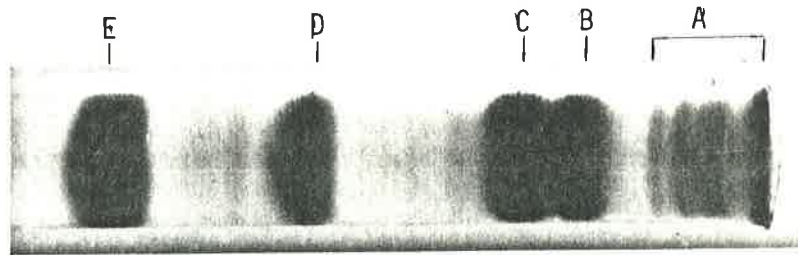
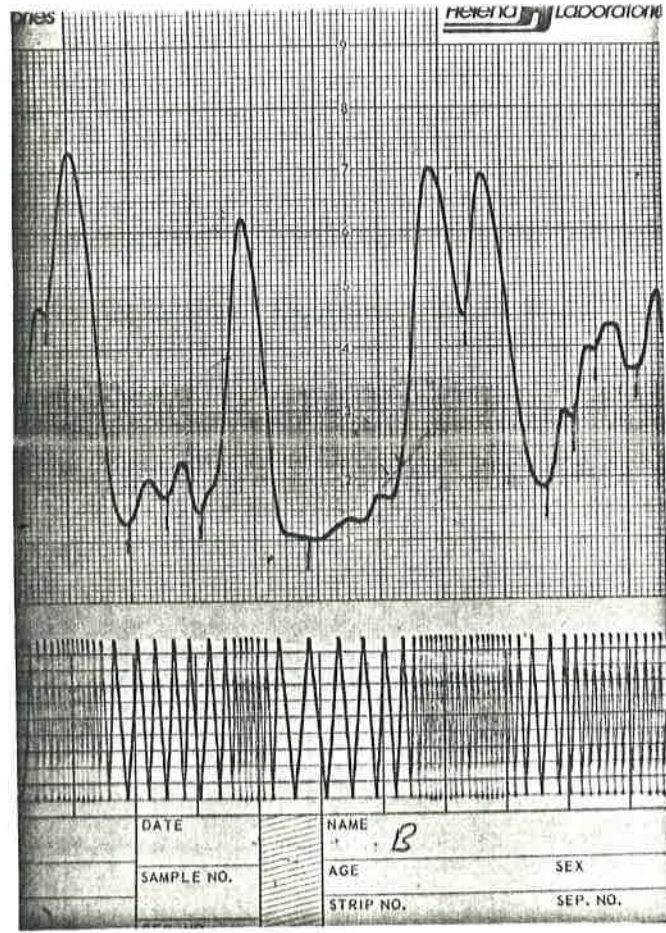
İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, grup ortalamaları arasındaki farklılığın önemli olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$).

4.3.

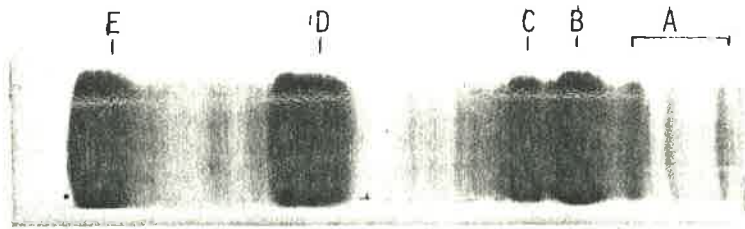
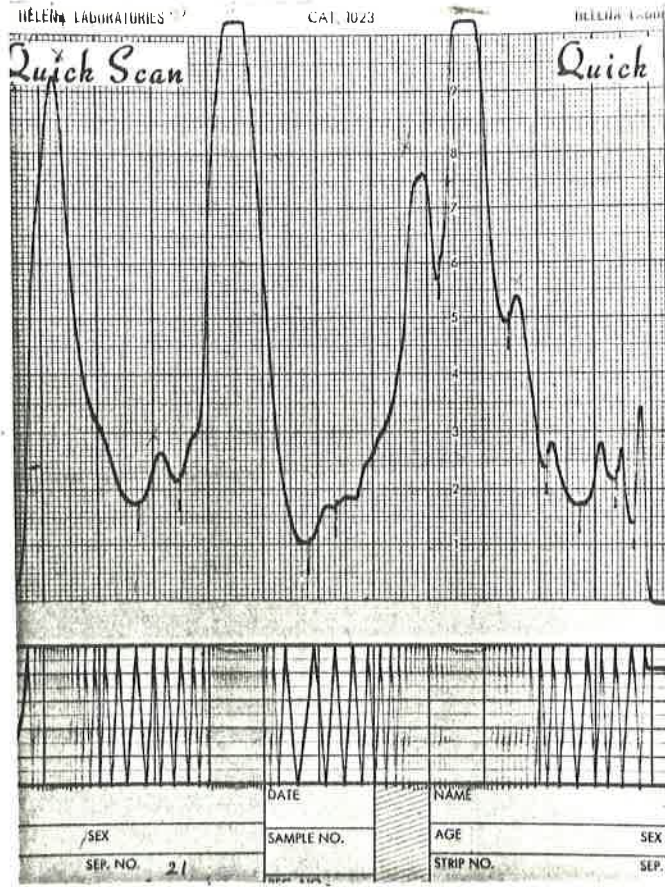
BULGULARA AİT
TABLO VE ŞEKİLLER



Şekil I. Standart süt proteinleri; 1. Laktoferrin 2. Serum albumin
3. β -Kazein 4. α -Laktalbumin 5. Karışık Standart 6. Örnek
süt proteinlerine ait elektroforez örnekleri.



Şekil II. Standart süt protein elektroforez örneği ve dansitometrik çizimi. A-Globulinler B-Laktoferrin C-Serum Albumin D-Kazein E- α -Laktalbumin.

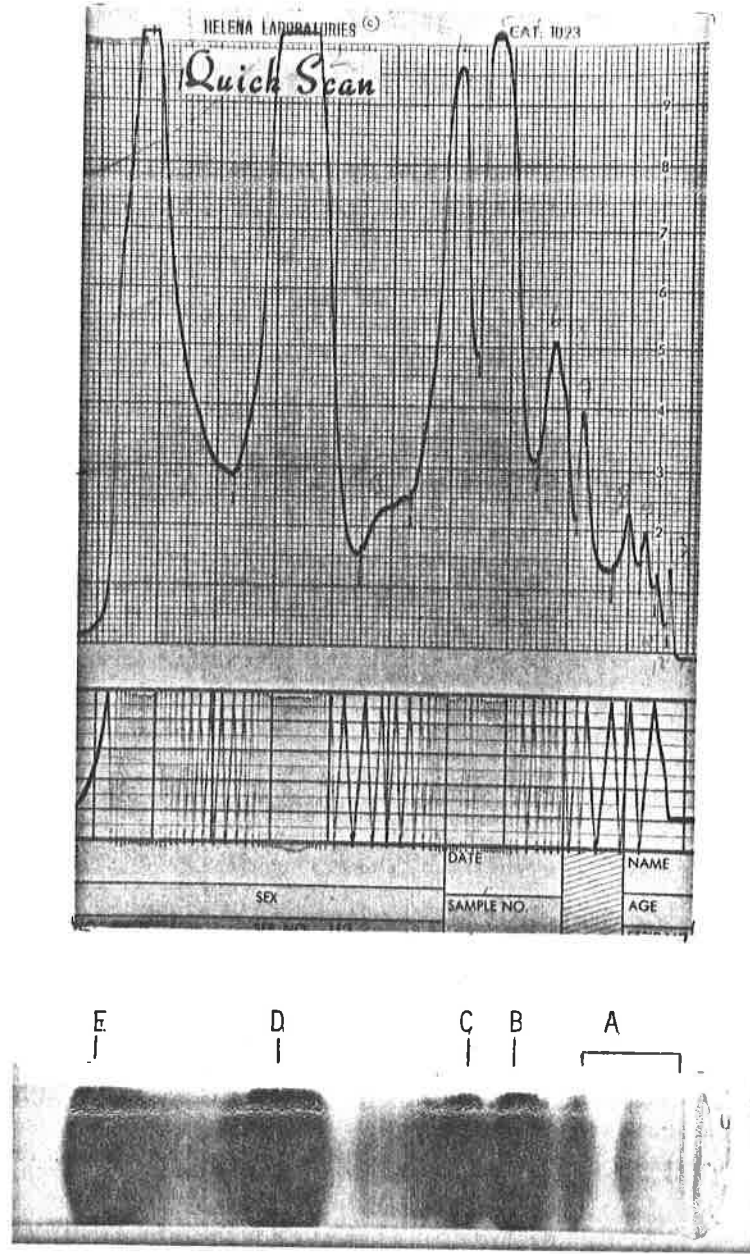


Şekil III. Kolostrum süt grubuna ait süt protein elektroforez örneği ve dansitometrik çizimi. A-Globulinler B-Laktoferrin C-Serum Albumin D-Kazein E- α -Laktalbumin.

TABLO 1: KOLOSTRUM GRUBUNA GİRENLERİNİN

SIRA NO	ANNENİN YAŞI	LAKTASYON SÜRESİ	TOTAL PROTEİN MİKTARI (gr/100 ml)				HER BİR SÜT PROTEİN FRAKSİYONUNUN % DEĞERİ				
			TÜM SÜT	DECELLED	SKİM SÜT	FAT GLOBÜLE	LAKTOFERRİN YÜZDESİ	SERUM ALBÜMİN YÜZDESİ	KAZEİN YÜZDESİ	α -LAKTALBÜMİN YÜZDESİ	GLOBULİNLER YÜZDESİ
1	28	2-6	1.90	1.87	1.67	0.03	22.4	13.5	22.6	9.6	9.9
2	28	3-6	1.38	1.34	1.33	0.04	23.7	9.0	30.0	12.1	0.6
3	21	4-6	1.32	1.25	1.07	0.09	25.9	23.2	18.3	13.7	3.0
4	40	4-6	1.45	1.38	1.19	0.04	13.5	17.8	23.4	14.7	2.8
5	20	4-6	1.93	1.93	1.90	0.01	19.8	16.4	27.5	25.6	1.4
6	16	4-6	1.96	1.90	1.67	0.06	14.8	9.5	27.6	10.6	5.5
7	26	4-6	1.29	1.25	1.21	0.06	13.1	16.9	17.6	15.8	2.0
8	28	4-6	1.35	0.96	0.90	0.06	17.9	16.8	23.9	18.7	0.3
9	20	5-6	0.87	0.83	0.80	0.03	18.8	22.7	15.3	24.1	0.9
10	30	5-6	0.99	0.96	0.90	0.03	21.1	15.2	26.7	19.7	1.1
\bar{X}	25.7	3.9	1.444	1.367	1.264	0.045	19.1	16.1	23.29	16.46	2.75
SD	6.8320	0.875	0.379	0.408	0.374	0.022	4.348	4.709	4.886	5.466	2.942

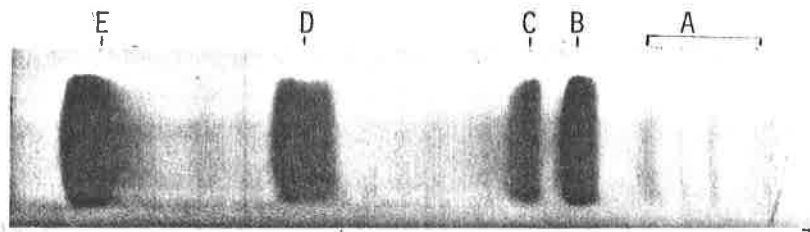
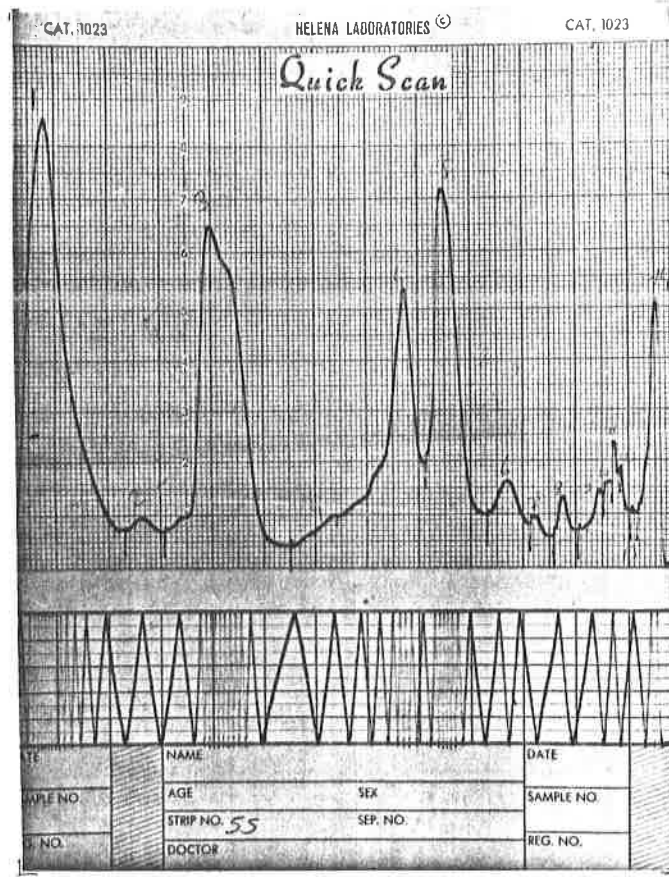
\bar{X} : Aritmetik ortalama SD: Standart sapma G: Gün



Şekil IV. Transisyonel süt grubuna ait süt protein elektroforez örneği ve dansitometrik çizimi. A-Globulinler B-Laktoferrin C-Serum Albumin D-Kazein E- α -Laktalbumin.

SIRA NO	ANNENİN YAŞI	LAKTASYON SÜRESİ	TOTAL PROTEİN MİKTARI (gr/100 ml)				HER BİR SÜT PROTEİN FRAKSİYONUNUN % DEĞERİ				
			TÜM SÜT	DECELLED	SKİM SÜT	FAT GLOBÜLE	LAKTOFERİNİN YÜZDESİ	SERUM ALBUMİN YÜZDESİ	KAZEİN YÜZDESİ	α -LAKTALBUMİN YÜZDESİ	GLOBULİNLER YÜZDESİ
1	26	6-G	1.09	1.06	1.03	0.06	11.7	11.3	14.7	13.9	1.5
2	32	7-Ğ	1.08	1.01	0.98	0.06	1.1	1.2	18.5	23.8	1.6
3	27	7-Ğ	1.09	0.99	0.90	0.06	15.0	14.0	14.6	11.1	0.2
4	26	10-G	1.12	1.03	1.00	0.19	15.6	9.9	24.1	20.5	0.6
5	20	10-Ğ	1.32	1.19	1.06	0.06	15.0	13.4	22.3	21.3	2.9
6	26	10-Ğ	1.67	1.64	1.48	0.06	12.7	23.7	18.6	11.1	7.7
7	18	10-G	1.22	1.10	1.05	0.29	14.5	5.7	24.7	24.8	2.2
8	22	15-G	1.29	1.04	0.96	0.16	18.4	21.1	22.9	26.3	0.3
9	19	12-G	1.12	1.02	0.96	0.09	24.1	22.5	20.8	11.2	0.4
10	26	8-G	1.07	1.00	0.95	0.06	16.6	20.9	18.8	22.9	0.7
X	24.2	9.5	1.208	1.108	1.037	0.109	14.47	14.37	20.0	18.69	1.81
SD	4.341	2.677	0.176	0.196	0.163	0.079	5.813	7.602	3.592	6.177	2.254

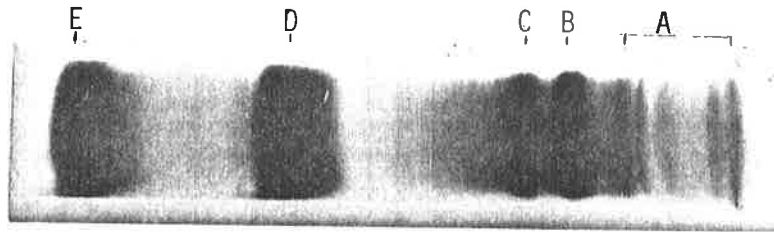
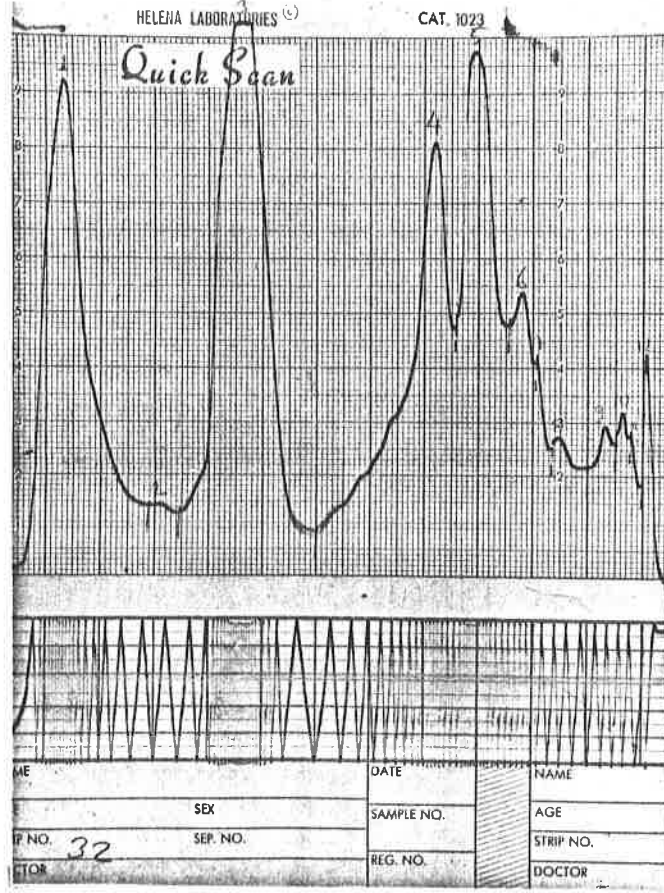
X : Aritmetik ortalama SD: Standart sapma G: Gün



Şekil V. Mature süt I grubuna ait süt protein elektroforez örneği ve dansitometrik çizimi. A-Globulinler B-Laktoferrin C-Serum Albumin D-Kazein E- α -Laktalbumin.

TABLO III: Mature süt I grubunu oluşturan süt örneklerinden elde edilen bulguların dağılımı.

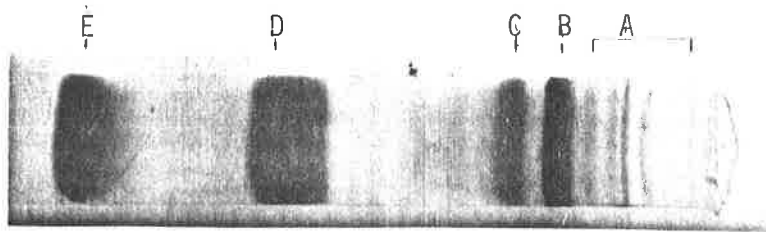
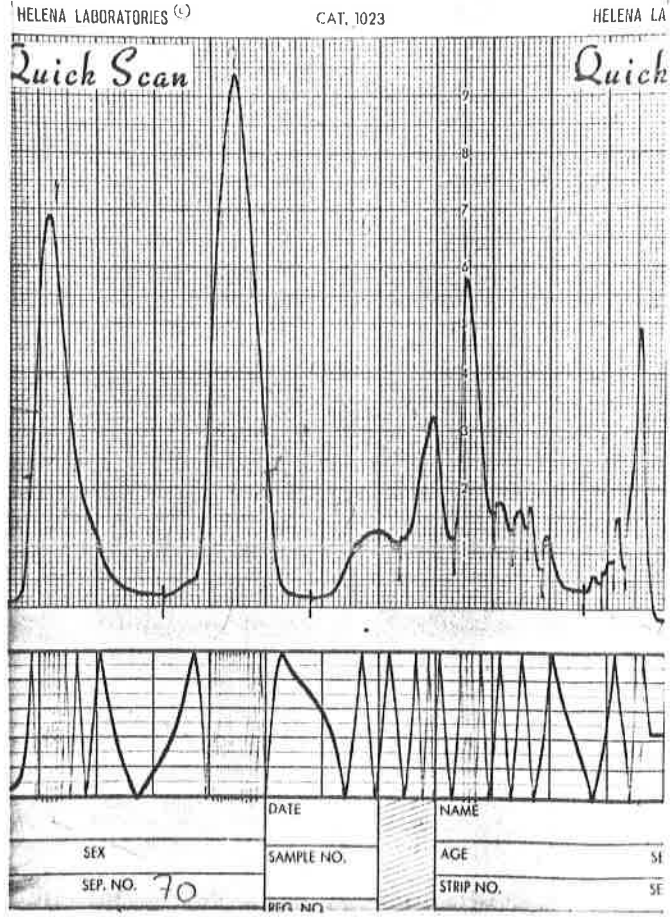
SIRA NO	ANNENİN YAŞI	LAKTASYON SÜRESİ	TOTAL PROTEİN MİKTARI (gr/100 ml)				HER BİR SÜT PROTEİN FRAKSİYONUNUN % DEĞERİ				
			TÜM SÜT	DECELLED	SKİM SÜT	FAT GLOBÜLE	LAKTOFERRİN YÜZDESİ	SERUM ALBÜMİN YÜZDESİ	KAZEİN YÜZDESİ	β -LAKTALBÜMİN YÜZDESİ	GLOBULİNLER YÜZDESİ
1	21	17.6	1.00	0.93	0.83	0.06	15.0	5.8	26.1	31.1	1.8
2	32	18.6	0.77	0.74	0.54	0.03	15.0	18.9	21.6	21.0	1.2
3	30	30.6	1.09	0.90	0.70	0.09	14.0	19.6	30.0	20.2	1.2
4	22	37.6	1.41	1.23	1.13	0.10	11.7	20.2	19.4	23.9	2.8
5	38	42.6	0.96	0.67	0.64	0.03	14.8	16.5	22.7	27.8	4.8
6	23	45.6	1.35	1.12	1.05	0.06	14.3	13.0	28.1	25.5	3.2
7	24.	60.6	1.00	0.90	0.86	0.12	16.7	16.8	25.0	22.1	3.8
8	25	60.6	1.32	1.22	1.16	0.05	19.6	22.6	19.5	21.4	1.5
9	30	90.6	1.03	0.94	0.89	0.07	12.3	11.06	33.4	22.6	0.6
10	26	60.6	1.03	0.93	0.82	0.09	13.8	18.3	27.0	28.1	2.7
\bar{X}	27.1	45.9	1.096	1.958	0.862	0.070	14.72	16.27	25.28	24.37	2.36
SD	5.321	22.36	0.201	0.184	0.205	0.029	2.221	5.011	4.571	3.625	1.328



Şekil VI. Mature süt II grubuna ait süt protein elektroforez
örneği ve dansitometrik çizimi. A-Globulinler B-Laktoferrin
C-Serum Albumin D-Kazein E- α laktalbumin

TABLO IV: Mature süt II grubunu oluşturan süt örneklerinden elde edilen bulguların dağılımı.

SIRA NO	ANNENİN YAŞI	LAKTASYON SÜRESİ	TOTAL PROTEİN MİKTARI (gr/100 ml)				HER BİR SÜT PROTEİN FRAKSİYONUNUN % DEğERİ				
			TÜM SÜT	DECELLED	SKİM SÜT	FAT GLOBÜLE	LAKTOFERİN YÜZDESİ	SERUM ALBÜMİN YÜZDESİ	KAZEİN YÜZDESİ	α -LAKTALBÜMİN YÜZDESİ	GLOBÜLİNLER YÜZDESİ
1	20	3.5.A	1.01	0.96	0.90	0.19	15.4	18.7	26.7	20.1	1.7
2	30	4.A	0.74	0.71	0.64	0.03	15.5	16.2	27.0	28.6	2.1
3	30	4.A	0.90	0.74	0.71	0.22	14.4	23.4	29.7	19.9	1.7
4	33	4.5.A	1.45	1.26	1.13	0.12	13.4	6.6	30.6	22.9	1.5
5	37	5.A	0.85	0.80	0.76	0.06	14.8	19.4	27.9	20.4	2.9
6	35	5.A	0.87	0.79	0.67	0.06	7.1	12.5	25.0	17.3	1.4
7	26	6.A	1.12	0.80	0.70	0.16	22.4	18.8	17.6	26.5	1.2
8	30	6.A	0.77	0.64	0.57	0.12	19.2	12.4	16.7	20.4	1.2
9	27	5.A	1.09	0.70	0.64	0.03	15.9	20.3	28.5	23.3	0.9
10	26	6.A	0.91	0.80	0.67	0.06	12.5	16.6	22.1	22.8	1.4
\bar{X}	29.4	4.9	0.974	0.82	0.739	0.105	15.56	16.49	25.18	22.22	1.6
SD	4.948	0.906	0.208	0.176	0.163	0.067	3.973	4.847	4.861	3.361	0.563



Şekil VII. Mature süt III grubuna ait süt protein elektroforez örneği ve dansitometrik çizimi. A-Globulinler B-Laktoferrin C-Serum Albumin D-Kazein E- α -Laktalbumin.

TABLO V: Mature süt III grubunu oluşturan süt örneklerinden elde edilen bulguların dağılımı

SIRA NO	ANNENİN YAŞI	LAKTASYON SÜRESİ	TOTAL PROTEİN MİKTARI (gr/100 ml)				HER BİR SÜT PROTEİN FRAKSİYONUNUN % DEĞERİ				
			TÜM SÜT	DECELLED	SKİM SÜT	FAT GLOBÜLE	LAKTOFERİN YÜZDESİ	SERUM ALBÜMİN YÜZDESİ	KAZEİN YÜZDESİ	α -LAKTALBÜMİN YÜZDESİ	GLOBULİNLER YÜZDESİ
1	25	7.A	0.70	0.61	0.54	0.22	12.3	12.9	30.3	24.8	3.9
2	30	7.A	0.74	0.70	0.67	0.09	11.1	16.6	32.8	28.2	1.3
3	30	7.A	0.90	0.84	0.70	0.03	20.5	19.1	26.8	18.9	1.0
4	30	7.A	1.12	0.99	0.80	0.09	10.7	8.5	37.3	23.5	5.0
5	37	8.A	1.06	0.77	0.74	0.03	13.2	9.3	34.5	21.0	2.6
6	23	11.A	0.77	0.68	0.58	0.03	11.9	7.6	29.9	34.7	1.7
7	23	8.A	0.96	0.70	0.64	0.09	12.8	8.0	30.9	26.4	1.1
8	23	8.A	0.67	0.64	0.61	0.06	15.4	18.4	18.1	15.4	3.8
9	27	7.A	1.00	0.90	0.80	0.06	10.4	19.1	20.3	19.3	1.0
10	17	8.A	1.16	0.97	0.87	0.03	16.2	14.6	33.9	23.3	2.2
X	26.5	7.8	0.908	0.780	0.695	0.073	13.45	13.41	29.48	23.55	2.36
SD	5.542	1.229	0.179	0.137	0.106	0.057	3.120	4.778	6.153	5.460	1.427

X : Aritmetik ortalama SD: Standart sapma A: Ay

TABLO VI: Kolostrum, Transisyonel süt grubu, Mature süt I, Mature süt II ve Mature süt III gruplarından elde edilen bulguların dağılımı.

	TOTAL PROTEİN MİKTARI ORTALAMALARI (gr/100 ml)				HER BİR SÜT PROTEİN FRAKSİYONUNUN ORTALAMA % DEĞERLERİ				
	TÜM SÜT	DECELLED	SKİM SÜT	FAT GLOBULE	LAKTOFERİN YÜZDESİ	SERUM ALBÜMİN YÜZDESİ	KAZEİN YÜZDESİ	α -LAKTALBÜMİN YÜZDESİ	GLOBULİNLER YÜZDESİ
KOLOSTRUM (0-6 gün)	1.444	1.367	1.264	0.045	19.1	16.1	23.29	16.46	2.75
TRANSİYONEL SÜT(6-16 gün)	1.208	1.108	1.037	0.109	14.47	14.37	20.0	18.69	1.81
MATURE SÜT I (17 gün,3 aylık)	1.096	0.958	0.862	0.070	14.72	16.27	25.28	24.37	2.36
MATURE SÜT II (4-6 aylık)	0.974	0.820	0.739	0.105	15.56	16.49	25.18	22.22	1.6
MATURE SÜT III (7 ay ve sonrası)	0.908	0.780	0.695	0.073	13.45	13.41	29.48	23.55	2.36
X	1.12	1.002	0.912	0.076	15.46	15.32	24.64	21.05	2.17
SD	0.212	0.236	0.237	0.025	2.169	1.362	3.445	3.364	0.464

X : Aritmetik ortalama SD: Standart sapma

TABLO VII. Kolostrum, Transisyonel süt, Mature süt I, Mature süt II ve Mature süt III gr-uplarının karşılaştırılmasıyla elde edilen istatistiksel bulgular.

	Kolostrum Grubu (0-5 günlük)		Transisyonel Süt Grubu (6-16 günlük)		Mature Süt I. Grubu (17 gün-3 aylık)		Mature Süt II. Grubu (4-6 aylık)		Mature Süt III. Grubu (7 aylık ve sonra)		f	P
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD		
Total Protein Ortalamaları (g/100 ml)	Tüm Süt	1444±0.379	1.208±0.176	1.096±0.201	0.974±0.208	0.908±0.179	7.590	P<0.001 ***				
	Decelled	1367±0.408	1.108±0.196	0.958±0.184	0.82±0.176	0.780±0.137	9.873	P<0.001 ***				
	Skim Süt	1264±0.374	1.037±0.163	0.862±0.205	0.739±0.163	0.695±0.106	11.189	P<0.001 ***				
	Fat Globule	0.045±0.022	0.109±0.079	0.070±0.029	0.105±0.067	0.073±0.057	2.683	P<0.05 *				
Her Bir Süt Protein Fraksiyonunun Ortalama % Değeri	Laktoferrin Yüzdesi	19.1±4.348	14.47±5.813	14.72±2.221	15.56±3.973	13.45±3.120	2.829	P<0.05 *				
	Serum Albumin Yüzdesi	16.1±4.709	14.37±7.602	16.27±5.011	16.49±4.847	13.41±4.778	0.619	P>0.05				
	Kazein Yüzdesi	23.29±4.886	20±3.592	25.28±4.571	25.18±4.861	29.48±6.153	4.979	P<0.01 **				
	∞ Laktalbumin Yüzdesi	16.46±5.466	18.69±6.177	24.37±3.625	22.22±3.361	23.55±5.460	4.627	P<0.01 **				
	Globulin Yüzdesi	2.75±2.942	1.81±2.254	2.36±1.328	1.6±0.563	2.36±1.427	0.581	P>0.05				

X : Aritmetik Ortalama SD: Standart Sapma

5. TARTIŞMA

Proteinlerin kantitatif ve kalitatif değerlendirmelerinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar, sütteki whey protein konsantrasyonlarını değerlendirmek için immünolojik yöntemler kullanmışlardır (14,16,36). Fakat, immünolojik yöntemle sütte mevcut bütün protein fraksiyonlarının belirlenmesinin mümkün olmadığı bildirilmektedir. Bizim, çalışmamızda kullandığımız SDS-poliakrilamid jel elektroforezi, birçok araştırmacının süt proteinlerinin kompleks karışımlarını ayırmada güvenle kullandığı, kazein ve whey proteinlerinin aynı zamanda belirlenmesinin mümkün olduğu ve zaman alıcı olmayan basit bir metoddur (10,13,27,34,35,36,41,49,51). Ayrıca bu yöntemle, protein gruplarında meydana gelen değişimler daha açık bir şekilde ortaya çıkarılabilmektedir (11). Bu özelliklerden dolayı, araştırmamızda da SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi seçilmiştir.

Bu çalışmamızda, insan sütünün total protein miktarları bütün gruplarda kolostrumdan mature süt III grubuna doğru bir azalma gösterdi. Bütün gruplarda kolostrum yüksek bir protein konsantrasyonu ile karakterize edildi. Bizim, total protein içerikleri ile ilgili elde ettiğimiz sonuçlar, Sanchez-Pozo ve arkadaşları (41) tarafından rapor edilen sonuçlarla uygunluk içerisindedir. Çeşitli araştırmacılar, laktasyon boyunca insan sütünün protein içeriğindeki azalışın whey süt proteinlerinin azalmasından dolayı meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir (16,35,36). Bizim bulduğumuz sonuçlara benzer sonuçlar diğer birçok araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir (15,17,18,35,36).

Whey proteinleri, insan sütünün enfeksiyona karşı ve beslenme ile ilgili özellikleri ile ilişkili heterojen bir gruptur. Sanchez-Pozo ve arkadaşları (41), laktasyon dönemi süresince insan süt proteinlerinde meydana gelen değişimleri SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile incelemişlerdir. Bu çalışmalarında, whey proteinlerinden olup antibakteriyel aktiviteye sahip olan laktoferrin miktarının ko-lostrumdan mature sütte doğru ilerleyen laktasyonla birlikte azalma gözlemişlerdir. Bu proteinin insan süt proteinlerinin %19-32'sini oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Nagasawa ve arkadaşları (36) yapmış oldukları çalışmalarda benzer sonuçlar bildirmişlerdir. Ayrıca Sanchez-Pozo ve arkadaşları (42) annenin sosyo-ekonomik durumu ve ağırlığına bağlı olarak insan sütünün protein içeriğini ve değişikliklerini SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile incelemelerinde laktoferrin miktarında ilerleyen laktasyonla azalma gözlemişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada da laktoferrin miktarında ilerleyen laktasyonla birlikte azalma gözledik. Sonuçlarımız daha önce yapılmış araştırmaların sonuçlarıyla bağdaşmaktadır.

Serum albumin sütteki minör bir whey protein fraksiyonudur. Bizim, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç, serum albumin total proteinin % 13 ile 16'sına karşılık gelmektedir. En yüksek serum albumin yüzdesini mature süt II grubunda % 16,49 olarak saptadık. Nagasawa ve arkadaşları (35) yaptıkları çalışmada serum albumin yüzdesini, %10 ile 13 olarak bildirmişlerdir. Sanchez-Pozo ve arkadaşları (41) serum albumin yüzdesini, %7 ile 11 olarak gözlemişlerdir. Bizim bulduğumuz sonuçlar sunulan bu sonuçlarla farklılık göstermektedir. Sonuçlarımızın biraz yüksek olmasının, kandaki serum albumin ile aynı

özelliklere sahip olan bu proteinin geçirgen eklemlerden veya endositozis yoluyla daha fazla süte taşındığını düşündürmektedir.

İnsan sütünün protein bileşiklerinden kazein fraksiyonlarının β -kazeinden ibaret olduğu görüşü hakimdir. Ancak β -kazeinden başka κ -kazein fraksiyonunda önemlilik arz etmektedir (41). Biz, çalışmamızda β ve κ -kazein fraksiyonlarının yüzde değerlerini kazein yüzdesi başlığı altında ifade ettik. Çünkü insan sütündeki kazein ihtivasını ayrı ayrı tatminkar bir biçimde nicel olarak tayin etmek için halen geçerli bir metod geliştirilememiştir. (32). Bu konuda daha fazla çalışılması gerektiği kanısındayız. Çalışmamızda kazein miktarının ilerleyen laktasyonla birlikte artma gösterdiğini gözledik. Kazein yüzdesini, %20 ile 29 arasında hesapladık. Bulduğumuz yüzde değerleri bu konuda çalışmış birçok araştırmacının sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir (15,30,41).

Sanchez-Pozo ve arkadaşları (41) süt proteinlerinde meydana gelen değişimleri SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile incelemelerinde α -laktalbumin yüzdesinin kolostrumdan mature süte doğru bir artış gösterdiğini saptamışlardır. Forsum (14) yapmış olduğu çalışmada α -laktalbumin miktarının kolostrumdan mature süte doğru arttığını rapor etmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da α -laktalbumin yüzdesi kolostrumdan mature süte doğru bir artış gösterdi. Kolostrumda %16 olan değer daha sonra %24'e kadar yükselme gösterdi.

Çalışmamızda globulinlerin laktasyon periyodu boyunca önemli bir değişiklik göstermediklerini saptadık. Globulinler en yüksek yüzde değeri ile kolostrumda gözlemlendi. Sanchez-Pozo ve arkadaşlarının (41) yaptıkları çalışmada bildirilen sonuçlar bizim sonuçlarımızı teyit etmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmamızda, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde doğum yapan annelerden alınan 10 kolostrum süt örneği (0-5 günlük); Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğine hasta çocuklarının muayene ve tedavisi amacıyla başvuran annelerden alınan 10 transisyonel süt (6-15 günlük); 10 mature süt I (16 gün-3 aylık); 10 mature süt II (4-6 aylık); 10 mature süt III (7 aylık ve sonrası) dönemlerini içeren toplam 50 süt örneğinin laktasyon periyodu boyunca total protein miktarlarını "Spektrofotometrik" yöntem ile, laktasyonun değişik dönemlerinde protein fraksiyonlarındaki değişimleri "SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi" yöntemiyle araştırmayı amaçladık. Bu çalışmamız sonucunda:

Total protein miktarında kolostrumdan mature süte doğru, laktasyon periyodu süresinde azalma gözlenmiştir. Kolostrum sütünün bütün gruplardan daha yüksek bir protein konsantrasyonuna sahip olduğu saptanmıştır. Laktasyon periyodu boyunca laktoferrin yüzdesinde bir azalma olduğu belirlenmiştir. Bu proteinin total süt proteinlerinin %14-19'unu oluşturduğu saptanmıştır. Serum albumin yüzdesinde laktasyon periyodu süresince önemli bir değişiklik gözlenmediği saptanmıştır. Bu proteinin total proteinin %13-16'sını oluşturduğu saptanmıştır. Kazein yüzdesinin kolostrumdan mature süte doğru artma gösterdiği gözlenmiştir. Kazeinin total proteinin %20-29'unu oluşturduğu belirlenmiştir. Keza α -laktalbumin yüzdesinin de laktasyon periyodu süresince artma gösterdiği saptanmıştır. α -laktalbuminin total proteinin

%16-24'üne karşılık geldiği gözlenmiştir. Globulinlerin yüzdesinde laktasyon peryodu süresince meydana gelen değişimin önemli olmadığı gözlenmiştir. Globulinlerin total proteinin %1-5'ine karşılık geldiği saptanmıştır.

7. ÖZET

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ve spektrofotometrik yöntem kullanılarak 50 adet anne sütünün total protein miktarı ve skim süt fazındaki laktoferrin, serum albumin, kazein, α -laktalbumin ve globulinlerin düzeyleri laktasyon periyodu boyunca çalışıldı.

Proteinlerin kompleks karışımlarının ayırmada kullanılan güvenilir metodlardan biri olan SDS-poliakrilamid jel elektroforezi bazı modifikasyonlarla Davis-Ornstein, Weber-Osborn yöntemine göre yapıldı.

Total protein miktarında, laktasyon periyodu süresince bir azalma olduğu; kolostrum grubunun diğer gruplardan daha fazla protein kapsadığı belirlenmiştir.

Laktoferrin yüzdesinde, laktasyonla doğru orantılı olarak azalma gözlenmiştir.

Serum albumin ve globulinlerin yüzdelerinin önemli bir değişiklik göstermedikleri belirlenmiştir.

Kazein ve α -laktalbumin yüzdelerinde ise kolostrumdan mature süte doğru bir artma olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. ANDERSON, N.G., POWERS, M.T., and TOLLAISEN, S.L.: Proteins of human milk. I. Identification of major components. Clin.Chem. 28 (4): 1045-1055, 1982.
2. ARAS,K. ve ERŐEN, G.: Klinik Biokimya. Klinik Laboratuvar Metodları Teşhis ve Klinik Anlamları. 47-57, 1067-1075 Hacetepe-TaŐ Kitapçılık Ltd.Őti. Ankara, 1985.
3. BAŐARAN,N.: Tıbbi Genetik Ders Kitabı. 200-204, 4. Baskı, Bilim Teknik Yayınevi, EskiŐehir, 1986.
4. BAŐARAN,A.: Eypreocnemis Plorans (Charpentier) 1825 türünün çeşitli gelişim evrelerinde haemolymp proteinleri üzerine elektroforetik araŐtırmalar (Doçentlik Tezi). D.Ü.Tıp Fak.,Diyarbakır, 1979.
5. BERGQVIST, Y., KARLSSON, L. and FOHLIN, L.: Total protein determined in human breast milk by use of Coomassie Brilliant Blue and centrifugal analysis. Clin. Chem. 35 (10): 2127-2129,1989.
6. BODHE, A.M., DESPHANDE, V.V., LAKSHMIKANTHAM, B.C. and VARTAK, H.G.: Simplified techniques for elution of proteins from polyacrylamide gel staining, destaining and isoelectric focusing Anal. Biochem., 123 (1): 133-142, 1982.
7. BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.Anal. Biochem., 72 : 248-54, 1976.
8. DAVIS, B.J.: Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Part II. Clinical applications. Ann.N.Y. Acad. Sci., 121: 404, 1964.

9. DIETZ, A.A. and LUMBRANO, T.: Separation and quantitation of lactic dehydrogenase izoenzymes by Disc Electrophoresis. Anal. Biochem., 20 : 246, 1967.
10. DONOVAN, M.S. and LÖNNERDAL, B.O.: Development of a human milk protein standart. Acta Paediatr. Scand. 78 : 171-179, 1989.
11. ERDAL, M.E.: Kanserli hastalarda serum proteinleri düzeyinin ve bazı haptoglobin tipleri sıklığının poliakrilamid jel disk elektroforezi yöntemiyle araştırılması (Doktora Tezi). D.Ü. Sağlık Bil. Enst., Diyarbakır, 1987.
12. ERDOĞAN, S.: Normal şahıslarda ve karaciğer hastalıklarında kolorimetrik ve elektroforetik olarak serum proteinleri tayini ve karşılaştırılması. D.Ü.Tıp Fak. Derg. 3 (3): 489, 1974.
13. FAIRBANKS, G., STECK, T.L. and WALLACH, D.F.H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry., 10 : 2606-2610, 1971.
14. FORSUM, E.: Determination of α -lactalbumin in human milk. J.Dairy Sci., 59 : 14-18, 1976.
15. GEORGE, D.N. and LEBENTHAL, E.: Human breast milk in comparison to cow's milk. Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy, ed. E. Lebenthal, pp. 295-320, New York: Raven press., 1981.
16. GOLDMAN, A.S., GARZA, C., NICHOLS, B. and GOLDBLUM, R.M.: Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. J. Pediat. 100 : 563-567, 1982.
17. GÜLTEKİN, A.: Anne ve inek sütünün özellikleri ile suni veya yapay beslenme. C.Ü.Tıp Fak.Derg., 8 (1-2): 233-243, 1986.

18. HAMBRAEUS, L.: Human milk composition. Nutr. Abstracts Reviews., 54 : 219-236, 1986.
19. HAMBRAEUS, L. and FRANSON, G.B.: Nutritional availability of breast milk protein. The Lancet, 21 : 167-168, 1984.
20. İMRE, S. ve BİLGİÇ, Z.: Besin analizinde elektroforetik orjin tayini II. İnek, koyun ve keçi sütlerinin poliakrilamid jel disk elektroforezi ile teşhis ve tayini. Doğa Türk Tıp ve Ecz.Derg., 10 : 282-287, 1986.
21. JENNES, R.: Biosynthesis and composition of human milk. J.Inv. Derma., 63 : 109-118, 1974.
22. KARAZEYBEK, A.H.: Anne sütünün önemi ve çalışan annenin sorunları. Dirim Aylık Tıp Gazetesi, 64 (3-4): 125-127, 1989.
23. KARLSON, P.: Biyokimya Ders Kitabı, 57-63. 1.Baskı, Arkadaş Tıp Kitapları Yayınları, İstanbul, 1988.
24. KELLER, R.P. and NEVILLE, M.C.: Determination of total protein in human milk: Comparison of methods. Clin. Chem., 32 (1): 120-123, 1986.
25. KURT, A.: Süt işleme teknolojisine giriş. 116-126, 2. Baskı, Atatürk Üniversitesi Yayını No: 645., Erzurum, 1987.
26. KUTSAL, A ve MULLUK, F.Z.: Uygulamalı Temel İstatistik. Hacetepe Üniversitesi Yayınları, 3. Baskı 192-195, 1978.
27. LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature., 227 : 680-685, 1970.
28. LAPIN, A., OGUNYEM, E. O., ZYMAN, H. and GABL, F.: A simple routine method for SDS-Electrophoresis of urinary proteins in Kidney Transplant Patients. J.Clin.Chem.Clin. Biochem., 23(1): 777, 1985.

29. LINDBLAD, B.S. and RAHIMTOOLA, R.J.: A pilot study of the quality of human milk in a lower socio-economic group in Karachi, Pakistan. *Acta Paediatr. Scand.* 63 : 125-128, 1974.
30. LÖNNERDAL, B.: Biochemistry and physiological function of human milk proteins^{1,2}. *Am.J.Clin.Nutr.*, 42 (6): 1299-1317, 1985.
31. LÖNNERDAL, B.: Methods for studying the total protein content of human milk. In. *Human lactation: Milk components and methodologies* (Neville, M.C. and Jensen R.G. eds.) pp 25-31, Plenum New York, 1985.
32. LÖNNERDAL, B. and FORSUM, E.: Casein content of human milk. *Am. J.Clin. Nutr.*, 41: 113-20, 1985.
33. LÖNNERDAL, B., WOODHOUSE, L.R. and GLAZIER, C.: Compartmentalization and quantitation of protein in human milk¹. *J.Nutr.*, 117(8): 1385-95, 1987.
34. MONTGOMERY, P.A., PATTON, S., HUSTON, G.E. and JOSEPHSON, R.V.: Gel electrophoretic analysis of proteins in human milk and colostrum. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86 (4): 635-9, 1987.
35. NAGASAWA, T., KIYOSAWA, I., FUKUWATARI, Y., KITAVAMA, T., UECHI, M. and HYODO, Y.: α -Laktalbumin and serum albumin in human milk. *J.Dairy Sci.*, 56 : 177-180, 1973.
36. NAGASAWA, T., KIYOSAWA, I. and KUWAHARA, K.: Amount of lactoferrin in human colostrum and milk. *J.Dairy Sci.*, 55 : 1651-1659, 1972.
37. ORNSTEIN, L.: Disc electrophoresis-I.: Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 :321, 1964.
38. OYSUN, G.: Süt kimyası ve Biyokimyası. 1,45. Ondokuz Mayıs, Üniversitesi Yayını. Yayın No. 18, Samsun, 1987.

39. PATTON, S. and HUSTON, G.E.: A method for isolation of milk fat globules. *Lipids.*, 21: 170-174, 1986 a.
40. REDDY, V, BHASKARAM, C., RAGHURAMULU, and JAGADEESAN, V.: Anti-microbiol factors in human milk. *Acta Paediatr. Scand.* 66 : 229-232, 1977.
41. SANCHEZ-POZO, A., LOPEZ, J., PITA, M.L., IZQUIERDO, A., GUERRERO, E., SANCHEZ- MEDINA, F., MARTINEZ VALVERDE, A. and GIL, A.: Changes in the protein fractions of human milk during lactation. *Ann.Nutr. Metab.* 30 : 15-20, 1985.
42. SANCHEZ-POZO, A., LOPEZ, J. IZQUIERDO, A., VALWERDE, A.M. and GIL, A.: Protein composition of human milk in relation to mothers' weight and socioeconomic status. *Hum.Nutr. Clin.Nutr.* 41 (2): 115-25, 1987.
43. SAOJI, A.M. and KHARE, P.M.: Poly-acrylamide gel disc electrophoresis (PAGDE). Part-I. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 28 (1): 85-89, 1985.
44. SAOJI, A.M. and KHARE, P.M.: Disc electrophoresis (Procedure part II). *Indian J. Pathol. Microbiol.* 28 : 179-186, 1985.
45. SAOJI, A.M. and KHARE, P.M.: Polyacrylamide gel disc electrophoresis (PAGDE). Part-III. *Indian J.Pathol. Microbiol.* 28 : 285-292, 1985.
46. SAOJI, A.M. and KHARE, P.M.: Polyacrylamide gel disc electrophoresis. Modifications. Part-IV. *Indian. J. Pathol. Microbiol.* 28 : 383-388, 1985.
47. SENGUPTA, L.K., TALUKDER, G. and SHARMA, A.: Serum proteins in cutaneous tuberculosis. *Bionature*, 5 (1): 41, 1985.

48. SWAIN, B.K., TALUKDER, G. and SHARMA, A.: Genetic variations in serum proteins in relation to diseases. Med. Biol. 58 :246, 1980.
49. TANZER, F. ve SUNEL, S.: Yirmi altı hafta anne sütüyle beslenmede anne sütüyle anne ve bebeklerin serum kalsiyum, fosfor ve magnezyum düzeyleri. Doğa TU Tıp ve Ecz.Derg. 11 (1): 111-120, 1987.
50. TIETZ, N.W.: Clinical Chemistry. 98-110, 559-618, W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1986.
51. WEBER, L. and OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. chem., 255 : 4406-4412, 1969.
52. WERTHAMER, S. and AMARAL, L.: Electrophoretic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and cancer sera. Am. J.Clin.Pathol., 65 : 40, 1976.
53. YENSON, M.: İnsan Biyokimyası. 386-581, 5. Baskı, İst.Üniv.Yayınları. Yayın No. 18, İstanbul, 1984.