

Keçi Sütünde Isıl İşlem Sonrası Melatonin Seviyeleri: Toplam Protein İlişkisi

Medine İSPİR¹, Pınar PEKER AKALIN², Filiz KAZAK³, Nuri BAŞPINAR⁴

^{1,2,3}Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay, ⁴Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Konya

¹<https://orcid.org/0000-0002-0857-9526>, ²<https://orcid.org/0000-0002-6991-3727>, ³<https://orcid.org/0000-0002-9065-394X>

⁴<https://orcid.org/0000-0002-5481-1111>

✉: filizkazak@mku.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, pastörizasyon (72 °C'de 15 saniye) ve kaynatma işlemlerinin (100 °C'de 5 dakika) keçi sütü melatonin ve toplam protein seviyeleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada Hatay ilinde özel bir çiftliğe ait 20 adet sağlıklı keçiden alınan sütler kullanılmıştır. Her bir süt örneği çiğ süt, pastörizasyon işlemi (72 °C'de 15 saniye) ve kaynatma işlemi (100 °C'de 5 dakika) için eşit şekilde bölünmüş, 3 grup oluşturulmuştur. Sütlerin melatonin düzeyleri ticari ELISA kiti ile, toplam protein düzeyleri spektrofotometrik olarak manuel yöntemlerle belirlenmiştir. Kaynatılmış süt örneklerinde (4.20 ± 0.39 pg ml⁻¹) melatonin seviyelerinin, çiğ süt (3.19 ± 0.25 pg ml⁻¹) örneklerine kıyasla yüksek olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Isıl işlem görmüş gruplar arasında Bradford yöntemi ile belirlenen toplam protein düzeyleri açısından fark olmamakla birlikte, Lowry yöntemi ile belirlenen kaynatılmış süt grubu toplam protein düzeylerinin diğer gruplara göre önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0.001$). Bradford ve Lowry yöntemleri ile belirlenen toplam protein düzeyleri açısından çiğ süt grubu ($r=0.723$, $P<0.01$), pastörize süt grubu ($r=0.838$, $P<0.01$) ve kaynatılmış süt grubu ($r=0.449$, $P<0.05$) için pozitif korelasyonlar tespit edilmiştir. Keçi sütüne pastörizasyon işlemi uygulamasının süt melatonin ve toplam protein düzeylerini etkilemediği, ancak kaynatma işlemi uygulanması ile süt toplam protein düzeylerinin düştüğü, melatonin düzeylerinin ise yükseldiği belirlenmiştir. Bu bağlamda, sütte ELISA yöntemi ile melatonin analizi yapılmadan önce, melatoninin bağlı olduğu proteinden ayırmak amacı ile, süte ön işlem yapılmasının yararlı olabileceği öngörülmüştür.

Biyokimya

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 03.02.2021

Kabul Tarihi : 01.07.2021

Anahtar Kelimeler

Bradford

Lowry

Süt Melatonin

Toplam Protein

Melatonin Levels After Heat Treatment in Goat Milk: Relation of Total Protein

ABSTRACT

Objective of this study was to investigate the effects of pasteurization (15 seconds at 72 °C) and boiling processes (5 minutes at 100 °C) on goat milk melatonin and total protein levels. The milk of 20 healthy goats obtained from a private goat farm were used as materials. Each milk sample was divided into 3 for raw milk, for pasteurization and for boiling process. Melatonin levels in raw, pasteurized and boiled milk were determined with commercial ELISA kit while total protein levels were determined spectrophotometrically by manual methods. Melatonin levels in boiled milk samples (4.20 ± 0.39 pg ml⁻¹) increased ($P<0.05$) compared to raw milk (3.19 ± 0.25 pg ml⁻¹) samples. While there was no difference between the heat-treated groups in terms of total protein levels determined by Bradford method, the total protein levels determined by Lowry method decreased significantly in boiling process group compared to the other groups ($P<0.001$). Positive correlations were determined between total protein levels determined by Bradford and Lowry methods in raw ($r=0.723$, $P<0.01$), pasteurized ($r=0.838$, $P<0.01$) and boiled ($r=0.449$, $P<0.05$) milk samples. Pasteurization process applied to goat milk did not change milk

Biochemistry

Research Article

Article History

Received : 03.02.2021

Accepted : 01.07.2021

Keywords

Bradford

Lowry

Milk Melatonin

Toplam Protein

melatonin and total protein levels, and boiling process decreased total protein levels, while increased melatonin levels. Before melatonin analysis was performed in milk by ELISA method, it was predicted that a pre-treatment of milk may be useful in order to separate melatonin from the bound protein.

- Atıf İçin:** İspir M, Peker Akalın P, Kazak F, Başpınar N 2022. Keçi Sütünde Isıl İşlem Sonrası Melatonin Seviyeleri: Toplam Protein İlişkisi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (3): 431-438. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi.873422>.
- To Cite :** İspir M, Peker Akalın P, Kazak F, Başpınar N 2022. Melatonin Levels After Heat Treatment in Goat Milk: Relation of Total Protein. KSU J. Agric Nat 25 (3): 431-438. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi.873422>.

GİRİŞ

Keçi sütü üretimi sadece az gelişmiş ülkelerde, temel beslenme ve geçim kaynağı sağladığı için değil, aynı zamanda gelişmiş ülkelerdeki insanların sofistike tüketici zevklerine çeşitlilik sağlaması ve inek sütü ürünleri ile ilgili bir takım sorunlar yaşayan kişiler (alerji, mide-bağırsak problemleri vb.) için bir alternatif sunması gibi nedenlerle günümüzde önem taşımaktadır (Haenlein, 1986; Park 2010; Lad ve ark., 2017; Yılmaz, 2017). Türkiye’de gerek doğal, gerekse ticari olarak en yaygın olarak kullanılan süt inek sütüdür. 2010-2011 verilerine göre, Türkiye toplam süt üretiminin % 91.7’sini inek sütü, % 6’sını koyun sütü, % 2’sini keçi sütü ve % 0.3’nü manda sütü oluşturmaktadır (Atasever ve Gülaç, 2012). Ortalama bileşim bakımından inek sütüne benzerlik göstermekle birlikte, fizikokimyasal niteliklerindeki bazı farklılıklar nedeniyle, keçi sütü inek sütünden daha değerli olarak kabul edilmektedir. İnek sütüne göre daha yüksek oranda küçük çaplı yağ globülleri bulundurması ve süt proteinlerinin özellikle de α -kazeinin kalitatif ve kantitatif açıdan farklılıklar göstermesi, keçi sütünün daha kolay sindirilebilmesini sağlamaktadır. Bu özelliğiyle de bebekler, yaşlılar ve süt veren kadınların beslenmesinde üstünlükleri bulunmaktadır (Yılmaz, 2017). Ayrıca keçi sütü, sığır sütündeki önemli bir alerjen olan α s-1 kazeini önemli ölçüde daha düşük seviyede içerir (Lara-Villoslada ve ark., 2004). Kısacası, keçi sütü, inek sütü ile kıyaslandığında, daha düşük kolesterol içermesi (Haenlein, 2004), yağ sindirilebilirliğinin daha yüksek olması (Park ve ark., 2007), bazı vitamin ve mineral düzeyleri ile (Belew ve Aiyegbusi, 2002; Park ve ark., 2007), non-protein nitrojen içeriğinin daha yüksek olması (Park ve ark., 2007) gibi nedenlerle, insan beslenmesinde inek sütüne tercih sebebi olabilmektedir (Lad ve ark., 2017).

Pineal bez tarafından, triptofan amino asitinden sentezlenen bir indol bileşiği olan melatonin, sentez ve salınımı ışık tarafından kontrol edilen bir hormondur. Melatonin sentez ve salınımı karanlıkta artmakta, aydınlıkta ışık ile birlikte baskılanmaktadır (Özgüner ve ark., 1995). Karanlıkta ve uykuda iken sentezlenen melatonin hücre yenilenmesi, anti-aging, anti-kanserojen, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, uyku düzeninin sağlanması gibi bir takım

fonksiyonları bulunmaktadır. Melatoninin, inek ve keçi sütünde 5-25 pg ml⁻¹ düzeylerinde bulunduğu rapor edilmiştir (Eriksson ve ark., 1998; Baskett ve ark., 2001; Valtonen ve ark., 2005). Melatoninin sütteki konsantrasyonu, serum konsantrasyonu ile paralel olarak diürenal bir seyir izlemektedir ve gece sağılan sütlerde melatonin düzeyleri gündüz sağılan sütlerle göre yüksektir (Milagres ve ark., 2014). Yüksek melatonin seviyeli gece sütü tüketen yaşlı kişilerin uyku düzeninin iyileştiği rapor edilmiştir (Valtonen ve ark., 2005).

İnsan ve rat kan plazmasında melatoninin özellikle albümine bağlanarak taşındığı (Cardinali ve ark., 1972), toplam melatoninin (bağlı ve serbest) % 23 kadarının ise serbest olduğu bildirilmiştir (Kennaway ve Voultsios, 1998). Keçilerde beyin omurilik sıvısında, protein düzeyleri düşük olduğundan, melatoninin büyük oranda serbest olarak bulunduğu tahmin edilmektedir (Cardinali ve ark., 1972). Sütlerde ise melatoninin proteinlerle ilişkisine dair bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Sütler, fabrikasyon işlemleri sırasında besinsel düzeylerinde değişime maruz kalmaktadır. Ticari olarak satılan uzun ömürlü (UHT) ve pastörize inek sütünün yağsız kuru madde, yağ, protein, laktoz ve kazein düzeylerinin, çiğ inek sütüne kıyasla düşük olduğu bildirilirken, ticari olarak satılan UHT keçi sütü ile çiğ keçi sütü kıyaslandığında bahsedilen parametrelerin önemli düzeyde değişmediği bildirilmiştir (Yılmaz, 2017). Diğer yandan keçi sütünün fizikokimyasal kompozisyonunun inek sütü ile kıyaslandığında ısıtma işlemi daha duyarlı olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Raynal-Ljutovac ve ark., 2007; Chen ve ark., 2019). İşlenmiş inek sütündeki (UHT, pastörize) melatonin düzeylerinin, çiğ süttekine göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Schaper ve ark., 2015). Ancak, literatür taramasında, keçi sütlerinde ısıtma işlemi sonrasında, melatonin düzeylerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Besinsel yönden değerli bir süt olan keçi sütünün ısıtma işlemi sonrasında melatonin yönünden bir kayba uğrayıp uğramadığının ortaya konulması, ısıtma işlemi keçi süt proteinleri üzerine etkisinin ve melatoninin bu süreçte süt proteinleri ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlarıyla; sunulan çalışmada keçi sütüne

uygulanan pastörizasyon (72 °C'de 15 sn) ve geleneksel olarak evlerde uygulanan kaynatma işleminin (100 °C'de 5 dk) süt melatonin ve toplam protein düzeylerine etkileri araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Hatay ilinde bulunan yarı entansif özel bir keçi çiftliğinden, nisan ayında (Bağıl nem % 60-70, sıcaklık en yüksek 22 °C, en düşük 12 °C), aynı bakım beslemeye tabi tutulan, 1-4 yaşlı, sağlıklı, 20 adet keçiden (10 Halep, 10 Kilis keçisi), 20 adet süt örneği toplanmıştır. Sütler, hayvan sahibinin sabah (10:30-11:00) meradan dönen keçilerden süt sağımı yaptığı sırada temin edilmiştir. Sütler klinik olarak sağlıklı görünen memelerin sağ lobundan alınmıştır. Meme başları % 70'lik etil alkollü pamuk ile steril edilmiştir. İlk 2-3 sıkım süt atılmış ve 50 ml'lik steril falkon tüplere 20'er ml süt örnekleri alınmıştır. Toplanan süt örnekleri soğuk zincirde biyokimya laboratuvarına getirilmiş ve uygulamalara kadar -20 °C'de saklanılmıştır.

Yirmi adet keçiden elde edilen süt örnekleri, deney sırasında çözündürülerek, 5'er ml'lik 3 eşit parçaya bölünmüş ve gruplar oluşturulmuştur: Grup 1, çiğ süt grubu olup, her bir numuneden 5 ml çiğ süt alınarak oluşturulmuştur. Grup 2, pastörize süt grubu olup, süt örneklerine (5 ml) laboratuvarında pastörizasyon işlemi (72 °C'de 15 sn) uygulanmıştır (Grant ve ark., 1999). Bu amaçla sütler, ısıya dayanıklı cam tüpler içerisinde (20 adet cam tüp ile), bir tüp sporu üzerinde, ben-mari'ye yerleştirilmiştir. Sütlerin iç ısısı Dijital termometre (Testo SE&Co.KGaA, Türkiye) ile ölçülmüştür. Tüp sporu üzerinde bulunan bir süt örneği içerisine daldırılan termometre ile, sütün iç ısısının 72 °C'ye yükseldiği gözlemlendiğinde, sütler 15 sn bekletildikten sonra hemen kırık buz bulunan bir küvete alınarak 6 °C'ye soğutulmuştur. Grup 3 kaynatma süt grubu olup, süt örneklerine (5 ml) kaynatma işlemi (100 °C'de 5 dk) uygulanmıştır (Metwally ve ark., 2011). Bu amaçla ısıya dayanıklı cam tüplerdeki süt örnekleri (20 adet cam tüp ile), su ısısı 100 °C olan ben-mari içerisinde (termometre ile süt iç ısısı 90 °C ölçülen) 5 dk bekletildikten sonra hemen kırık buz bulunan bir küvet içerisinde 6 °C'ye soğutulmuştur.

Süt melatonin düzeylerinin analizi Milagres ve ark. (2014) ile Schaper ve ark. (2015)'nin inek sütü için modifiye ettiği insan direkt tükürük melatonin ELISA kiti (RE54041, IBL International, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sütler 5400 rpm x 15 dk x +4 °C'de santrifüj edilmiş ve üstteki yağlı tabaka uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan süt serumu kit prosedürüne göre analizlenmiştir. Örneklemeye öncesinde süt serumu örnekleri kit içerisindeki örnek sulandırıcı ile dört kat sulandırılmıştır (Milagres ve ark., 2014, Schaper ve ark. 2015).

Prosedür: Melatonin antijeni ile kaplanmış mikrolept

kuyucuklarının kullanıldığı yöntemde, kuyucuklara standart çözeltileri ve süt örnekleri eklendikten sonra tracer olarak biotinle işaretlenmiş melatonin antikoru ve HRP (Horse radish peroxydase) birlikte verilerek inkube edilmiştir. Inkubasyon sonrası plaklar yıkanarak tracer'a bağlanmamış HRP'ler uzaklaştırılmış, yıkanan plaklara substrat eklenerek inkube edilmiş ve inkubasyon sona erince stop solusyonu ile enzim reaksiyonu durdurulmuş ve 10 dakika içinde 450 nm'de absorpsanlar okunmuştur. Standart eğri oluşturularak sonuçlar hesaplanmıştır. Sonuçlar pg ml⁻¹ olarak verilmiştir.

Süt toplam protein düzeylerinin analizleri

Süt toplam protein tayini amacıyla, yaygın olarak, sütteki nitrojen seviyelerinin belirlendiği Kjeldahl metodu (Barbano ve ark., 1990) kullanılmasına rağmen, sunulan çalışmada ısıl işlemin süt proteinleri ve melatonin üzerine etkilerinin, ayrıca bu süreçte melatonin ile protein ilişkilerinin araştırılması amacıyla, peptid bağlarının varlığında protein tayini gerçekleştirilen Lowry yöntemi (Lowry ve ark., 1951) ile amino asitlerin de reaksiyon verdiği Bradford yöntemi (Bradford, 1976) süt proteinlerinin tayini amacıyla kullanılmıştır. Sığır serum albümini (Sigma-A2153) standart olarak kullanılmış ve protein düzeyleri, standart ile çizilen absorpsan-konsantrasyon grafiği üzerinden hesaplanmıştır. Sonuçlar g dl⁻¹ olarak verilmiştir. Süt toplam proteinlerinin analizi 5400 rpm x 15 dk x +4 °C'de santrifüj edilmiş ve yağı alınmış süt serumlarında gerçekleştirilmiştir.

Lowry yöntemi

Prensip: Bu yöntemde, alkali ortamda Cu⁺², proteinin yapısını oluşturan peptid bağlarıyla birleşerek Cu⁺¹e indirgenir ve biüret kompleksini oluşturur. Daha sonra, Folin ve Ciocalteu'nun fenol reaktifi ilave edilir ve fosfotungstik ve fosfomolibdik asitlerin indirgenmesiyle molibdenyum mavisi ve tungsten mavisi renkleri meydana gelir. Oluşan renkli kompleksin 700 nm'deki optik dansitesi, spektrofotometrede (UV 2100 UV-VIS Recording Spectrophotometer Shimadzu, Japonya) ölçülerek protein düzeyleri belirlenir (Lowry ve ark., 1951). Prosedür: Çalışma reaktifi hazırlamak için; 0.1 N NaOH'te (Merck 1,06462) % 2'lik Na₂CO₃ (Merck 1,06392) çözeltisi hazırlanmış, bu çözelti daha sonra % 1'lik CuSO₄ çözeltisi (Carlo Erba UN3077) ve % 2'lik Na-K tartarat çözeltisi (Carlo Erba 474117) ile 98/1/1(v) oranında karıştırılmıştır. Numune ve standart tüplerine 10 µl süt serumu ve standart çözeltisi eklenmiştir. Kör tüpüne 10 µl bidistile su eklenmiştir. Tüplere çalışma reaktifinden 2,5 ml eklenmiştir. Tüpler vortekslenmiş ve 25 °C'de 10 dk bekletilmiştir. Tüplere, hacimsel olarak 1/1 oranda distile su ile hazırlanan Folin-Ciocalteu's reaktifinden

(Carla Erba UN3264) 0,25 ml eklenmiştir. Tüpler karıştırılmış ve 25 °C'de 30 dk bekletildikten sonra, absorbanslar spektrofotometrede 700 nm'de köre karşı okunmuştur.

Bradford yöntemi

Prencip: Bu yöntemde, Coomassie brilliant blue G250 boyası (Sigma 27815), negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki amino asitlerin pozitif yüküne bağlanır (Bradford, 1976). Oluşan renkli kompleksin 595 nm'deki optik dansitesi spektrofotometrede ölçülerek, protein düzeyleri belirlenir. **Prosedür:** Bradford reaktifi hazırlamak amacıyla 40 mg Coomassie Brilliant blue G250, 50 ml % 95'lik etanolde çözüldükten sonra, üzerine 55 ml % 85'lik fosforik asit (Sigma 79617) eklenmiştir. Son hacim bidistile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan reaktiften her bir örnek, standart ve kör tüpüne 1 ml eklenmiştir. Reaktifin üzerine süt serumu örnekleri ve standartlardan 20'şer µl eklenmiştir. Kör tüpü için 20 µl bidistile su kullanılmıştır. Tüpler karıştırılıp 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra 595 nm'de spektrofotometre ile absorbans ölçümleri yapılmıştır.

İstatistik Analizler

Elde edilen değerler SPSS 15.0 programında ANOVA ile değerlendirilerek, gruplar arası farklılıklar post-hoc Duncan testi ile ortaya konulmuştur. Bradford ve

Lowry metodları ile belirlenen toplam protein düzeyleri arasındaki ilişkiler student's t-testi ile belirlenmiştir. Korelasyon analizleri, veriler normal dağılım gösterdiğinden, Pierson testi ile yapılmıştır. $P < 0.05$ önem düzeyinde önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Çiğ sütte, pastörize edilen ve kaynatılan keçi sütlerinde melatonin ve toplam protein düzeyleri Çizelge 1'de sunulmuştur. Kaynatma işlemi uygulanan süt örneklerinde melatonin düzeyleri (4.20 ± 0.39 pg ml⁻¹), çiğ süt örneklerine (3.19 ± 0.25 pg ml⁻¹) kıyasla yüksek bulundu ($P < 0.05$). Toplam protein düzeyleri değerlendirildiğinde, Bradford yöntemi belirlenen toplam protein düzeyleri açısından gruplar arasında bir farklılık bulunmaz iken, Lowry yöntemi ile belirlenen toplam protein düzeylerinin kaynatma uygulanan grupta diğer gruplara göre önemli düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir ($P < 0.001$). Çiğ süt ve pastörize sütteki toplam protein düzeyleri Bradford yöntemi ve Lowry yöntemi ile belirlenen düzeyler açısından birbiri ile yakın bulundu ($P > 0.05$). Kaynatma uygulanan gruplarda ise Bradford yöntemi ile belirlenen toplam protein düzeyleri (2.26 ± 0.13 g dl⁻¹), Lowry metodu ile belirlenen toplam protein düzeylerinden (1.92 ± 0.09 g dl⁻¹) yüksek olarak belirlenmiştir ($P < 0.05$).

Table 1 Melatonin and total protein levels in raw, pasteurized and boiled milk (Mean±SE) (n=20)

Çizelge 1. Çiğ sütte, pastörize edilen ve kaynatılan sütlerde melatonin ve toplam protein düzeyleri (Ort±SH) (n=20)

Süt Numuneleri	Melatonin (pg ml ⁻¹)	Toplam Protein Bradford (g dl ⁻¹)	Toplam Protein Lowry (g dl ⁻¹)
Çiğ süt	3.19 ± 0.25 ^b	2.33 ± 0.07	2.32 ± 0.07 ^a
Pastörize süt	3.42 ± 0.24 ^{ab}	2.27 ± 0.10	2.28 ± 0.05 ^a
Kaynatılan süt	4.20 ± 0.39 ^a	2.26 ± 0.13	1.92 ± 0.09 ^b
P	<0.05	>0.05	<0.001

^{a,b,c} Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak önemli düzeyde farklıdır. $P < 0.05$ and $P < 0.001$.

Çiğ süt, pastörizasyon ve kaynatma ısı işlemi uygulanan sütlerde ilgili biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonlar Çizelge 2, 3 ve 4'de sunulmuştur. Çiğ süt örneklerinde Bradford metodu ile Lowry metodu kullanılarak belirlenen toplam protein düzeyleri arasında yüksek pozitif korelasyon belirlenmiştir ($r = 0.723$, $P < 0.01$). Pastörizasyon uygulanan süt örneklerinde Bradford metodu ve Lowry metodu kullanılarak belirlenen toplam protein düzeyleri arasında yüksek pozitif korelasyon belirlenmiştir ($r = 0.838$, $P < 0.01$). Kaynatma işlemi uygulanan sütlerde Bradford metodu ile Lowry metodu kullanılarak belirlenen toplam protein düzeyleri arasında, diğer uygulamalara göre kıyaslandığında, zayıf pozitif korelasyon belirlenmiştir ($r = 0.449$, $P < 0.05$).

Çiğ sütte insan sağlığı açısından zararlı mikroorganizmalar bulunduğu için, insan tüketimine sunulmadan önce çiğ sütler bir takım ısı işlemlere tabi

tutulmaktadır. Ancak ısı işlem uygulamalarının süt bileşenlerinde bir takım değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Metwally, 2011; Yılmaz, 2017). Süte uygulanan ısı işlemler sonrasında sütte bulunan proteinlerin konformasyonlarının değiştiği ve böylece proteinlerin denatürasyona ve/veya agregasyona uğradıkları bildirilmektedir (Jimenez-Saiz ve ark., 2015, Lamberti ve ark., 2018). Keçi sütünde temel olarak 5 protein tipi bulunur; bunlar α 2-kazein, β -kazein, κ -kazein, β -laktoglobülin ve α -laktalbümindir. Majör protein fraksiyonu inek sütünde α 1-kazein iken, keçi sütünde β -kazeindir (Chandan ve ark., 1992). Keçi sütünün kazein miselleri inek sütününkinden daha az çözünür formdadır ve ısı karşısındaki dayanırlılığı daha azdır, dolayısı ile ısı artışı ile β -kazein kaybı daha fazladır (Juarez ve Ramos, 1986). Günümüzde geleneksel kaynatma yönteminin süt proteinleri içeriği ve konformasyonel değişimi hakkında sınırlı veri bulunmaktadır:

proteinlerin 55-70 °C'de ikincil yapılarının bozulduğu, 70-80 °C'de disülfid bağlarının koptuğu, 80-90 °C'de yeni intra- ve inter-moleküler bağların kurulduğu ve

90-100 °C'de agregatların oluştuğu bildirilmektedir (Wal, 2003).

Table 2 Correlations between melatonin and total protein in raw milk

Çizelge 2. Çiğ sütlerde melatonin ile toplam protein arasındaki korelasyonlar

Çiğ Süt	Toplam Protein Bradford (g dl ⁻¹)	Toplam Protein Lowry (g dl ⁻¹)
Melatonin (pg ml ⁻¹)	0.270	0.264
Toplam Protein Bradford (g dl ⁻¹)		0.723*

*P<0.01 (Pierson testi, n=20)

Table 3 Correlations between melatonin and total protein in pasteurized milk

Çizelge 3. Pastörizasyon işlemi uygulanan sütlerde melatonin ile toplam protein arasındaki korelasyonlar

Pastörize Süt	Toplam Protein Bradford (g dl ⁻¹)	Toplam Protein Lowry (g dl ⁻¹)
Melatonin (pg ml ⁻¹)	0.321	0.218
Toplam Protein Bradford (g dl ⁻¹)		0.838*

*P<0.01 (Pierson testi, n=20)

Table 4 Correlations between melatonin and total protein in boiled milk

Çizelge 4. Kaynatma işlemi uygulanan sütlerde melatonin ile toplam protein arasındaki korelasyonlar

Kaynatılmış Süt	Toplam Protein Bradford (g dl ⁻¹)	Toplam Protein Lowry (g dl ⁻¹)
Melatonin (pg ml ⁻¹)	-0.077	-0.026
Toplam Protein Bradford (g dl ⁻¹)		0.449*

*P<0.05 (Pierson testi, n=20)

İnek sütüne kaynatma (98 °C'de 16 dk) ve mikrodalga yöntemi ile ısıtılma işlemi uygulaması sonucunda, tek yönlü elektroforezde peynir altı suyu protein (α -laktalbümin) bantlarının zayıfladığı, β -laktoglobülin bantlarının ise neredeyse kaybolduğu belirlenmiştir (Lamberti ve ark., 2018). Bloom ve ark. (2014) da 20 dk'dan uzun kaynatma işlemi uyguladıkları inek sütünde α -laktalbümin ve β -laktoglobülinin yüksek molekül ağırlıklı agregatlarının oluştuğunu bildirmişlerdir. Yılmaz (2017), taze keçi sütü ile marketlerden toplanan UHT keçi sütlerini karşılaştırdığı çalışmada keçi sütü toplam protein düzeylerinin (FOSS MilkoScan™ FT-120, Foss electric, Denmark) taze süt (% 3.04± 0.17) ve ticari sütlerde (% 2.94±0.02) istatistiksel olarak farklı olmadığını bildirmiştir. Taze inek sütünde ise toplam protein düzeylerinin (% 3.66±0.16) ticari inek sütü toplam protein düzeylerinden(% 2.71±0.07) önemli düzeyde yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Formol titrasyon testi ile belirlenen toplam protein düzeyleri, taze ve pastörize keçi sütünde 2.90 g dl⁻¹, 63 °C'de 30 dk ısıtılma işlemi uygulanmış, yağı ve hücreleri alınmış (9800 rpm x 15 dk x 4 °C) sütte 2.63 g dl⁻¹ olarak bildirilmiştir (Paz ve ark., 2014). Diğer yandan Moreno-Montoro ve ark. (2015), Kjeldahl metodu ile belirledikleri keçi sütü toplam protein düzeylerini çiğ sütte 3.62 ± 0.19 g 100g⁻¹, santrifüj edilmiş çiğ sütte 4.10 ± 0.33 g 100g⁻¹ olarak bildirmişlerdir. Rukke ve ark. (2010) da santrifüj edilmiş ve yağı alınmış çiğ keçi sütünde Kjeldahl metoduna göre belirledikleri toplam protein düzeylerini 1.72-3.31g 100g⁻¹ olarak bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada 5400 rpm x 15 dk x +4 °C'de santrifüj edilerek hem yağı hem de süt hücrelerinden

ayrılan çiğ süt örneklerinde Bradford yöntemi ile belirlenen toplam protein düzeyleri 2.33±0.07 g dl⁻¹, Lowry metodu ile belirlenen toplam protein düzeyleri 2.32±0.07 g dl⁻¹ olarak belirlenmiştir. Düzeylerin, Rukke ve ark. (2010)'nın bildirdiği düzeyler arasında olduğu, diğer araştırmacıların bildirdiği düzeylerden ise biraz düşük olduğu görüldü. Bu durum, protein analiz metodlarının farklılığı, keçi ırklarının farklılığı, bölgesel farklılık, süt alımının yılın farklı zamanlarında gerçekleştirilmesi gibi nedenlerden kaynaklanabilir.

Sunulan çalışmada Bradford yöntemi ile belirlenen toplam protein düzeyleri ısıtılma işlemi uygulamaları ile değişim göstermezken, Lowry yöntemi ile belirlenen toplam protein düzeyleri 5 dk süreyle kaynatma uygulanan sütlerde, diğer gruplara göre önemli düzeyde düşük olarak belirlenmiştir. Bradford yönteminde Commassie blue G250 anyonunun proteinler üzerinde bulunan NH₃⁺ katyonik grubuna bağlandığı, polilizin, poliarjinin, politirozin, polihistin peptidleri, arjinin, histidin gibi bazı amino asitler ve bazı di ve tri-peptidlerle bağlanarak renk verdiği bildirilmiştir (De Moreno ve ark., 1986). Diğer yandan, Lowry metodunda ise Biüret ve Folin reaksiyonu sonucu, Cu⁺ iyonları proteinlerde bulunan peptid bağlarına bağlanmaktadır (Lowry ve ark., 1951). Amino asit düzeyi arttıkça Folin reaksiyonunda meydana gelen rengin, proteinlere göre azaldığı da bildirilmiştir (Andersch ve Gibson, 1933). Dolayısı ile sunulan çalışmada, keçi sütü proteinlerinin 5 dk kaynatma işlemi sonucunda peptid bağlarının sayısının azaldığı ve böylece Lowry yöntemi ile belirlenen toplam protein düzeylerinin düşük

bulunduğu sonucuna varılabilir. Bu nedenle sütlerde, özellikle ısıtma işlemi uygulaması sonrasında protein düzeylerinin belirlenmesi amacıyla 'toplam nitrojen düzeylerinin belirlenmesinin' daha hassas ve net sonuçlar vereceği öngörülmektedir.

Melatonin, sirkadyen ritim üzerine etkili, aynı zamanda antioksidan (Maksimovich, 2002), ve antikanser (Dullo ve Chaudhary, 2009) özellikleri bulunan bir hormondur. Melatonin sentez ve salınımı karanlıkta artmaktadır (Özgüner ve ark., 1995). Özellikle gece saat 23:00-05:00 sıralarında melatonin salgılanması en yüksek seviyeye ulaşır; hücre içinde ve kandaki konsantrasyonu gündüze nazaran 3-10 kat artar (Claustrat ve ark., 2005). Melatonin hormonunun insan, inek ve keçi sütünde varlığı ve düzeyleri (5-25 pg ml⁻¹) ortaya konulmuştur (Eriksson ve ark., 1998; Valtonen ve ark., 2005). Süt melatonin düzeylerinin, gece sağılan (gece 02:00-04:00), sütlerde gündüz sağılan sütlerle oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Milagres ve ark., 2014). Sunulan çalışmada gündüz saatlerinde mera dönüşünde alınan keçi sütü melatonin düzeyleri, ineklerde gündüz sütünde bildirilen değerlere yakın çıkmıştır. Schaper ve ark. (2015), farklı marketlerden elde edilen işlenmiş sütler ile bir çiftlikten elde edilen 10 ineğe ait çiğ sütlerdeki melatonin düzeylerini karşılaştırdıkları çalışmada, işlenmiş inek sütündeki (UHT süte 4.5 pg ml⁻¹, pastörize süte 7 pg ml⁻¹) melatonin düzeylerinin, çiğ süttekine (13.6 pg ml⁻¹) göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise aynı süt üzerine pastörizasyon uygulamasının, çiğ sütlerle göre melatonin düzeylerinde bir değişime neden olmadığı belirlenmiştir. İnek sütü üzerine ısıtma işleminin etkileri ile ilgili çalışmada (Shaper ve ark., 2015) aynı süt örneği üzerine ısıtma işlemi uygulamasının etkileri değil, marketlerden temin edilen sütler (UHT, pastörize) ile çiftliklerden elde edilen çiğ sütler karşılaştırılmıştır. Sunulan çalışma ise, hem keçi sütünde olması hem de aynı süt örneği üzerine uygulanan ısıtma işleminin melatonin düzeylerine etkilerinin araştırılması yönlerinden özgündür.

Yapılan literatür taramalarında melatoninin süte taşınması ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. İnsan ve rat kan plazmasında melatoninin özellikle albümine bağlanarak taşındığı (Cardinali ve ark., 1972), toplam melatoninin (bağlı ve serbest) % 23 kadarının ise serbest olduğu bildirilmiştir (Kennaway ve Voultsios, 1998). Sunulan çalışmada, serbest melatonin düzeylerinin ölçüldüğü yöntemde, kaynatma işlemi sonrasında süt melatonin düzeylerinin, pastörize ve çiğ süt örneklerine göre yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Keçi sütü yapısında bulunan α -laktalbuminin süte melatonin taşınmasında rolünün olabileceği düşünülebilir. İnek sütünde, ısıtma işlemi uygulaması sonucunda, elektroforetik incelemede, α -laktalbumin bantlarının zayıfladığı, β -laktoglobülin bantlarının ise neredeyse

kaybolduğu belirlenmiştir (Lamberti ve ark., 2018). Yine 20 dk'dan uzun kaynatma işlemi uygulanan inek sütünde α -laktalbumin ve β -laktoglobülinin yüksek molekül ağırlıklı agregatlarının olduğu bildirilmiştir (Bloom ve ark., 2014). Bu bilgiler ışığında, keçi sütünde bulunan laktalbumine bağlı melatoninin, ısıtma işlemi uygulaması sonrasında laktalbuminin denatürasyonu ve/veya agregasyonu neticesinde serbest hale geçerek, ELISA analizinde çiğ süt ve pastörize süte göre daha yüksek düzeyde belirlenmiş olması olasıdır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Keçi sütüne uygulanan pastörizasyon işleminin, süt melatonin ve toplam protein düzeylerini çiğ süte göre değiştirmediği, 100 °C'de 5 dk kaynatma uygulamasının ise proteinlerin denatürasyonu ve/veya agregasyonuna neden olabileceği belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında keçi sütünün biyoyararlanımında pastörizasyon işleminin, geleneksel kaynatma işlemine göre daha üstün olduğu düşünülmüştür. Sütlerde ELISA metodu ile melatonin analizi yapılmadan önce, melatoninin süte bağlı bulunduğu proteinden ayrıştırılması amacıyla, sütün, bir ön işleminden geçirilmesinin, melatonin düzeylerinin daha doğru olarak belirlenmesinde faydalı olabileceği öngörülebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen (proje numarası: 19.YL.031), Medine DAĞ'a ait yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Andersch M, Gibson RB 1933. The Colorimetric Determination of Plasma Proteins. J Lab Clin Med 18: 816-820.
- Atasever Z, Gülaç Z 2012. Durum ve Tahmin: Süt ve Süt Ürünleri-2011-2012. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, s. 109, 191.
- Barbano DM, Clark JL, Dunham CE, Flemin RJ Kjeldahl 1990. Method for Determination of Total Nitrogen Content of Milk: Collaborative Study. J Assoc Offic Anal Chem 73(6): 849- 59.
- Baskett JJ, Wood PC, Broad JB, Duncan JR, English J, Arendt J 2001. Melatonin in Older People Withage-Related Sleep Maintenance Problems: A

- Comparison with Age Matched Normal Sleepers. *Sleep* 24(4): 418-424.
- Belewu MA, Aiyegbusi OF 2002. Comparison of the Mineral Content and Apparent Biological Value of Milk from Human, Cow and Goat. *JFTA* 7(1): 9-11.
- Bloom KA, Huang FR, Bencharitiwong R, Bardina L, Ross A, Sampson HA 2014. Effect of Heat Treatment on Milk and Egg Proteins Allergenicity. *Pediatr Allergy Immunol* 25(8): 740-746.
- Bradford MM 1976. A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantitation of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72(1-2): 248-251.
- Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ 1972. Binding of Melatonin to Human and Rat Plasma Proteins. *Endocrinol* 91(5): 1213-1218.
- Chandan RC, Attaie R, Shahani KM 1992. Nutritional Aspects of Goat Milk and Its Products; *Proc V Intl Conf Goats*, New Delhi, India, Bölüm II, 399.
- Chen D, Li X, Zhao X, Qin Y, Wang J, Wang C 2019. Comparative Proteomics of Goat Milk During Heated Processing. *Food Chem* 275: 504-514.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G 2005. The Basic Physiology and Pathophysiology of Melatonin. *Sleep Med Rev* 9 (1): 11-24.
- De Moreno MR, Smith JF, Smith RV 1986. Mechanism Studies of Coomassie Blue and Silver Staining of Proteins. *J Pharm Sci* 75(9): 907-911.
- Dullo P, Chaudhary R 2009. Short Review of Reproductive Physiology of Melatonin. *Pak J Physiol* 5(2): 46-48.
- Eriksson L, Valtonen M, Laitinen JT, Paananen M, Kaikkonen M 1998. Diurnal Rhythm of Melatonin in Bovine Milk: Pharmacokinetics of Exogenous Melatonin in Lactating Cows and Goats. *Acta Vet Scand* 39(3): 310.
- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT 1999. Effect of Higher Pasteurization Temperatures, and Longerholding Times at 72°C, on The Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in Milk. *Lett Appl Microbiol* 28(6): 461-465.
- Haenlein GFW 1986. Dimensions of The Goat Milk Industry in The USA. In: *Proceedings, Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk Seminar*, 23-25 September 1985, Athens, Greece, *Int Dairy Federation Bull* 202: 215-217.
- Haenlein GFW 2004. Goat Milk in Human Nutrition. *Small Rumin Res* 51(2): 155-163.
- Jimenez-Saiz R, Benede S, Molina E, Lopez-Exposito I 2015. Effect of Processing Technologies on The Allergenicity of Food Products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55(13): 1902-1917.
- Juarez M, Ramos M 1986. Physico-Chemical Characteristics of Goat Milk As Distinct From Those of Cow Milk. *International Dairy Bulletin* 202: 54.
- Kennaway DJ, Voultsios A 1998. Circadian Rhythm of Free Melatonin in Human Plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 83(3): 1013-1015.
- Lad S, Aparnathi KD, Mehta B, Suresh V 2017. Goat Milk in Human Nutrition and Health – A Review. *Int J Curr Microbiol App Sci* 6(5): 1781-1792.
- Lamberti C, Baro C, Giribaldi M, Napolitano L, Cavallarin L, Giuffrida MG 2018. Effects of Two Different Domestic Boiling Practices on The Allergenicity of Cow's Milk Proteins. *J Sci Food Agric* 98(6): 2370-2377.
- Lara-Villoslada F, Olivares M, Jimenez J, Boza J, Xaus J 2004. Goat Milk is Less Immunogenic Than Cow Milk in a Murine Model of Atopy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 39(4): 354-360.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- Maksimovich AA 2002. Structure and Function of The Pineal Gland in The Vertebrates. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 38(1): 3-13.
- Metwally AMM, Dabiza NMA, Wagih I, EL-Kholy WI, Sadek ZI 2011. The Effect of Boiling on Milk Microbial Contents and Quality. *Am J Sci* 7(2): 110-114.
- Milagres MP, Minim VP, Minim LA, Simiqueli AA, Moraes LE, Martino HS 2014. Night Milking Adds Value to Cow's Milk. *J Sci Food Agric* 94(8): 1688-1692.
- Moreno-Montoro M, Olalla M, Gimenez-Martinez R, Bergillos-Meca TB, Ruiz-Lopez MD, Cabrera-Vique CC, Artacho R, Navarro-Alarcon M 2015. Ultrafiltration of Skimmed Goat Milk Increases Its Nutritional Value by Concentrating Nonfat Solids Such As Proteins, Ca, P, Mg, and Zn. *J Dairy Sci* 98(11): 7628-7634.
- Özgüner F, Özcankaya R, Delibaş N, Koyu A, Çalışkan S 1995. Melatonin ve Klinik Önemi. *Süleyman Demirel Univ Tıp Fak Derg* 2(4): 1-6.
- Park Y 2010. Improving goat milk. Improving the Safety and Quality of Milk. *Improving Quality in Milk Products Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, pp. 304-346. doi.org/10.1533/9781845699437.3.304.
- Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW 2007. Physico-chemical Characteristics of Goat and Sheep Milk. *Small Ruminant Res* 68(1-2): 88-113.
- Paz NF, DE Oliveira EG, De Kairuz MSN, Ramon AN 2014. Characterization of Goat Milk and Potentially Symbiotic Non-Fat Yoğurt. *Food Sci Technol* 34(3): 629-635.
- Raynal-Ljutovac K, Park Y, Gaucheron F, Bouhallab S 2007. Heat Stability and Enzymatic Modifications of Goat and Sheep Milk. *Small Rum Res* 688(1-2): 207-220.
- Rukke EO, Olsen EF, Devold T, Vegarud G, Isaksson T 2010. Technical note: Comparing Calibration Methods for Determination of Protein in Goat Milk By Ultraviolet Spectroscopy. *J Dairy Sci* 93(7): 2922-2925.

Schaper C, Koethe M, Braun PG 2015. Comparison of Melatonin Concentrations in Raw and Processed Cow's Milk. *J Food Safety Food Qual* 66(5): 125-156.
Valtonen M, Niskanen L, Kangas AP, Koskinen T 2005. Effect of Melatonin Rich Night Time Milk on Sleep and Activity in Elderly Institutionalized Subjects. *Nord J Psychiatry* 59(3): 217-221.

Wal JM 2003. Thermal Processing and Allergenicity of Foods. *Allergy* 58(8): 727-729.
Yılmaz E 2017. Sütlerin Besinsel Değerlerinin Karşılaştırılması. Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 1-21 sy.