



**T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**LC-MS/MS KULLANILARAK OPTİMİZE EDİLEN
METOT İLE İNEK SÜTÜNÜN AMİNO ASİT
KOMPOZİSYONUNUN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Arzu YAVUZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

AĞUSTOS 2022

**T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**LC-MS/MS KULLANILARAK OPTİMİZE EDİLEN METOT İLE İNEK
SÜTÜNÜN AMİNO ASİT KOMPOZİSYONUNUN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Arzu YAVUZ
(171083203)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Rasim Alper ORAL

AĞUSTOS 2022

BTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 171083203 numaralı Doktora Öğrencisi Arzu YAVUZ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “LC-MS/MS KULLANILARAK OPTİMİZE EDİLEN METOT İLE İNEK SÜTÜNÜN AMİNO ASİT KOMPOSİZYONUNUN BELİRLENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Rasim Alper ORAL**
Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Mete YILMAZ**
Bursa Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Gökçen YILDIZ
Bursa Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Şebnem BUDAK
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr Serap DURAKLI VELİOĞLU
Namık Kemal Üniversitesi

Teslim Tarihi : 14/09/2022
Savunma Tarihi : 23/08/2022



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, TAGEM/HSGYAD/A/21/A3/P1/2313 numaralı TAGEM projesi ile desteklenmiştir.

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Arzu Yavuz

İmzası :

(Handwritten signature area)



Canım babam Kurulay YILMAZ'a,

ÖNSÖZ

Doktora çalışmam boyunca bilimsel katkıları ile beni yönlendiren, emeğini ve desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Rasim Alper ORAL'a, Yorum ve tavsiyeleri ile doktora çalışmamın şekillenmesinde katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Mete YILMAZ ve Sayın Doç. Dr. Gökçen YILDIZ'a,

TAGEM/HSGYAD/A/21/A3/P1/2313 nolu proje ile tezimi mali olarak destekleyen Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne, Tez çalışmalarımın altyapı desteğini sağlayan kurumum Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Çalışmama süt numunesi sağlayan Bursa Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği, tüm yetiştiriciler ve İlker ÜNAL'a,

Çalışmamın kimyasal bileşen analizlerinin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Ferhat POLAT ve Mehmet Metin ÇİFCİ'ye, renk analizlerinde yardımından dolayı Nagihan UĞUR'a, amino asitlerin üç boyutlu görsellerini oluşturmamda desteğinden dolayı Semih YAVUZ'a

Çalışmam boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen Mehmet Yılmaz KARACA, Dr. Nazan ÇÖPLÜ ve başta İsmail AZAR olmak üzere bütün bölüm arkadaşlarıma, Tüm eğitim hayatım boyunca bana destek olan annem Nurten YILMAZ ve babam Kurulay YILMAZ'a,

Tez çalışmalarım boyunca sabırla beni destekleyen eşim Bünyamin YAVUZ ve kızım Aylin YAVUZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos 2022

Arzu YAVUZ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
SEMBOLLER	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1 Süt.....	4
2.1.1 Sütün bileşimini etkileyen faktörler.....	5
2.1.2 Farklı süt sığır ırkları.....	7
2.1.3 İnek sütünün bileşimi	10
2.2 Amino Asitler	12
2.3 Farklı Sütlerin Amino Asit Kompozisyonunu Karşılaştıran Çalışmalar.....	17
2.4 Sütün Amino Asit Kompozisyonunun Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler	19
2.5 Süte Uygulanan Isıl İşlemler	21
2.5.1 Maillard reaksiyonu	22
2.5.2 HMF oluşumu	25
2.5.3 HMF tespitinde kullanılan yöntemler	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1 Süt Örneklerinin Alınması	30
3.2 Kullanılan Kimyasallar	31
3.3 Amino Asit Analizi	32
3.3.1 LC-MS/MS analizi	32
3.3.2 Validasyon	38
3.3.3 Örnek hazırlama	43
3.3.3.1 Asidik hidroliz.....	43
3.3.3.2 Alkali hidroliz	45
3.4 Bileşen Analizleri.....	46
3.5 Isıl İşlem	47
3.6 HMF Analizi	48
3.6.1 LC-MS/MS analizi	48
3.6.2 Validasyon	50
3.6.3 Örnek hazırlama	51
3.7 Renk Analizi.....	52
3.8 İstatiksel Analiz.....	53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	54
4.1 Amino Asit Analizi Sonuçları	54

4.1.1 Validasyon sonuçları.....	54
4.1.2 Süt örneklerinin amino asit sonuçları.....	55
4.2 Bileşen Analizleri.....	57
4.3 Isıl İşlem Uygulaması Sonrası Analizler.....	59
4.3.1 Lisin analizi.....	59
4.3.2 HMF analizi	60
4.3.3 Renk analizi.....	63
5. SONUÇ.....	67
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ.....	80



KISALTMALAR

AOAC	: Resmi Tarım Kimyagerleri Derneği
APCI	: Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonizasyon
CIE	: Uluslararası Aydınlatma Komisyonu
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
HMF	: Hidrosimetilfurfural
HPLC	: Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
ICAR	: Uluslararası Hayvan Kayıt Komitesi
IDF	: Uluslararası Sütçülük Federasyonu
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
LOD	: Tespit Limiti
LOQ	: Ölçüm Limiti
MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme
RSD	: Bağlı Standart Sapma
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyon
TAGEM	: Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu

SEMBOLLER

dk	: Dakika
g	: Gram
mL	: Mililitre
ms	: Milisaniye
N	: Normalite
nmol	: Nanomol
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Farklı sütlerin ortalama kompozisyonları (Pereira, 2014).....	5
Çizelge 2.2: Amino asitlerin moleköl ağırlıkları ve formülleri.	16
Çizelge 2.3: Farklı ölkelerden inek sütlerinin amino asit kompozisyonları (mg/100g) (Schönfeldt ve diğ, 2012).	18
Çizelge 3.1: Örnek alma planı.	30
Çizelge 3.2: 18 amino asit için optimize edilen LC-MS/MS parametreleri.	33
Çizelge 3.3: Amino asit analizi kütle spektrometresi parametreleri.	34
Çizelge 3.4: Amino asit analizi için optimize edilen HPLC parametreleri.	34
Çizelge 3.5: Amino asitlerin kalibrasyon noktaları.	43
Çizelge 3.6: HMF analizi için optimize edilen LC-MS/MS parametreleri.	48
Çizelge 3.7: HMF analizi kütle spektrometresi parametreleri.	49
Çizelge 3.8: HMF analizi için optimize edilen HPLC parametreleri.	49
Çizelge 4.1: Amino asit validasyon sonuçları özeti.....	54
Çizelge 4.2: Farklı ırklardan elde edilen sütlerin amino asit bileşimi (g/100mL).	55
Çizelge 4.3: Farklı ırklardan elde edilen sütlerin bileşen analizleri (g/100mL).	58
Çizelge 4.4: Isı uygulamasından sonra lizin değerleri (g/100mL).	59
Çizelge 4.5: Sütlerde HMF değerleri (µg/kg).	61
Çizelge 4.6: Farklı ırklardan elde edilen çiğ sütlerin renk değerleri.	64
Çizelge 4.7: Isı uygulamasından sonra L* değerleri.	64
Çizelge 4.8: Isı uygulamasından sonra a* değerleri.	65
Çizelge 4.9: Isı uygulamasından sonra b* değerleri.	65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Boz Irk (TAGEM, 2009).	9
Şekil 2.2 : Yerli Kara (TAGEM, 2009).	9
Şekil 2.3 : İnek sütünün bileşimi.	11
Şekil 2.4 : Esansiyel amino asitlerin üç boyutlu yapısı (Met, Val, Thr, Ile).	13
Şekil 2.5 : Esansiyel amino asitlerin üç boyutlu yapısı (Leu, Lys, Pro, Trp).	14
Şekil 2.6 : Maillard reaksiyonu şeması (Alais ve Linden, 1991; Oral, 2006).	23
Şekil 2.7 : HMF oluşum mekanizması (Perez-Locas ve Yaylayan, 2008; Capuano ve Fogliano, 2011; Masatçıoğlu, 2013).	26
Şekil 3.1 : LC-MS/MS (Shimadzu LCMS-8040).	32
Şekil 3.2 : Lys, Cys, Phe, Trp, Met, Ileu kromatogramları.	35
Şekil 3.3 : Val, Pro, Asp, Thr Ala, Glu kromatogramları.	36
Şekil 3.4 : Tyr, Leu, His, Gly, Ser, Arg kromatogramları.	37
Şekil 3.5 : Lisin kalibrasyon eğrisi.	39
Şekil 3.6 : Histidin kalibrasyon eğrisi.	39
Şekil 3.7 : Glisin kalibrasyon eğrisi.	39
Şekil 3.8 : Sistin kalibrasyon eğrisi.	39
Şekil 3.9 : Serin kalibrasyon eğrisi.	40
Şekil 3.10 : Arjinin kalibrasyon eğrisi.	40
Şekil 3.11 : Aspartik asit kalibrasyon eğrisi.	40
Şekil 3.12 : Treonin kalibrasyon eğrisi.	40
Şekil 3.13 : Alanin kalibrasyon eğrisi.	40
Şekil 3.14 : Glutamik asit kalibrasyon eğrisi.	41
Şekil 3.15 : Prolin kalibrasyon eğrisi.	41
Şekil 3.16 : Valin kalibrasyon eğrisi.	41
Şekil 3.17 : Metiyonin kalibrasyon eğrisi.	41
Şekil 3.18 : İzolösin kalibrasyon eğrisi.	41
Şekil 3.19 : Tirozin kalibrasyon eğrisi.	42
Şekil 3.20 : Lösin kalibrasyon eğrisi.	42
Şekil 3.21 : Fenilalanin kalibrasyon eğrisi.	42
Şekil 3.22 : Triptofan kalibrasyon eğrisi.	42
Şekil 3.23 : Asidik hidroliz prosedürü.	44
Şekil 3.24 : Alkali hidroliz prosedürü.	45
Şekil 3.25 : Asidik ve alkali hidroliz sonrası viallerin görüntüleri.	46
Şekil 3.26 : Bentley FTS/FCM cihazı.	47
Şekil 3.27 : HMF kromatogramı.	50
Şekil 3.28 : HMF kalibrasyon eğrisi.	51
Şekil 3.29 : HMF analizi için örnek hazırlama prosedürü.	52

LC-MS/MS KULLANILARAK OPTİMİZE EDİLEN METOT İLE İNEK SÜTÜNÜN AMİNO ASİT KOMPOSİZYONUNUN BELİRLENMESİ

ÖZET

Hayvansal kaynaklı proteinlerin biyoyararlılığı yüksektir. Süt insan beslenmesinde vazgeçilmez olan ve biyoyararlılığı yüksek proteinler içeren hayvansal kaynaklı bir gıdadır. Sütün amino asit bileşiminin belirlenmesi, sütün besin değerini etkileyebilecek peptitlerin ve proteinlerin kalitatif değerlendirmesi için çok önemlidir. Gıdaların amino asit profillerinin belirlenmesinde HPLC metodu yaygın olarak kullanılsa da, son zamanlarda amino asitlerin türevlendirme olmadan analiz edilebilmesine olanak sağlamasından dolayı LC-MS/MS metodu ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı, hidroliz sonrası LC-MS/MS ile türevlendirme olmaksızın sütteki amino asitlerin tayini için bir metot optimize etmek ve optimize edilen bu metot ile Türkiye’de yetiştirilen beş sığır ırkından (Siyah Alaca, Simental, Esmer, Yerli Kara ve Boz Irk) elde edilen sütlerin amino asit profillerini araştırmaktır. Süt örneklerine asidik hidrolizin yanı sıra alkali hidroliz de uygulanmış ve triptofan içerikleri de çalışmanın sonuçlarına dahil edilmiştir. Sonuç olarak sütlerde lizin, histidin, sistin, aspartik asit, treonin, alanin, glutamik asit, prolin, valin, izolösin, tirozin, lösin, fenilalanin, metiyonin, glisin, serin, arjinin ve triptofan olmak üzere toplam 18 adet amino asidin kompozisyonunun belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Daha önce inek sütlerinde yapılan çalışmalarla uyumlu olarak, LC-MS/MS kullanılarak optimize edilen metot ile yapılan bu çalışmada da inek sütlerinde en bol bulunan amino asit glutamik asit, en bol bulunan esansiyel amino asit lösin, en az miktarda bulunan esansiyel amino asit ise triptofan olarak bulunmuştur. Farklı ırklardan elde edilen inek sütlerinin lizin, histidin, sistin, aspartik asit, treonin, alanin, glutamik asit, prolin, valin, izolösin, tirozin, lösin, fenilalanin, metiyonin ve triptofan konsantrasyonları için önemli farklılıklar ($P<0,05$) gözlenirken, glisin, serin, arjinin konsantrasyonları açısından önemli bir fark olmadığı görülmüştür ($P>0,05$). Farklı ırkların sütlerinin amino asit kompozisyonu karşılaştırıldığında, yerli ırk olan Boz Irk ve kültür ırkı Siyah Alaca sütlerinde toplam esansiyel amino asitlerin toplam amino asitlere oranının çalışılan diğer ırkların sütlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Yine iki ırkın sütlerinin lizin, valin, izolösin, lösin, treonin, fenilalanin, triptofan, histidin, glisin, sistin, serin, arjinin, aspartik asit, alanin, glutamik asit, prolin ve tirozin konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($P>0,05$).

Süt örneklerinin amino asit kompozisyonunun yanı sıra kimyasal kompozisyonunun da incelendiği çalışmada, Boz Irk sütünün yüksek protein içeriği ile diğer ırkların sütlerinden önemli ölçüde farklı olduğu, yağ içeriğinin ise en düşük olduğu görülmüştür. Laktoz içeriği açısından değerlendirildiğinde ise Boz Irk ve Yerli Kara sütlerinin diğer ırklardan istatistiksel olarak önemli oranda ($P < 0,05$) yüksek olduğu tespit edilmiştir. Simental ırkı sütünün ise çalışılan ırkların sütleri arasında en yüksek yağ içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada ısıtıl işlemin sütler üzerinde etkisini değerlendirmek amacıyla tez kapsamında çalışılan beş sığır ırkından elde edilen sütlerle, aynı normlarda ev tipi

kaynatma ve pastörizasyon işlemi uygulanmış ve sütlerde ısıtım işlem öncesi ve sonrası hidroksimetilfurfural (HMF), lizin ve renk analizleri değerlendirilmiştir. Sütte uygulanan ısıtım işlem şiddetinin ve kalitenin belirlenmesinde kullanılan ve Maillard reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan en bilinen ve en yaygın ara ürünlerden biri olan HMF'yi tespit etmek amacıyla yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip LC-MS/MS'te bir yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Analizler sonucunda pastörize edilen örneklerde ölçüm limitinin altında HMF oluştuğu gözlenirken kaynatılan süt örneklerinde ise $7,14 \pm 0,89$ - $9,39 \pm 3,35$ µg/kg aralığında HMF oluştuğu gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: süt, amino asit, renk, LC-MS/MS, HMF, lizin



DETERMINATION OF AMINO ACID COMPOSITION OF COW MILK BY OPTIMIZED METHOD USING LC-MS/MS

SUMMARY

The bioavailability of proteins of animal origin is high. Milk is an animal originated food that is indispensable in human nutrition. Determination of the amino acid composition of milk is very important for the qualitative evaluation of peptides and proteins that may affect the nutritional value of milk. Although the HPLC method is widely used in the determination of the amino acid profiles of foods, the LC-MS/MS method has recently come to the fore because it allows the analysis of amino acids without derivatization. The aim of this study was to optimize a method for the determination of amino acids in milk without derivatization by LC-MS/MS after hydrolysis and to investigate the amino acid profiles of milk obtained from five cattle breeds (Holstein, Simmental, Brown Swiss, Anatolian Black and Turkish Grey) by using the optimized method. In addition to acidic hydrolysis, alkaline hydrolysis was also applied to milk samples and tryptophan contents were also included in the results of the study. As a result, the composition of 18 amino acids in milk, including lysine, histidine, cystine, aspartic acid, threonine, alanine, glutamic acid, proline, valine, isoleucine, tyrosine, leucine, phenylalanine, methionine, glycine, serine, arginine and tryptophan determination was carried out. Consistent with previous studies in cow milk, in this study conducted with the optimized method using LC-MS/MS, the most abundant amino acid was glutamic acid, the most abundant essential amino acid leucine and the least abundant essential amino acid was tryptophan in cow milk. While significant differences ($P < 0.05$) were observed for lysine, histidine, cystine, aspartic acid, threonine, alanine, glutamic acid, proline, valine, isoleucine, tyrosine, leucine, phenylalanine, methionine and tryptophan concentrations of cow's milk obtained from different breeds, there was no significant difference in glycine, serine and arginine concentrations ($P > 0.05$). When the amino acid composition of the milks of different breeds was compared, it was seen that the ratio of total essential amino acids to total amino acids in the milk of the domestic breed Turkish Grey and the culture breed Holstein was higher than the milk of the other studied breeds. There was no significant difference in the concentrations of lysine, valine, isoleucine, leucine, threonine, phenylalanine, tryptophan, histidine, glycine, cystine, serine, arginine, aspartic acid, alanine, glutamic acid, proline and tyrosine in the milks of the two breeds ($P > 0.05$).

In the study, the chemical composition of the milk samples were examined as well as the amino acid composition. It was observed that the milk of the Turkish Grey was significantly different from the milk of other breeds with its high protein content, while the fat content was the lowest. In terms of lactose content, it was determined that milk of Turkish Grey and Anatolian Black were statistically significantly higher ($P < 0.05$) than the other breeds. It was determined that the milk of Simmental breed had the highest fat content among the milks of the studied breeds.

In the study, in order to evaluate the effect of heat treatment on milk, domestic boiling and pasteurization processes were applied to the milk obtained from five cattle breeds within the scope of the thesis, and HMF, lysine and color analyzes were evaluated before and after heat treatment in milk. HMF is one of the most well-known and most common intermediate marker, which is used to determine the severity and quality of heat treatment applied to milk and is produced as a result of the Maillard reaction. An easy, practical and inexpensive method in LC-MS/MS with high sensitivity and selectivity to detect HMF has been developed and validated.

As a result of the analysis, it was observed that HMF was formed below the limit of quantification in pasteurized samples, while HMF was formed in the range of 7.14 ± 0.89 - 9.39 ± 3.35 $\mu\text{g/kg}$ in boiled milk samples.

Keywords: milk, amino acid, breed, LC-MS/MS, HMF, lysine



1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde zorunlu olarak tüketilmesi gereken gıdalar arasında olan sütün biyolojik yararı, yapısında yer alan maddelerden kaynaklanmaktadır. Bu maddelerden birisi biyolojik değeri yüksek yapı taşları olan amino asitlerdir. Proteinlerin bileşiminde bulunan amino asitler protein kalitesini ve biyolojik değerini belirlemektedir. Amino asitler, biyolojik anlamda esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Esansiyel amino asitler vücudun sentezleyemediği gıdalarla dışarıdan alınması zorunlu olan amino asitlerdir. Bu grupta yer alan amino asitler aynı zamanda diğer amino asitlerin sentezlenmesinde görev almaktadır ve bu amino asitlerin değerine göre proteinler “biyolojik değeri yüksek” ya da “biyolojik değersiz” olarak değerlendirilmektedir (Kavas ve Kınık 2005).

Hayvansal kaynaklı proteinler, biyoyararlılığı yüksek protein kaynakları sınıfında yer almaktadırlar. Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitleri dengeli bir biçimde içeren süt beslenmede en önemli besinlerdendir. Süt proteinleri, insan amino asit gereksinimleri, sindirilebilirliği ve biyoyararlanımı dikkate alınarak yüksek kaliteli proteinler olarak sınıflandırılmaktadır ve esansiyel amino asit skoru ve protein sindirilebilirliği düzeltilmiş amino asit skoru dikkate alınarak genellikle en iyi protein kaynağı olarak kabul edilmektedir (Pereira, 2014).

Dünyada ve Türkiye’de süt üretimi içerisinde en önemli payı inek sütü almaktadır ve inek sütü, kolay ulaşılabilir olması nedeniyle en çok tüketilen süt çeşitidir. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre Türkiye’de 2019 yılında süt üretiminin yaklaşık 23 milyon ton civarında olduğu ve bu miktarın %90,5’ini inek sütünün oluşturduğu bildirilmiştir. Türkiye’de sadece 1.5 milyonu yerli olmak üzere 17 milyon büyükbaş hayvan bulunmaktadır (TÜİK, 2020).

Türkiye’de yetiştirilen kültür ırkı sığırların önemli bir bölümünü sütçü özelliği ile ön plana çıkan Siyah Alaca ırkı oluşturmaktadır. Siyah Alaca ırkını Simental, Esmer ve Jersey ırkları takip etmektedir.

Yerli Kara, Boz Irk, Güney Anadolu Kırmızısı ve Doğu Anadolu Kırmızı ise ülkemizde bulunan önemli yerli ırklardır (TUİK 2020). Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de yerli ırkların popülasyonu oldukça azalmıştır. Genetik kaynakların korunması adına Türk yerli sığır ırkları koruma altına alınmıştır.

Süt kompozisyonunun kalıtım derecesinin oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Farklı ırklardaki sığırların sütlerinin protein, yağ, kuru madde vb. yönünden karşılaştırıldığı ve bunun kalıtım ile ilişkilendirildiği pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonucuna göre sütün protein miktarının farklı hayvan türlerinden ve ırklarından elde edilen sütlerde farklılık gösterdiği bilinmektedir. Farklı türlerden elde edilen sütlerin protein konsatrasyonlarıyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olsa da toplam amino asit (proteine bağlı ve serbest) kompozisyonu hakkında çok az sayıda sistematik çalışma vardır (Sabhelkheir ve diğ, 2012).

Aynı türün farklı ırklarından elde edilen sütlerin amino asit kompozisyonunun karşılaştırıldığı çalışma sayısı ise oldukça sınırlıdır. Türkiye’de farklı keçi sütü türlerinin amino asit kompozisyonu çalışılmıştır (Günay ve diğ, 2021), ancak farklı inek sütlerinin amino asit profilleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Yerli Kara ve Boz Irk’ın amino asit profilleri ile ilgili bir veriye ise rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada, LC-MS/MS (sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi) tekniğinin amino asitlerin türevlendirme olmadan analizine imkan vermesi avantajı kullanılarak sütte amino asitlerin analizi için bir metot oluşturulması ve oluşturulan metot ile Türkiye’de yetiştirilen kültür ırkı sığırlardan Siyah Alaca, Simental, Esmer ve yerli ırklardan Yerli Kara ve Boz Irk sütlerinde bulunan amino asitlerin kompozisyonunun belirlenmesi ve esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler yönünden karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada süt örneklerine asidik hidrolizin yanı sıra bazik hidroliz de uygulanarak, lizin, histidin, sistin, aspartik asit, treonin, alanin, glutamik asit, prolin, valin, izolösin, tirozin, lösin, fenilalanin, metiyonin, glisin, serin, arjinin ve triptofan olmak üzere toplam 18 adet amino asidin kompozisyonunun incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Alınan süt örneklerinin kimyasal bileşen analizleri de gerçekleştirilerek çalışma sonuçlarında değerlendirilmiştir.

Süte uygulanan ısıtma işlem sonucu amino asitler ve karbonhidratların tepkimeye girmesiyle oluşan Maillard reaksiyonları lizin amino asidi kaybına neden olmaktadır. Sütlerde Maillard reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan ara ürünlerden biri olan

hidroksimetilfurfural (HMF) sütlere uygulanan ısıł işlemler şiddetinin ve kalitenin belirlenmesinde kullanılan en yaygın belirteçlerden biridir ve lizin kaybı ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Çalışmada ısıł işlemin sütlere üzerinde etkisini değerlendirmek amacıyla tez kapsamında çalışılan beş sığır ırkından elde edilen sütlere, aynı normlarda ev tipi kaynatma ve pastörizasyon işlemi uygulanmış ve sütlere ısıł işlem öncesi ve sonrası HMF, lizin ve renk analizleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerde HMF analizleri, LC-MS/MS cihazında yapılmıştır. Sütlere HMF'yi tespit etmek amacıyla yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip LC-MS/MS kullanılarak kolay, pratik ve ucuz bir yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Süt

Süt, dişi memeli hayvanların yeni doğmuş yavrularını beslemek amacıyla hayvan türüne göre farklı sürelerde süt bezlerinden salgılanan, içerisinde yavrunun alması gereken bütün besin maddelerini içeren, porselen beyazı rengi, kendine has tat ve kokusu olan bir sıvıdır (Metin, 1999).

Sütün tarihi, insanların yerleşik bir yaşam biçimine geçmeye başladığı Neolitik Çağ'da başlamıştır. Tarımsal gelişmeyle birlikte etlerine, kürklerine ve sütlerine sürekli erişim amacıyla hayvanları (keçi, inek ve koyun) evcilleştirmeye yönelik ilk girişimler yaklaşık olarak 11.000 yıl önce Ortadoğu'da başlamış ve sonrasında da süt yüzyıllar boyunca besi hayvanlarının yetiştirildiği her yerde arzu edilen ve değerli olduğu kabul edilen bir besin kaynağı haline gelmiştir (Barłowska ve diğ, 2011).

Süt çok sayıda besin maddesi içerir ve içerdiği besin öğeleri organizma tarafından kolay alınabilecek ve sindirilebilecek özelliktedir. Kalsiyum, fosfor, riboflavin, amino asitler, yağ asitleri ve bir çok mineral madde ve vitamin gibi diğer önemli besleyici değere sahip bileşenleri önemli oranda içeren süt temel gıda maddesi olarak kabul edilmektedir (Metin, 1999).

Süt, bitkisel protein esaslı diyetlerde eksik olması muhtemel olan esansiyel amino asitleri yüksek oranda içermesi nedeniyle tüm insanlar için diyetin önemli bir bileşenidir (Layman, 2003; Etzel, 2004). Süt, demir açısından fakirdir, C vitamini düşüktür, antibesinsel faktörler içermez ancak diyet lifi açısından yoksundur (Walstra ve diğ, 2005).

Süt, insan beslenmesi için gerekli olduğu bilinen hemen hemen tüm farklı maddeleri içeren tek gıda maddesi olarak kabul edilmektedir. Süt ve süt ürünlerinin kemik ve diş sağlığının korunması üzerinde önemli etkileri, osteoporoz, majör kardiyovasküler hastalık risk faktörleri, hipertansiyon, tip 2 diyabet, metabolik sendromlar ve ayrıca bazı kanserleri önleyici etkisi hususunda olumlu etkileri rapor edilmiştir (Davoodi ve diğ, 2013).

Süt ve süt ürünlerinin obeziteye katkıda bulunmadığı ve kilo yönetimi konusunda faydalı bir role sahip olduğu bilinmektedir (Miller ve diğ, 2000).

Süt proteinin küçük çocuklarda kemik uzaması ve kemik kütlesi artışı için gerekli insulin benzeri büyüme faktörlerini uyardığı ve bodurluk riskini azalttığı bilinmektedir. Ergenlik döneminde düşük süt tüketiminin, kalsiyum, magnezyum, iyot ve diğer önemli besinlerin yetersiz alımına neden olabileceği bildirilmiştir (Givens, 2020). Grenov ve diğ. (2020) yüksek süt alımının diyet çeşitliliğini sınırlayabileceğini ve demir eksikliğine neden olabileceğini, bu nedenle küçük çocuklarda süt alımının 500 mL/gün'ü geçmemesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Esansiyel (izolösin, lösin, lisin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan, valin) ve esansiyel olmayan (histidin, arjinine, alanin, aspartik asit, sistin, glutamik asit, glisin, prolin, serin, tirozin) amino asitlerin dengeli olarak sütte bulunduğu bildirilmektedir (Miller ve diğ, 2000; Tripaldi ve diğ, 1998; Frau ve diğ, 1997).

2.1.1 Sütün bileşimini etkileyen faktörler

İçerdiği besin öğeleriyle beslenmenin vazgeçilmez bir parçası olan sütün bileşimine etki eden pek çok faktör bulunmaktadır. Farklı türlerden elde edilen sütlerin bileşimi oldukça farklılık gösterir. Elde edildiği hayvan türüne göre süt bileşiminde %11-38 aralığında kuru madde, %1,9-22,0 aralığında yağ, %2,0 -10,5 aralığında protein, %1,8-6,7 aralığında laktoz, %0,5-1,7 arasında mineral madde bulunmaktadır (Üçüncü, 2004). Keçi, koyun, inek ve insan sütünün bazı bileşenler açısından ortalama değerleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 : Farklı sütlerin ortalama kompozisyonları (Pereira, 2014).

	Keçi	Koyun	İnek	İnsan
Yağ (%)	3,8	7,9	3,6	4,0
Laktoz (%)	4,1	4,9	4,7	6,9
Protein	3,4	6,2	3,2	1,2
Enerji (kcal/100mL)	70	105	69	68
Kalsiyum mg/100 g	134	193	122	33
Fosfor mg/100 g	121	158	119	43
Vitamin A (IU)	185	146	126	190
Vitamin D (IU)	2,3	0,18	2,0	1,4

Elde edildiği tür dışında da süt bileşiminin rasyon, mevsim, ırk, genetik, laktasyon aşaması gibi pek çok parametreden etkilendiği rapor edilmiştir (Schwendel ve diğ, 2015; Teter ve diğ, 2020).

Sütün protein konsantrasyonunun ve kompozisyonunun beslenme yönetimindeki değişikliklerden çok daha az etkilendiği (Walker ve diğ, 2004), sığırın genetiği, laktasyon aşaması ve ırkının süt içindeki protein konsantrasyonunu önemli ölçüde etkilediği (Maurice- Van Eijndhoven ve diğ, 2011) bildirilmiştir.

Laktasyon döneminin süt bileşiminde önemli derecelerde varyasyon yarattığı belirlenmiştir (Semjan ve Kazimir,1984; Yadav ve Sharma, 1984; Sharaby, 1988; Yadav diğ, 1991; Patel ve diğ, 1991; Şekerden ve Kuran, 1992; Şekerden, 2002).

Organik ve konvansiyonel sütün karşılaştırıldığı bir çalışmada organik sütte Ca seviyesi daha yüksek bulunmuş, iki sütün protein oranında ise bir fark olmadığı görülmüştür. Aynı çalışmada farklı aylarda alınan numunelerin protein miktarları arasında küçük farklılıklar bulunmuş, bunun da laktasyon aşamasındaki farklılıktan olabileceği belirtilmiştir (Cubon ve diğ, 2008).

Yine Dunkley ve diğ. (1977) tarafından yapılan bir çalışmanın sonucunda üç farklı oranda iç yağı ile beslemenin hayvanların sütlerinin yağ asiti kompozisyonunda değişikliğe sebep olurken amino asit kompozisyonunda herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı bildirilmiştir.

Waldner ve diğ. (2001) tarafından sütün protein miktarının farklı hayvan türlerinden elde edilen sütlerde farklılık gösterdiği ve süt kompozisyonunun kalıtım derecesinin oldukça yüksek olup, 0,50 dolayında olduğu bildirilmiştir.

Schroeder (2012) süt yağ ve protein varyasyonunun yaklaşık %55'inin genetik yapıdan, %45'inin ise diğerk faktörlerden kaynaklandığını ifade etmiştir. Özek (2015) ise çevre şartları ne kadar iyileştirilirse iyileştirilsin ırkın genetik yapısında kodlanmış süt yağ ve protein miktarından daha fazla yağ ve protein elde etmenin mümkün olmadığını belirtmiştir.

Gabriella ve Virginia (2007) süt sığırlarında rasyon proteinin süt proteinine dönüşüm etkinliğinin %25-30 gibi düşük bir oranda olduğunu bildirmiştir. Özek (2015) süt sığırlarının rasyon nitrojeninin önemli bir kısmını vücut fonksiyonlarının yerine

getirilmesinde kullandığını ve bu durumun süt protein içeriğinin besleme manipölasyonlarıyla değiştirilmesini zorlaştırdığını ifade etmiştir.

2.1.2 Farklı süt sığır ırkları

Süt üretiminde en önemli tür sığırır. Ancak dünyada süt amaçlı yetiştirilen farklı türde hayvanların sayısı oldukça çoktur. Dünyanın farklı bölgelerinde, süt üretmek amacıyla o bölgeye özgü belirli türler yetiştirilmektedir. Dünyanın birçok bölgesinde manda sütü sıklıkla kullanılmaktadır. Deve sütü, Kenya, Somali, Etiyopya ve Pakistan gibi çeşitli ülkelerde yaygın olarak tüketilmektedir. Latin Amerika, devegiller ve lamalar dahil, çok çeşitli geviş getiren hayvanlara sahiptir. Geyik sütü Rusya ve İsveç'te popülerdir, Moğolistan'da ise at sütü yaygın olarak tüketilirken, Tibet'te yak sütü kullanılmaktadır. Çok sayıda süt amaçlı yetiştirilen hayvan türü olsa da günümüzde küresel süt üretimine süt sığırır, manda, keçi, koyun ve deve olmak üzere beş hayvan türü hakimdir ve ilk sırayı açık ara fark ile süt sığırır almaktadır (Barłowska ve dię, 2011).

Kökeni Hollanda, Almanya ve Danimarka'nın Kuzey Denizi kıyılarındaki ovalık kesimlerde yetiştirilen sığırırara dayanan Siyah Alaca (Holstein, Holstein Friesian) ırkı dünyanın en yaygın sığırır ırkıdır. Önce Batı Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde başlatılan, özellikle 1950'li yıllardan itibaren daha sistemli hale getirilen ıslah programlarıyla birlikte Siyah Alaca ırkının, başta süt olmak üzere, birçok verimi diğer sığırır ırklarının rekabet edemeyeceği seviyelere yükseltilmiştir (Kumlu ve Akman, 1999).

Ancak hastalıklara karşı dayanıksız olması, döl tutma sorununun fazla ve sürü ömür süresinin nispeten daha kısa olması nedeniyle Siyah Alaca ırkına alternatif olarak ismini batı İsviçre'nin Bernese Oberland'ında Simme Irmağı vadisinden alan çok yönlü sığırır ırkı Simental ırkı görölmüştür. Simental ırkının adaptasyon yeteneğinin yüksek olması dünya genelinde sığırır pazarlarında önemli bir etkiye sahip olmasını sağlamıştır. Besideki performansının göreceli olarak yüksek oluşu gibi gerekçelerle üreticilerin Simental ırkına ilgisi artmış ve başta Avusturya ve Almanya'dan olmak üzere damızlık materyal olarak Türkiye'ye önemli miktarlarda Simental ırkı sığırır girmeye başlamıştır (Atakan, 2016).

Esmer ırk sığırır ise çeşitli iklim şartlarına uyum yetenekleri yüksek olan, değişik bakım ve besleme şartlarında başarıyla yetiştirilebilen ve diğer kültür ırkı sığırırara göre

güç şartlara daha dayanıklı olan bir ırktır. İlk olarak 1925 yılında Avusturya'dan Türkiye'ye getirilmiş ve Türkiye şartlarında başarılı olması nedeni ile daha sonraki yıllarda değişik Avrupa ülkelerinden ithali yapılmıştır (Aktaş ve Bakır 2011).

Türkiye'de yetiştirilen kültür ırkı sığırların da önemli bir bölümünü sütçü özelliği ile ön plana çıkan Siyah Alaca ırkı oluşturmaktadır. Siyah Alaca ırkını Simental, Esmer ve Jersey ırkları takip etmektedir. Yerli Kara, Boz Irk, Güney Anadolu Kırmızısı ve Doğu Anadolu Kırmızı ise ülkemizdeki önemli yerli ırklardır (TUİK 2020).

Yerli Kara ve Boz Irk, Türkiye'de sınırlı alanlarda küçük çiftçiler tarafından yetiştirilen yerli ırklardır. Yerli Kara, özellikle İç Anadolu'da yetiştirilen uzun ve dar başlı, adından da anlaşılacağı gibi genellikle siyah olan bir ırktır. Lalahan'da Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde bir Yerli Kara ırkı sürüsü koruma altında tutulmaktadır. Boz Irk'ın Bulgar Boz Irk'ından geldiği düşünülmektedir. Step ve Plevne olarak da anılır. Güneydoğu Avrupa'da yaygın olan Boz Irk grubunun bir çeşididir. Trakya ve Güney Marmara bölgelerinde yetiştirilmektedir. Bu yerli ırkların her ikisi de çift amaçlı et ve süt hayvanıdır, zorlu çevre koşullarına iyi uyum sağlar, esas olarak düşük kaliteli otlatmaya dayanır, çok az veteriner bakımına ihtiyaç duyar ve hala geleneksel olarak yetiştirilmektedir (Yılmaz ve diğ, 2012; Demir ve Balcioğlu, 2019; Ünal ve diğ, 2019).

Yerli Kara, karasal iklim bölgelerinde, ilkel barındırma, besleme ve bakım koşullarında yetiştirilebilmektedir. Boz Irk'ın doğal yaşam alanları genellikle dağlık bölgelerdeki engebeli araziler ve orman içleridir. Bu tür bölgelerde Boz Irk, insan müdahalesi olmaksızın yaşama, beslenme ve üreme yeteneğine sahiptir. Hırçın ve saldırganlardır. Bulunduğu sürüyü ve yavrusunu koruma içgüdüleri çok fazla gelişmiştir (TAGEM, 2009). Boz Irk'a ait görsel Şekil 2.1' de, Yerli Kara ırkına ait görsel ise Şekil 2.2'de verilmiştir.

Modern çiftliklerde süt sığırı yetiştiricileri, yüksek verimli kültür ırklarını düşük süt verimliliğine sahip yerli ırklara tercih etmiş ve bu nedenle yerli ırkların popülasyonu hızla azalmıştır.

Demir ve Balcioğlu (2019) suni tohumlamada kültür ırklarının kullanılmasının da yerli ırkların popülasyonunun düşüşünü hızlandırdığını ifade etmiştir.



Şekil 2.1 : Boz Irk (TAGEM, 2009).



Şekil 2.2 : Yerli Kara (TAGEM, 2009).

Yerli ırkların tüm dünyada hızla azalmasının genetik çeşitlilik için bir tehdit oluşturduğu ve bu nedenle yerli sığır ırklarının genetik kaynak olarak korunmasına acilen ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (Medugorac ve diğ, 2009; Groeneveld ve diğ, 2010).

Yıllar içerisinde sayılarının azalmaya başlaması sonucunda yok olma tehlikesi ile karşı

karşıya olan Türkiye'nin yerli ırklarına ait örneklerin ilk olarak 1995 yılında Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) bünyesinde başlatılan, "Hayvan Genetik Kaynaklarının Korunması Projesi" ile TAGEM'e bağlı enstitülerde koruma altına alınması kararlaştırılmıştır. Daha sonra yerli ırkların küçük sürüler halinde halk elinde korunması amacıyla 2005 yılında TAGEM tarafından yürütülen "Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarının Halk Elinde Korunması Projesi" başlatılmıştır. 2005 yılında Ankara'nın Çamlıdere İlçesinde 150 baş Yerli Kara sığır ile başlayan yerinde koruma projesinin, 2019 yılı itibariyle Çamlıdere'de 1.668 baş, Bayramören'de 148 baş, Antalya ilinde ise 420 baş hayvan olmak üzere toplamda 2.236 baş hayvanla başarılı bir şekilde sürdürülmeye devam edildiği bildirilmiştir (Ünal ve diğ, 2020).

Yine proje kapsamında Boz Irk sığır ırkının korunmasına yönelik çalışmalar Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü bünyesinde koruma altına alınan sürü ile başlamış ve Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Edirne ve Kocaeli illerinde yetiştiricilere ait sürülerin koruma altına alınmasıyla devam etmiştir.

Nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan Türk yerli ırkları, genetik kaynakların korunması amacıyla Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından koruma altına alınmasının yanı sıra Türk yerli sığır ırkları hakkında daha fazla bilgi edinilmesine yönelik araştırmalar Bakanlık tarafından tavsiye edilmekte ve teşvik edilmektedir.

2.1.3 İnek sütünün bileşimi

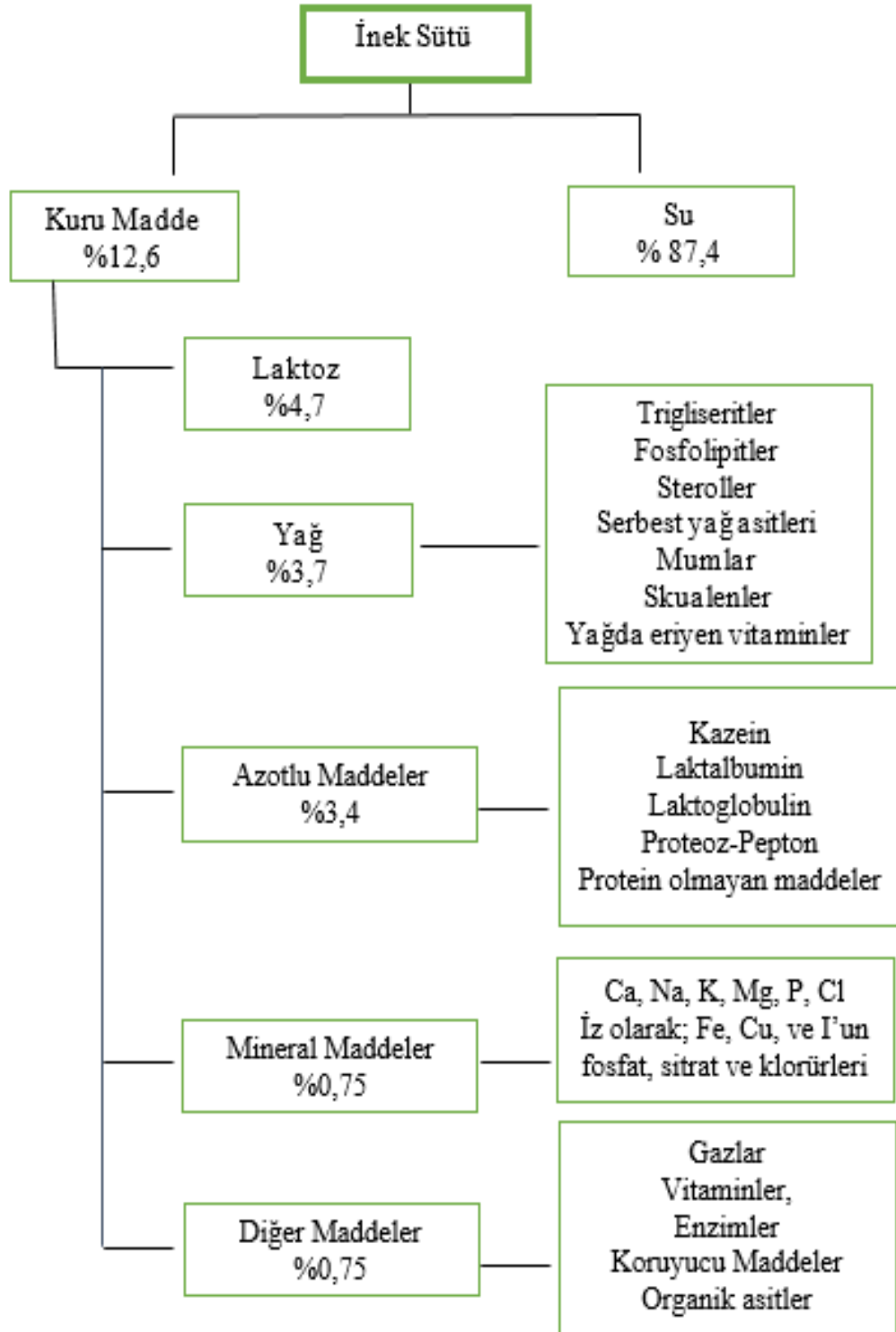
Muehlhoff ve diğ. (2013) tarafından ineğin, ana süt hayvanı olarak kabul edildiği ve "süt" teriminin çoğu insanın zihninde inek sütü ile neredeyse eşanlamlı olduğu bildirilmiştir. Metin (1999) içme sütü başta olmak üzere bir çok süt ürününün işlenmesine uygun olan inek sütünün bileşimine etki eden en önemli faktörün ırk olduğunu bildirmiştir.

Üçüncü (2004) inek sütü bileşiminde; %10,5-14,5 arasında kuru madde, %2,5-6,0 arasında yağ, %2,9-5,0 arasında protein, %3,6-5,5 arasında laktoz, %0,6-0,9 arasında mineral madde bulunduğunu, inek sütünün yoğunluğunun ise 1,028-1,039 g/mL arasında değiştiğini belirtmiştir.

Metin (2009) içme sütü ve pek çok süt ürününün işlenmesine uygun olması nedeniyle süt teknolojisi açısından önemli olan inek sütünün kuru maddesinin yaklaşık olarak % 27'sini azotlu maddelerin, %29'unu süt yağının %37'sini laktozun ve %5,95'ini

mineral maddelerin oluşturduğunu bildirmiştir.

İnek sütü bileşiminin ortalama değerleri Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 : İnek Sütünün Bileşimi (Metin, 2009).

Muehlhoff ve diğ. (2013) inek sütünün, insan sütünden daha fazla protein içerdiğini, ancak insan sütünün daha fazla laktoz içerdiğini, inek sütünün 12 aylıktan küçük bebeklere önerilmemesinin nedenlerinden birinin yüksek protein içeriği olduğunu

bildirmişlerdir.

İnek sütü, genç ve yetişkin insanlar için önemli bir besin kaynağıdır. Bos ve diğ. (2000) diyet proteinlerinin besin değerinin genellikle doku büyümesi ve bakımı için azot ve amino asit gereksinimlerinin karşılama yetenekleriyle ilgili olduğunu ve diyet protein kalitesinin, çeşitli faktörlerden ve özellikle amino asit bileşiminden ve ayrıca proteinin biyoyararlanımından etkilendiğini ifade etmişlerdir.

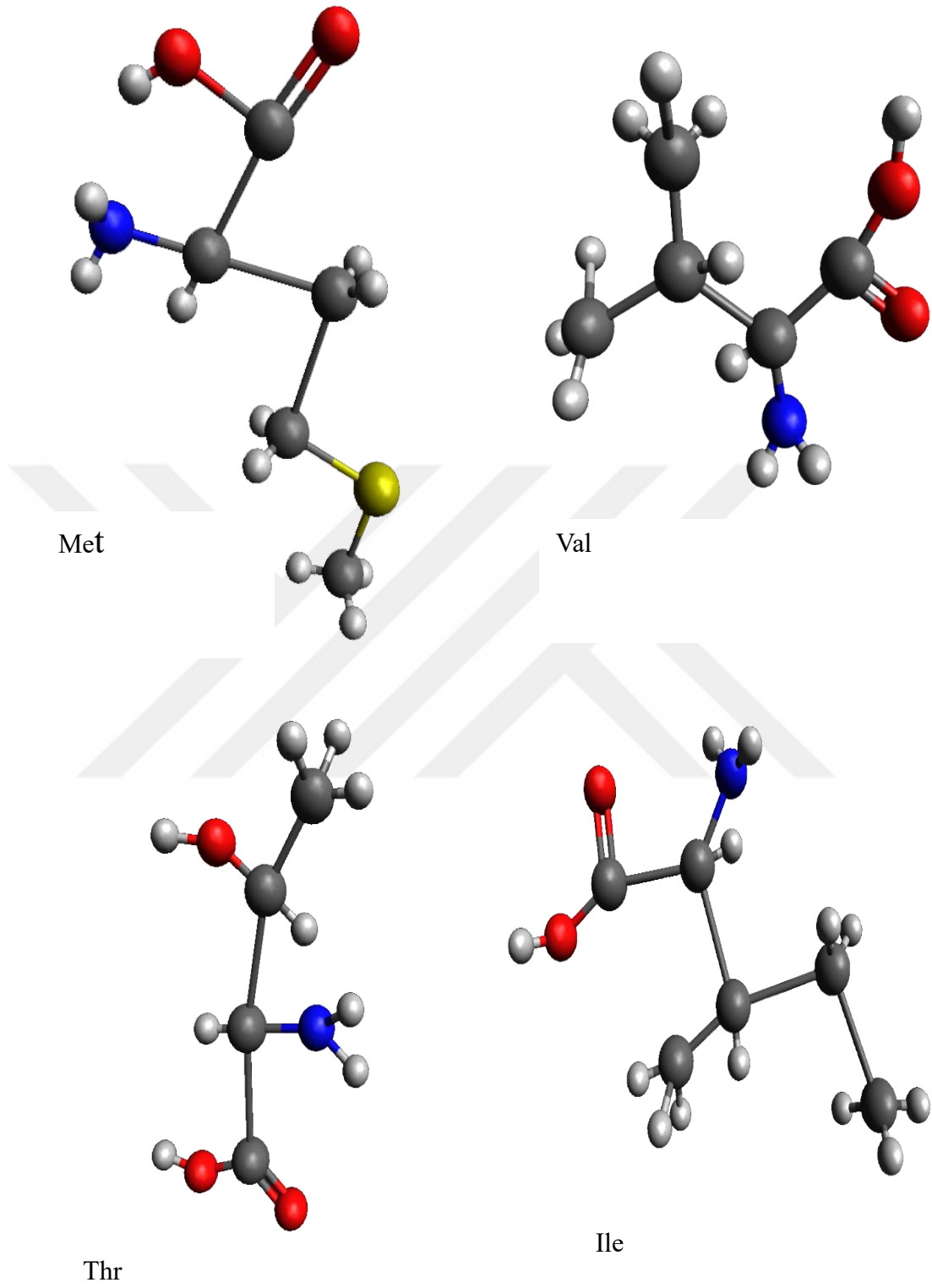
Muehlhoff ve diğ. (2013) inek sütündeki proteinin yüksek kalitede olduğunu ve maksimum büyümeyi destekleyen protein olarak tanımlandığını, lisin de dahil olmak üzere tüm temel amino asitlerin iyi bir dengesini içerdiğini, süt ve süt ürünlerinin temel diyetlere dahil edilmesinin, genel diyet kalitesinin iyileştirilmesi için elzem olduğunu ifade etmişlerdir.

2.2 Amino Asitler

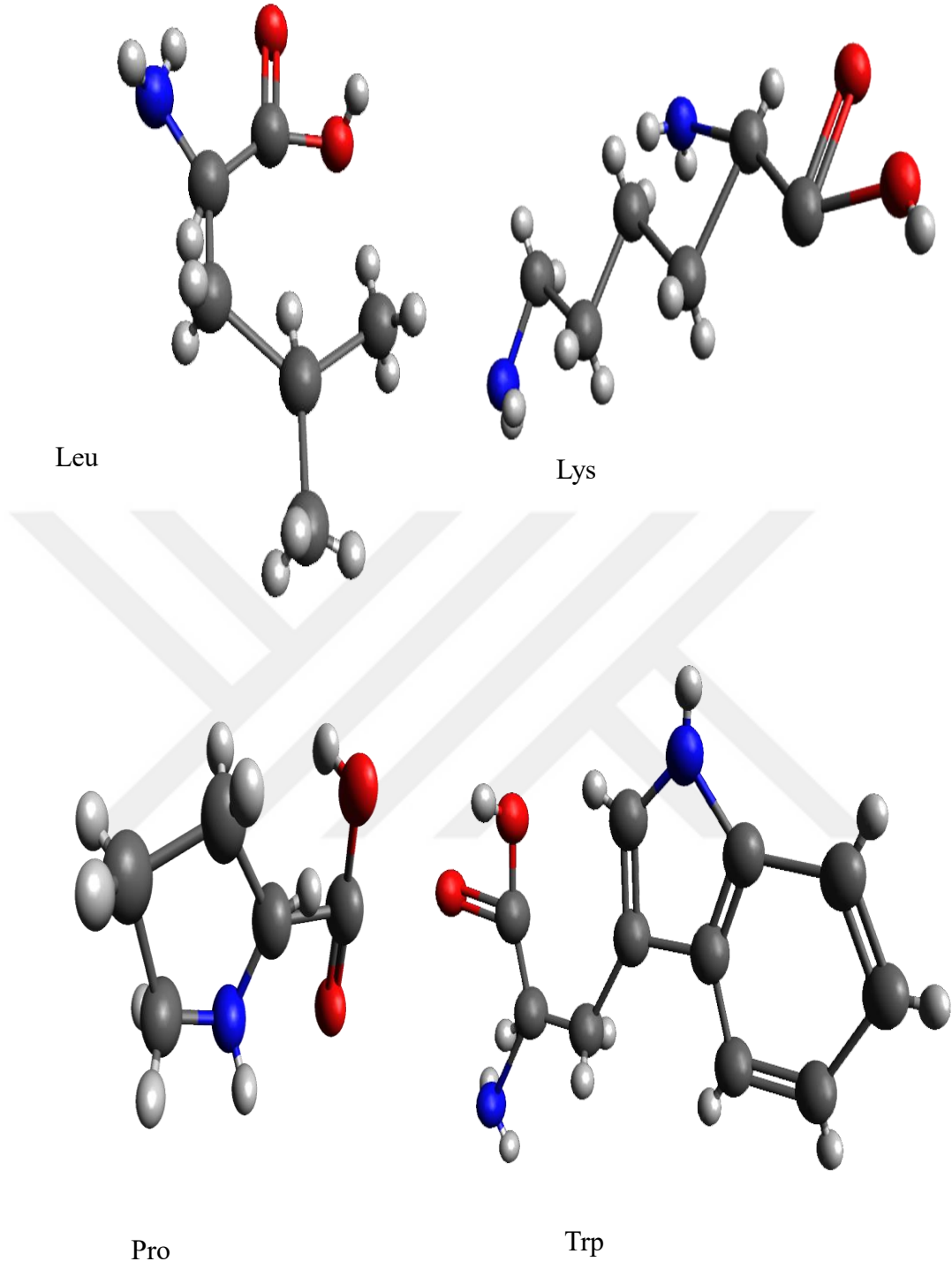
Proteinlerin yapıtaşı olan amino asitlerin yapılarında bir amino grubu ($-NH_2$), bir karboksil grubu ($-COOH$), bir hidrojen atomu (H) ve her amino asit için farklı bir R grubu bulunmaktadır. Amino asitlerin çözünürlüğünü, kimyasal reaktivliğini, hidrojen bağlama gücünü ve diğer bazı fizikokimyasal özelliklerini içerdiği R grubunun kimyasal doğası belirlemektedir. R grubu sadece hidrojenden oluşan Glisin amino asitler içerisinde en basit yapıya sahip olanıdır (Saldamlı, 2007). Dolayısıyla en düşük molekül ağırlığına sahip amino asit glisindir.

Amino asitler temel olarak esansiyel (Eksojen) ve esansiyel olmayan (Endojen) amino asitler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Esansiyel amino asitler vücudun sentezleyemediği ve gıdalar ile dışarıdan alınması zorunlu amino asitlerdir ve bu grupta yer alan amino asitler aynı zamanda esansiyel olmayan amino asitlerin sentezlenmesinde de görev almaktadır. Esansiyel amino asitlerin miktarına göre proteinler “biyolojik değeri yüksek” ya da “biyolojik değersiz” olarak değerlendirilmektedirler (Kavas ve Kınık 2005). Saldamlı (2007) tarafından bir proteinin beslenme bakımından kalite ölçütünün esansiyel amino asitleri miktarca ve sayıca yeterli oranda içermesine bağlı olduğu belirtilmiştir.

Esansiyel amino asitlerin moleküllerinin üç boyutlu şekilleri Met, Val, Thr, Ile için şekil 2.4’de ve Leu, Lys, Pro, Trp için şekil 2.5’de gösterilmiştir.



Şekil 2.4 : Esansiyel amino asitlerin üç boyutlu yapısı (Met,Val, Thr, Ile).



Şekil 2.5 : Esansiyel amino asitlerin üç boyutlu yapısı (Leu, Lys, Pro, Trp).

Proteinlerin yapısında bulunan lizin, treonin, metiyonin, valin, lösin, izolosin, fenilalanin ve triptofan; esansiyel amino asitleri oluşturmaktadır. İnsan vücudunun sentezleyemediği bu esansiyel amino asitlerin tümünü bileşiminde dengeli biçimde içeren inek sütü besinsel olarak, proteini yüksek kaliteli veya "tam bir protein" olarak kabul edilir. Yüksek kalitesi nedeniyle inek sütü proteininin, gıda proteinlerinin besleyici değerini değerlendirmek için standart bir referans protein olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Miller ve diğ, 2000).

Proteinler gıdalarla vücuda alındıktan sonra bir takım kimyasal reaksiyonlardan geçerek yapı taşları olan amino asitlerine ayrılır ve metabolizmada çeşitli amaçlara yönelik olarak kullanılır.

Esansiyel amino asitlerin özellikleri ve metabolizmada ki işlevleri hakkında aşağıda özet bilgi verilmiştir (Nollet ve diğ, 201; Saldamlı, 2007; Friedman, 2018; Ünal ve Besler, 2008).

Lisin; vücuttaki tüm proteinler için gerekli bir yapı taşıdır. Kalsiyum absorpsiyonunda, kas protein oluşumunda, yaraların iyileşmesinde, hormon ve enzimlerin üretilmesinde büyük rolü vardır. Tahıllar lizin açısından fakirken, baklagiller, yumurta, süt ve et lizin açısından zengin gıdalardır.

Metiyonin; vücuttaki temel kükürt kaynağıdır. Hemoglobin sentezinde rol oynar. Bu amino asidin noksanlığı bitkisel proteinin önemini sınırlayan faktördür.

Treonin; antikorların ve immünoglobulinlerin üretiminde yer alır. Tendon ve derideki bağ dokusunun önemli bir bileşenidir. Karaciğerde yağ birikimini önleyerek lipid metabolizmasına katılır.

Valin; kas dokunun onarılmasında rol almaktadır. Hayvansal gıdalarda önemli miktarda bulunur.

Lösin; doku ve kemiklerdeki yara iyileşmesini destekler, insulin sekresyonunu artırır, kan şekeri seviyesini düşürür. Tahıl proteinlerinde bol miktarda bulunur.

Isolösin; hemoglobin oluşumunda önemlidir. Bitkisel kaynaklı besinlerde yetersiz miktarda bulunur.

Fenilalanin; Organizmada tirozin amino asitine dönüşebilmektedir. Merkezi sinir sisteminde önemli görevlere sahiptir. Bazı insanlarda enzimatik sistemdeki bir eksiklik fenilketonuri hastalığına sebep olmaktadır. Bu hastalığa sahip kişiler fenilalanin içeren

gıdalara karşı duyarlılık göstermektedirler.

Triptofan; normal büyümede önemli bir rolü olan esansiyel bir amino asittir ve çeşitli biyoaktif bileşikler için *in vivo* öncü görevi görür.

Bazı gıdalarda miktar ve kalite açısından eksikliği duyulan amino asitler, gıdayı zenginleştirmek amacıyla ortama katılabilir. Bu amaçla kullanılan yapay amino asitlerin, kimyasal olarak sentezlenerek, protein hidrolizatından ayırarak veya mikrobiyolojik yöntemlerle üretilebileceği belirtilmiştir (Saldamlı 2007).

18 adet amino asitin molekül ağırlıkları ve kimyasal formülleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2: Amino asitlerin molekül ağırlıkları ve formülleri.

Amino asit	Moleküler Ağırlığı(g)	Formülü
Glycine	75,07	C ₂ H ₅ NO ₂
Alanin	89,09	C ₆ H ₅ NH ₂
Serin	105,09	C ₃ H ₇ NO ₃
Prolin	115,13	C ₅ H ₉ NO ₂
Valin	117,15	C ₅ H ₁₁ N ₀₂
Aspartik Acid	133,11	C ₄ H ₇ NO ₄
Losin	131,17	C ₆ H ₁₃ NO ₂
Isolosin	131,17	C ₆ H ₁₃ NO ₂
Glutamik Asit	147,13	C ₅ H ₉ NO ₄
Lisin	146,19	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂
Treonin	119,11	C ₄ H ₉ NO ₃
Metiyonin	149,21	C ₅ H ₁₁ N ₀₂ S
Histidin	155,15	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂
Fenilalanin	165,19	C ₉ H ₁₁ NO ₂
Arjinin	174,2	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂
Tirozin	181,19	C ₉ H ₁₁ NO ₃
Triptofan	204,23	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂
Sistin	240,29	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂

Otter (2012) tarafından dünya nüfusundaki hızlı büyümenin, kaliteli gıda proteini için benzeri görülmemiş bir talebe yol açtığı ve protein kalitesinin, hem büyümeyi hem de sağlığı desteklemek için gıda proteinlerinin beslenme yeterliliği olarak tanımlanabileceği ve artık genellikle proteinlerin amino asit bileşimlerinin analizi yoluyla değerlendirildiği belirtilmiştir.

Amino asitler polar özellikli olduklarından alkol gibi çözücülerde çözünürlükleri düşüktür, genellikle suda çözünseler de bazı amino asitler suda sınırlı oranda çözünür

ancak ortama asit ya da baz ilavesi ve ortamda diğer amino asitlerin bulunuşu çözünürlüklerini artırır.

2.3 Farklı Sütlerin Amino Asit Kompozisyonunu Karşılaştıran Çalışmalar

Sabhelkheir ve diğ. (2012) farklı türlerden elde edilen sütün protein konsatrasyonlarıyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olsa da toplam amino asit (protein bağlı ve serbest) kompozisyonu hakkında çok az sayıda sistematik çalışma olduğunu bildirmiştir.

Borshch ve diğ. (2018) tarafından Ukrayna'nın yerli saf sığır ırklarıyla melez ırklarının sütlerinin amino asit yönünden analiz edilerek karşılaştırıldığı bir çalışmada melez ırkların esansiyel amino asit oranı yerli ırklara göre %3,11-6,25 oranında daha yüksek bulunmuştur.

Mikailoğlu ve diğ. (2005) tarafından Azeri mandası sütünün Simental ırkı ineklerin sütüyle karşılaştırıldığı bir çalışmada Azeri mandası sütünde neredeyse bütün amino asitlerin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Ceballos ve diğ. (2009) mümkün olduğunca benzer koşullarda yetiştirilen inek ve keçi sütünün kompozisyonunun karşılaştırıldıkları bir çalışmada, 100 g sütte ki Tyr ve Ser miktarları arasındaki farklılık önemli bulunmazken ($P>0,05$), diğer tüm amino asitlerin keçi sütünde inek sütünden önemli oranda ($P<0,05$) yüksek olduğu bulunmuştur.

Mapekula ve diğ. (2011) tarafından Güney Afrika'da Nguni ve melez ırkların sütlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada Nguni ineklerinden elde edilen sütlerin erken ve orta laktasyon döneminde esansiyel amino asitler açısından çalışılan diğer ineklerden elde edilen sütlere göre daha zengin olduğu belirlenmiştir.

Mazhitova ve Kulmyrzaev (2016) ve Mazhitova ve diğ. (2015) tarafından yapılan Kırgız yerli cins kısıraklarından elde edilen sütlerin amino asit kompozisyonun araştırıldığı çalışmalarda analiz edilen sütlerde glutamik asit, lösin ve lisin en çok bulunan amino asitler olarak belirlenmiştir.

Rafiq ve diğ. (2016) tarafından eşek sütünün amino asit kompozisyonun incelendiği bir çalışmada, eşek sütünün kısırak ve inek sütü ile karşılaştırıldığında, muhtemelen daha düşük protein içeriği nedeniyle daha düşük amino asit içeriğine sahip olduğu

ancak esansiyel amino asitlerin toplam amino asitlere oranının eşek sütünde daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Ren ve diğ. (2015) Çin'deki üç farklı manda ırkının süt proteini, yağ, laktoz, toplam katı madde ve amino asit profillerini karşılaştırdıkları bir çalışmada lizin, izolösin, lösin, fenilalanin, sistin ve histidin konsantrasyonlarında önemli farklılıklar ($P<0,05$) gözlerken, metiyonin, valin, treonin, aspartik asit, serin, glutamik asit, prolin, glisin, alanin, tirozin, arjinin konsantrasyonlarında önemli farklılıklar ($P >0,05$) olmadığını bildirmişlerdir.

Schönfeldt ve diğ. (2012) tarafından ülkeye özgü süt kompozisyon verilerinin farklılık gösterdiği belirtilmiş ve farklı ülkelere özgü süt kompozisyon verileri derlenmiştir. Farklı ülkelerden inek sütlerinin amino asit kompozisyonlarının verildiği Çizelge 2.3'de görüldüğü gibi tüm ülkelerde inek sütlerinde en bol bulunan amino asit glutamik asit, yine en bol bulunan esansiyel amino asit lösin olmaktadır. Triptofan ise bütün ülkelerin sütlerinde en az miktarda bulunan esansiyel amino asit olarak görülmektedir.

Çizelge 2.3: Farklı ülkelerden inek sütlerinin amino asit kompozisyonları (mg/100g) (Schönfeldt ve diğ, 2012).

	Güney Afrika	ABD	Danimarka	Avusturalya Yeni Zellanda
Arjinin	123	75	120	121
Serin	186	107	190	210
Aspartik Asit	250	237	280	258
Glutamik Asit	689	648	680	690
Treonin	155	143	150	167
Glisin	70,8	75	70	67
Alanin	120	103	110	115
Tirozin	150	152	150	160
Prolin	308	342	330	330
Metiyonin	89,1	75	86	79
Valin	193	192	240	225
Fenilalanin	166	147	170	163
İsolösin	174	165	20	192
Lösin	306	265	330	324
Histidin	90,2	75	96	100
Lizin	257	140	310	274
Triptofan	39,3	75	46	42
Sistin	37,1	17	26	29

Zhou ve diğ. (2018) tarafından Çin'de üç farklı manda ırkı sütünün amino asit kompozisyonlarının karşılaştırdığı bir çalışma sonucunda, incelenen üç süt çeşidi için

de lösin, lizin, valin ve izölösün en bol esansiyel amino asitler; glutamik asit, prolin, aspartik asit ve serin en bol esansiyel olmayan amino asitler olarak tespit edilmiş ve manda sütünün zengin bir esansiyel amino asit kaynağı olduğu bildirilmiştir.

Berisha ve diğ. (2021) tarafından Balkan yarımadasının nesli tükenmekte olan Busha sığır ırkının amino asit kompozisyonu incelenmiş ve sütlerde esansiyel amino asitlerin önemli oranda bulunduğu ve diğer ırkların neredeyse hayatta kalamadığı dağlık bölgelerde yetişebilen bu ırkların bir an önce korumaya alınması gerektiği bildirilmiştir.

Türk Saanen, Kıl ve Malta keçisi ırklarından elde edilen sütlerin amino asit, mineral ve vitamin profillerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada tüm ırklarda yüksek düzeyde prolin, lösin, glutamik asit bulunmuş ve kıl keçisi sütlerinde tirozin hariç diğer tüm amino asitler diğer ırkların sütlerine göre daha yüksek bulunmuştur (Günay ve diğ, 2021).

2.4 Sütün Amino Asit Kompozisyonunun Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler

Geleneksel amino asit analizleri proteinlerin parçalanarak yapı taşları olan amino asitlere parçalanması için örneğin hidrolizi, ve türevlendirme sonrası kromatografik analiz ile gerçekleştirilmektedir.

Otter (2012) amino asit analiz yöntemlerinin çoğunda peptid bağlarının hidroliz edilmesi amacıyla 6 N hidroklorik asit (HCl) kullanılarak 72 saate kadar 100 ile 165 °C arasındaki sıcaklıklarda bekletmenin yıllardır büyük ölçüde değişmeyen yöntem olarak kaldığını ifade etmiştir. Ancak bu hidroliz koşullarının bazı amino asitler için optimum olmadığından, triptofan için ise uygun olmadığından, buna yönelik farklı hidroliz yöntemleri denenmiştir. Asit hidrolizi sırasında triptofan kaybını önlemek için bazı çalışmalar yapılmış olsa da, triptofan analizi için en yaygın ve en etkili yöntemin sodyum hidroksit (NaOH) ile alkali hidroliz olduğu bildirilmiştir (Ritota ve Manzi 2020).

Gıdalardaki amino asitlerin kromatografik analizinde iyon değiştirme sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisi gibi çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir ancak yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) açık ara en yaygın uygulanan teknik olmuştur.

Amino asitler yüksek polariteye ve düşük ultraviyole (UV) absorbansa sahiptir; bu nedenle, geleneksel ters fazlı HPLC-UV yöntemleri kullanılarak zayıf tutma, zayıf ayırma ve sınırlı dedeksiyon limitleri nedeniyle bunların saptanması ve doğru miktarlandırılması zordur. Bu zorlukların üstesinden gelmek için, HPLC yöntemlerinde, fotometrik algılama hassasiyetini ve kromatografik ayrımı geliştirmek için sıklıkla kolon öncesi veya sonrası ninhidrin veya o-ftalaldehit gibi güçlü kromofor grupları içeren reaktiflerle kimyasal türevlendirme kullanıldığı bildirilmiştir (Qui ve diğ, 2020).

Marino ve diğ. (2010), sütteki amino asitlerin analizi için hidroliz aşamasını farklı süre ve sıcaklıklarda deneyerek hızlı bir yöntem geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Hidroliz sıcaklığının artırılmasıyla hidroliz süresinin azaltıldığı bu hızlı yöntem, süt proteini hidrolizinden sonra yine amino asitlerin türevlendirilmesini ve HPLC ile tespit edilmesini içermektedir.

Amino asit analizindeki türevlendirme adımı, prosedürü karmaşık, zaman alıcı ve reaktif tüketen hale getirir. Yani analizin hem daha zahmetli hem de daha maliyetli olmasına neden olur. Amino asit analizinde LC-MS/MS kullanmanın bilinen diğer geleneksel yöntemlere göre avantajı amino asitlerin türevlendirme olmadan analiz edilebilmesine olanak sağlamasıdır.

Gıdaların amino asit analizindeki mevcut eğilim, LC-MS/MS cihazının avantajını kullanarak, türevlendirme olmaksızın amino asitleri analiz edebilen yöntemlerin geliştirilmesidir.

Thiele ve diğ. (2008), arpada türevlenmemiş amino asitlerin LC-MS/MS ile ölçümü için bir yöntem geliştirmiştir. Nimbalkar ve diğ. (2012) LC-MS/MS ile türevlendirme olmadan tahılda amino asit bileşimini analiz etmiştir. Kıvrak ve diğ. (2014), türevlendirme olmadan mantarların amino asit profilini analiz etmek için UPLC-MS/MS kullanmıştır. Kowalski ve diğ. (2017) ve Łozowicka ve diğ. (2021), türevlendirme aşaması olmaksızın LC-MS/MS tekniğine dayalı bir yöntemle balların amino asit profilini analiz etmişlerdir.

Bu çalışmaların tümünde, proteine bağlı olan amino asitlere değil, serbest amino asitlerin analizine odaklanılmıştır. Taş ve diğ. (2019), LC-MS/MS kullanarak oluşturdukları metot ile Türk fındık çeşitlerinde serbest ve proteine bağlı triptofan miktarını araştırmışlardır.

2.5 Süte Uygulanan Isıl İşlemler

Gıda endüstrisinde, ısıt işlemler genellikle ürünlerin raf ömrünü uzatmak için uygulanan önemli bir adımdır. Özellikle ısıt işlemlerin patojenik organizmaları ortadan kaldırmaya, mikrobiyolojik gelişmeyi en aza indirmeye ve bazı duyuusal özellikleri iyileştirmeye yardımcı olduğu bilinmektedir.

Bununla birlikte, ısıt işlemler gıdalarda biyokimyasal, fiziko-kimyasal ve duyuusal değışikliklere neden olabilir ve ardından ürünlerin nihai kalitesini olumsuz yönde etkileyebilir.

Süt endüstrisinde de patojen (hastalık yapan) mikroorganizmaları öldürmek, patojen olmayan fakat süt ve süt ürünlerinde bozulmaya neden olabilecek mikroorganizmaları sınırlandırmak amacıyla uygulanan ısıt işlemler sonucunda sütün yapısında kimyasal, besinsel ve organoleptik değışiklikler oluşmaktadır. Süt ve süt endüstrisinde pastörizasyon, klasik veya UHT sterilizasyon teknikleri gibi farklı ısıt işlemler yaygın olarak kullanılmaktadır.

Claeys ve diğ. (2013) tarafından ısıt işlemin sütün besin değerlerine zarar verdiğ ve hatta bazı zararlı etkilere neden olabileceğı algısının son zamanlarda çiğ süt tüketimine yönelik eğilimi arttırsa da çiğ sütün mikroorganizmalar için mükemmel bir gelişme ortamı oluşturduğı ve bu yüzden mikrobiyal güvenliği sağlamak ve raf ömrünü uzatmak amacıyla sütün ısıt işleme tabi tutulduğı belirtilmiştir.

Birçok ülkede ev koşullarında çiğ süt genellikle kaynatılarak işlenmektedir. Ev koşullarında yaygın olarak kullanılan geleneksel kaynatmanın süt üzerine etkileri hakkında diğ ısıt işlemlere göre çok daha kısıtlı bilgi olsa da kaynatmanın etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Tremonte ve diğ. (2014) tarafından İtalya'da ve farklı sanayileşmiş ülkelerde, “doğal tüketme” ve “yerel satın alma” yönündeki mevcut eğilim sayesinde, çiğ süt tüketiminin oldukça popüler hale geldiğı ve İtalya'da 2014 yılından beri çiğ süt satışına izin verildiğı belirtilmiş ve kaynatma, mikrodalga işlemleri ve soğutmanın sütün mikrobiyolojik kalitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiş, çiğ sütü kaynatmanın mikrobiyolojik kalite açısından önemli olduğı ancak sütün besin değerinde olumsuz etki yaptığı bildirilmiştir.

László ve diğ. (2018) tarafından çiğ sütte bulunan veteriner ilaç kalıntılarının kaynatıldıktan sonra ısıyla bozunması üzerine LC-MS çalışması yapılmış, kaynatmanın bazı antibiyotiklerin kısmi degradasyonuna sebep olsa da antibiyotik kalıntıları yönünden tüketicinin sağlığına yönelik potansiyel riskleri ortadan kaldırmadığı bildirilmiştir.

Kuboka ve diğ. (2019) Nairobi'de ticareti yapılan çiğ sütte aflatoksin M1 oluşumu üzerine kaynatma ve fermentasyonun etkisini araştırdıkları çalışmada, sütü kaynatma işleminin aflatoksin M1 üzerinde etkisi olmadığını gözlemlemişlerdir.

Efigênia ve diğ. (1997) kaynatılmış, pastörize ve UHT süt kullanılarak deneysel örneklerle hazırlanan diyetlerle beslenen farelerin karaciğerindeki *in vitro* protein sentezi oranını incelemişlerdir. Kaynatılmış, pastörize ve UHT süt örnekleriyle beslenen farelerin karaciğerlerinde, deney koşullarında çiğ sütle karşılaştırıldığında protein sentez oranını %62 ile %72 arasında bulmuşlar, kontrol çiğ süt ile karşılaştırıldığında sadece kaynatmanın protein sentezine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmişlerdir.

Khan ve diğ. (2017) tarafından ısıl işlem görmüş inek ve manda sütünün antioksidan kapasitesi ve yağ asitleri karakterizasyonunu incelemek amacıyla pastörize edilen ve 1 dk süre ile kaynatılan sütler karşılaştırılmış ve her iki işlemin de sütlerde antioksidan kapasitesi, E vitamini, A vitamini, çinko, selenyum ve duyusal özellikleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Hazra ve diğ. (2021) tarafından kaynatma ve ultrasonikasyonun sütteki antioksidan aktivite, kazein partikül boyutu ve sütün beyazlığı üzerindeki etkileri üzerine karşılaştırmalı bir çalışma yapılmış, 15 dk kaynatılmış sütte, 20 kHz'de 150 W'da 10 dakika (JY92-IIN) sonikasyona tabi tutulularak hazırlanmış ultrasonik süte göre kazein bozunmasının, antioksidan aktivitede azalmanın daha fazla olduğu, ultrasonik sütün kaynamış süte göre daha beyaz olduğu belirtilmiştir.

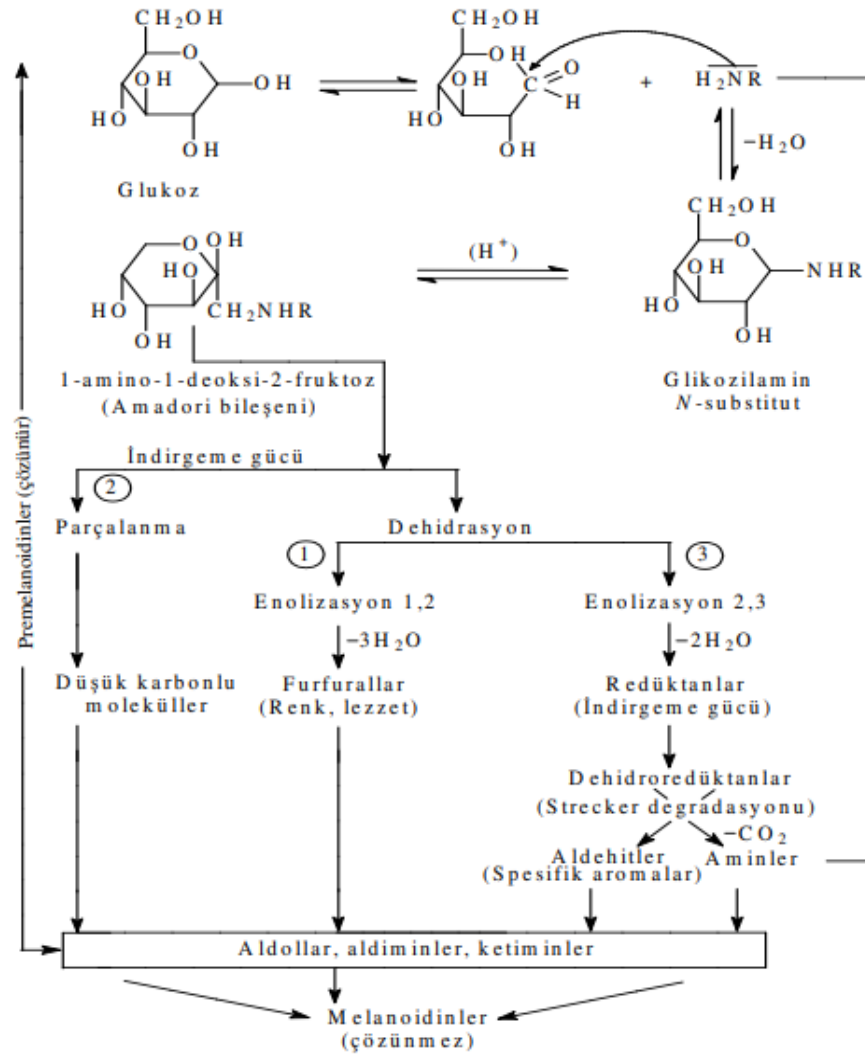
2.5.1 Maillard reaksiyonu

Isıl işlem uygulamalarıyla proteinlerin serbest amino grupları ile indirgen şekerlerin serbest aldehit grupları arasında enzimatik olmayan Maillard reaksiyonu meydana gelmektedir.

Martins ve diğ. (2001) Maillard reaksiyonunu, aroma, tat ve renk üzerine olan etkisiyle, gıdaların pişirilmesinde yiyeceklerin görünüşünü ve tadını iyileştirmede önemli bir rol oynayan, özellikle kahve ve kakao çekirdeklerinin kavrulması, tahılların kızartılması, fırıncılık ürünlerinin ve etin pişirilmesi gibi geleneksel işlemlerde, gıda endüstrisinde önemli zorluk oluşturan, kontrol edilmesi zor ve karmaşık bir reaksiyon olarak bildirmiştir.

Maillard reaksiyonları proteinlerin sindirilebilirliğinde ve amino asit biyoyararlanımında azalmaya neden olmakta ve besinsel kayıplara yol açmaktadır (Malec ve diğ, 2002).

Maillard reaksiyonunun şeması Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6 : Maillard reaksiyonu şeması (Alais ve Linden, 1991; Oral, 2006).

Van Boekel (1998) sütte maillard reaksiyonun ilk aşamasında laktozun (açık zincirli formda bir aldehit olarak), proteine bağlı lisinin amino grubuyla bir Schiff bazı oluşturduğunu ve Amadori ürünü olan laktosillisine dönüştüğünü ve bu aşamada lisin yararlanabilirliği kayba uğrarken neredeyse hiçbir renk ve lezzet kaybı olmadığını belirtmiştir.

Van Boekel (1998) ve Stanciuc (2010) sütte Maillard reaksiyonunun sonuçlarını aşağıdaki şekilde özetlemişlerdir.

1. Sindirim için artık mevcut olmayan lisin kalıntılarının blokajı (erken, ileri ve son Maillard reaksiyonu), sindirilebilirliğin azalması ve enzimlerin inhibisyonu nedeniyle besleyici değer kaybı,
2. Esas olarak Amadori bileşiğinin bozulmasından kaynaklanan düşük moleküler fisyon bileşikleri (ileri Maillard reaksiyonu) olan aroma bileşiklerinin oluşumu,
3. Gelişmiş Maillard reaksiyonunda antioksidatif bileşiklerin oluşumu;
4. Mutajenik, ayrıca antimutajenik ve antikanserojenik bileşiklerin oluşumu,
5. Antibakteriyel bileşikler oluşabilmesi,
6. Isıtılmış inek sütünün antijenikliğin, inek sütüne alerjisi olan kişilerde azalabilmesi,
7. Maillard reaksiyonu nedeniyle süt proteinlerinin polimerizasyonu
8. Melanoidinlere bağlı olarak kahverengi bir renk gelişimi (ileri ve son Maillard reaksiyonu).

Hegele ve diğ. (2008) Maillard reaksiyonu ürünlerinin birtakım yararları olsa da, gıda endüstrisinin, protein glikasyonu ile ilgili bazı dezavantajlarla, her şeyden önce, esansiyel amino asit lisinin modifikasyonu nedeniyle biyolojik olarak kullanılamaz hale gelmesi sonucu proteinlerin besin değeri kaybına uğraması ile başa çıkmak zorunda olduğunu belirtmişlerdir. Süt ve süt ürünlerinin, protein fraksiyonunun yüksek lisin içeriği ve glikasyon reaksiyonlarını destekleyen indirgeyici disakkarit laktozun varlığı nedeniyle Maillard reaksiyonundan etkilendiğini ve bu yüzden süt ve süt ürünlerindeki glikasyon ürünlerini belirlemek için çok sayıda farklı analitik yaklaşım kullanıldığını bildirmişlerdir.

Maillard reaksiyonunun ilk aşamasında oluşabilen furozin, karboksimetillisin, laktuloz, furfural ve ileri aşamada oluşan HMF ısıtıl işlem göstergeleri olarak kabul edilmektedir (Martins ve diğ, 2001; Ames, 1998, Van Boekel, 1998).

Maillard reaksiyon ürünlerinin saptanmasının, modifiye veya bloke edilmiş lisin ve mevcut lisin olarak adlandırılan modifiye edilmemiş lisin miktarı hakkında bilgi sağladığı için süt ve süt ürünlerinin besin değerinin ve kalite kontrolünün değerlendirilmesi açısından önemli olduğu ve UHT süt ve pastörize süt gibi hafif ısıtıl işlem görmüş gıdaların besin kalitesinin değerlendirilmesinde karboksimetillisin, HMF, pirralin ve pentosidinin en yaygın kullanılan belirteçler olduğu bildirilmiştir (Erbersdobler ve Somoza, 2007; Mehta ve Deeth, 2016).

Pellegrino ve diğ. (1994) tarafından sütteki yağın artmasıyla furozinin azaldığı bildirilmiştir.

Morales ve Jiménez-Pérez (1999) tarafından ise sütteki yağın artmasıyla HMF'nin azaldığı gözlemlenirken, furozin ve HMF'nin Maillard reaksiyonunun erken evrelerinin belirteçleri olduğu, ancak furozinin doğrudan laktulosillisinin asidik bozunmasından HMF'nin ise 3-deoksiosülozların kimyasal ayrışmasından olmak üzere farklı şekillerde oluştuğu ifade edilmiştir.

Maillard reaksiyon ürünlerini azaltmaya ve önlemeye yönelik araştırmalar da yapılmaktadır. Prestel ve diğ. (2020) tarafından ultra yüksek sıcaklıkta işlenmiş sütte berry özlerinin karboksimetillisin ve lisin üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmada; Maillard reaksiyon ürünü N ε-(karboksimetil)-L-lisin (CML) ve lisini gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) yöntemi ile tespit edebilen metot geliştirilmiş ve geliştirilen metotla kontrol numunesinde ısıtıl işlemden önce tespit edilen lisin miktarının ısıtıl işlemden sonra tespit edilen lisin miktarından yüksek olduğu, ısıtıl işlemden önce berry ilave edilen sütlerde ise ısıtıl işlemden sonra ölçülen lisinin nihai konsantrasyonunun, ısıtıl işleme tabi tutulmamış kontrol sütüyle istatistiksel olarak benzer olduğu gözlemlenmiştir.

2.5.2 HMF oluşumu

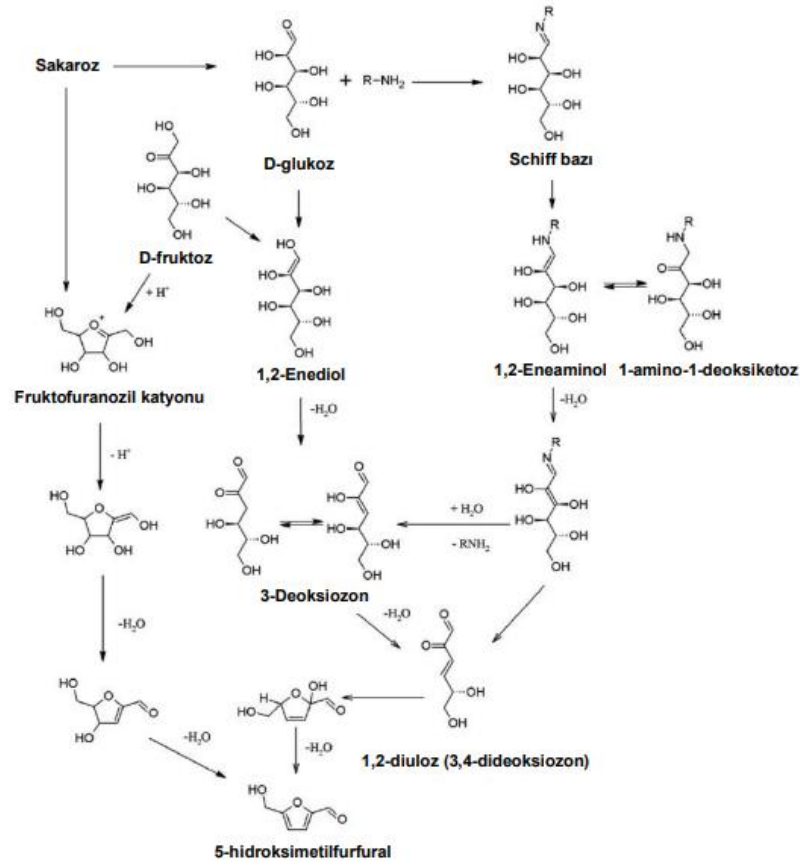
Isıl işlem uygulanan sütlerde Maillard reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan en bilinen ve en yaygın ara ürünlerden biri olan HMF'nin sütlere uygulanan ısıtıl işlem şiddetinin ve kalitenin belirlenmesinde kullanıldığı bildirilmiştir (Van Boekel, 1998, Berg ve Van Boekel, 1994, Erbersdobler ve Somoza, 2007, Özdal ve diğ, 2018).

Erbersdobler ve Somoza (2007) HMF'nin sadece Maillard reaksiyonundan değil, aynı zamanda şekerlerin izomerizasyonu ve ardından bozunması ile de oluştuğunu ve UHT süt ile yapılan çalışmalarda HMF analizlerinin ısı etkisinin hızlı ve basit bir göstergesi olarak kullanılabilirliğini gösterdiğini bildirmişlerdir.

HMF oluşum mekanizması Şekil 2.7'te gösterilmiştir. HMF molekülü bir hidroksil grubu, bir karbonil grubu ve bir furan halkası içermektedir.

Morales ve diğ. (1999) sütte bulunan HMF miktarının sütün besin içeriğine, ısı işlemin yoğunluğuna ve saklama koşullarına bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Ulbricht ve diğ. (1984) yüksek konsantrasyonlarda alındığı zaman HMF'nin toksik etkiye ilaveten göz, üst solunum yolu, deri ve mukoz membranlarında tahrişe neden olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar HMF'nin kanserojenik ve mutajenik etkileri olduğunu da göstermiştir (Schoental ve diğ, 1971; Lee ve diğ, 1995; Surh ve Tannenbaum, 1994). Tüm bu olumsuz etkilerinden dolayı gıdalardaki HMF oluşumu pek çok araştırmanın konusu olmuştur.



Şekil 2.7 : HMF oluşum mekanizması (Perez-Locas ve Yaylayan, 2008; Capuano ve Fogliano, 2011; Masatçıoğlu, 2013).

Son yıllarda, yüzlerce gıda örneği üzerinde yapılan çeşitli çalışmaların gıdalarda yüksek seviyelerde (1-9,5 g/kg) HMF bulunabildiğini gösterdiği, Oral ve diğ. (2015) tarafından ifade edilmiştir.

Urgu ve diğ. (2017) tarafından piyasada yer alan farklı markalara ait pastörize ve UHT süt örneklerinin HMF miktarları yönünden incelendiği bir çalışmada HMF değerleri pastörize süt örneklerinde 1,15-4,78 $\mu\text{mol/L}$, UHT süt örneklerinde 2,16-12,74 $\mu\text{mol/L}$, laktozsuz süt örneklerinde ise 27,35-35,73 $\mu\text{mol/L}$ aralığında tespit edilmiştir. Laktozsuz süt örneklerinde HMF değerinin daha yüksek olmasının nedeni, bu sütlerde laktozun enzimatik hidrolize uğrayarak daha yüksek reaktiviteye sahip olan glikoz ve galaktoza dönüşmesi ve böylece lisinlerle daha hızlı reaksiyona girmesi olarak belirtilmiştir.

Morales ve diğ. (1996) tarafından pastörize ve UHT sütlere uygulanan ısı işlemin amino asit düzeylerine olan etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, lisin ile HMF arasında önemli bir ilişki olduğu belirlenmiş ve sütlerde yararlanılabilir lisin miktarının HMF oluşumu ile azaldığı tespit edilmiştir.

HMF miktarına depolama sıcaklığı ve süresi de etki etmektedir. Oral ve diğ. (2012) tarafından çeşitli pekmez örneklerinin farklı sıcaklıklarda depolama sırasında HMF düzeylerinin incelendiği çalışmada depolama süresi ve sıcaklığına bağlı olarak örneklerde ki HMF düzeylerinin arttığı raporlanmıştır.

Cais-Sokolińska ve diğ. (2004) tarafından farklı sıcaklıklarda depolanan süt örneklerinde HMF miktarının incelendiği çalışmada $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'de ve $8\pm 1^\circ\text{C}$ 'de bekletilen süt örneklerinde HMF miktarının değişmediği, oda sıcaklığında 24 hafta bekletilen UHT süt örneklerinde ise HMF miktarının iki katına çıktığı gözlemlenmiştir.

Yanmış ve Coşkun (2018) tarafından farklı sıcaklıktaki ısı işlem ve depolamanın keçi sütündeki etkisini inceleyen bir çalışmada yüksek sıcaklıkta pastörize edilen sütlerin HMF değeri düşük sıcaklıkta pastörize edilen sütlere göre daha yüksek bulunmuş, 4°C 'de 10 gün boyunca depolamanın ise sütlerin HMF düzeylerini önemli oranda ($P>0,05$) değiştirmedeği bildirilmiştir.

Gıdalarda HMF oluşumunu azaltmaya yönelik olarak da bazı çalışmalar yapılmıştır. Oral ve diğ. (2015) tarafından, bazı gıda maddelerinin HMF düzeylerini belirlemek ve biyolojik olarak parçalanmasını sağlayarak HMF düzeylerini azaltmaya yönelik olarak yapılan bir çalışmada, kahve beyazlatıcı, kapuçino, sıcak çikolata, hazır kahve, hazır

toz karışım (kahve, kahve beyazlatıcı ve şeker) ve aromatize kakao HPLC kullanılarak HMF analizine tabi tutulmuş ve örneklerin ortalama HMF seviyeleri, kahve beyazlatıcı için 12,59 mg/kg, kapuçino için 572,49 mg/kg, sıcak çikolata için 660,29 mg/kg, hazır kahve için 1804,91 mg/kg, hazır toz karışım için 871,56 mg/kg ve aromatize kakao için 980,94 mg/kg olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda, laktik asit kültürlerinin eklenmesinin, numunelerin HMF içeriğini, HMF biyolojik bozunmasının bir sonucu olarak yaklaşık %25 oranında azalttığı belirtilmiştir.

2.5.3 HMF tespitinde kullanılan yöntemler

Morales ve diğ. (1996) HMF tespitinde kolorimetrik yöntemler kullanılabilse de kromatografik yöntemlerin çok daha hassas ve seçici olduğunu ifade etmişlerdir.

HMF tespitinde HPLC uzun yıllardan beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar kullanılan en yaygın teknik olmuştur. Bu teknikte çoğunlukla yaklaşık 280-285 nm'de furfurallerin güçlü absorpsiyonundan dolayı ultraviyole (UV) dedeksiyonu kullanılır ve gıdalarda doğal olarak bulunan veya oluşan birçok bileşik de bu dalga boyunda emilebildiğinden, bu bileşiklerin zayıf kromatografik çözünürlüğü, UV tespiti sırasında HMF'nin miktarını olumsuz etkileyebilmektedir (Gökmen ve Şenyuva, 2006).

Son zamanlarda gıdalardaki HMF tespitine yönelik olarak kütle spektrometresi başta olmak üzere çeşitli teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikler gıdalarda oluşan çok daha düşük seviyelerde ki HMF düzeylerini de tespit edebilmektedir.

Gökmen ve Şenyuva (2006) tarafından bebek mamalarında HMF analizi için LC-MS kullanarak bir yöntem geliştirmiş ve incelenen örneklerden süt bazlı bebek mamalarında <1,0 µg/g seviyesinde, tahıl bazlı bebek mamalarında ise 0,17 ile 57,18 µg/g aralığında HMF tespit edilmiştir.

Chen ve Yan (2009) diyot dizi dedektörü (DAD) ile kapiler elektroforez (CE) kullanarak süt numunelerinde HMF ve melaminin eş zamanlı tespiti için bir analitik yaklaşım geliştirmiş ve geliştirdikleri yöntemi valide etmişlerdir.

Qin ve diğ. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada ısıtılmış deniz ürünlerinde HMF ve akrilamidin eş zamanlı ölçümü için LC-MS/MS tekniği kullanılarak bir metot geliştirilmiş ve geliştirilen metodun LOQ seviyesi 4,86 ng/mL

olarak belirlenmiştir. Geliştirilen metot ile analiz edilen örneklerde 12,54 ile 2276,44 µg/kg seviyelerinde HMF saptanmıştır.

Jozinović ve diğ. (2019) tarafından gıda endüstrisi yan ürünleri ile zenginleştirilmiş mısır ürünlerinde eş zamanlı olarak akrilamid ve HMF tayini için, Gökmen ve Şenyuva (2006) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek, LC-MS/MS kullanılarak geliştirilen yöntem ile incelenen ürünlerde en yüksek HMF değeri 6069 ± 789 ng/g düzeyinde elma posasında bulunmuştur.

Cui ve diğ. (2020) tarafından GC-MS/MS sistemi ve QuEChERS tekniği kullanılarak süt bazlı ürünlerde furfural oluşumuna ısıtma işlemi ve fermentasyon işlemlerinin etkilerinin araştırıldığı ve uygulanan metotta HMF tespit limitinin 20 µg/kg olarak belirlendiği bir çalışmada pastörize ve UHT süt örneklerinde HMF oluşumu tespit edilememiş, furfural, 2-acetylfuran, 5-methyl-2-furfural ise çok düşük seviyelerde tespit edilmiştir. Analiz edilen süt tozu ve rekonstitüe süt ve rekonstitüe yoğurt numunelerinde ise dört furfural değişen oranlarda bulunmakla birlikte genel eğilimin miktarsal olarak $HMF > Furfural > 5\text{-methyl-2-furfural} > 2\text{-acetylfuran}$ şeklinde sıralandığı bildirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Süt Örneklerinin Alınması

Çalışma kapsamında, Siyah Alaca, Simental ve Esmer ırkı süt örnekleri Bursa Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği vasıtasıyla üyesi olan işletmelerden temin edilmiştir.

Yerli Kara ırkı süt numuneleri Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi aracılığıyla Ankara'nın Çamlıdere ilçesinde yetiştiricilerin koruma altına alınmış sürülerinden, Boz Irk süt numuneleri Bandırma Hayvancılık Araştırma Enstitüsü aracılığıyla Bursa'nın Mustafakemalpaşa ilçesinde bir yetiştiricinin koruma altına alınmış sürüsünden temin edilmiştir.

Örnek alma planı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1: Örnek alma planı.

	Laktasyon Aralığı	Laktasyon Evresi	1.Örnek	2. Örnek	3. Örnek	4.Örnek
Boz Irk	1. veya 2.	erken (10-60 gün)				
		geç (120-250 gün)				
	3. veya 4.	erken (10-60 gün)				
		geç (120-250 gün)				
Yerli Kara	1. veya 2.	erken (10-60 gün)				
		geç (120-250 gün)				
	3. veya 4.	erken (10-60 gün)				
		geç (120-250 gün)				
Simental	1. veya 2.	erken (10-60 gün)				
		geç (120-250 gün)				
	3. veya 4.	erken (10-60 gün)				
		geç (120-250 gün)				
Siyah Alaca	1. veya 2.	erken (10-60 gün)				
		geç (120-250 gün)				
	3. veya 4.	erken (10-60 gün)				
		geç (120-250 gün)				
Esmer	1. veya 2.	erken (10-60 gün)				
		geç (120-250 gün)				
	3. veya 4.	erken (10-60 gün)				
		geç (120-250 gün)				

Beş ırkın her birinden 1. ve 2. laktasyonun erken dönemlerinden (10-60 gün aralığı) 4'er örnek ve ileri dönemlerinden (120-250 gün aralığı) 4'er örnek; 3.laktasyon ve daha ileri laktasyonlardan yine laktasyonun erken dönemlerinden (10-60 gün aralığı) 4'er örnek ve ileri dönemlerinden (120-250 gün aralığı) 4'er örnek olmak üzere ırk başına 16 adet, toplamda 80 adet süt örneği toplanmıştır.

Örnekler 250 mL'lik amber renkli numune kaplarına alınmıştır. Her hayvandan iki kap olacak şekilde temin edilen örnekler analize alınıncaya kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2 Kullanılan Kimyasallar

Her bir amino asit standardı tek olarak (Gly, Ala, Ser, Pro, Val, Thr, Leu, Ile, Asp, Lys, Glu, Met, His, Phe, Arg, Tyr, Cys, Trp) Sigma Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Aynı zamanda, eşit konsantrasyonlarda 2,5 µmol/L Gly, Asp, His, Ser, Arg, Lys, Glu, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Leu, Ile, Met ve Phe ve 1,25 µmol/L Cys içeren amino asit standart karışımı Waters (Milford, MA, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Tek olarak temin edilen Trp standardı 2,5 µmol/L düzeyinde hazırlanmış ve amino asit standart karışımına bire bir oranda ilave edilmiştir. Daha sonra kalibrasyon standartları, bu karışımın %0,1 (v/v) formik asit içeren metanol (MeOH):su (20:80, v/v) ile seri seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

Amonyum format ($\geq 99\%$) Fluka (Buchs, İsviçre) firmasından satın alınmıştır. LC-MS dereceli metanol, HCl, formik asit ve NaOH Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır.

HMF standardı Merck (Schuchardt OHG, Hohenbrun, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Analizlerde kullanılan ultra saf su Elga, Purelab Su Arıtma Sistemi (ELGA Lab Water, Veolia Technologies, High Wycombe, Buckinghamshire, UK) kullanılarak elde edilmiştir.

3.3 Amino Asit Analizi

Sütlerdeki amino asit bileşiminin belirlenmesi, amino asitleri serbest hale getirmek için proteinlerin hidrolizi ve serbest hale geçen aminoasitlerin analizi ve miktarlandırılması olmak üzere iki adımdan oluşmuştur. Çalışmada örneklere hem asidik hidroliz hem de bazik hidroliz uygulanmıştır.

Proteinlerin hidrolizinden sonra serbest hale geçen amino asitlerin miktarlandırma işlemi LC-MS/MS cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 LC-MS/MS analizi

Amino asitlerin spektrometrik tespiti amacıyla bir elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı, bir Shimadzu LC20AD pompası, bir Shimadzu CTO-10ASvp kolon fırını, bir Shimadzu Nexera X2 SIL-30AC otomatik örnekleyici ve PC yazılımı, LabSolutions versiyon 5.97 ile birleştirilmiş bir Shimadzu LCMS-8040 üçlü kuadrapol kütle spektrometresi (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) kullanılmıştır.

Kromatografik ayırma, InertSustain AQ-C18 kolonu (3 µm, 4.0 x 150 mm) ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan LC-MS/MS cihazının görseli Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1 : LC-MS/MS (Shimadzu LCMS-8040).

Hedef amino asitlerin konsantrasyonu, ESI temelli çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanılarak belirlenmiştir.

Her amino asidin (~1 mg/L) 0,1 N HCl içindeki çözeltileri, optimal MS koşullarını belirlemek amacıyla ayrı ayrı hazırlanmıştır. ESI kaynağı pozitif iyon modunda çalıştırılırken kolon çıkarılmış olarak LC/MS sistemine her 1 mg/L amino asit çözeltisinden 1 µL enjekte edilerek her bir amino asitin moleküler iyonları belirlenmiştir.

Optimum öncü iyonların (m/z), çarpışma enerjisinin (V), Q1 ve Q3 voltajlarının (V) ve ürün iyonlarının (m/z) belirlenmesi LabSolution yazılımı kullanılarak optimize edilmiştir.

Amino asitlerin analizi için optimize edilen LC-MS/MS parametreleri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2: 18 amino asit için optimize edilen LC-MS/MS parametreleri.

Amino Asit	Alıkonma zamanı (dk)	Dwell zamanı (ms)	Öncü iyon (m/z)	Ürün iyon (m/z)	Çarpışma Enerjisi (V)	Niteleyici iyonlar (m/z)
1 Lisin	2.24	15	147.2	83.9	18	129.9,55.9
2 Histidin	2.41	53	156.1	110.1	15	
3 Glisin	2.44	53	76,2	30.1	13	
4 Cystine	2.43	25	241.2	74.1	28	
5 Sistin	2.49	53	106.2	60.1	14	
6 Arjinin	2.49	53	175.3	70.1	24	
7 Aspartik Asit	2.54	53	134.2	74.2	16	
8 Treonin	2.64	25	120.1	74.0	12	
9 Alanin	2.59	53	90.1	44.1	13	
10 Glutamik asit	2.76	15	147.5	83.9	16	101.9,55.8
11 Prolin	3.16	53	116.1	70.1	16	
12 Valin	4.41	25	118.1	72.1	13	55
13 Methiyonin	5.75	53	150.2	104.1	12	
14 Isolösin	8.57	117	132.1	69.1	19	
15 Tirozin	8.69	117	182.1	165.0	11	
16 Lösin	8.77	57	132.1	43.1	24	86
17 Fenilalanin	9.52	57	166.1	120.0	15	103
18 Triptofan	9.86	57	205.1	188.0	10	146

Her bir amino asidin en yüksek yoğunluklu iyonları miktar tayini amacıyla kullanılmıştır. Her bir amino asit için belirlenen öncü iyonların ve kantifikasyon için kullanılan ürün iyonların yanı sıra lisin ve glutamik asit için ikişer adet, valin, lösin, fenilalanin ve triptofan için ise birer adet niteleyici iyon da belirlenmiştir.

Analizler, çoklu reaksiyon izleme (MRM) kullanılarak ESI pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. Amino asit analiz metodu için cihazda kullanılan kütle spektrometresi parametreleri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3:Amino asit analizi kütle spektrometresi parametreleri.

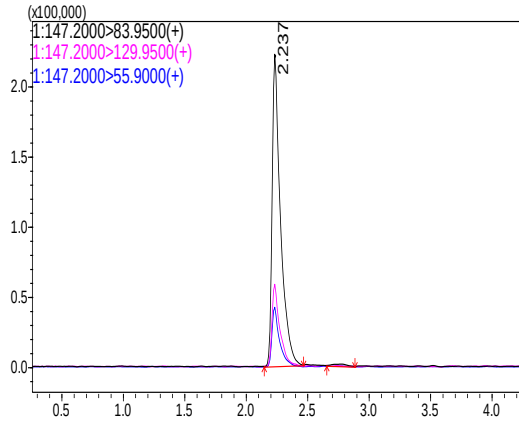
Nebulize edici gaz akışı	3,0 L/dak
Kurutucu gazı akışı	10 L/dak;
DL sıcaklığı	250°C
Isı bloğu sıcaklığı	400°C
CID gas	230 kPa

Optimize edilen HPLC parametrelerinin yer aldığı Çizelge 3.4'te belirtilen koşullarda 12 dakikalık geçiş süresince kromatografik olarak 18 adet amino asiti analiz edilebilmesine imkan sağlanmıştır.

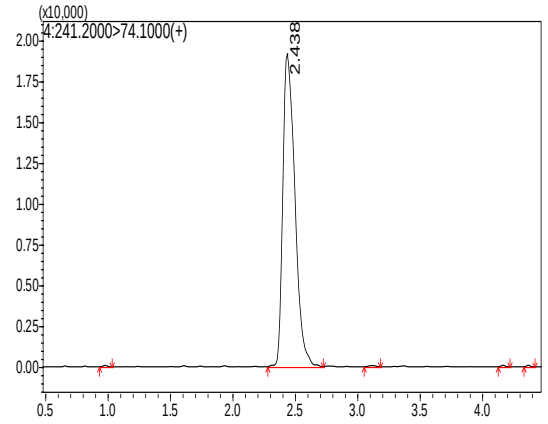
Çizelge 3.4: Amino asit analizi için optimize edilen HPLC parametreleri.

Sabit Faz	InertSustain AQ-C18 analytical column (4.0 × 150 mm, 3 µm)
Haraketli Faz	A: %0,1 formik asit ve 0,1 mM amonyum format içeren su B: %0,1 formik asit ve 0,1 mM amonyum format içeren MeOH
Akış	0.5 ml /dk
Kolon Sıcaklığı	40°C
Enjeksiyon Hacmi	5 µl
Geçiş zamanı	12 dk
Haraketli Faz Akış Programı	0–4.0 dk, 1–1% B; 4.0–5.0 dk, 1–15% B; 5.0–7.0 dk, 15–60% B; 7.00–7.01 dk, 60–1% B; 7.01–12.00 dk, 1–1% B

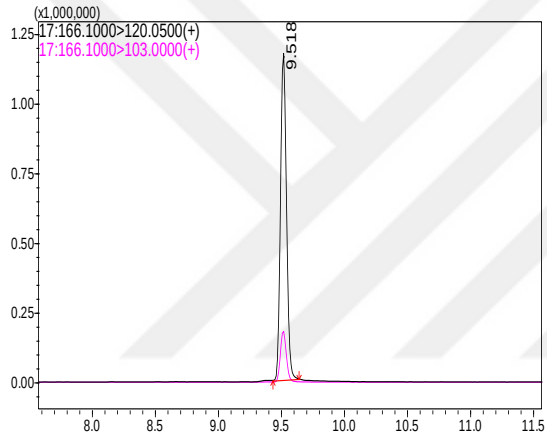
Lys, Cys, Phe, Trp, Met, Ileu kromatogramları Şekil 3.2'de, Val, Pro, Asp, Thr Ala, Glu kromatogramları Şekil 3.3'te, Tyr, Leu, His, Gly, Ser, Arg kromatogramları Şekil 3.4'te verilmiştir.



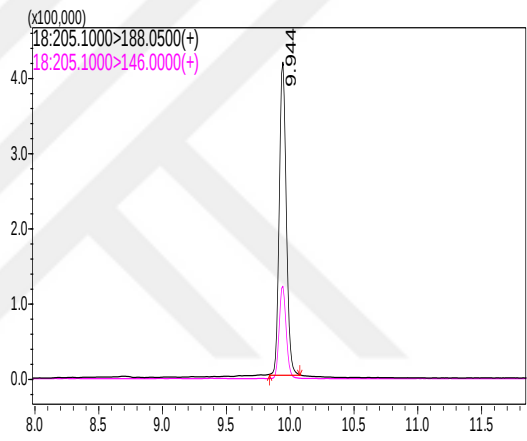
Lys



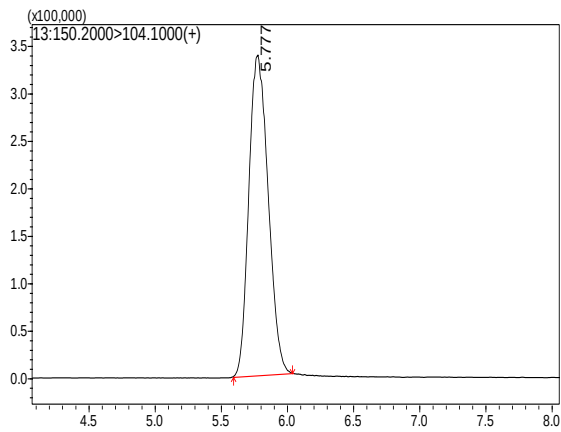
Cys



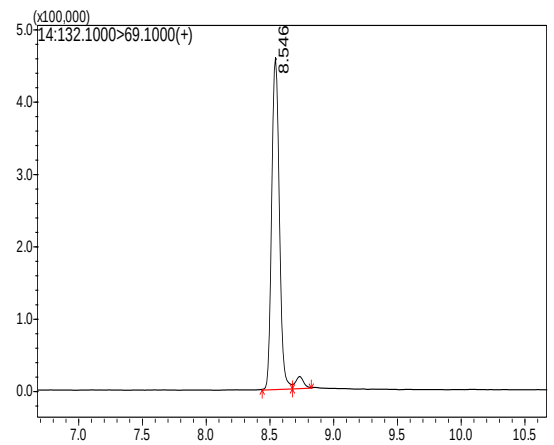
Phe



Trp

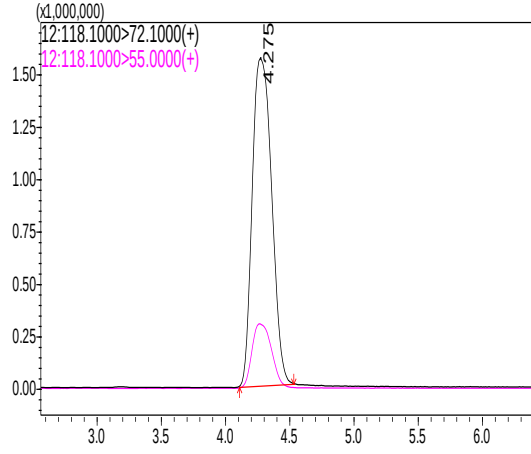


Met

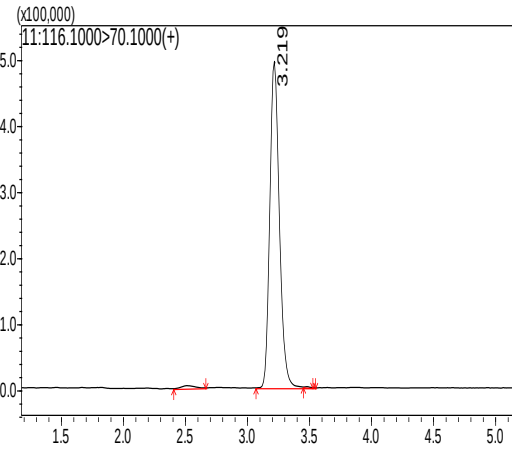


Ileu

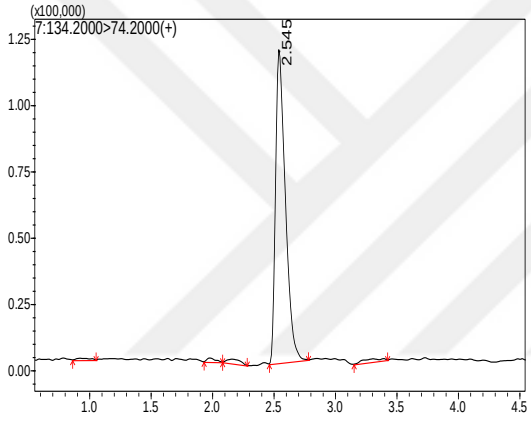
Şekil 3.2 : Lys, Cys, Phe, Trp, Met, Ileu kromatogramları.



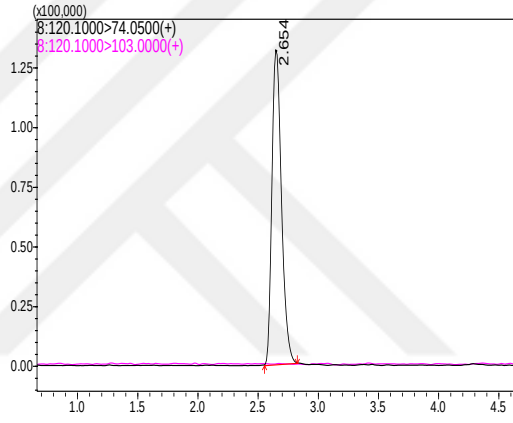
Val



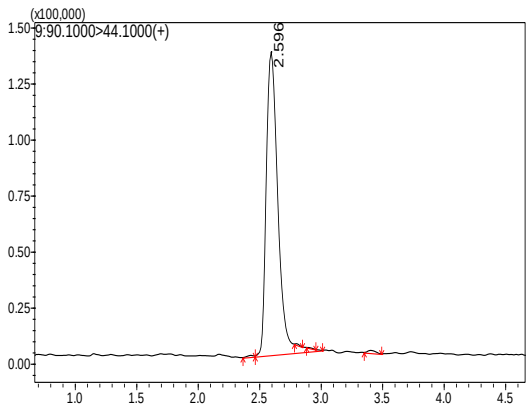
Pro



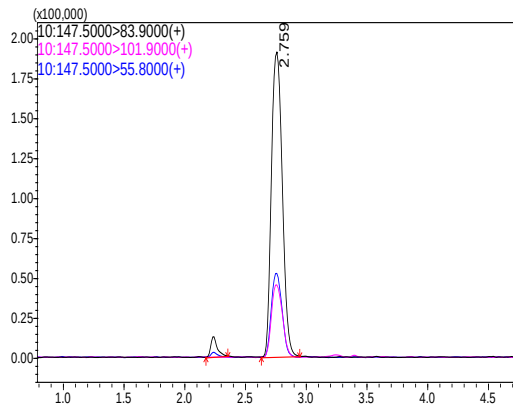
Asp



Thr

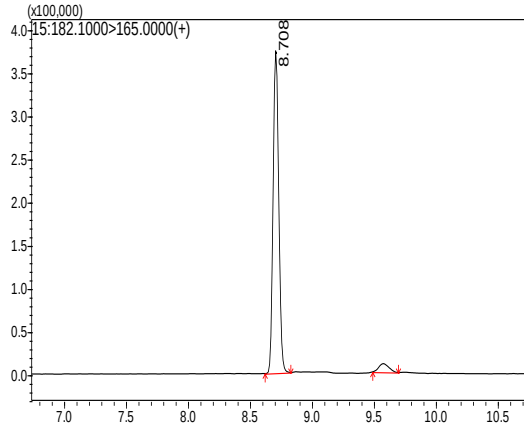


Ala

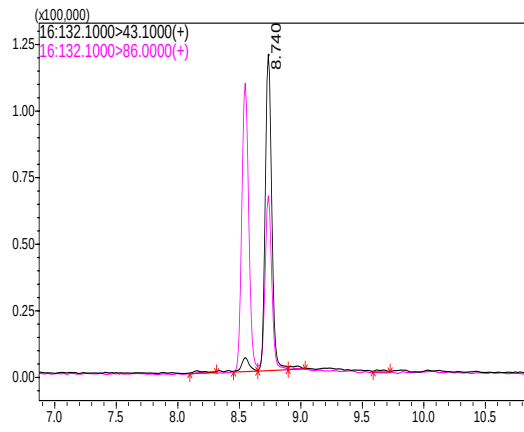


Glu

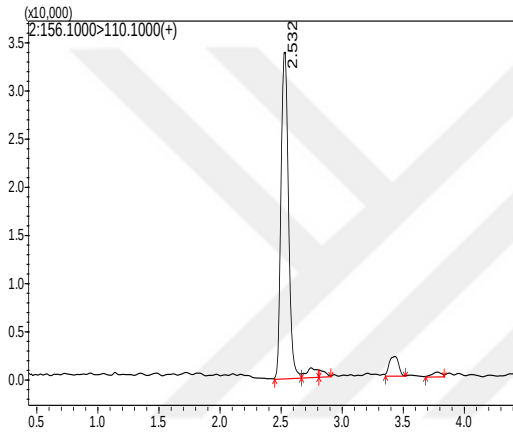
Şekil 3.3 : Val, Pro, Asp, Thr Ala, Glu kromatogramları.



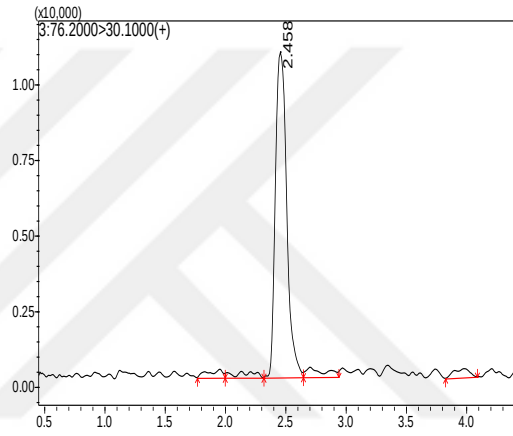
Tyr



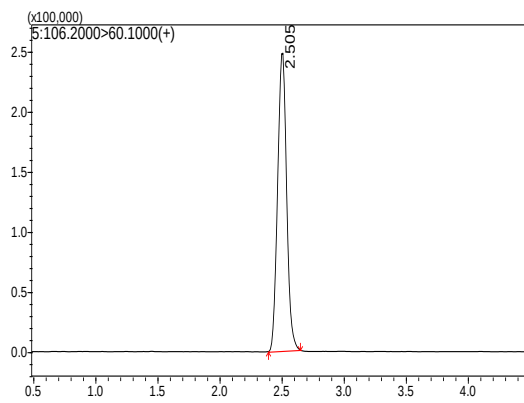
Leu



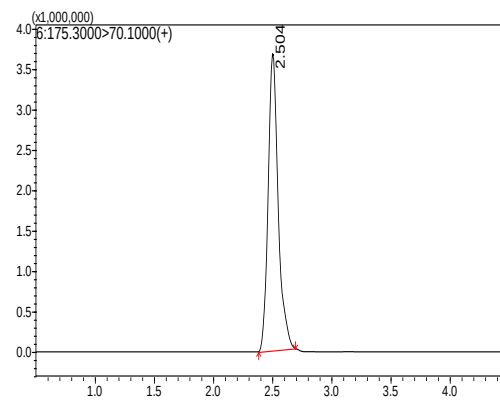
His



Gly



Ser



Arg

Şekil 3.4 : Tyr, Leu, His, Gly, Ser, Arg kromatogramları.

Sabit faz olarak kullanılan InertSustain AQ-C18 analitik kolon yüksek polar bileşikler için güçlü tutma yeteneğine sahiptir.

Oluşturulan metot ile kromatografik olarak 18 adet amino asidi analiz etme imkanı oluşmuştur. Ancak proteine bağlı triptofan amino asidi, asidik hidrolizde tahrip olup hidrolizatta bulunmadığından, triptofanı analiz etmek amacıyla ayrı ekstraksiyon koşulları uygulanması gerekmiştir. Bu nedenle triptofan analizleri için alkali hidroliz yapılarak hazırlanan örnek aynı analitik metot kullanılarak cihaza ayrıca enjeksiyon yapılmıştır.

3.3.2 Validasyon

Analitik yöntem doğrusallık, kesinlik (tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik) ve ölçüm limiti (LOQ) bakımından değerlendirilmiştir.

Ölçülecek amino asitlerin her biri sütte yüksek seviyelerde mevcut olduğundan tespit limiti (LOD) değerlendirmeleri gerekli görülmemiştir. LOQ, sinyal/gürültü oranı ≥ 10 seviyesinde bir pik veren analit miktarı olarak tanımlanmıştır.

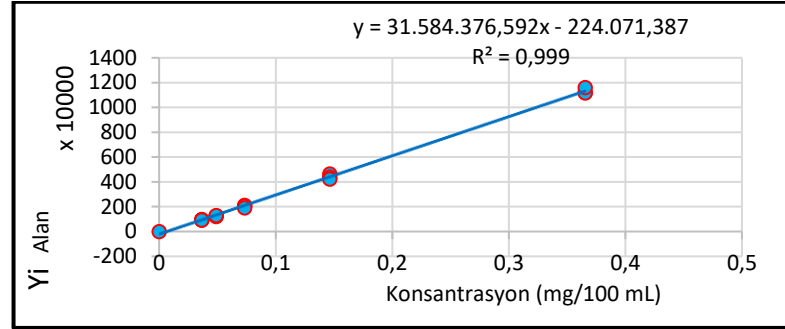
Yöntemin tekrarlanabilirliğini (gün içi kesinlik) değerlendirmek için aynı süt altı kez bağımsız olarak analiz edilmiştir ve cihaza enjeksiyon yapılarak analiz sonuçları hesaplanmıştır. Bu işlem, tekrarüretilebilirliği (günler arası kesinlik) değerlendirmek için üç gün tekrarlanmıştır. Tüm varyasyonlar, bağıl standart sapma RSD olarak ifade edilmiştir. Her amino asit için doğrusallık, en az beş noktalı standart kalibrasyon eğrisi ile belirlenmiştir. Hazırlanan kalibrasyon noktalarının her biri cihaza üçer kez enjekte edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Lisin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.5'te; histidin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.6'da; glisin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.7'de; sistin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.8'de, serin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.9'da verilmiştir.

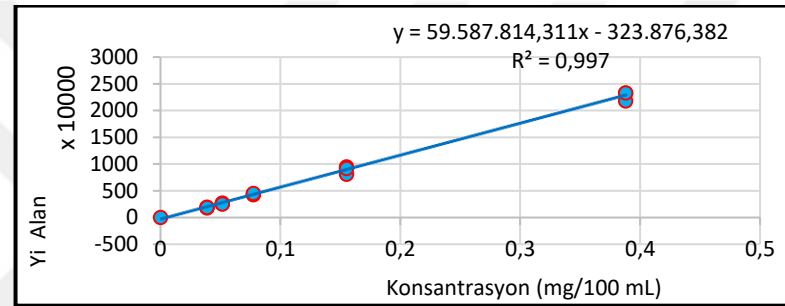
Arjinin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.10'da; aspartik asit kalibrasyon eğrisi Şekil 3.11'de; treonin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.12'de; alanin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.13'de; glutamik asit için kalibrasyon eğrisi Şekil 3.14'de verilmiştir.

Prolin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.15'de; valin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.16'da, metiyonin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.17'de; isolösin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.18'de; verilmiştir.

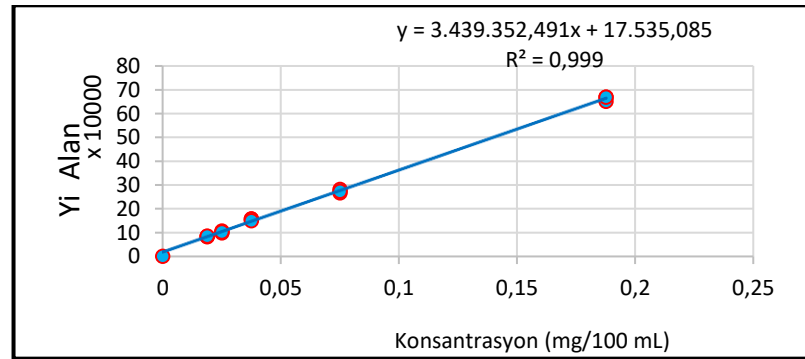
Tirozin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.19’da; lösin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.20’de; fenilalanin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.21’de; triptofan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.22’de verilmiştir.



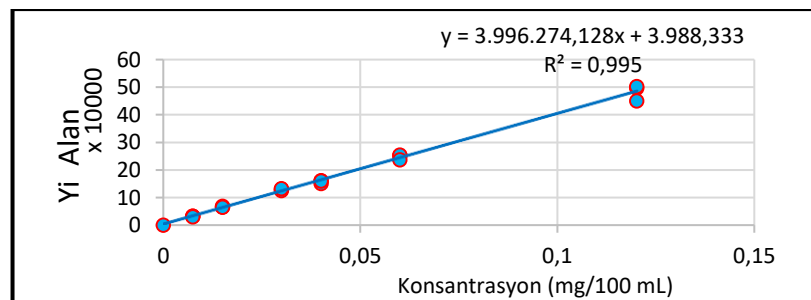
Şekil 3.5 : Lisin kalibrasyon eğrisi.



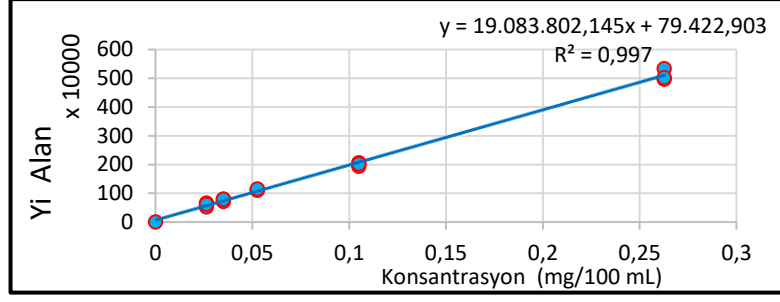
Şekil 3.6 : Histidin kalibrasyon eğrisi.



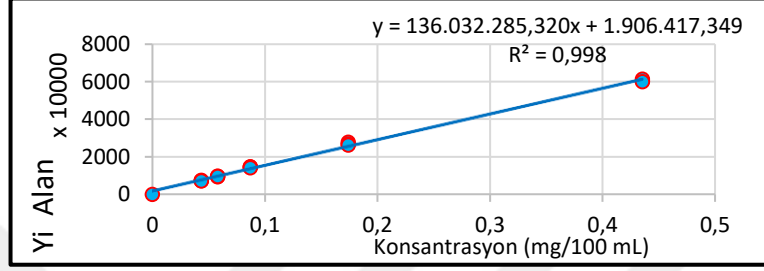
Şekil 3.7 : Glisin kalibrasyon eğrisi.



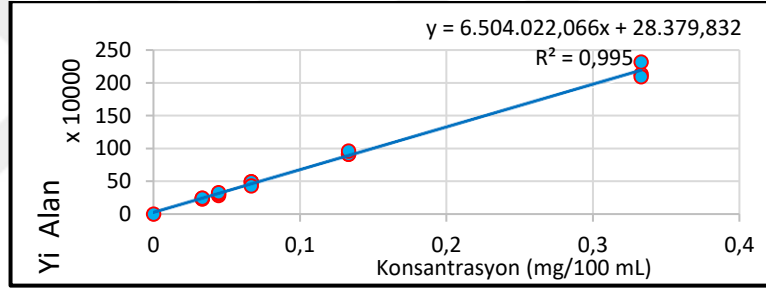
Şekil 3.8 : Sistin kalibrasyon eğrisi.



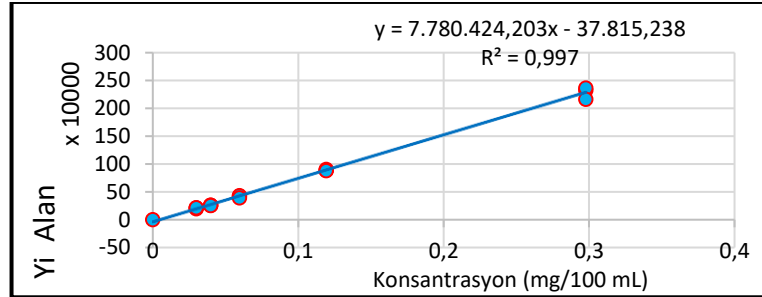
Şekil 3.9 : Serin kalibrasyon eğrisi.



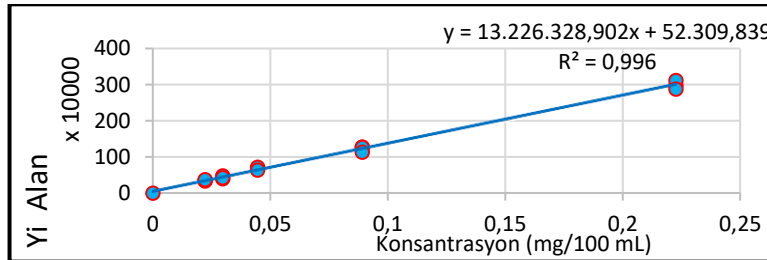
Şekil 3.10 : Arjinin kalibrasyon eğrisi.



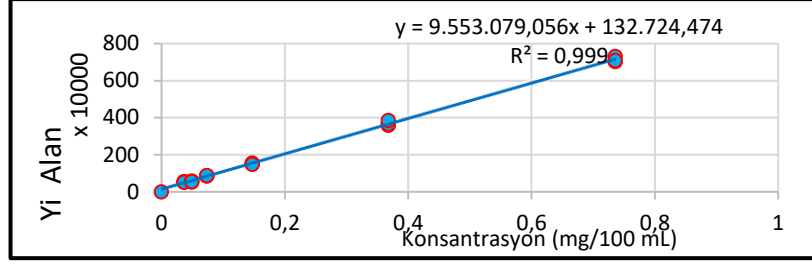
Şekil 3.11 : Aspartik asit kalibrasyon eğrisi.



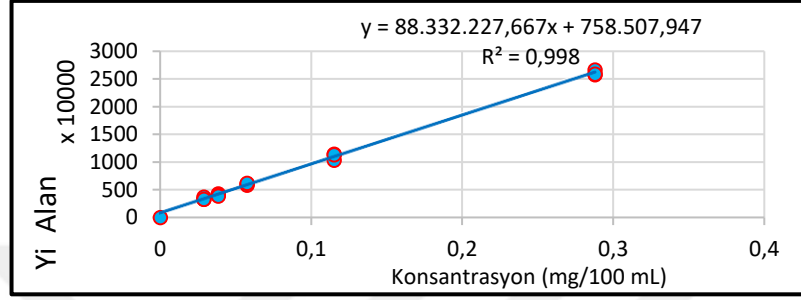
Şekil 3.12 : Treonin kalibrasyon eğrisi.



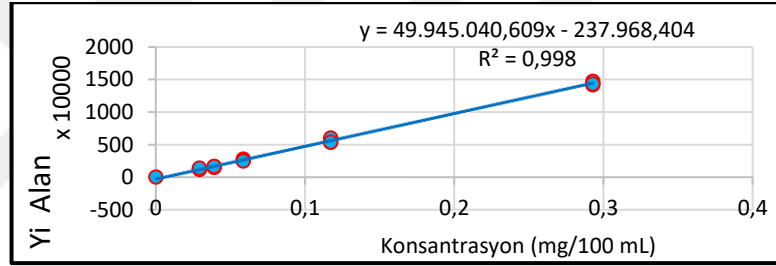
Şekil 3.13 : Alanin kalibrasyon eğrisi.



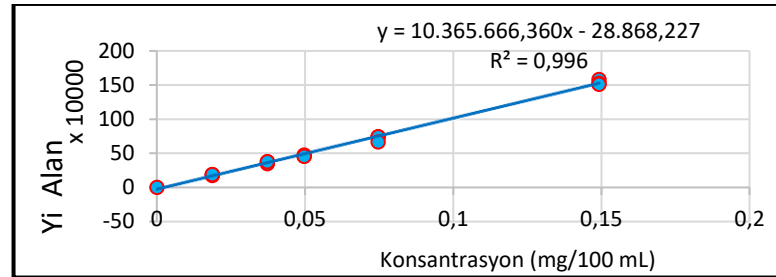
Şekil 3.14 : Glutamik asit kalibrasyon eğrisi.



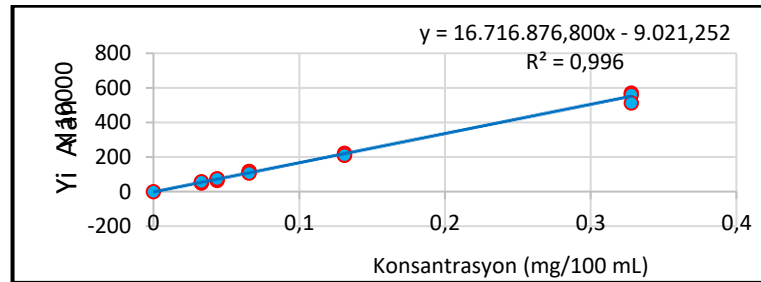
Şekil 3.15 : Prolin kalibrasyon eğrisi.



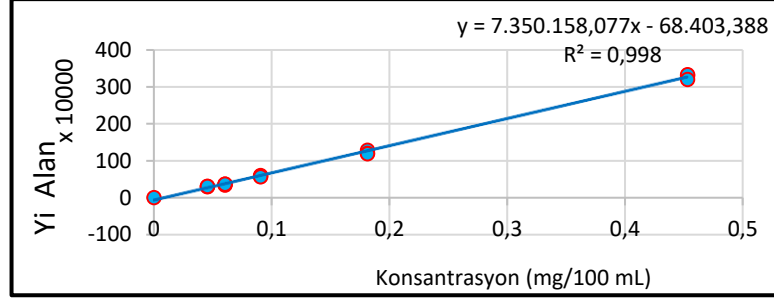
Şekil 3.16 : Valin kalibrasyon eğrisi.



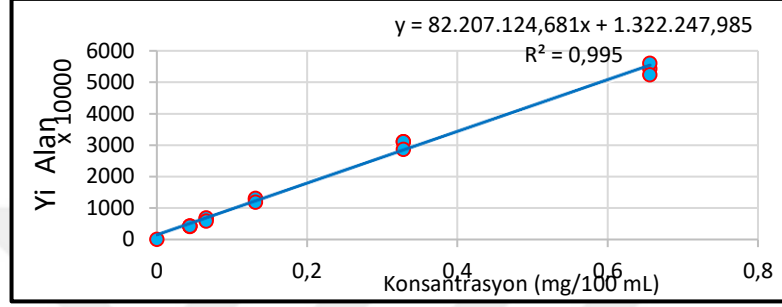
Şekil 3.17 : Metiyonin kalibrasyon eğrisi.



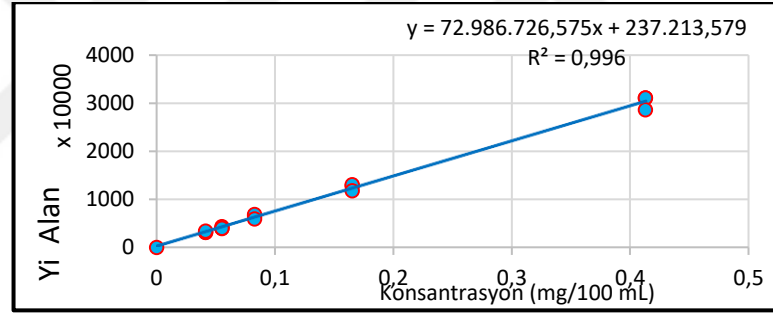
Şekil 3.18 : Isolösün kalibrasyon eğrisi.



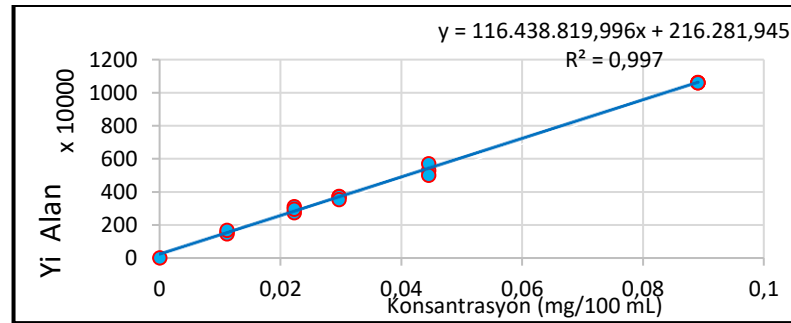
Şekil 3.19 : Tirozin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 3.20 : Lösin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 3.21 : Fenilalanin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 3.22 : Triptofan kalibrasyon eğrisi.

Her bir amino asit için en az beş noktalı kalibrasyon eğrilerini oluşturan kalibrasyon noktaları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5: Amino asitlerin kalibrasyon noktaları.

Amino asit	Kalibrasyon noktaları (nmol/mL)
Lisin	2,5-3,3-5-10-25
Histidin	2,5-3,3-5-10-25
Glisin	2,5-3,3-5-10-25
Sistin	0,3125-0,625-1,25-1,66-2,5-5
Serin	2,5-3,3-5-10-25
Arjinin	2,5-3,3-5-10-25
Aspartik Asit	2,5-3,3-5-10-25
Treonin	2,5-3,3-5-10-25
Alanin	2,5-3,3-5-10-25
Glutamik Asit	2,5-3,3-5-10-25-50
Prolin	2,5-3,3-5-10-25
Valin	2,5-3,3-5-10-25
Metiyonin	1,25-2,5-3,3-5-10
Isolösin	2,5-3,3-5-10-25
Tirozin	2,5-3,3-5-10-25
Lösin	3,3-5-10-25-50
Fenilalanin	2,5-3,3-5-10-25
Triptofan	1,25-2,5-3,3-5-10

3.3.3 Örnek hazırlama

Asit hidrolizi sırasında asparajin ve glutamin sırasıyla tamamen aspartik asit ve glutamik aside dönüştüğü ve tirozinin kısmen tahrip olurken serin ve treonin kısmen hidrolize olduğu bildirilmiştir (Fountoulakis ve Lahm 1998). Asit hidrolizi 17 amino asit için optimal olmasa da, Gorissen ve diğ. (2018) tarafından çeşitli protein kaynakları arasında karşılaştırmalar için kullanıldığı gibi farklı ırklara ait sütlerin bileşiminde yer alan 17 adet amino asidi analiz etmek amacıyla asidik hidroliz uygulanmıştır. Asit hidrolizi sırasında triptofanın parçalanması ve oluşan hidrolizatta triptofanın bulunmaması nedeniyle sütlerde ki triptofan miktarlarını analiz etmek için sütlere alkali hidroliz de uygulanmıştır.

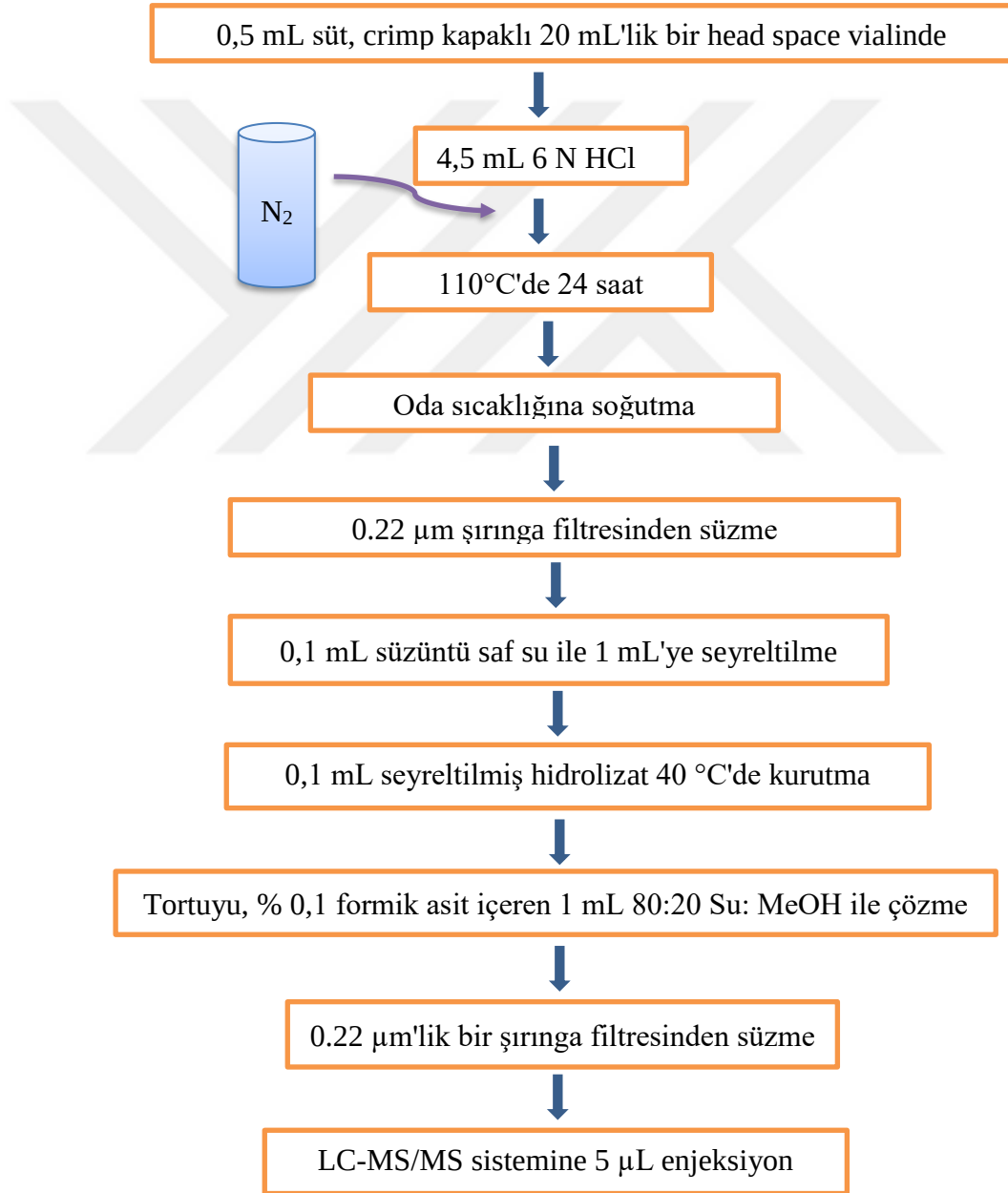
Analize alınacak süt örnekleri öncelikle 30°C'de su banyosunda çözülmüştür. Homojen örnek almak amacıyla sütler karıştırılmıştır.

3.3.3.1 Asidik hidroliz

Çözülmüş ve karıştırılmış süttten 0,5 mL örnek, crimp kapaklı 20 mL'lik bir head space vialine alınmıştır. Üzerine 4,5 mL 6 N HCl eklenmiştir. Vialin içerisindeki havayı uzaklaştırmak amacıyla vial azot gazı uygulanmıştır. Vialler sıkıca kapatılmış ve

hidroliz aşamasının gerçekleşmesi amacıyla 110°C'de 24 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. Hidroliz tamamlandıktan sonra vialler oda sıcaklığına soğutulmuş ve vial içeriği 0.22 µm şırınga filtresinden süzölmüştür. 0,1 mL süzöntü alınmış ve saf su ile 1 mL'ye seyreltilmiştir. 0,1 mL seyreltilmiş hidrolizat temiz bir cam tüpe aktarılmış ve 40 °C'de Nitrojen Turbo Evaporatörde (Biotage, TurboVap®LV) kurutulmuştur.

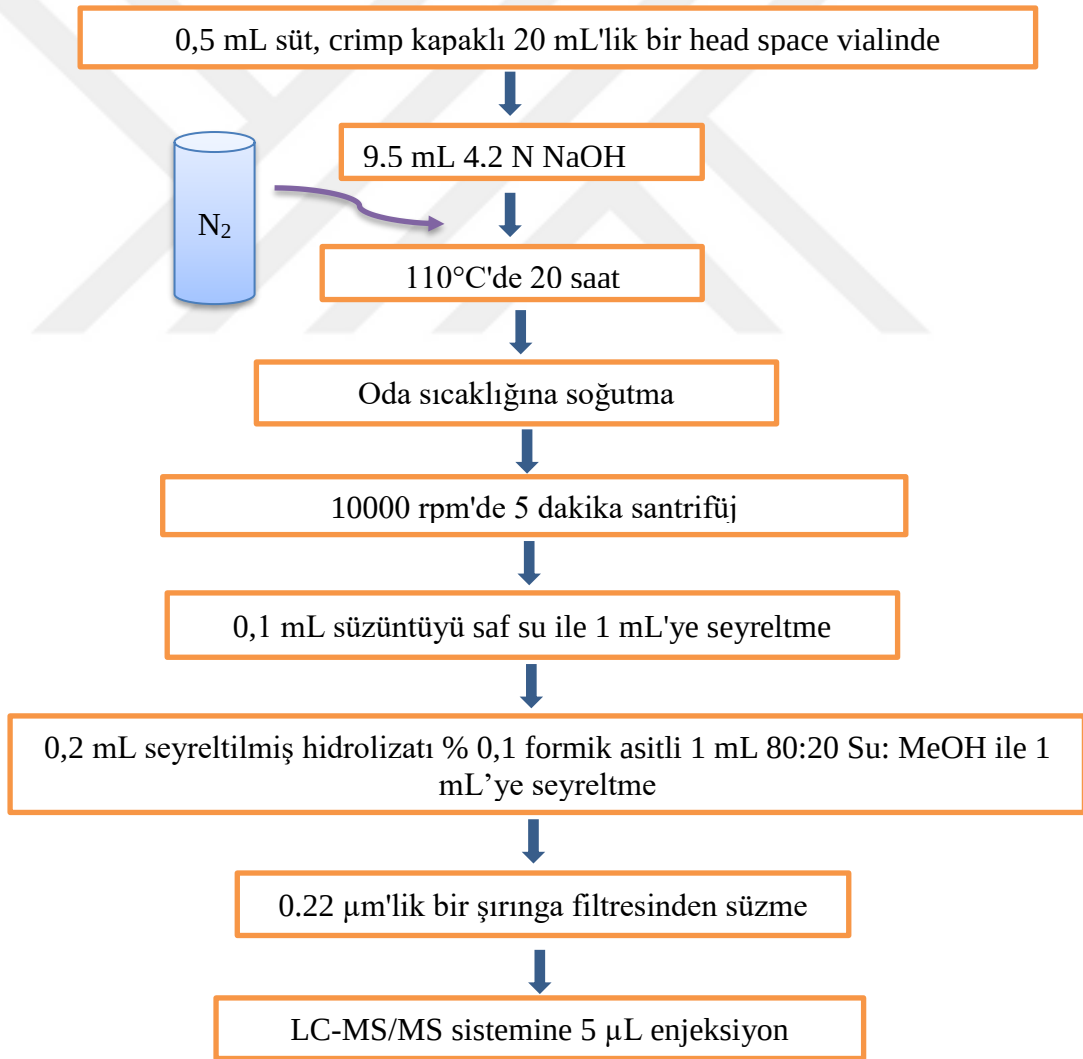
Tortu, % 0,1 formik asit içeren 1 mL 80:20 Su:MeOH ile çözülmüştür. Numune 0.22 µm'lik şırınga filtresinden HPLC vialine süzölmüş ve LC-MS/MS sistemine beş mikrolitre enjekte edilmiştir. Örnek hazırlama aşaması Şekil 3.23'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.23 : Asidik hidroliz prosedürü.

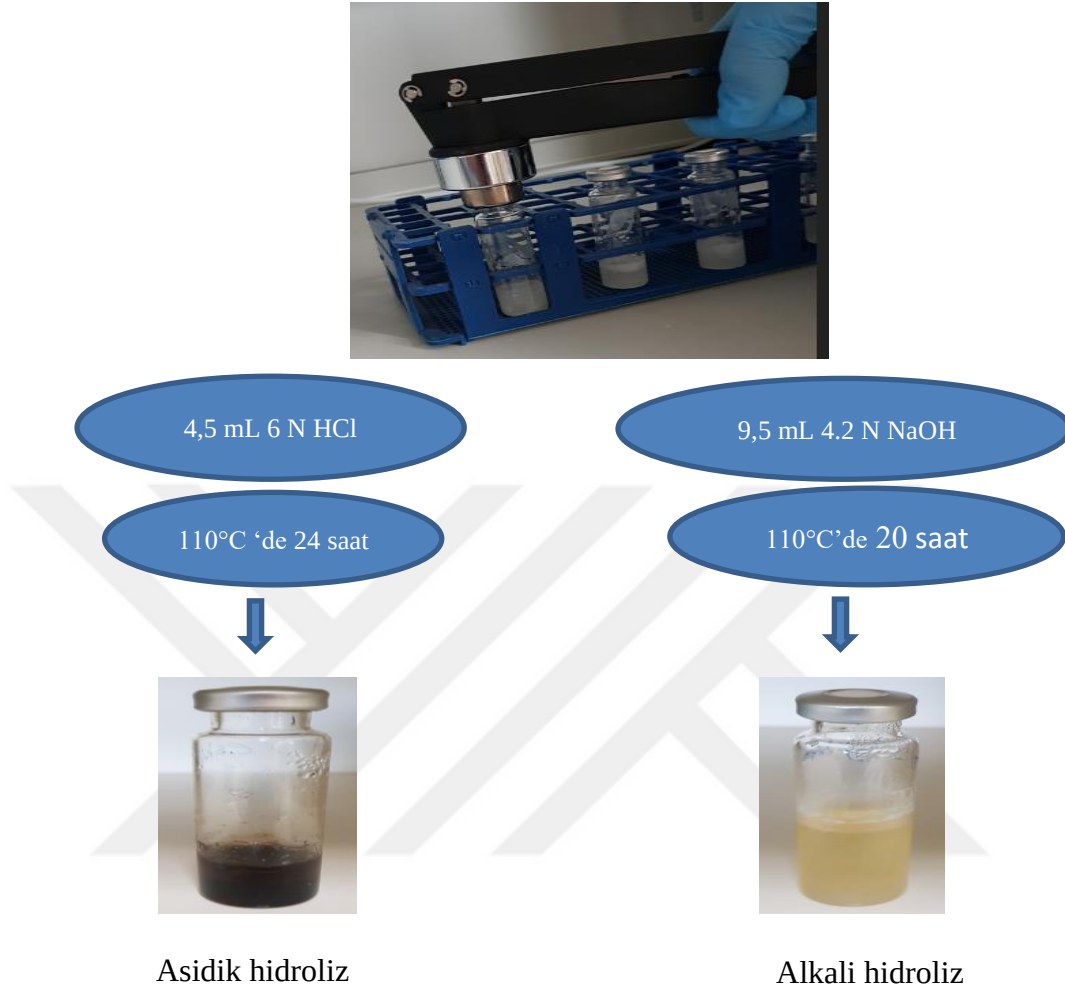
3.3.3.2 Alkali hidroliz

Çözölmüş ve karıştırılmış süttten 0,5 mL örnekle, crimp kapaklı 20 mL'lik bir head space vialine alınmıştır. 9,5 mL 4,2 N NaOH eklenmiş ve vialin içerisindeki havayı uzaklaştırmak amacıyla azot gazı uygulanmıştır. Vialler sıkıca kapatılmış ve daha sonra etüvde 20 saat boyunca 110°C'de hidroliz gerçekleştirilmiştir. Hidroliz tamamlandıktan sonra şişeler oda sıcaklığına soğutulmuş ve içerik 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. 0,1 mL süpernatant alınarak saf su ile 1 mL'ye seyreltilmiştir. Seyreltilmiş numunenin 0,2 mL'si alınmış ve % 0,1 formik asit içeren 80:20 Su: MeOH karışımı ile 1 mL'ye seyreltilmiştir. Numune 0.22 µm'lik bir şırınga filtresinden HPLC vialine süzölmüşür ve LC-MS/MS sistemine beş mikrolitre enjekte edilmiştir. Örnek hazırlama aşaması Şekil 3.24'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.24 : Alkali hidroliz prosedürü.

Asidik ve bazik hidroliz sonrası hidrolizatları içeren viallerin görseli Şekil 3.25’de gösterilmiştir.



Şekil 3.25 : Asidik ve alkali hidroliz sonrası viallerin görüntüleri.

3.4 Bileşen Analizleri

Alınan çiğ süt örneklerinde bileşen analizleri (protein, yağ, laktoz ve kuru madde) IDF (Uluslararası Sütçülük Federasyonu) 141C:2000 ve ICAR (Uluslararası Hayvan Kayıt Komitesi) standartlarına uygun olarak çalışan ve AOAC (Resmi Tarım Kimyagerleri Derneği) onaylı metodunu kullanan Bentley FTS/FCM cihazı ile yapılmıştır. Analizlerin yapıldığı cihaz görseli Şekil 3.26’da verilmiştir.



Şekil 3.26 : Bentley FTS/FCM cihazı.

3.5 Isıl İşlem

Her ırka ait laktasyonun ileri aşamasından (120-250 gün) alınmış 3'er adet süt örneğine aynı koşullarda pastörizasyon ve kaynatma işlemi uygulanmıştır.

Pastörizasyon işlemi cam tüplerde 72°C'de 15 dk süre ile Nüve BM 30 sirkülasyonlu su banyosunda yapılmıştır.

Kaynatma işlemi ise, Gerhardt KT 20s Azot Protein Tayin Cihazının alüminyum blok yakma üniteleri kullanılarak yapılmıştır. Toplamda 15 adet süt örneğinden cam tüplere 40'ar mL süt alınmıştır. Süt örnekleri kaynamaya başladıktan sonra 10 dk süresince kaynatılmaya devam edilmiştir.

Isıl işlemin etkisini değerlendirmek amacıyla çiğ süt, pastörize edilen ve kaynatılan süt örneklerinde HMF, lisin ve renk analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.6 HMF Analizi

3.6.1 LC-MS/MS analizi

HMF analizleri LC-MS/MS cihazında optimize edilen metot ile yapılmıştır. Amino asit analizinde kullanılan bir ESI kaynağı, bir Shimadzu LC20AD pompası, bir Shimadzu CTO-10ASvp kolon fırını, bir Shimadzu Nexera X2 SIL-30AC otomatik örnekleyici ve PC yazılımı, LabSolutions versiyon 5.97 ile birleştirilmiş, Shimadzu LCMS-8040 üçlü kuadrapol kütle spektrometresi (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) HMF analizleri için de kullanılmıştır.

İlk olarak HMF standardı (~1 mg/L) MeOH içinde çözölmüş ve optimum kütle spektrometresi koşullarını belirlemek üzere hazırlanmıştır. ESI kaynağı pozitif iyon modunda çalıştırılırken kolon çıkarılmış olarak LC/MS sistemine 1 µL enjekte edilerek HMF moleküler iyonu belirlenmiştir.

Optimum öncü iyonun (m/z), çarpışma enerjisinin (V), Q1 ve Q3 voltajlarının (V) ve ürün iyonlarının (m/z) belirlenmesi LabSolution yazılımı kullanılarak optimize edilmiştir.

HMF analizi için bir moleküler iyon, kantifikasyon için bir ürün iyon ve bir de tanımlayıcı iyon belirlenmiştir.

HMF analizi için optimize edilen LC-MS/MS parametreleri Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6: HMF analizi için optimize edilen LC-MS/MS parametreleri.

Analit	Alıkonma zamanı (dk)	Dwell zamanı (ms)	Öncü iyon (m/z)	Ürün İyon (m/z)	CE (V)	Niteleyici iyon (m/z)
HMF	2.56	100	126.9	109.0	14	53.15

Analizler, MRM kullanılarak ESI pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir.

HMF analizinde LC-MS/MS cihazında kullanılan kütle spektrometresi parametreleri Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7:HMF analizi kütle spektrometresi parametreleri.

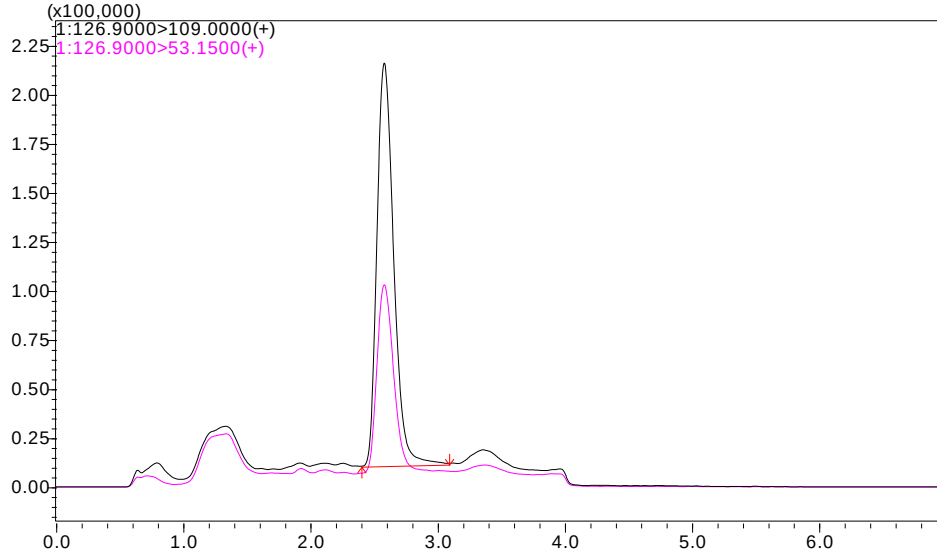
Nebulize edici gaz akışı	3,0 L/dk
Kurutucu gazı akışı	12 L/dk;
DL sıcaklığı	250 °C
Isı bloğu sıcaklığı	500 °C
CID gas	230 kPa

Optimize edilen HPLC parametreleri ise Çizelge 3.8’de yer almaktadır. Shim-pack XR-ODSII kolon kullanılarak 7 dk gibi kısa bir geçiş zamanı olan bir metot elde edilmiştir.

Çizelge 3.8: HMF analizi için optimize edilen HPLC parametreleri.

Sabit Faz	Shim-pack XR-ODSII 2.2 μ 2.0x75mm kolon
Haraketli Faz	A: %0,1 formik asit ve 0,1 mM amonyum format içeren su B: %0,1 formik asit ve 0,1 mM amonyum format içeren MeOH
Akış	0.2 ml /dk
Kolon Sıcaklığı	60°C
Enjeksiyon Hacmi	5 μ l
Geçiş zamanı	7 dk
Haraketli Faz Akış Programı	0–3.0 dk, 5–5% B; 3.01–5.0 dk, 5–60% B; 5.00–5.01 dk, 60–5% B 5.01–7 dk, 5–5% B

Elde edilen HMF kromatogramı Şekil 3.27’de gösterilmiştir. HMF için alıkonma zamanı 2.56 dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.27 : HMF kromatogramı

3.6.2 Validasyon

Analitik yöntem doğrusalılık, geri kazanım, ve kesinlik (tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik), LOD ve LOQ bakımından değerlendirilmiştir.

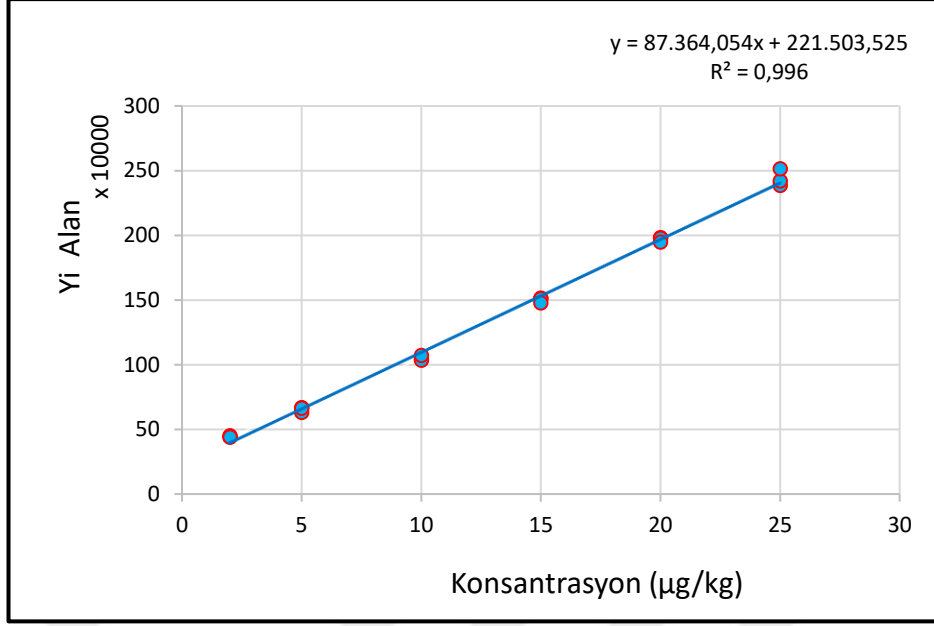
LOD ve LOQ değerlerini belirlemek amacıyla HMF açısından temiz süte birinci kalibrasyon noktası olan 2 µg/kg düzeyinde HMF ilave edilmiş ve 12 kez bağımsız olarak çalışılmıştır. Ekstrakte edilen örnekler LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiş ve analiz sonuçlarından elde edilen standart sapmanın 3 katı LOD, 10 katı LOQ olarak belirlenmiştir.

Doğrusallık, altı noktalı standart kalibrasyon eğrisi ile belirlenmiştir. Matriks uyumlu (matrix-matched) kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Doğrusallığı belirlemek amacıyla HMF açısından temiz süte belirlenen seviyelerde (2 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg) HMF standardı ilave edildikten sonra bu örneklerin analiz edilmesiyle hazırlanan kalibrasyon noktalarının her biri sisteme üçer kez enjekte edilmiştir.

Elde edilen HMF kalibrasyon eğrisi Şekil 3.28’de verilmiştir.

Yöntemin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek amacıyla içerisinde HMF olmayan süte 5 µg/kg düzeyinde HMF standardı ilave edilerek altı kez bağımsız olarak analiz edilmiştir. Bu işlem, tekrarüretilebilirliğini (günler arası kesinlik) değerlendirmek için üç gün tekrarlanmıştır.

Tüm varyasyonlar, bağıl standart sapma (% RSD) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.28: HMF kalibrasyon eğrisi.

3.6.3 Örnek hazırlama

10 ± 0,1 g süt örneği, 50 mL'lik santrifüj tüpüne tartılmıştır. %1 asetik asit içeren 10mL asetonitril eklenmiştir ve vortekste 30 dakika karıştırıldıktan sonra 6 g magnezyum sülfat ve 1,5 g sodyum asetat eklenmiş ve 2 dakika elde çalkalanmıştır.

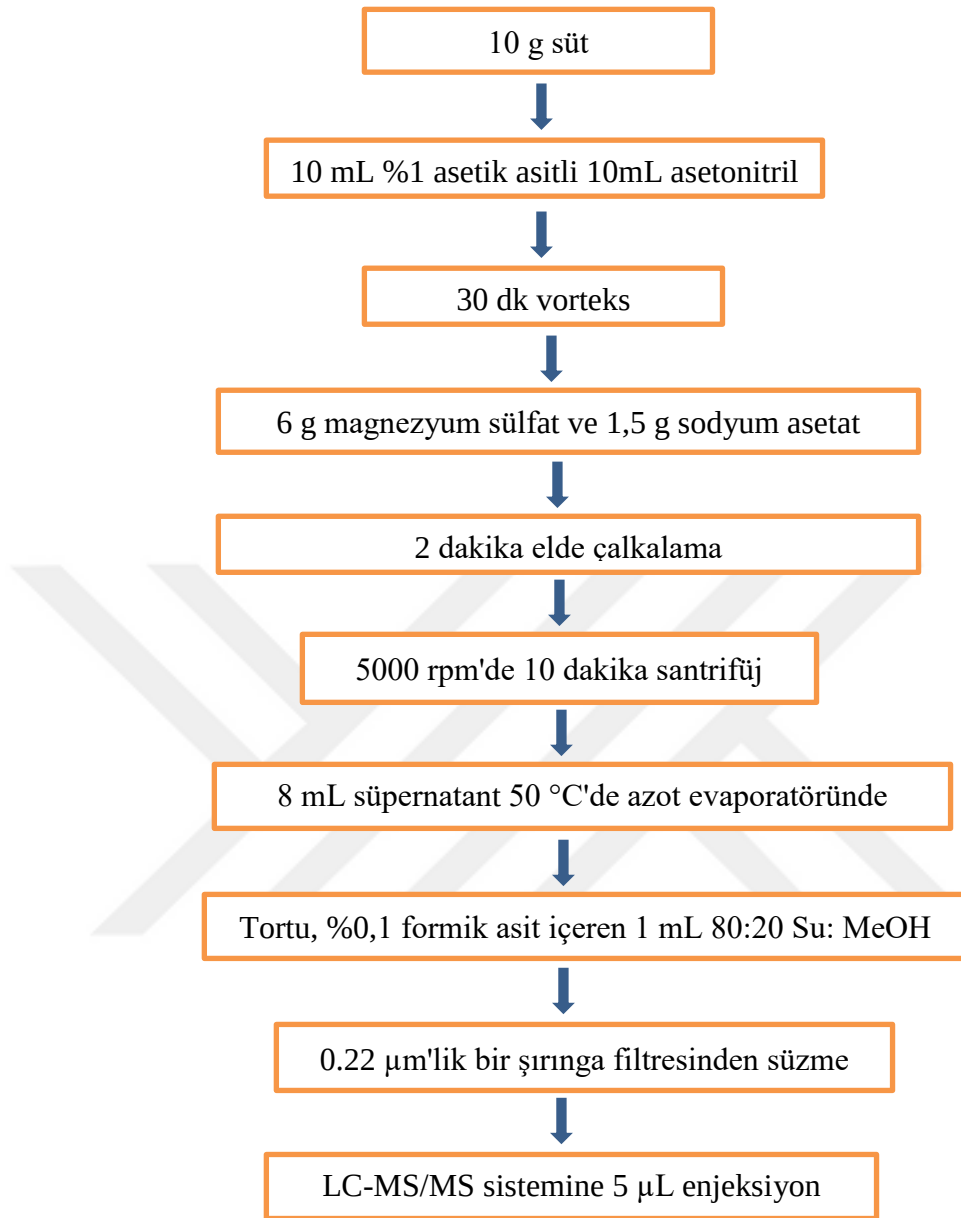
Tüp 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra 8 mL süpernatant temiz bir cam santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 50 °C'de azot evaporatöründe kurutulmaya bırakılmıştır.

Elde edilen tortu, %0,1 formik asit içeren 1 mL 80:20 Su: MeOH ile çözülmüştür. 0.22 µm'lik bir şırınga filtresinden bir HPLC şişesine süzülmüş ve LC-MS/MS sistemine beş mikrolitre enjekte edilmiştir.

Örnek hazırlama aşaması şekil 3.11'de şematize edilmiştir.

Analiz metodunda düşük LOD düzeylerine inebilmek amacıyla örnek hazırlama optimizasyonu sırasında örnek miktarı yüksek tutulmuştur. Yine hem analiti konsantre etmek, hem de çözücüyü değiştirmek amacıyla örneğe evaporasyon işlemi uygulanmıştır.

Matriks uyumlu (matrix-matched) kalibrasyon eğrisi kullanılarak örnekten gelen matriks etkisi elimine edilmiştir.



Şekil 3.29 : HMF analizi için örnek hazırlama prosedürü

3.7 Renk Analizi

Süt rneklerinin renk lmleri Hunter kolorimetresi (Colorflex EZ, HunterLab, USA) kullanılarak yapılmıştır.

Çiğ, pastörize ve kaynatılmış süt örneklerinde, CIE (Uluslararası Aydınlatma Komisyonu) Renk Değeri; L^* (parlaklık/beyazlık), a^* (kırmızılık/yeşillik), b^* (sarılık/mavilik) olmak üzere üç renk değeri ölçülmüştür.

3.8 İstatiksel Analiz

Analizlerden elde edilen sonuçların istatiksel olarak değerdendirilmesi JMP (JMP 7, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) programı ile yapılmıştır. Programın Fit Model prosedürü kullanılmıştır.

Çalışılan ırklardan elde edilen sütlerin amino asit kompozisyonu ve kimyasal bileşimleri arasındaki ortalama farklılıkları raporlamak için Tukey HSD testi uygulanmıştır.

Isıl işlem sonrası yapılan HMF, lisin ve renk analizleri değerdendirmesinde de aynı prosedür kullanılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Amino Asit Analizi Sonuçları

4.1.1 Validasyon sonuçları

LOQ, sinyal/gürültü oranı ≥ 10 seviyesinde bir pik veren analit miktarı olarak tanımlanan LOQ değerleri 0.008 ile 0.083 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ aralığında değişmektedir. Kesinlik için hesaplanan RSD değerleri, tekrarlanabilirlik için %1,3 ile %7,4 ve tekrarüretilebilirlik için %1,7 ile %10,7 aralığında bulunmuştur. Validasyon sonucunda her bir amino asit için elde edilen doğrusallık, LOQ değerleri ve kesinlik sonuçları Çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1: Amino asit validasyon sonuçları özeti.

Amino asit	Doğrusal aralık nmol/mL	Doğrusallık (R^2)	LOQ ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	Tekrarlanabilirlik RSD (%) (n=6)	Tekrarüretilebilirlik RSD (%) (n=18)
Lisin	2,5-25	0.999	0,046	5,9	5,9
Histidin	2,5-25	0.997	0,012	7,1	10,7
Glisin	2,5-25	0.999	0,047	7,4	6,5
Sistin	0,3125-5	0.995	0,038	4,5	10,5
Serin	2,5-25	0.997	0,008	5,9	4,8
Arjinin	2,5-25	0.998	0,014	2,2	3,6
Aspartik	2,5-25	0.995	0,083	3,1	7,6
Treonin	2,5-25	0.997	0,009	2,4	3,3
Alanin	2,5-25	0.996	0,028	5,8	4,7
Glutamik	2,5-50	0.999	0,046	2,5	5,4
Prolin	2,5-25	0.998	0,009	3,5	3,4
Valin	2,5-25	0.998	0,037	1,8	1,7
Metiyonin	1,25-10	0.996	0,012	3,2	3,4
İsolösin	2,5-25	0.996	0,010	1,9	3,1
Tirozin	2,5-25	0.998	0,057	1,3	2,1
Lösin	3,3-50	0.995	0,041	2,1	2,5
Fenilalanin	2,5-25	0.996	0,013	3,3	2,6
Triptofan	1,25-10	0.997	0,016	2,2	2,2

Kalibrasyon eğrileri, Çizelge 4.1’de listelenen konsantrasyon aralıklarında her amino asit için iyi bir doğrusallık göstermiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrilerinden doğrusal regresyon analizinin korelasyon katsayıları (R^2) tüm amino asitler için >0.995 olarak elde edilmiştir.

4.1.2 Süt örneklerinin amino asit sonuçları

Çalışma kapsamında beş sığır ırkından elde edilen sütlerde toplam 18 amino asidin analizi yapılmıştır. Ozols (1990) triptofanın genellikle asit hidrolizatlarında geri kazanılamadığını ve triptofan analizinin özel yöntemler gerektirdiğini bildirmiştir. Bu nedenle triptofan amino asit analizlerine genellikle dahil edilmez. Oysa triptofan esansiyel bir amino asittir ve Friedman, (2018) tarafından triptofanın, normal büyümede önemli bir rolü olduğu ve çeşitli biyoaktif bileşikler için *in vivo* öncü görevi gördüğü bildirilmiştir. Yani bir gıdanın besin değerinin belirlenmesinde diğer amino asitler ile beraber triptofan içeriğinin bilinmesi de önemlidir.

Bu çalışmada asidik hidrolizin yanı sıra alkali hidroliz de gerçekleştirilmiş olup, çalışmanın sonuçlarına triptofan içerikleri de dahil edilmiştir. Çalışılan ırklardan elde edilen ortalama amino asit konsantrasyonları Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2: Farklı ırklardan elde edilen sütlerin amino asit bileşimi (g/100mL).

Amino Asitler	Siyah Alaca (n=16)	Simental (n=16)	Esmer (n=16)	Boz Irk (n=16)	Yerli Kara (n=16)
EAA					
Lisin	0,196±0,0258 ^{AB}	0,197±0,0258 ^{AB}	0,199±0,0312 ^{AB}	0,211±0,0194 ^A	0,177±0,0222 ^B
Metiyonin	0,081±0,0123 ^{AB}	0,092±0,0107 ^A	0,072±0,0179 ^{BC}	0,074±0,0152 ^{BC}	0,062±0,0106 ^C
Valin	0,223±0,0236 ^A	0,236±0,0283 ^A	0,222±0,0337 ^A	0,230±0,0148 ^A	0,190±0,0172 ^B
Isolösin	0,177±0,0182 ^A	0,188±0,0208 ^A	0,171±0,0241 ^A	0,178±0,0132 ^A	0,146±0,0144 ^B
Lösin	0,399±0,0414 ^A	0,414±0,0466 ^A	0,380±0,0421 ^{AB}	0,404±0,0282 ^A	0,344±0,0320 ^B
Treonine	0,164±0,0173 ^A	0,177±0,0188 ^A	0,168±0,0252 ^A	0,171±0,0115 ^A	0,145±0,0156 ^B
Fenilalanin	0,166±0,0166 ^A	0,168±0,0208 ^A	0,159±0,0216 ^{AB}	0,168±0,0115 ^A	0,144±0,0151 ^B
Triptofan	0,052±0,0077 ^A	0,054±0,0049 ^A	0,039±0,0070 ^B	0,050±0,0042 ^A	0,052±0,0073 ^A
NEAA					
Histidin	0,086±0,0125 ^C	0,106±0,0164 ^A	0,101±0,0179 ^{AB}	0,091±0,0066 ^{BC}	0,080±0,0099 ^C
Glisin	0,058±0,0101	0,068±0,0101	0,068±0,0237	0,061±0,0057	0,060±0,0050
Sistin	0,011±0,0039 ^{BC}	0,020±0,0049 ^A	0,015±0,0066 ^B	0,010±0,0023 ^C	0,011±0,0025 ^{BC}
Serin	0,181±0,0360	0,194±0,0258	0,183±0,0248	0,189±0,0144	0,177±0,0165
Arjinin	0,135±0,0191	0,149±0,0164	0,140±0,0224	0,144±0,0085	0,133±0,0121
Aspartik Asit	0,273±0,0368 ^{AB}	0,288±0,0288 ^A	0,250±0,0296 ^{BC}	0,280±0,0177 ^A	0,238±0,0211 ^C
Alanin	0,107±0,0112 ^{AB}	0,121±0,0302 ^A	0,107±0,0197 ^{AB}	0,110±0,0057 ^{AB}	0,097±0,0086 ^B
Glutamik acit	0,655±0,0666 ^A	0,678±0,0708 ^A	0,652±0,0752 ^A	0,647±0,0409 ^A	0,562±0,0465 ^B
Prolin	0,292±0,0243 ^A	0,300±0,0257 ^A	0,299±0,0343 ^A	0,302±0,0161 ^A	0,254±0,0224 ^B
Tirozin	0,177±0,0235 ^{AB}	0,189±0,0251 ^A	0,177±0,0314 ^A	0,173±0,0143 ^{AB}	0,154±0,0209 ^B
EAA/TAA	0,425 ^A	0,419 ^{AB}	0,414 ^B	0,425 ^A	0,416 ^B

EAA: esansiyel amino asitler

NEAA: esansiyel olmayan amino asitler

TAA: toplam amino asit

^{A,B,C} aynı satırdaki farklı üst simgeler istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir

İncelenen ırkların sütlerinin amino asit bileşimi karşılaştırıldığında metiyonin, lisin, histidin, sistin, aspartik asit, treonin, alanin, glutamik asit, prolin, valin, izolösin, tirozin, lösin, fenilalanin ve triptofan konsantrasyonları açısından ırkların sütleri arasında önemli farklılıklar ($P<0,05$) olduğu görülmüştür. Glisin, serin, arjinin konsantrasyonları açısından ise sütler arasında önemli bir farklılık bulunamamıştır ($P>0,05$).

Triptofan dışındaki esansiyel amino asitler ve ayrıca esansiyel olmayan amino asitler serin, arjinin, aspartik asit, alanin, glutamik asit, prolin ve tirozin Yerli Kara'dan elde edilen sütlerde en düşük konsantrasyonlarda bulunmuştur.

Esansiyel olmayan amino asitler histidin, sistin, aspartik asit, alanin, glutamik asit ve tirozin ve esansiyel amino asitler metiyonin, valin, izolösin, lösin, treonin ve triptofan Simental sütlerinde en yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir.

Boz Irk ve Siyah Alaca süt örneklerinde toplam esansiyel amino asitlerin toplam amino asitlere oranının diğer ırklara göre daha yüksek olduğu, Esmer ve Yerli Kara ırklarında ise önemli ölçüde daha düşük olduğu görülmüştür.

Boz Irk ve Siyah Alaca sütlerinin amino asit kompozisyonlarının karşılaştırılmasında lisin, valin, izolösin, lösin, treonin, fenilalanin, triptofan, histidin, glisin, sistin, serin, arjinin, aspartik asit, alanin, glutamik asit, prolin ve tirozin konsantrasyonlarında istatistiksel anlamda fark olmadığı görülmüştür ($P>0,05$). Geleneksel yöntemlerle yetiştirilen Boz Irk sütlerinin amino asit bileşimi ile modern yöntemlerle yetiştirilen ve özel yemlerle beslenen Siyah Alaca sütlerinin amino asit bileşiminin birbirine benzer olduğu gözlemlenmiştir.

Schönfeldt ve diğ. (2012) tarafından ülkeye özgü süt kompozisyon verilerinin derlendiği bir çalışmada Güney Afrika, Amerika, Danimarka, Avusturalya ve Yeni Zellanda'da inek sütünün amino asit kompozisyonlarının karşılaştırıldığı verilerde, tüm ülkelerde inek sütlerinde en bol bulunan amino asitin glutamik asit yine en bol bulunan esansiyel amino asitin lösin olduğu görülmektedir. Aynı çalışmada yer alan ülkelerin hepsinin sütlerinde triptofan en az miktarda bulunan esansiyel amino asit olarak görülmektedir.

Yine Khromova ve diğ. (2018) tarafından modern süt kompleksi koşullarında yetiştirilen Avrupa Siyah Alaca ineklerinin amino asit kompozisyonunun incelendiği çalışmada sütlerde en yüksek bulunan esansiyel amino asit lösin, en az bulunan

esansiyel amino asit triptofan, sütlerde en bol bulunan amino asit ise yine glutamik asit olarak bildirilmiştir.

Mevcut çalışmada da literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak bütün ırklara ait süt örneklerinde triptofan en az miktarda ($0,039\pm0,007$ - $0,054\pm0,0049$ g/100mL) bulunan esansiyel amino asit olmuştur.

İnek sütünün amino asit profilini inceleyen önceki çalışmalarla uyumlu olarak, tüm süt örneklerinde en bol bulunan amino asit glutamik asit (0,562-0,678 g/100 mL süt) ve yine en bol bulunan esansiyel amino asit lösin (0,344-0,414 g/100 mL süt) olarak tespit edilmiştir (Zndoki ve diğ, 2006; Ceballos ve diğ, 2009; Mapekula ve diğ, 2011; Berisha ve diğ, 2021).

Literatürde oğunlukla HPLC metodu kullanılarak türevlendirme aşaması içeren uzun prosedürler kullanılarak inek sütünde protein bağlı amino asit kompozisyonunun incelendiği çalışmalardan elde edilen sonuçların mevcut çalışmada LCMS/MS kullanılarak optimize edilen metottan elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Schönfeldt ve diğ. (2012) tarafından ülkeye özgü süt kompozisyon verilerinin farklılık gösterdiği ve ülkeye özel süt bileşim verilerinin bilinmesinin önemli olduğu bildirilmiştir. Literatürde ise Türkiye’de yetişen sığır ırklarının amino asit kompozisyonunun araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu alışma ile LCMS/MS kullanılarak optimize edilen metot ile Türkiye’de yetişen beş sığır ırkından elde edilen sütün amino asit kompozisyonu araştırılmış ve belirlenmiştir. Daha ayrıntılı çalışmalar için de mevcut metot kullanılabilir. Ayrıca daha fazla çalışmaya kesinlikle ihtiyaç duyulsa da, mevcut çalışmanın sonuçları spesifik amino asit içeriklerine sahip inek sütü üretmek için melezleme çalışmalarına yardımcı olarak kullanılabilir.

4.2 Bileşen Analizleri

Farklı beş sığır ırkından elde edilen sütlerin protein, yağ, laktoz ve toplam kuru madde bileşimi analizleri yapılmıştır. Çözünmüş ve karıştırılmış süt örneklerinin bileşen analizleri Bentley FTS/FCM cihazında paralel olarak yapılmıştır.

Analizlerden elde edilen sonuçların ortalama değerleri izelge 4.3’de özetlenerek verilmiştir.

Çizelge 4.3: Farklı ırklardan elde edilen sütlerin bileşen analizleri (g/100mL).

	Siyah Alaca	Simental	Esmer	Boz Irk	Yerli Kara
Protein	3,00±0,34 ^B	3,14±0,39 ^B	2,88±0,35 ^B	3,48±0,22 ^A	2,92±0,36 ^B
Yağ	3,29±0,91 ^{BC}	4,38±1,09 ^A	3,85±0,58 ^{AB}	2,52±0,51 ^C	3,12±0,70 ^{BC}
Laktoz	4,63±0,31 ^B	4,43±0,39 ^B	4,39±0,22 ^B	5,01±0,21 ^A	4,93±0,24 ^A
Kuru Madde	11,69±1,36 ^B	12,85±1,26 ^A	11,87±0,71 ^{AB}	11,77±0,88 ^B	11,62±1,05 ^B

Farklı ırklardan elde edilen sütlerin protein içeriği 2,88±0,35 ile 3,48±0,22 g/100mL arasında belirlenmiştir.

Yerli Kara, Esmer, Simental ve Siyah Alaca ırkı ineklerden elde edilen sütlerin protein değerleri arasındaki fark önemsiz ($P>0,05$) bulunmuş, istatistiksel olarak önemli olmasa da esmer ırkı ineklerden elde edilen sütlerin en düşük protein içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Boz Irk ineklerden elde edilen sütlerin protein değerleri, diğer dört ırk inekten elde edilen sütlerin protein değerlerine göre istatistiksel olarak önemli oranda ($P<0,05$) yüksek bulunmuştur.

Sütlerin yağ içerikleri 2,52±0,51 ile 4,38±1,09 g/100mL aralığında ölçülmüştür. Boz Irk inekten elde edilen sütlerin en düşük yağ içeriğine sahip olduğu ve Simental ırkı ineklerden elde edilen sütlerin ise en yüksek yağ içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Sütlerin laktoz içerikleri 4,39±0,22 ile 5,01±0,21 g/100mL seviyelerinde belirlenmiştir. Boz Irk ve Yerli Kara ırkı ineklerden elde edilen sütlerin en yüksek laktoz içeriğine sahip olduğu ve aralarında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca Simental, Siyah Alaca ve Esmer ırkı ineklerden elde edilen sütlerin laktoz değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

Diyetteki laktoz oranının artması ile kalsiyum, magnezyum ve fosfor gibi minerallerin emiliminin arttığı bilinmektedir. Ayrıca bağırsakta fermente edilen laktozun oluşturduğu laktik asitin, bazı bağırsak mikroorganizmalarına karşı antiseptik görevi gördüğü, bifidus florasının artışı desteklediği ve bazı istenmeyen virüslerin büyümesini engellediği bildirilmiştir (Kwak ve diğ, 2012; Seki ve Saito, 2012; Masood, 2011). Geleneksel fermente süt ürünlerinde önemli olan laktozun, kefir/kıymaz gibi fonksiyonel fermente süt ürünlerinin de en önemli substratı olduğu belirtilmiştir (Shi ve diğ, 2011; Singh ve diğ, 2017). Ayrıca anne sütünün inek sütüne göre daha yüksek oranda (%6,5-7) laktoz içerdiği düşünüldüğünde, Boz Irk ve Yerli Kara ırkı

ineklerden elde edilecek sütün çocukların beslenmesinde çok önemli olabileceği düşünülmektedir.

Sütlerin toplam kuru madde değerleri $11,62 \pm 1,05$ ile $12,85 \pm 1,26$ g/100mL aralığında değişmekte olup, bu değerlerin Simental hariç diğer sütlerde benzer olduğu tespit edilmiştir. Simental sütlerinde ise kuru madde diğer ırklara göre önemli oranda ($P < 0,05$) yüksek bulunmuştur.

4.3 Isıl İşlem Uygulaması Sonrası Analizler

Isıl işlem uygulamalarının etkilerini değerlendirmek üzere her ırka ait üçer adet süt örneğinde ısıl işlem öncesi, pastörizasyon sonrası ve kaynatma işlemi sonrası HMF, lisin ve renk analizleri yapılmıştır.

4.3.1 Lisin analizi

Pastörizasyon ve kaynatma işlemi uygulanan sütler 3.3.3.1’de anlatılan prosedüre göre gerçekleştirilen asidik hidroliz sonrası LC-MS/MS’te analiz edilmiştir.

Analizlerden elde edilen sonuçlar açısından pastörize edilen ve kaynatılan süt örneklerinin lisin konsantrasyonları ile çiğ süt örneklerinin lisin konsantrasyonları arasında önemli bir fark ($P > 0,05$) olmadığı görülmüştür.

Sonuçlar Çizelge 4.4’te özetlenmiştir.

Çizelge 4.4: Isı uygulamasından sonra lisin değerleri (g/100mL).

	Çiğ Süt	Pastörize Süt	Kaynatılmış Süt
Siyah Alaca	$0,191 \pm 0,022$	$0,195 \pm 0,025$	$0,223 \pm 0,047$
Simental	$0,183 \pm 0,014$	$0,184 \pm 0,010$	$0,201 \pm 0,043$
Esmer	$0,222 \pm 0,012$	$0,226 \pm 0,033$	$0,223 \pm 0,047$
Boz Irk	$0,216 \pm 0,027$	$0,189 \pm 0,025$	$0,222 \pm 0,048$
Yerli Kara	$0,170 \pm 0,024$	$0,143 \pm 0,026$	$0,159 \pm 0,022$

Erbersdobler ve Somoza, (2007) tarafından Maillard reaksiyonları sonucunda lisinin artık besinsel olarak mevcut olmadığı, ancak standart amino asit analizi prosedürü uygulandığında, asit hidrolizinin ön adımını takiben yani hidroliz sırasında serbest lisin olarak nicelendirilen bileşiklerin oluşumuyla sonuçlandığı bildirilmiştir. Bu durum göz önüne alındığında, lisin analizinin asidik hidroliz uygulanarak yapıldığı bu

çalışmada çiğ süt lizin değerleri ile pastörizasyon ve kaynatma uygulanan sütlerin lizin değerlerinin birbirine benzer bulunması şaşırtıcı değildir.

Erbersdobler ve Somoza (2007) ısıtıl işlem öncesi ve sonrası lizin değerlerini ölçmek için yapılan asit hidrolizi aşamasında bağlanmış olan lizin de serbest hale geçtiği ve sonuçları yanılttığı için oluşumu ısıtıl işlemin tipine daha yakından bağlı olan çok çeşitli Maillard reaksiyon bileşikleri tanımlandığını ve bunlar arasında furozin, Nε-karboksimetillisin, HMF, pirralin ve pentosidinin ultra yüksek sıcaklıkta işlem görmüş süt veya hatta pastörize süt gibi ciddi ve hatta hafif ısıtıl işlem görmüş gıdaların besin değerinin değerlendirmesi amacıyla en yaygın kullanılan belirteçler olduğunu bildirmişlerdir.

Hegele ve diğ. (2008) süt ürünlerinde serbest ve proteine bağlı erken ve ileri glikasyon kaynaklı lizin modifikasyonlarının (Nε-fruktoselsine , Nε- karboksimetillisin ve pirralin) karşılaştırmalı LC-MS/MS profilini inceledikleri çalışmalarında, çiğ ve UHT inek sütünün serbest ve proteine bağlı Lys modifikasyonları açısından profillerinin çok yakın olduğunu belirlemişlerdir. Sonuç olarak çiğ sütün hafif ısıtıl işleminin, yani pastörizasyon ve UHT işleminin, hem serbest hem de proteine bağlı Lys modifikasyonlarının miktarını önemli ölçüde artırmamasını dikkat çekici olarak değerlendirmişlerdir.

Mevcut çalışmada ise ısıtıl işlem görmüş sütlerin besin değerinin değerlendirmesi amacıyla belirteç olarak yaygın kullanılan HMF seçilmiş ve HMF analizleri çalışmaya dahil edilmiştir.

4.3.2 HMF analizi

4.3.2.1 Validasyon sonuçları

Birinci kalibrasyon seviyesi olan 2 µg/kg düzeyinde HMF ilave edilmiş sütün 12 bağımsız analizi sonuçlarından elde edilen LOD değeri 0,83 µg/kg, LOQ değeri ise 2,79 µg/kg olarak hesaplanmıştır.

Hazırlanan kalibrasyon eğrisinden doğrusal regresyon analizinin korelasyon katsayısı (R^2) 0,996 olarak elde edilmiştir.

Keskinlik için hesaplanan RSD değerleri, tekrarlanabilirlik için %3,7 ve tekrarüretilebilirlik için %3,2 olarak bulunmuştur.

Sütün 5 µg/kg düzeyinde HMF ilave edilerek 6 bağımsız analiz edilmesi sonucu elde edilen geri kazanım oranı % 99,7 olarak bulunmuştur.

4.3.2.2 Süt örneklerinin HMF analiz sonuçları

Analiz edilen çiğ süt örneklerinde HMF tespit edilememiştir. Pastörize edilen süt örneklerinde ise iz miktarda (LOD değerinin üzerinde LOQ değerinin altında) HMF olduğu tespit edilmiştir.

Kaynatılan süt örneklerinin hepsinde LOQ seviyesinin üstünde HMF olduğu görülmüştür. HMF oluşumu bakımından ırklar arasında önemli bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

Çiğ süt örneklerinde ve ısıtılmış süt örneklerinde oluşan HMF değerleri Çizelge 4.5'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.5: Sütlerde HMF değerleri (µg/kg).

	Çiğ Süt	Pastörize Süt	Kaynatılmış Süt
Siyah Alaca	Tespit Edilemedi	< LOQ	8,45±3,75
Simental	Tespit Edilemedi	< LOQ	8,78±4,18
Esmer	Tespit Edilemedi	< LOQ	7,14±0,89
Boz Irk	Tespit Edilemedi	< LOQ	11,71±1,37
Yerli Kara	Tespit Edilemedi	< LOQ	9,39±3,35

Gıdalarda HMF tespiti için genellikle ekstraksiyon aşamasında çoğu, organik asit ile ısıtılmış protein hidrolizasyonu adımı içeren çeşitli teknikler kullanılmıştır.

Dehn-Müller ve diğ. (1989) çiğ sütlerde Furosine ve HMF bulunmadığını belirtmişlerdir. Morales ve diğ. (1995) tarafından yapılan çalışmada ısıtılmış numunelerde saptanan HMF değerlerinin, uygulanan hidroliz koşulları (oksalik asitte kaynatma) nedeniyle yeni oluşumdan kaynaklandığının açıkça belli olduğu ifade edilmiştir.

Oral ve diğ. (2014) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarında HMF'nin, asit hidroliz aşamasında asit ve karbonhidratlar arasındaki kimyasal reaksiyonla üretildiği ve bu nedenle, her bir gıda örneğinin HMF seviyesinin gerçek içerikten daha yüksek olarak bulunduğu belirtilmiştir. Çalışmanın sonucunda bu durumdan kaçınmak için, analizde asit hidroliz aşamasının atlanması gerektiği kanısına varılmıştır.

Literatür bilgileri ışığında çeşitli çalışmalarda çiğ süt örneklerinde tespit edildiği belirtilen HMF değerlerinin asidik hidroliz sırasında meydana geldiği düşünülmektedir. Mevcut çalışmada sütlerde ekstraksiyon kaynaklı HMF oluşumuna neden olmamak için hidroliz aşaması uygulanmamış ve sonuç olarak çiğ süt örneklerinde HMF tespit edilememiştir.

Czerwonka ve diğ. (2020) de yaptıkları çalışmada 1.3 µg/kg gibi düşük bir LOD seviyesi elde etmelerine rağmen çiğ sütlerde HMF tespit edememişlerdir. Sütü 100°C'de 20 dakika süre ile ısıtma sonrasında sütlerde 144 µg/kg düzeyinde HMF oluştuğunu, 20-100 dakika arasında ise HMF oluşumunun neredeyse lineer olarak arttığını bildirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunun, sütün ısıtılma süresinin HMF konsantrasyonunun artmasıyla ilişkili olduğunu, bir ısı-hasar göstergesi olarak HMF kullanımının yararlılığını doğrulayabildiğini belirtmişlerdir.

Mevcut çalışmada kullanılan yöntemin ekstraksiyon prosedürü Gökmen ve Şenyuva (2006) tarafından bebek mamalarında HMF tespiti amacıyla LC-MS tekniği kullanılarak geliştirilen yöntemin ekstraksiyon prosedürü ile benzerlik göstermektedir. Ancak Gökmen ve Şenyuva (2006) çalışmalarında ekstraktın temizlenmesi amacıyla SPE (katı faz ekstraksiyon kartuşu) kullanmışlardır.

Jozinović ve diğ. (2019) tarafından gıda endüstrisi yan ürünleri ile zenginleştirilmiş mısır ürünlerinde eş zamanlı olarak akrilamid ve HMF tayini için Gökmen ve Şenyuva (2006) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek, LC-MS/MS kullanılarak geliştirilen, örneğin MeOH ile ekstrakte edilmesinden sonra, çöktürülmesi ve evaporatörde kurutulup, tekrar su ve asetonitril karışımında çözülmesi adımlarını içeren yöntemde SPE kartuş kullanılmamıştır ve bu bakımından mevcut çalışmada kullanılan yöntemle daha fazla benzerlik göstermektedir.

Yine Gökmen ve Şenyuva (2006) ve Jozinović ve diğ. (2019) tarafından geliştirilen her iki yöntemde atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon (APCI) kullanılmışken mevcut metotta ESI kullanılmıştır.

Pastörize edilen süt örneklerinde ise LOD limitinin üstünde ancak LOQ limitinin altında HMF tespit edilmiştir. Yine literatürde pastörize sütlerde tespit edildiği belirtilen bazı HMF değerlerine göre düşük miktarda HMF bulunmasının nedeninin uygulanan metodun hidroliz aşaması içermemesi olduğu düşünülmektedir.

Süte uygulanan kaynatma işlemi evde yaygın olarak kullanılan ısıtma işlemi olsa da diğer ısıtma işlemlere göre süte etkisinin araştırıldığı kısıtlı çalışma mevcuttur. Sütün kaynatılması sonucu HMF oluşumunun izlendiği bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Ancak 10 dakika süre ile sütün kaynatıldığı bu çalışmada, sütlerde LOQ seviyesinin üzerinde (4,3-13,19 µg/kg arasında) HMF oluştuğu görülmüştür.

Ancak Czerwonka ve diğ. (2020) tarafından bildirildiği gibi sütteki HMF düzeyleri, bu değerlerin çok daha yüksek olduğu, genellikle mg/kg veya L olarak ifade edilen diğer başka gıda ürünlerine kıyasla nispeten daha küçüktür.

Czerwonka ve diğ. (2018) tarafından popüler alkolsüz içeceklerdeki HMF içeriğini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada, test edilen ürünlerden en fazla HMF içeriği 3000 mg/kg'ı aşan miktarlarda olmak üzere hazır kahvelerde belirlenmiştir. Kavrulmuş kahvelerde 200 mg/kg'ı aşan seviyelerde, meyve suları ve nektarlarında ise üretildiği meyvelere bağlı olarak 0,47 ile 110,75 mg/L arasında HMF olduğu görülmüştür. Gazlı alkolsüz içeceklerde, içeceğin ve tatlandırıcının türüne bağlı olarak 0,23 ile 40,69 mg/L arasında HMF tespit edilmiştir.

Bal ve pekmez de HMF açısından risk oluşturabilecek gıdalar arasında bulunmaktadır. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (2020) ile tüketime sunulan ballarda bulunabilecek maksimum HMF düzeyi belirlenmiş, balda en fazla 40 mg/kg seviyesinde HMF bulunmasına izin verilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Üzüm Pekmezi Tebliği (2017) ile de tüketime sunulan üzüm pekmezinde bulunabilecek maksimum HMF düzeyi belirlenmiş, sıvı üzüm pekmezi için en fazla 75 mg/kg seviyesinde, katı üzüm pekmezi için en fazla 100 mg/kg seviyesinde olarak belirlenmiştir.

Türk gıda kodeksinde, süt ve süt ürünlerinde HMF düzeyi ile ilgili belirlenmiş herhangi bir yasal limit bulunmamaktadır. Avrupa Birliği tarafından da sütte bulunabilecek maksimum HMF miktarı ile ilgili belirlenmiş bir limite rastlanılamamıştır.

4.3.3 Renk analizi

Renk analizleri sonucunda farklı ırklardan elde edilen çiğ süt örneklerinin L* değerleri ve a* değerleri istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmamıştır ($P>0,05$).

Elde edilen b* değerlerinin ise Siyah Alaca ineklerde diğer ırklara göre daha düşük olduğu görülmüştür. Çiğ süt örneklerinden elde edilen renk değerlerinin özeti Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6: Farklı ırklardan elde edilen çiğ sütlerin renk değerleri.

	Siyah Alaca	Simental	Esmer	Boz Irk	Yerli Kara
L* değeri	90,15±1,60	88,24±1,09	88,54±1,67	87,77±1,31	88,85±0,94
a* değeri	-3,64±1,00	-3,43±0,74	-3,54±0,73	-4,29±1,06	-4,41±0,89
b* değeri	9,58±0,24 ^B	13,05±1,20 ^A	13,87±0,80 ^A	12,48±0,76 ^A	12,15±0,74 ^A

Isı uygulamalarından sonra da örnekler renk analizine tabi tutulmuştur. Çalışılan beş ırk için L*, a*, b* değerleri çiğ, kaynatılmış ve pastörize sütler açısından değerlendirilmiştir.

Örneklerin paralel olarak yapılan analizler sonucu elde edilen L* değerleri Çizelge 4.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.7: Isı uygulamasından sonra L* değerleri.

	Çiğ Süt	Pastörize Süt	Kaynatılmış Süt
Siyah Alaca	90,15±1,60	87,82±3,68	89,84±2,53
Simental	88,24±1,09	88,35±1,71	90,56±1,20
Esmer	88,54±1,67	88,02±0,55	89,76±1,21
Boz Irk	87,77±1,31	85,70±0,72	88,31±2,22
Yerli Kara	88,85±0,94 ^A	86,46±0,49 ^B	89,72±0,86 ^A

Çalışılan beş ırktan sadece Yerli Kara ırkının pastörize süt L* değerleri çiğ ve kaynatılmış süttten önemli oranda düşük bulunmuş ($P<0,05$), diğer dört ırkın L* değerleri açısından çiğ, kaynatılmış ve pastörize sütler arasında önemli bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

Isı uygulamalarından sonra yapılan renk analizi sonucu elde edilen a* değerleri Çizelge 4.8'de özetlenmiştir. Esmer ırkı dışında ki diğer dört ırkta çiğ, kaynatılmış ve pastörize sütlerin a* değerleri arasında önemli bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

Çizelge 4.8: Isı uygulamasından sonra a* değerleri.

	Çiğ Süt	Pastörize Süt	Kaynatılmış Süt
Siyah Alaca	-3,64±1,00	-4,21±0,59	-4,86±0,79
Simental	-3,43±0,74	-4,32±0,64	-5,06±1,1
Esmer	-3,54±0,73A	-4,76±0,27AB	-5,51±0,95B
Boz Irk	-4,29±1,06	-5,08±0,56	-5,40±0,95
Yerli Kara	-4,41±0,85	-4,78±0,52	-5,30±0,55

Isı uygulamalarından sonra süt örneklerinin b* değerleri ise Çizelge 4.9’da özetlenmiştir.

İstatistiksel olarak bazıları önemli bazıları önemsiz olmakla birlikte pastörize ve kaynatılmış sütlerin b* değerlerinin bütün ırklarda çiğ süt örneklerine göre daha düşük olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.9: Isı uygulamasından sonra b* değerleri.

	Çiğ Süt	Pastörize Süt	Kaynatılmış Süt
Siyah Alaca	9,58±0,24 ^A	6,58±0,53 ^B	8,23±1,51 ^{AB}
Simental	13,05±1,20 ^A	9,67±0,69 ^B	11,88±0,40 ^A
Esmer	13,87±0,80 ^A	11,00±0,73 ^{AB}	10,76±1,89 ^B
Boz Irk	12,48±0,76 ^A	7,91±0,48 ^B	10,92±0,74 ^A
Yerli Kara	12,15±0,74 ^A	7,45±0,93 ^B	10,69±0,77 ^A

Chudy ve diğ. (2020) sütün doğal renginin, ışığın dağılmış yağ globülleri, kalsiyum kazeinat ve kalsiyum fosfat tarafından yansımından kaynaklandığını ve ayrıca sütte bulunan suda çözünen riboflavin ve yağda çözünen karatonoidlerin sütün rengini etkileyen pigmentler olduğunu ifade etmişlerdir.

Burton (1994) tarafından ısı işlemlerin sütün L* değerlerinde artışa veya azalışa sebep olabileceği belirtilmiştir.

Hazra ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmada çiğ süte göre 15 dk kaynatılmış sütte L* değerlerinin düştüğü yani çiğ sütün daha beyaz olduğu gözlemlenmiştir.

Chugh ve diğ. (2014) tarafından yapılan çalışmada çiğ, düşük ve yüksek sıcaklıkta pastörize edilen yağsız sütlerin L*, a*, b* değerlerinde önemli bir fark olmadığı görülmüştür.

Yanmış ve Coşkun (2018) tarafından keçi sütünde yapılan çalışmada elde edilen L^* değerleri bakımından çiğ süt ile düşük sıcaklıkta pastörize edilen sütlerde önemli bir fark bulunmazken, yüksek sıcaklıkta pastörize edilen sütlerde L^* değerlerinin önemli oranda arttığı görülmüştür. Aynı çalışmada b^* değerlerinin önemli oranda değişmediği a^* değerlerinin ise ısıtılma işlem görmüş sütlerde çiğ süte göre önemli oranda düşük olduğu görülmüştür.

Mevcut çalışmada ısıtılma işleminin Yerli Kara ırkında L^* değerine etki ettiği, esmer ırkında ise a^* değerine etki ettiği görülmüştür. İstatistiksel olarak bazıları önemli bazıları önemsiz olmakla birlikte pastörize ve kaynatılmış sütlerin b^* değerlerinin bütün ırklarda çiğ süt örneklerine göre daha düşük olduğu görülmüştür.



5. SONUÇ

Bir gıdanın amino asit profilinin belirlenmesi, gıdanın besinsel açıdan değerlendirilmesi için önemlidir. Süt insan diyetindeki en önemli gıdalardan biridir ve sütün amino asit profilinin belirlenmesi, sütün kimyasal ve besinsel özelliklerini etkileyebilecek peptit ve proteinlerin kalitatif değerlendirilmesi için önemlidir. Farklı türde hayvanların sütleri içme sütü olarak kullanılsa da inek sütü dünyada süt üretimi ve tüketiminde açık ara farkla ilk sırayı almaktadır.

Yapılan çalışmada, LC-MS/MS tekniğinin amino asitlerin türevlendirme olmadan analizine imkan vermesi avantajı kullanılarak sütte amino asitlerin analizi için LC-MS/MS ile basit ve düşük maliyetli bir analitik yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Geliştirilen yöntemle Türkiye'de yetiştirilen kültür ırkı sığırlardan Siyah Alaca, Simental, Esmer ve yerli ırklardan Yerli Kara ve Boz Irk olmak üzere beş farklı sığır ırkından elde edilen sütlerin amino asit bileşimleri belirlenmiştir. Çalışmada süt örneklerine asidik hidrolizin yanı sıra bazik hidroliz de uygulanarak, sütlerde lizin, histidin, sistin, aspartik asit, treonin, alanin, glutamik asit, prolin, valin, izolösin, tirozin, lösin, fenilalanin, metiyonin, glisin, serin, arjinin ve triptofan olmak üzere toplam 18 adet amino asidin kompozisyonunun belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Mevcut çalışmada, inek sütünde daha önceki çalışmalarla benzer amino asit bileşimleri sonuçları elde edilmiştir. Farklı ırklardan elde edilen sütlerin amino asit bileşimi karşılaştırıldığında, Türkiye'nin yerli ırklarından olan Boz Irk ve kültür ırkı Siyah Alaca sütlerinin, toplam esansiyel amino asitlerinin toplam amino asitlere oranının çalışılan diğer ırklardan daha yüksek olduğu görülmüştür.

Süt örneklerinin kimyasal bileşimleri de incelenmiştir. Boz Irk ve Yerli Kara ırklarından elde edilen sütlerin laktoz içeriklerinin diğer ırklara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Daha fazla çalışmaya kesinlikle ihtiyaç duyulsa da, mevcut çalışmanın sonuçlarının, spesifik amino asit içeriklerine sahip inek sütü üretmek için melezleme çalışmalarına yardımcı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

LC-MS/MS tekniğinin amino asitlerin türevlendirme olmadan analizine imkan vermesi avantajını kullanarak sütteki amino asitleri analiz etmek amacıyla geliştirilen metot bundan sonraki çalışmalarda da yardımcı olabilecektir. Ayrıca bu metot farklı gıdaların bağlı ve serbest amino asit profillerinin incelenmesinde de modifiye edilerek kullanılabilir.

Yine çalışma kapsamında kaynatma ve pastörizasyonun sütler üzerinde etkisi incelenmiş, bu amaçla ısıtıl işlem öncesi ve sonrası sütlerin lizin analizleri sonuçlarında önemli bir farklılık tespit edilememiştir. Yapılan renk ölçümlerinde ise ısıtıl işlemin sütlerin L* değerlerine etkisi sadece Yerli Kara ırkında önemli bulunmuştur. Tüm ırkların a* değerlerinin ısıtıl işleminden önemli derecede etkilenmediği, istatistiksel olarak bazıları önemli bazıları önemsiz olmakla birlikte pastörize ve kaynatılmış sütlerin b* değerlerinin ise bütün ırklarda çiğ süt örneklerine göre daha düşük olduğu görülmüştür.

Süte uygulanan ısıtıl işlem şiddetinin ve kalitenin belirlenmesinde kullanılan ve Maillard reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan en bilinen ve en yaygın ara ürünlerden biri olan HMF'yi tespit etmek amacıyla yüksek hassiyet ve seçiciliğe sahip LC-MS/MS'te kolay, pratik ucuz bir yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Farklı ırklara ait süt örneklerine aynı koşullarda pastörizasyon ve kaynatma uygulanmış ve sonuç olarak pastörize edilen örneklerde LOD seviyesinin üzerinde HMF oluştuğu gözlenirken kaynatılan süt örneklerinde geliştirilen metotun LOQ seviyesinin üzerinde HMF oluştuğu gözlemlenmiştir.

Isıtıl işlem öncesi ve sonrası lizin analiz sonuçlarında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Ancak lizin değerlerini ölçmek için yapılan asit hidrolizi aşamasında bağlanmış olan lizin de serbest hale geçtiği ve sonuçları yanılttığı göz önüne alınarak, ısıtıl işlem görmüş gıdaların besin değerinin değerlendirilmesi amacıyla en yaygın kullanılan belirteçlerden biri olan HMF süt örneklerinde analiz edilmiştir. HMF sonuçları dikkate alındığında pastörizasyon ve kaynatmanın sütün besin değerlerinde bir miktar kayba yol açtığı, ancak diğer bir çok gıdaya göre bu miktarın ihmal edilebilir olduğu söylenebilir. Ancak bebek maması gibi ısıtıl işlem görmüş süt tozu bazı gıdalarda depolama süresince de sıcaklık ve süreye bağlı olarak HMF miktarının artabileceği ve önemli düzeyde risk oluşturabileceği göz ardı edilmemelidir.

Mevcut çalışmada sütlerde HMF tespiti için geliştirilen yöntem modifiye edilerek, HMF düzeyleri, sütteki değerlerin çok daha üzerinde olabilen süt tozu ve süt tozu bazlı ürünlerin yanı sıra, pekmez, bal gibi diğer pek çok gıda da kullanılabilir.

LC-MS/MS ile amino asit analizi ve HMF analizi için uygulanan her iki yöntem de klasik HPLC analizlerine göre daha az reaktif kullanılan ekonomik ve pratik yöntemler olarak ileriki çalışmalarda farklı gıdalar için uygulanabilecektir.



KAYNAKLAR

- Alais, C. & Linden, G.** (1991). Non-enzymatic browning–the Maillard reaction. *Food Biochemistry*, 86-89.
- Ames, J. M.** (1998). Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chemistry*, 62(4), 431-439.
- Aktaş, T. ve Bakır, G.** (2011). Konuklar Tarım İşletmesinde yetiştirilen Esmer sığırların süt verim özellikleri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 42(1), 27-34.
- Atakan, K. O. Ç.** (2016). Simmental Yetiştiriciliğinin Değerlendirilmesi: 1. Dünyada Ve Türkiye'deki Yetiştiriciliği. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(2), 97-102.
- Barłowska, J., Szwajkowska, M., Litwińczuk, Z., & Król, J.** (2011). Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10(6), 291-302.
- Berg, H.E., Van Boekel, M.A.J.S.** (1994). Degradation of lactose during heating of milk. 1.reaction pathways. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 48: 157-175
- Berisha, K., Bytyçi, H., Mednyánszky, Z., Kiss, E. & Simon-Sarkadi, L.** (2021). Amino acid and biogenic amine composition of Busha cattle milk. *Acta Alimentaria*, 50(1), 144-152.
- Borshch, A.A., Borshch A.V., Lutsenko M.M., Merzlov S.V., Kosior L.T., Lastovska I.A., Pirova L.V.** (2018). Amino acid and mineral composition of milk from local Ukrainian cows and their crossbreedings with Brown Swiss and Montbeliarde breeds. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 43(3):238-246
- Bos, C., Gaudichon, C. & Tomé, D.** (2000). Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(sup2), 191S-205S.
- Burton, H.** (1994). Chemical and physical changes in milk at high temperatures. In *Ultra-high-temperature processing of milk and milk products* (pp. 44-76). Springer, Boston, MA.
- Cais-Sokolińska, D., Pikul, J. & Danków, R.** (2004). Measurement of colour parameters as index of the hidroxyethylfurfural content in the UHT sterilised milk during its storage. *Electron. J. Pol. Agric. Univ*, 7(2).
- Capuano, E. & Fogliano, V.** (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-food science and technology*, 44(4), 793-810,

- Ceballos, L. S., Morales, E. R., de la Torre Adarve, G., Castro, J. D., Martínez, L. P. & Sampelayo, M. R. S.** (2009). Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of food Composition and Analysis*, 22(4), 322-329.
- Chen, Z. & Yan, X.** (2009). Simultaneous determination of melamine and 5-hydroxymethylfurfural in milk by capillary electrophoresis with diode array detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(19), 8742-8747.
- Chudy, S., Bilska, A., Kowalski, R. & Teichert, J. O. A. N. N. A.** (2020). Colour of milk and milk products in CIE L* a* b* space. *Medycyna Weterynaryjna*, 76(2), 77-81.
- Chugh, A., Khanal, D., Walkling-Ribeiro, M., Corredig, M., Duizer, L. & Griffiths, M. W.** (2014). Change in color and volatile composition of skim milk processed with pulsed electric field and microfiltration treatments or heat pasteurization. *Foods*, 3(2), 250-268.
- Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., ... & Herman, L.** (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food control*, 31(1), 251-262.
- Cubon, J., Foltys V., Hascik, P., Kacaniova, M., Ubrežiova, I., Kracmar S., & Vavrisinova, K.** (2008). The raw milk quality from organic and conventional agriculture. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* 56:25–30,
- Cui, Y., Shi, X., Tang, Y., Xie, Y., & Du, Z.** (2020). The effects of heat treatment and fermentation processes on the formation of furfurals in milk-based dairy products using a QuEChERS technique followed by gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 313, 125930,
- Czerwonka, M., Opilka, J., & Tokarz, A.** (2018). Evaluation of 5-hydroxymethylfurfural content in non-alcoholic drinks. *European Food Research and Technology*, 244(1), 11-18.
- Czerwonka, M., Pietrzak-Sajjad, R., & Bobrowska-Korczak, B.** (2020). Evaluation of 5-hydroxymethylfurfural content in market milk products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(7), 1135-1144.
- Davoodi, H., Esmaeili, S., & Mortazavian, A. M.** (2013). Effects of milk and milk products consumption on cancer: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 249-264.
- Demir, E. & Balcioğlu, M. S.** (2019). Genetic diversity and population structure of four cattle breeds raised in Turkey using microsatellite markers. *Czech Journal of Animal Science*, 64(10), 411-419.
- Dehn-Müller, B., Müller, B., Lohmann, M., & Erbersdobler, H. F.** (1989). Determination of Furosine, Lysinoalanine (LAL) and 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) as a measure of heat intensity for UHT-milk. In *Milk Proteins* (pp. 228-232). Steinkopff.

- Dunkley, W. L., Smith, N. E., & Franke, A. A.** (1977). Effects of feeding protected tallow on composition of milk and milk fat. *Journal of dairy science*, 60(12), 1863-1869
- Efigênia, M., Pova, B., & Moraes-Santos, T.** (1997). Effect of heat treatment on the nutritional quality of milk proteins. *International dairy journal*, 7(8-9), 609-612.
- Erbersdobler H.F. & Somoza V.** (2007). Forty years of furosine – Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods, *Molecular Nutrition and Food Resesarch*, 51, 423-430,
- Etzel, M.R.** (2004). Manufacture and use of dairy protein fractions. *J. Nutr.*, 134: 996s-1002s.
- Fountoulakis, M., & Lahm, H. W.** (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of chromatography A*, 826(2), 109-134.
- Frau M., Massanet J., Rosello C., Simal S., & Canellas J.** (1997). Evaluation of free amino acid content during ripening of Mahon cheese. *Food Chemistry*.; 60 (4): 651- 657.
- Friedman, M.** (2018). Analysis, nutrition, and health benefits of tryptophan. *International Journal of Tryptophan Research*, 11, 1178646918802282.
- Gabriella, A., V., & Virginia, A., I.** (2007). Managing nutrition for optimal milk components. *Western Dairy Management Conference*, March 7-9 Reno, NV
- Givens, D. I.** (2020). MILK Symposium review: The importance of milk and dairy foods in the diets of infants, adolescents, pregnant women, adults, and the elderly. *Journal of dairy science*, 103(11), 9681-9699.
- Gorissen, S. H., Crombag, J. J., Senden, J. M., Waterval, W. A., Bierau, J., Verdijk, L. B., & van Loon, L. J.** (2018). Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino acids*, 50(12), 1685-1695.
- Gökmen, V. & Şenyuva, H. Z.** (2006). Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2845-2849.
- Grenov, B., Larnkjær, A., Mølgaard, C., & Michaelsen, K. F.** (2020). Role of milk and dairy products in growth of the child. *Global Landscape of Nutrition Challenges in Infants and Children*, 93, 77-90,
- Groeneveld, L. F., Lenstra, J. A., Eding, H., Toro, M. A., Scherf, B., Pilling, D. & Globaldiv Consortium.** (2010). Genetic diversity in farm animals—a review. *Animal genetics*, 41, 6-31.
- Günay, E., Güneşer, O. & Karagül Yüceer, Y.** (2021). A comparative study of amino acid, mineral and vitamin profiles of milk from Turkish Saanen, Hair and Maltese goat breeds throughout lactation. *International Journal of Dairy Technology*, 74(3), 441-452.

- Hazra, T., Sindhav, R., Sudheendra, C. V., Bumbadiya, M., Govani, R., & Ramani, V. (2021).** A comparative study on the effects of boiling and ultrasonication on radical scavenging activity, casein particle size, and whiteness of milk. *Veterinary World*, 14(7), 1784.
- Hegele, J., Buetler, T., & Delatour, T. (2008).** Comparative LC–MS/MS profiling of free and protein-bound early and advanced glycation-induced lysine modifications in dairy products. *Analytica Chimica Acta*, 617(1-2), 85-96.
- Jozinović, A., Šarkanj, B., Ačkar, Đ., Panak Balentić, J., Šubarić, D., Cvetković, T. & Babić, J. (2019).** Simultaneous determination of acrylamide and hydroxymethylfurfural in extruded products by LC-MS/MS method. *Molecules*, 24(10), 1971.
- Kavas, G., & Kınık, Ö. (2005).** İnek sütü ve peynir suyu proteinindeki esansiyel amino asitlerin beyin fonksiyonları, psikiyatrik hastalıklar ve süte uygulanan teknolojik parametrelerle olan ilişkileri. *Gıda*, 30(3).
- Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Ayaz, M., Ajmal, M., Ellahi, M. Y., & Khalique, A. (2017).** Antioxidant capacity and fatty acids characterization of heat treated cow and buffalo milk. *Lipids in health and disease*, 16(1), 1-10,
- Khromova, L. G., Levina, G. N., Bailova, N. V., & Petrin, A. N. (2018).** Characteristics of protein components of European Holstein Cow milk. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9(5), 2015-2024.
- Kıvrak, İ., Kıvrak, Ş., & Harmandar, M. (2014).** Free amino acid profiling in the giant puffball mushroom (*Calvatia gigantea*) using UPLC–MS/MS. *Food chemistry*, 158, 88-92.
- Kowalski, S., Kopuncová, M., Ciesarová, Z., & Kukurová, K. (2017).** Free amino acids profile of Polish and Slovak honeys based on LC–MS/MS method without the prior derivatisation. *Journal of food science and technology*, 54(11), 3716-3723.
- Kuboka, M. M., Imungi, J. K., Njue, L., Mutua, F., Grace, D., & Lindahl, J. F. (2019).** Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk traded in peri-urban Nairobi, and the effect of boiling and fermentation. *Infection ecology & epidemiology*, 9(1), 1625703.
- Kumlu, S. ve Akman, N. (1999).** Türkiye Damızlık Siyah Alaca Sürülerinde Süt Ve Döl Verimi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 39(1), 1-16.
- Kwak H.S., Lee W.J., & Lee M.R., (2012).** Revisiting lactose as an enhancer of calcium absorption, *International Dairy Journal*, 22, 2, 147-151.
- Łozowicka, B., Kaczyński, P., & Iwaniuk, P. (2021).** Analysis of 22 free amino acids in honey from Eastern Europe and Central Asia using LC-MS/MS technique without derivatization step. *Journal of Food Composition and Analysis*, 98, 103837

- László, N., Lányi, K., & Laczay, P.** (2018). LC-MS study of the heat degradation of veterinary antibiotics in raw milk after boiling. *Food chemistry*, 267, 178-186.
- Layman, D.K.** (2003). The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostatis. *J. Nutr.*, 133: 261s-267s.
- Lee, Y. C., Shlyankevich, M., Jeong, H. K., Douglas, J. S., & Surh, Y. J.** (1995). Bioactivation of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde to an electrophilic and mutagenic allylic sulfuric acid ester. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209 (3): 996-1002
- Malec, L.S., Gonzales, A.S.P., Naranjo, G.B., & Vigo, M.S.** (2002). Influence of water activity and storage temperature on lysine availability of a milk-like system, *Food Research International*, 35(9), 849-853.
- Mapekula M., Chimonyo M., Mapiye C., & Dzama K.** (2011). Fatty acid, amino acid and mineral composition of milk from Nguni and local crossbred cows in South Africa. *Journal of Food Composition and Analysis* Volume 24 24, Issues 4–5, June–August 2011, Pages 529-536.
- Marino, R., Iammarino, M., Santillo, A., Muscarella, M., Caroprese, M., & Albenzio, M.** (2010). Rapid method for determination of amino acids in milk. *Journal of dairy science*, 93(6), 2367-2370,
- Martins, S.I.F.S., Jongen, W.M.F., & Van Boekel, M.A.J.S.** (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology* 11: 364–373
- Masatcioğlu, M. T.** (2013). Ekstrüzyon Pişirmenin Maillard Reaksiyonu Üzerine Etkileri (Doktora tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H., & Khan, I. U.** (2011). Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Critical reviews in microbiology*, 37(1), 91-98.
- Maurice-Van Eijndhoven, M. H. T., S. J. Hiemstra, and M. P. L. Calus.** (2011). Short communication: Milk fat composition of 4 cattle breeds in the Netherlands. *J. Dairy Sci.* 94:1021–1025.
- Mazhitova A. T., Kulmyrzaev A. A.** (2016). Determination of amino acid profile of mare milk produced in the highlands of the Kyrgyz Republic during the milking season. *J Dairy Sci.* 2016 Apr;99(4):2480-2487. doi: 10.3168/jds.2015-9717. Epub 2016 Feb 3.
- Mazhitova, A. T., Kulmyrzaev, A. A., Ozbekova, Z. E., & Bodoshev, A.** (2015). Amino acid and fatty acid profile of the mare's milk produced on suusamyр pastures of the Kyrgyz Republic during lactation period. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 195, 2683-2688.
- Medugorac, I., Medugorac, A., Russ, I., VEIT-KENSCH, C. E., Taberlet, P., Luntz, B., ... & Foerster, M.** (2009). Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size. *Molecular ecology*, 18(16), 3394-3410,

- Mehta B. M., Deeth H. C.** (2016) Blocked Lysine in Dairy Products: Formation, Occurrence, Analysis, and Nutritional Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 206-218.
- Metin M.** (1999). Süt Teknolojisi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları no:33. Bornova, İzmir.
- Mikailoğlu a. M., Bayramoğlu İ. T., Velioğlu A. O.** (2005). Amino Acid Ingredient of Milk Azeri Buffalo. *YYÜ Vet Fak Derg* 2005, 16 (2):103-104.
- Miller, GD., Jarvis, KJ., McBean, LD.** (2000). Handbook of Dairy Foods and Nutrition. In: Jensen RG, Kroger M, editors. The Importance of Milk and Milk Products in the Diet. CRC Press, New York, p 4-24.
- Morales, F. J., Romero, C., & Jiménez-Pérez, S.** (1995). New methodologies for kinetic study of 5-(hydroxymethyl)-furfural formation and reactive lysine blockage in heat-treated milk and model systems. *Journal of Food Protection*, 58(3), 310-315.
- Morales FJ, Romero. C. Jimenez-Perez S.** (1996). Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: hydroxymethylfurfural and available lysine content. *Journal of Food Science and Technology* 35, 193-200,
- Morales, F.J., Jiménez-Pérez, S.** (1999). HMF formation during heat-treatment of milk-type products as related to milkfat content. *Journal of Food Science* 64(5): 855-859.
- Muehlhoff, E., Bennett, A., & McMahon, D.** (2013). Milk and dairy products in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Nimbalkar, M. S., Pai, S. R., Pawar, N. V., Oulkar, D., & Dixit, G. B.** (2012). Free amino acid profiling in grain Amaranth using LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 134(4), 2565-2569.
- Nollet, L. M., & Toldrá, F. (Eds.).** (2012). Handbook of analysis of active compounds in functional foods. CRC Press.
- Oral, R. A.** (2006). Bazı Gıdalarda Hidroksimetilfurfural (Hmf) İçeriğinin Saptanması, Depolanması Etnasındaki Değişimi Ve Biyolojik Yöntemle Azaltılması (Doktora Tezi). Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Oral, R. A., Dogan, M., Sarioglu, K., & Toker, Ö. S.** (2012). 5-hydroxymethyl furfural formation and reaction kinetics of different pekmez samples: effect of temperature and storage. *International Journal of Food Engineering*, 8(4).
- Oral, R.A., Dogan, M., Sarioglu, K., Kayacier, A., & Sagdic, O.** (2015). Determination of HMF in Some Instant Foods and Its Biodegradation by Some Lactic Acid Bacteria in Medium and Food. *Ann Chromatographia, Sep Tech*, 1(1), 1004.
- Oral, R. A., Mortas, M., Dogan, M., Sarioglu, K., & Yazici, F.** (2014). New approaches to determination of HMF. *Food chemistry*, 143, 367-370,

- Otter, D. E.** (2012). Standardised methods for amino acid analysis of food. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S230-S237.
- Ozols, J.** (1990). Amino acid analysis. *Methods in enzymology*, 182, 587-601.
- Özdal H. R., Yıldız B., Arkun G.** (2018). Hydroxymethylfurfural (Hmf) Formation in Milk and Dairy Products. *International Journal of Food Engineering Research (IJFER)* Year 4 Num 1 - April 2018 (13-23)
- Özek K.** (2015). Süt Sığırlarında Süt Kompozisyonunu Etkileyen Faktörler ve Besleme - Süt Kompozisyonu İlişkisi. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*. 4 (2):37-45.
- Patel, K.S., A.M. Patel, M.N. Mansuri.** (1991). Milk fat content in Jersey x Kankrej and Holstein Friesian x Kankrej cows. *Asian J.of Dairy Research* (1991) 10(1) 53-56, India
- Pellegrino, L., Resmini, P., & Luf, W.** (1995). Assessment (indices) of heat treatment of milk. Ch. 20 in *Heat-Induced Changes in Milk*, P.F.Fox (Ed.), p. 409-453. IDF, Brussels, Belgium.
- Pereira, P. C.** (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30(6), 619-627.
- Prestel, S., de Falco, B., Blidi, S., Fiore, A., & Sturrock, K.** (2020). Evaluation of the effect of berry extracts on carboxymethyllysine and lysine in ultra-high temperature treated milk. *Food Research International*, 130, 108923.
- Perez Locas, C., & Yaylayan, V. A.** (2008). Isotope labeling studies on the formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis-GC/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(15), 6717-6723.
- Qin, L., Zhang, Y. Y., Xu, X. B., Wang, X. S., Liu, H. W., Zhou, D. Y. & Thornton, M.** (2017). Isotope dilution HPLC-MS/MS for simultaneous quantification of acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in thermally processed seafood. *Food chemistry*, 232, 633-638.
- Qiu, X., Reynolds, R., Johanningsmeier, S. & Truong, V. D.** (2020). Determination of free amino acids in five commercial sweetpotato cultivars by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 92, 103522.
- Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Sameen, A., Mukhtar, O., & Khan, M. I.** (2016). Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(7), 1022.
- Ren, D. X., Zou, C. X., Lin, B., Chen, Y. L., Liang, X. W., & Liu, J. X.** (2015). A Comparison of Milk Protein, Amino Acid and Fatty Acid Profiles of River Buffalo and Their F1 and F2 Hybrids with Swamp Buffalo in China. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(5).
- Ritota, M., & Manzi, P.** (2020). Rapid determination of total tryptophan in yoghurt by ultra high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Molecules*, 25(21), 5025.

- Sabahelkheir, M., Fat, M., & Hassan, A.** (2012). Amino acid composition of human and animal's milk (camel, cow, sheep and goat). *ARNP J Sci Technol*, 2, 32-34.
- Saldamlı, İ.** (2007). Gıda kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- Seki N., Saito H, 2012.** Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives, *International Dairy Journal*, 22, 2, 110-115
- Semjan, S., L. Kazimir.** (1984). Dairy performance of high yielding Slovakian Pied cows, 2. Milk protein, *Polnohospodarstvo*, 30, 10, 931-941.
- Schoental, R., Hard, G. C., & Gibbard, S.** (1971). Histopathology of renal lipomatous tumors in rats treated with the "natural" products, pyrrolizidine alkaloids and a, b-saturated aldehydes. *Journal of the National Cancer Institute*, 47 (7): 10371044
- Schönfeldt, H. C., Hall, N. G., & Smit, L. E. (2012).** The need for country specific composition data on milk. *Food Research International*, 47(2), 207-209.
- Schroeder, J.W.** (2012). Dairy cow nutrition affects milk composition. North Dakota State University Extension Service AS1118
- Schwendel, B., H., Wester, T., J., Morel, P., C., H., Tavendale, M., H., Deadman, C., Shadbolt, N., M., & Otter, D., E.** (2015). Organic and conventionally produced milk-An evaluation of factors influencing milk composition *J. Dairy Sci.*, 98 (2) :721–746. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8389>.
- Sharaby, M.A.** (1988). Factors influencing the concentrations and yields of milk constituents and their interrelationships. *J. Dairy Res.*, 55, 2, 171-177
- Shi, Y. D., Sun, G. Q., Zhang, Z. G., Deng, X., Kang, X. H., Liu, Z. D., ... & Sheng, Q. H.** (2011). The chemical composition of human milk from Inner Mongolia of China. *Food chemistry*, 127(3), 1193-1198.
- Singh, P. K., & Shah, N. P.** (2017). Other fermented dairy products: Kefir and koumiss. In *Yogurt in health and disease prevention* (pp. 87-106). Academic Press.
- Stanciuc, N., Rapeanu, G., & Stanciuc, S.** (2010). Quantitative evaluation of colour development in milk model systems during heat treatment: a kinetic study. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(3), 5331-5341.
- Surh, Y. J. & Tannenbaum, S. R.** (1994). Activation of the Maillard reaction product 5(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chemical Research in Toxicology*, 7 (3): 313-318
- Şekerden, Ö.** (2002). Siyah Alaca İneklerde Laktasyon Dönemi ile Sütün Miktar ve Bileşimi Arasındaki İlişkiler ve Süt Bileşenlerinin Kalıtım Dereceleri. *Hayvansal Üretim* 43(2): 61-67 (2002)
- Şekerden, Ö. & M. Kuran.** (1992). Jersey sığırlarında sütün miktar ve akış hızı ile bazı komponentlerinin laktasyon dönemlerine göre değişimi ve bu özellikler arasındaki ilişkiler. *Doğa Veteriner ve Hayvancılık Derg.*, 16(1992), 381-392.

- TAGEM.** (2009). Türkiye evcil hayvan genetik kaynakları tanıtım kataloğu, 82-83.
<https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/Katalog%20T%C3%BCrk%C3%A7e.pdf>
- Teter, A., Kędzierska-Matysek, M., Barłowska, J., Król, J., & Brodziak, A.** (2020). Nutritional value and coagulation properties of milk from local cow breeds, including the selected macro- and micronutrients and trace elements. *Mljekarstvo*, 70(3), 210–220.
<https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2020.0307>
- TÜİK,** (2020). Hayvansal Üretim İstatistikleri. Erişim: 06 Aralık, 2021,
<https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-2019-33873>
- Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği,** (2020). Tebliğ No: 2020/7
<https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/04/20200422-13.htm>
Erişim tarihi: 26.03.2022
- Türk Gıda Kodeksi Üzüm Pekmezi Tebliği,** (2017). Tebliğ No: 2017/8
<https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/06/20170930-24.htm>
Erişim tarihi: 26.03.2022
- Tremonte, P., Tipaldi, L., Succi, M., Pannella, G., Falasca, L., Capilongo, V., & Sorrentino, E.** (2014). Raw milk from vending machines: Effects of boiling, microwave treatment, and refrigeration on microbiological quality. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3314-3320,
- Urgu M., Saatli T. E. , Türk A. ve Koca N.** (2017). Isıl İşlem Görmüş İçme Sütlerinde (Pastörize, UHT ve Laktozsuz UHT Süt) Hidroksimetilfurfural İçeriğinin Belirlenmesi. *Akademik Gıda* 15(3) (2017) 249-255, DOI: 10,24323/akademik-gida.345258.
- Üçüncü, M.** (2004). A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi (Cilt I). Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova/İzmir.
- Ünal İ., Ünal G. ve Sakar, Ç. M.** (2020). Yerli Kara Sığırları Halk Elinde Koruma Projesi ve Sosyoekonomik Etkileri. *Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü e-Bülten*, 2020 (8), 14-15. Erişim Adresi https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/E_BULTEN/AG%CC%86USTOS%202020.pdf
- Ünal İ., Tuncer, H. İ., Sakar, Ç. M., & Ünay E.** (2019). The effect of maternal age on some body measurements in Anatolian Black Calves. *Black Sea Journal of Agriculture*, 2(1), 47-50,
- Ünal, R. N., & Besler, H. T.** (2008). Beslenmede sütün önemi. Sağlık Bakanlığı Yayın, 727.
- Walstra, P., Wouters, J. T., & Geurts, T. J.** (2005). Dairy science and technology. 2nd ed. Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL.
- Yanmış, D. & Coşkun, H.** (2018). The Changes in Goat Milk during Heating and Storage after Milking. *Journal of Food and Nutrition Research*, 6(12), 760-766.
- Yilmaz, O., Akin, O., Yener, S. M., Ertugrul, M., & Wilson, R. T.** (2012). The domestic livestock resources of Turkey: cattle local breeds and types

and their conservation status. *Animal Genetic Resources/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales*, 50, 65-73.

Van Boekel, M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food chemistry*, 62(4), 403-414.

Zhou, L., Tang, Q., Wasim Iqbal, M., Xia, Z., Huang, F., Li, L., & Zou, C. (2018). A comparison of milk protein, fat, lactose, total solids and amino acid profiles of three different buffalo breeds in Guangxi, China. *Italian Journal of Animal Science*, 17(4), 873-878.

Zándoki, R., Csapó, J., Csapó-Kiss, Z., Tábori, I., Domokos, Z., Szucs, E., & Tozser, J. (2006). Change of amino acid profile in Charolais cows' colostrum and transient milk during the first week post partum. *Czech Journal of Animal Science*, 51(9), 375.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Arzu Yavuz

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2001, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği
- **Yüksek Lisans** : 2005, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2001-2004/Mühendis/ÖzelSektör
- 2004-2009/ Mühendis/ Bilecik İl Tarım Müdürlüğü
- 2009-2012/ Mühendis/ Balıkesir İl Kontrol Laboratuvarı
- 2012-..... / Mühendis/ Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Bildiri

- Yavuz A., Oral R. A. (2021). Method for the Analysis of Amino Acids in Milk by LC -MS/MS. 2nd International/12th National Food Engineering Congress (Poster Bildiri)

Proje

- Farklı Sığır Irklarından Elde Edilen Sütlerin Amino Asit Kompozisyonun ve Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi (TAGEM/HSGYAD/A/21/A3/P1/2313)

DİĞER ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Makaleler

- Yavuz, A. , Azar, İ. , Özcan, A. & Ülkü, N. (2021). A Multiclass Method for the Analysis of Antibiotic Residues in Milk Powder and Whey Powder by UPLC-MS/MS. Gıda, 47 (1) , 25-33 . DOI: 10,15237/gida.GD21124

- Yavuz A., Azar İ., Özcan, A., & Çetin, V. (2020). Hayvansal Gıdalarda Antibiyotik Kalıntıları. Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi, (24), 8-15.
- Özcan A., Azar İ., Yavuz A., Yavaş H., Tokat, E., & Çetin, V. (2020). Glüten Analizinde HPLC, LC-MS/MS Yöntemlerinin ELISA ile Karşılaştırılması. Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi, (24), 30-54
- Elik A., Koçak Yanık D., İstanbullu Y., Aysar Güzelsoy N., Yavuz A., Göğüs F., 2019 Strategies to reduce Post-Harvest Losses for Fruits and Vegetables. International Journal of scientific and Technological Research. Vol.5 No:3
- Akgün B., Ayşar Güzelsoy N., Yavuz A., İstanbullu Y., Budaklıer A. Alternative Techniques For Fruit and Vegetable Waste Valorization in Turkey. Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi. yıl:2019 Sayı:22
- Çetin V., Özcan A., Azar İ., Yavuz A. Bazı Karma Yemlerde Çeşitli Anabolik Steroitlerin Tespiti. Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi yıl:2018 sayı:20

Bildiriler

- Yavuz A., İstanbullu Y., Aysar Güzelsoy N., Çavuş F., Çöplü N., Işık Ö., Akgün B., Enhancing YOUTH(18-26) Employability in Bakery Sector. IX Food Technology International Symposium. 14 May 2019, Murcia/SPAIN
- İstanbullu Y., Güzelsoy N.A., Yavuz A., Martinez-Sanmartin A., Göğüs F., Budaklıer A., Schleining G., Chrysanthopoulou F., Lordachescu G. 2019. Best Innovative Approach to Minimize Post Harvest Losses within Food Chain for VET [POSTHARVEST]. 9TH Food Technology International Symposium, 14-15 May Murcia/SPAIN
- Yavuz, A., Azar, İ. Ülkü, N., Yavaş H., Değirmenci G. (2021). A Multiclass Method for the Analysis of Antibiotic Residues in Milk by LC-MS/MS. 2nd International/12th National Food Engineering Congress
- Yavuz A., Azar İ., Özcan A. Hayvansal Orijinli Gıdalarda Veteriner İlaç Kalıntılarının Yasal Limitleri. 10. Gıda Mühendisliği Kongresi. 9-11 Kasım 2017-Antalya
- Azar İ., Yavuz A., Özcan A. Kütle Spektrometresinde Metod Validasyonu Gereklilikleri. 10. Gıda Mühendisliği Kongresi. 9-11 Kasım 2017-Antalya