



**KÜTLE SPEKTROMETRESİ TEMELLİ  
PROTEOMİK YAKLAŞIMLAR KULLANILARAK  
KEFİRİN DETAYLI KARAKTERİZASYONU**

**Sena AKSOY**

**2022  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Hacı Mehmet KAYILI**

**KÜTLE SPEKTROMETRESİ TEMELLİ PROTEOMİK YAKLAŞIMLAR  
KULLANILARAK KEFİRİN DETAYLI KARAKTERİZASYONU**

**Sena AKSOY**

**T.C.  
Karabük Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalında  
Yüksek Lisans Tezi  
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Hacı Mehmet KAYILI**

**KARABÜK  
Ağustos 2022**

Sena AKSOY tarafından hazırlanan “KÜTLE SPEKTROMETRİSİ TEMELLİ PROTEOMİK YAKLAŞIMLAR KULLANILARAK KEFİRİN DETAYLI KARAKTERİZASYONU” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Hacı Mehmet KAYILI .....

Tez Danışmanı, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 29/08/2022

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Bekir SALİH ( HÜ)

Çevrimiçi

Üye : Doç. Dr. Hacı Mehmet KAYILI ( KBÜ)

.....

Üye : Doç. Dr. Hüseyin Avni KIRMACI ( KBÜ)

.....

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Hasan SOLMAZ .....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

*“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”*

Sena AKSOY

## **ÖZET**

**Yüksek Lisans Tezi**

### **KÜTLE SPEKTROMETRESİ TEMELLİ PROTEOMİK YAKLAŞIMLAR KULLANILARAK KEFİRİN DETAYLI KARAKTERİZASYONU**

**Sena AKSOY**

**Karabük Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı:**

**Doç. Dr. Hacı Mehmet KAYILI**

**Ağustos 2022, 83 sayfa**

Kafkasya kökenli kadim içecek kefir çok eski tarihlerden beri bir sağlık kaynağı olarak görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar da bunu desteklemektedir. Kefirin bu önemli özellikleri göstermesinin altında yatan mekanizmalar henüz aydınlatılabilmemiş değildir. Bu çalışmada kefir üretimi ve depolanması süreçlerinde süt protein profillerinde meydana gelen değişimlerin kütle spektrometresi temelli-omik yaklaşımlar kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca kefir mikroflorasından süte geçen kefir bazlı proteinlerin de tespiti çalışma kapsamında incelenmiştir. İlk olarak kefir üretimi gerçekleştirilmiştir. Kefirin üretim ve depolanması süreçlerinde çalışmada belirlenen periyotlardan kefir örnekleri alınmış ve süt proteinleri ekstrakte edilmiştir. Klasik bir proteomik yaklaşım kullanılarak Lys-C ve tripsin enzimleri kullanılarak peptitler üretilmiştir. Sonrasında peptitlerin fraksiyonlanması gerçekleştirilmiştir. Peptit içeren örnekler nLC-QExactive-Plus

kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Analiz sonucu elde edilen veriler MaxQuant yazılımı ile işlenmiş ve istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda süt proteinlerinde meydana gelen değişimler gösterilmiştir. Ayrıca kefir mikroflorasından süte geçen proteinler ve bu proteinlerin işlevleri çalışmada gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre süt proteomunda 0-12 saat aralığında 3 adet protein, 0-24 saat aralığında 39 adet protein, 0-7 gün aralığında 41 adet protein ve son olarak 0-28 gün aralığında 42 adet proteinde anlamlı değişiklikler saptanmıştır. 24. Saatten itibaren 23 adet proteinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmiştir. Analizlerde 398 adet kefir temelli proteinin süte salındığı çalışmada tespit edilmiştir. Bu proteinlerin 141 adedi etiketsiz olarak çalışmada miktarlanabilmiştir. Bu sonuçların kefir üretiminde süt proteomunda meydana gelen değişimleri göstermesi açısından literatüre değerli katkılar sağlayacağı öngörülmektedir.

**Anahtar Sözcükler :** Kefir, proteomik, fosfoproteomik, kütle spektrometresi.

**Bilim Kodu** : 92509

## **ABSTRACT**

**M. Sc. Thesis**

### **IN-DEPTH CHARACTERIZATION of KEFIR USING MASS SPECTROMETRY-BASED PROTEOMICS APPROACHES**

**Sena AKSOY**

**Karabük University**

**Institute of Graduate Programs**

**Department of Biomedical Engineering**

**Thesis Advisor:**

**Assoc. Prof. Dr. Hacı Mehmet KAYILI**

**August 2022, 83 pages**

Kefir, an ancient beverage originating from the Caucasus, has been seen as a source of health since ancient times. Recent studies also support this. The mechanisms underlying kefir's display of these essential properties have not yet been elucidated. This study aims to examine the changes in milk protein profiles during kefir production and storage by using mass spectrometry-based-omics approaches. In addition, the detection of kefir-based proteins that pass into milk from kefir microflora was also investigated within the scope of the study. First, kefir production by using bovine milk was carried out. During the production and storage processes of kefir, kefir samples were taken from the periods determined in the study, and milk proteins were extracted. Peptides were produced using Lys-C and trypsin enzymes using a classical proteomics approach. The peptides were then fractionated. Samples containing peptides were analyzed by nLC-QExactive-Plus mass spectrometry. The data obtained as a result of the analysis were processed with the Maxquant software,

and statistical analyses were performed. As a result of the study, the changes in milk proteins were shown. In addition, the proteins that pass into milk from kefir microflora and the functions of these proteins are shown in the study. According to the results, significant changes were found in the milk proteome in 3 proteins between 0-12 hours, 39 proteins between 0-24 hours, 41 proteins between 0-7 days, and finally, 42 proteins between 0-28 days. From the 24th hour, a significant change was observed in 23 proteins. In the analysis, it was determined in the study that 398 kefir-based proteins were released into milk. One hundred forty-one of these proteins could be quantified in the study by a label-free approach. These results are anticipated to provide valuable contributions to the literature showing the changes in the milk proteome in kefir production.

**Key Word** : Kefir, proteomics, phosphoproteomics, mass spectrometry.

**Science Code** : 92509



## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın danışman hocam Doç. Dr. Hacı Mehmet KAYILI' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada standart kütle spektrometrik görüntülerin elde edilmesinde Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Kütle Spektrometresi Araştırma Laboratuvar imkanlarını kullanmamızı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Bekir SALİH' e ve kefir üretiminde destek olan, çalışmanın hiçbir aşamasında yardımını ve bilgisini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Hüseyin Avni KIRMACI' ya teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 1001 kodlu ve 219Z117 numaralı projesi kapsamında desteklenmiştir. Destekleri için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen anneme, babama ve abime hiçbir yardımı esirgmeden yanımda oldukları için minnetle teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan ve bu yolda yürümem de hep destekçim olan eşim Erkut AKSOY'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiv
KISALTMALAR .....	xv
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 .....	5
LİTERATÜR TARAMASI.....	5
2.1. KEFİR .....	5
2.2. KEFİR TANESİ ve FLORA .....	6
2.3. SÜTTEN KEFİR ÜRETİMİ .....	9
2.4. KEFİR ve SAĞLIK .....	11
2.5. KEFİRİN BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNE ETKİSİ.....	12
2.6. KEFİRİN ANTİKANSEROJENİK ETKİSİ .....	12
2.7. KEFİRİN ANTİMİKROBİYEL ETKİSİ.....	13
2.8. KEFİRİN HİPERTANSİYON ÖNLEYİCİ ETKİSİ.....	13
2.9. KEFİRİN DİĞER GIDALARLA İLİŞKİSİ.....	14
2.10. PROTEOMİK.....	14
2.11. FOSFOPROTEOMİK .....	15
2.12. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (MS).....	16

	<b><u>Sayfa</u></b>
BÖLÜM 3 .....	19
MATERYAL ve DENEYSEL YÖNTEM .....	19
3.1. MATERYAL.....	19
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar .....	19
3.2. DENEYSEL YÖNTEM .....	19
3.2.1. Çiğ Sütten Kefir Üretimi .....	19
3.2.2. Kefirden Kazein Proteinlerinin Ekstraksiyonu .....	20
3.2.3. Kefirden Whey Proteinlerinin Ekstraksiyonu.....	20
3.2.4. Ekstrakte Edilen Proteinlerin Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	21
3.2.5. Kefirden Kloroform/Methanol Ekstraksiyon Yöntemi ile Toplam (Kazein + Whey) Protein Ekstraksiyonu .....	21
3.2.6. Ekstrakte Edilen Toplam Proteinlerin Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	21
3.2.7. Konsantrasyonu Belirlenen Toplam Proteinlerin Analizler İçin Proteolitik Olarak Parçalanması .....	22
3.2.8. Elde edilen Peptitlerin Analizleri İçin Tuz Giderimi.....	22
3.2.9. Tuzu Uzaklaştırılan Peptitlerin Fosfoproteomik Analizleri için Zenginleştirilmesi .....	22
3.2.10. Tuzu Uzaklaştırılan Peptitlerin Glikoproteomik Analizler İçin Zenginleştirilmesi .....	23
3.2.11. Deamide Olan Glikopeptitlerin Tespiti İçin PNGase F İşemi .....	23
3.2.12. Kloroform/Metanol Yöntemi ile Ekstrakte Edilen Toplam Proteinlerin Fraksiyonlama İşlemi İçin Proteolitik Olarak Peptide Parçalanması .....	23
3.2.13. Fraksiyonlama İşlemi İçin Elde Edilen Peptitlerden Tuz Giderimi.....	24
3.2.14. Tuzu Uzaklaştırılan Peptitlerin Fraksiyonlanması.....	24
3.2.15. nLC-ORBITRAP ile Kütle Spektrometrik Analizlerin Gerçekleştirilmesi .....	26
3.2.16. MaxQuant, Perseus ve GraphPad Prism ile Proteomik Veri Analizleri	27
 BÖLÜM 4 .....	 28
BULGULAR ve TARTIŞMA.....	28
4.1. KEFİRİN BELİRTİLEN SÜREÇLERDEKİ PH ÖLÇÜMÜ .....	28
4.2. BELİRTİLEN SÜREÇLERDE WHEY VE KAZEİN PROTEİNLERİNİN KONSANTRASYON ÖLÇÜMÜ .....	29

4.3. SÜT PROTEİNLERİNDE BELİRTİLEN SÜREÇLERDEKİ DEĞİŞİMİNİN KÜTLE SPEKTROMETRESİ TEMELLİ ETİKETSİZ MİKTARLAMA YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ .....	30
4.4. SÜT PROTEİNLERİNE AİT FOSFOPEPTİTLERİN BELİRTİLEN SÜREÇLERDEKİ DEĞİŞİMLERİNİN KÜTLE SPEKTROMETRESİ TEMELLİ ETİKETSİZ MİKTARLAMA YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ	38
4.5. SÜT PROTEİNLERİNE AİT BELİRTİLEN SÜREÇLERDEKİ DEAMİDE OLMUŞ (POTANSİYEL GLİKOPEPTİTLERİN) PEPTİTLERİN DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ .....	40
4.6. SÜTE SALINAN KEFİR ORJİNLI PROTEİNLERİN KÜTLE SPEKTROMETRESİ TEMELLİ ETİKETSİZ MİKTARLAMA YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ .....	40
4.7. TESPİT EDİLEN KEFİR PROTEİNLERİN BİYOİNFORMATİK YAKLAŞIMLA FONKSİYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ .....	42
BÖLÜM 5 .....	44
SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	44
KAYNAKLAR .....	45
EK AÇIKLAMALAR A. ....	52
SONUÇLAR .....	52
ÖZGEÇMİŞ .....	83

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2. 1. Kefir tanesi .....	7
Şekil 2. 2. Kefir tanesinin iç kısmından bir görüntü. ....	8
Şekil 2. 3. Geleneksel yollarla kefir üretimi. ....	10
Şekil 2. 4. Endüstriyel yollarla kefir üretimi.....	11
Şekil 2. 5. Kütle spektrometresinin temel bileşenlerinin şematize hali . ....	17
Şekil 4. 1. Belirtilen süreçlerde kefir için ölçülen pH.....	28
Şekil 4. 2. Belirtilen süreçlerde proteinlerin konsantrasyonları: A, B ve C BCA Assay yöntemi, D kloroform metanol yöntemi. A) Kazein Fraksiyonu, B) Whey Fraksiyonu ve C) Toplam (Kazein+Whey) Fraksiyonu. D) Toplam (Kloroform/Metanol Ekstraksiyonu). ....	30
Şekil 4. 3. Belirtilen süreçlerdeki süt proteinlerine ait histogram grafiği. ....	32
Şekil 4. 4. Belirtilen süreçlerdeki kefir örneklerine ait çoklu dağılım grafiği (Pearson korelasyon dağılımı). ....	33
Şekil 4. 5. Süt proteinlerinin miktarsal değişimini gösteren ısı haritası. ....	37
Şekil 4. 6. Kloroform/metanol ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen fosfopeptitlerin intensitelerdeki değişimini gösteren ısı haritası.....	39
Şekil 4. 7. Kefirden süte salınan proteinlerin miktarsal değişimlerini ifade eden ısı haritası.....	41
Şekil 4. 8. Kefir mikroflorasından süte salınan proteinlerin hücresel bileşenlerine göre sınıflandırılması. ....	42
Şekil 4. 9. Kefir mikroflorasından süte salınan proteinlerin moleküler işlevlerine göre sınıflandırılması. ....	43
Şekil 4. 10. Kefir mikroflorasından süte salınan proteinlerin biyolojik süreçlerde yer aldığı görevlerine göre sınıflandırılması. ....	43

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 3. 1. Kefirin deneylerde kullanılan saat bazında fermantasyon zamanları ve gün bazında depolanma zamanları.....	20
Çizelge 3. 2. Fraksiyon sayısı ve her fraksiyonda kullanılan elüsyon çözeltileri, miktarları ve pH'ları. ....	25
Çizelge 4. 1. Anlamlı değişiklik saptanan proteinlerin listesi. ....	34
Çizelge Ek A. 1. Fraksiyonlama yöntemi ile tespit edilen süt proteinleri ve değişimlerine ait istatistiksel analiz sonucu. ....	53
Çizelge Ek A. 2. Kloroform/metanol ekstraksiyon yöntemi ile tespit edilen fosfopeptitlerin değişimlerine ait istatistiksel analiz sonucu.....	63
Çizelge Ek A. 3. Tespit edilmiş deamide olmuş glikopeptitlerin listesi (Kloroform/metanol ekstraksiyon yöntemi ile).....	68
Çizelge Ek A. 4. Fraksiyonlama yöntemi ile tespit edilen kefirde geçen kefir mikroorganizmasına ait proteinler. ....	71

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

m/z : Mass-to-charge ratio (kütle/yük oranı)

mL : Mililitre

$\mu$ L : Mikrolitre

$\mu$ g : Mikrogram

M : Molar

mM : Milimolar

nm : Nanometre

s : Saniye

## KISALTMALAR

Ost	: 0.Saat
12st	: 12.Saat
24st	: 24.Saat
7gn	: 7.Gün
28gn	: 28.Gün
ABC	: Amonyum Bikarbonat
SDC	: Sodyum Deoksikolat
IAA	: İyodoasetamid
DDT	: DL-Ditiyoltriol
ACN	: Asetonitril
TFA	: Trifloro Asetik Asit
PNGase F	: Peptit-N-Glikozidaz F Enzimi
Lys-C	: Lizil Endopeptidaz
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikada Dönme Sayısı)
rcf/g	: Relative Centrifugal Force (Göreceli Santrifüj Kuvveti) veya Gravite



## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Protein, Yunanca kökenli ve ‘‘en önemli’’, ‘‘birinci sırada’’ gibi anlamlarda kullanılan ‘‘proteios’’ kelimesinden türetilmiştir [1,2]. Proteinlerin canlıların organizasyonunda önemli fonksiyonları olduğunun ortaya konması ile birçok araştırmanın dinamiği haline gelmiştir.

Proteom, genom tarafından kodlanan belirli bir canlıdaki ya da canlıdan elde edilen bir örnekteki proteinlerin tamamını kapsayan terimdir [3]. Proteom oldukça değişkendir çünkü proteinler, sentezlendikten sonra işlevlerine göre birçok değişikliğe uğrarlar [4]. Bu değişiklikler ‘‘Posttranslasyonel Modifikasyonlar (PTM)’’ olarak ifade edilir, enzimatik olarak gerçekleşir ve proteinin aktivasyon gösterebilmesi için gereklidir. PTM’ler fosforilasyon, glikolizasyon, metilasyon, asetilasyon gibi birçok farklı modifikasyonu içerirler [1].

Proteomik, herhangi doğal bir örnekteki proteinin ekspresyonu, tanımlanması, miktarsal olarak belirlenmesi, uğradığı değişimler, diğer biyomoleküller ile olan etkileşimi, işlevlerinin saptanması gibi olaylar ile ilgilenen alandır [4,5].

Kütle spektrometresi (MS) geçmiş dönemlerde daha çok kimyagerler ve fizikçilerin tercih ettiği bir yöntemken günümüzde her alandan bilim insanlarının çalışmalarında yer alan bir dinamiktir [6].

Proteomik araştırmalar yeni gelişmeler ile yüksek hassasiyet, verim, doğruluk ve tekrarlanabilirliğe sahip olması sebebiyle kütle spektrometresi üzerine temellenmiştir [7]. Atom veya moleküllerin elektrik veya manyetik alan ile gaz iyon fazına geçmesi ile kütle/yük oranına göre ayrımının kaydedilmesini sağlayan cihazlardır. İyon bolluğuna göre m/z oranının gösterildiği spektrum elde edilir [8].

Proteomik çalışmalar için yukarıdan-aşağı ya da aşağıdan-yukarı yaklaşımlar izlenir. Aşağıdan-yukarıya yaklaşımda protein molekülleri kimyasal veya enzimatik parçalanmaya tabii tutulup peptit fraksiyonları elde edilirken yukarıdan-aşağı yaklaşımda sağlam protein molekülleri doğrudan analize verilir [9].

Beslenme konusunda bilinçlenmenin artması ile beraber insanlar, temel besin bileşen gereksinimlerini karşılayabilmenin yanı sıra daha fazla fizyolojik ve metabolik faydaları olan gıdalara yönelmeye başlamıştır. Bu sebeple patojenik olmayan, doğal gastrointestinal florada da bulunan ve vücut sağlığını destekleyen probiyotikler ile probiyotiklerin gıdası olarak tanımlanan, konak tarafından sindirilmeyen, probiyotiklerin sayısal ve kalitesel artışlarını sağlayan prebiyotik gıdalara olan ilgi artmıştır[10–12]. Bu nedenle canlı mikroorganizma içeren ya da bunlardan üretilmiş probiyotik gıdalardan olan fermente gıdaların tüketimi artmaktadır. [13]. Bu gıdalardan biri de Kefirdir.

Kafkasya Dağlarından dünyaya yayılan kefir; inek, keçi, koyun gibi çeşitli sütlerin ‘kefir tanesi’ adı verilen karnabahar görünümlü, düzensiz partiküllü kültür ile mayalanması sonucu elde edilir [14]. Kefir tanesinin yapısında lipidler, çözünebilir ve çözünemeyen proteinler ve kefiran olarak adlandırılan mukopolisakkaritler bulunur [15]. Kefiranda bulunan laktik asit ve asetik asit bakterileri ile laktozu fermente eden ve edemeyen mantar türlerinin ortak yaşamı ve aktivasyonu sonucu etil alkol ve laktik asit fermantasyonunun bir arada gözlemlenmesi ile kefirin hafif alkollü, asidik ve kendine has tadı oluşmaktadır [14]. Bunun yanı sıra besin kalitesini arttırıcı vitaminler, mineraller, peptitler ve aminoasitler gibi başka biyoaktif maddeler açısından da zengindir.

Doğal bir probiyotik fermente süt ürünü olan kefirin yapılan çalışmalarda sağlık üzerine birçok olumlu etkileri olduğu ortaya konmuştur. Bu etkiler başlıca; antikanserojenik, antialerjik, antimikrobiyel, tansiyon düşürücü, kan şekeri düzenleyici, sinir ve sindirim sistemi düzenleyici olarak sıralanabilir. Bu etkilerin mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte mayalanma süresince ortama salınan çeşitli biyomoleküllerden veya mevcut süt bileşiminde meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir [16].

Kazein ve whey (serum) proteinleri kefirin içerdiği önemli süt kaynaklı proteinlerdir. Kazein proteinleri dört alt birimden oluşur;  $\beta$ -,  $\kappa$ -,  $\alpha_{s1}$ - , ve  $\alpha_{s2}$ - . Kazein proteinleri süt ürünlerinde fermantasyon sonrası oluşan biyoaktif peptidlerin önemli kaynağını oluşturmaktadır [17]. Whey proteinleri ise başlıca  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbümin ve serum albümininden oluşmuştur. [18]. Bunların yanı sıra laktoferrin, lizozim, immünoglobulinler ve laktoperoksidazlar da bulunur.  $\beta$ -laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbümin biyoaktif aminoasit zincirlerine sahip öncüllerdir [17].

Bu çalışmada Çizelge 3.1'de belirtilen zamanlardaki hem süt orijinli hem de mayalanma sonucunda salınan biyoaktif proteinlerin tespiti üzerine yoğunlaşmaktadır. Kefirin içerdiği süt veya mayalanma kaynaklı proteinler ve proteinlerin uğradığı modifikasyonlar üzerine fermantasyon ve depolama süreçlerini karşılaştırmalı içeren detaylı bir çalışma bulunmadığından literatürde ki bu eksikliğin giderilmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple kazein ve whey proteinlerinde ki değişimlerin miktarsal olarak protein bazında saptanması, fermantasyon sürecinde kültürden salınan proteinlerin saptanması ve bu proteinlerin süt orijinli proteomlara etkileri, süt proteinlerine ait PTM takibi için proteinlerdeki ve fosfopeptidlerdeki değişimlerin saptanması üzerine çalışılmıştır.

Çalışmada proteom ve fosfoproteom analizleri, aşağıdan-yukarıya proteomik yaklaşımı kullanılarak yüksek kütle ayırıcılığına, doğruluğuna ve hassasiyetine sahip bir kütle spektrometrik cihaz (Dionex 3000 RSLC nano akış sıvı kromatografisi entegre Q-Exactive Plus-Orbitrap) ile gerçekleştirilmiştir. MaxQuant yazılımı, verilerin işlenmesinde Perseus yazılımı ise MaxQuant'dan elde edilen verilerin değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

Bu çalışmanın tez yazım kapsamında aşağıda belirtilen aşamalar izlenmiştir:

Birinci bölümde, çalışmanın konusu ve çalışmanın amacı hakkında kısa bir bilgilendirme yapılmıştır.

İkinci bölümde, çalışmanın ana konusu olan kefir hakkında yapılan literatür incelemesine, çalışma kapsamında olan proteomik, fosfoproteomik ve kütle spektrometresi hakkında genel bilgilere yer verilmiştir.

Üçüncü bölümde, materyal ve deneysel yöntem çalışmanın amacına uygun olarak ele alınmış, bu kapsamda örneğin hazırlanması detaylandırılmıştır.

Dördüncü bölümde, çalışmalar sonucu elde edilen bulgular aktarılmış, elde edilen bulgular literatürde bulunan kefir çalışmaları ile karşılaştırılmış ve değerlendirilmiştir.

Beşinci bölümde, elde edilen bulgular çalışma ve tez kapsamına uygun olarak yorumlanmıştır.

## BÖLÜM 2

### LİTERATÜR TARAMASI

#### 2.1. KEFİR

Üretimi ve tüketimi milattan öncelere dayanan ve Kafkasya Dağlarından dünyaya yayılan kefire olan ilgi günden güne artmaktadır[19]. İsminin kökeni dilimizde ‘‘hoşa giden’’ anlamında ki bir kelime olan ‘‘keyf’’tir [20]. Kefir inek, keçi, koyun gibi çeşitli sütlerin ‘‘kefir tanesi’’ adı verilen kültür ile mayalanması sonucu elde edilir [21]. Bir fermente süt ürünü olan kefir, karbondioksit içeren, hafif alkollü, asidik ve kendine has serinletici tada sahip bir içecektir.

Kefir, geleneksel yollarla ya da endüstriyel üretim ile elde edilebilir. Geleneksel yollarla üretilen kefir ile endüstriyel üretilen kefir arasında ki potansiyel fonksiyonel farklılıklar hala tartışma konusudur [22].

Kefir kültürünün içerdiği mikroorganizmaların aktivitesi ile (özellikle proteolitik ve lipolitik) süt bileşiminde önemli değişiklikler meydana gelir [23]. Kefirin yine bu mikroorganizmalarının aktivitesi sonucu besinsel değeri artar. Kefir A, B (B1, B2, B5 ve B12), C ve K vitaminleri, mineraller (Mg, Ca, P, Zn, Cu, Mn, Fe, Co ve Mo), folik asit ve serbest aminoasitler (serin, lizin, alanin, treonin, triptofan, valin, lizin, metionin, fenilalanin ve izölösün) bakımından zengin önemli bir besin kaynağıdır [20,23–25].

Kefiri diğer fermente süt ürünlerinden ayıran önemli bir özellik spesifik bakteri ve mayaların aktivasyonu sonucu laktik asit ile etil alkol fermantasyonunun dolayısıyla da ürünleri olan laktik asit, etanol ve CO<sub>2</sub> ’in bir arada görülmesidir [15,26].

Kefirin kimyasal kompozisyonu oldukça değişkendir ve bu değişkenlik sadece kefir tanelerinin mikroorganizma miktarını ve türünü etkileyen kökenine göre değil, sütün kaynağı, sıcaklık gibi fermantasyon koşullarına ve depolama süreç ile şekline bağlı olarak da değişmektedir [27].

Sütten kefire mayalanma sürecinde süt içeriğinde bulunan laktozun bir kısmı glukoz ve galaktoza sindirilir [28]. Kefir mikrobiyomunun bir aktivitesi sonucu kefirde tat ve aromaya katkı sağlayan uçucu ve uçucu olmayan bileşikler olan piruvik asit, hippurik asit, propiyonik asit ve butirik asit diasetil ve aset-aldehit salınmaktadır [26].

## **2.2. KEFİR TANESİ ve FLORA**

Kafkasya Türklerinin sütü keçi tulumunda muhafaza ederken köpüren bir içeceğe dönmesi ile keşfettiği düşünölen kefir, günümüzde ticari kültürler ya da ‘‘kefir tanesi’’ (Şekil 2.1.) denen gelenekselleşmiş bir kültür ile elde edilir [29].

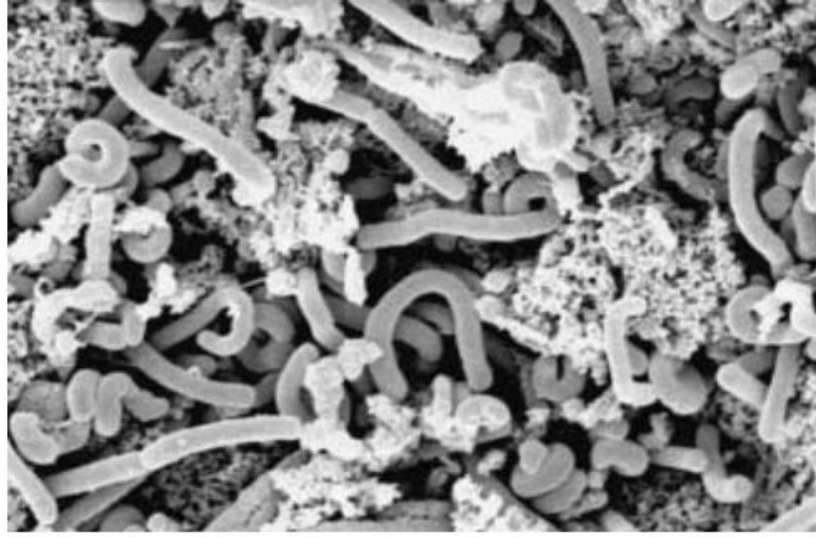
Kefir tanesi, protein ve polisakkarit yapıda zengin bir mikrofloraya sahip, şekil olarak karnabahar ya da patlamış mısıra benzeyen, elastik, düzensiz partiküllü, beyazımsı veya sarımtırak renkli, çeşitli çap aralığında olan bir yapıdır [22,30]. Yağ (%4,4), kül (%12,1), mukopolisakkarit (%45,7), çözünebilen proteinler (%1,6), çözünemeyen proteinler (%27), serbest aminoasitler (%5,6)’den oluşan kefir tanesi aynı zamanda mayalar ve bakterilerden oluşan zengin bir simbiyotik yaşama ev sahipliği yapar [15].



Şekil 2. 1. Kefir tanesi [31].

Yapay olarak sentezlenemeyen kefir tanelerinde protein ve “kefiran” denen mukopolisakkarit yapı içerdiği mikroorganizmaların birbirleri ile iletişimini sağlayan karmaşık bir yapı olarak karşımıza çıkmaktadır. Kefiranda 1:1 oranında D-glukoz ve D-galaktoz bulunmaktadır [15,30]. Kefiran, kefir tanesinde ki laktobasiller olan *Lactobacillus kefiranofaciens* ve *Lactobacillus kefiri* tarafından üretilir [28,32].

Kefiranda laktik asit ve asetik asit bakterileri ile laktozu fermente edebilen-edemeyen mayalar bulunmaktadır [21,22]. Yine kefir tanelerinde laktik asit bakterileri asetik asit bakterilerine oranla daha fazla bulunmaktadır [22]. Kefir tanesinde mayalar tanenin ortasından iç kesimine (Şekil 2.2.), laktik asit bakterileri tanenin ortasından dış kesimine doğru, asetik asit bakterileri ise tanenin dış kısmında yerleşim gösterirler [33].



Şekil 2. 2. Kefir tanesinin iç kısmından bir görüntü[34].

Kefir tanelerinde çok sayıda mikroorganizma türü saptanabilir. Farklı kökenli tanelerden 23'ten fazla tür izole edilmiştir [35]. En baskın bulunan bakteri türleri: *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactocaseibacillus paracasei* (basonym *Lactobacillus paracasei*), *Lactiplantibacillus plantarum* (basonym *Lactobacillus plantarum*), *Lactobacillus acidophilus*, ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; maya türleri: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kefir*, ve *Kluyveromyces marxianus* ssp. *marxianus*'tir. [23].

Kefir tanelerinin en önemli özelliklerinden biri tekrar tekrar kullanılabilmesidir [32]. Taneler çeşitli yöntemlerle muhafaza edilebilir ve dikkatli muhafaza koşullarında özelliklerini kaybetmezler [28]. Taneler +4 °C'de 10 güne kadar aktifliklerini korurlar. Bunun yanı sıra oda sıcaklığında 36-48 saat gibi bir zaman aralığında kurutularak 18 aya kadar özelliklerinin korunması sağlanabilir [15]. Garrote ve arkadaşları, tanelerin -20 °C'de muhafaza edilmesinin en uygun yöntem olduğunu belirledi [36].

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliğine göre kefirin ağırlıkça en az %2,7 süt proteini, en az %0,6 laktik asit içermesi gerektiği, yağ oranının ise ağırlıkça en fazla %10,0 olması gerektiği belirtilmiştir. İçerdiği alkol oranına ise bir sınırlama getirilmemiştir.



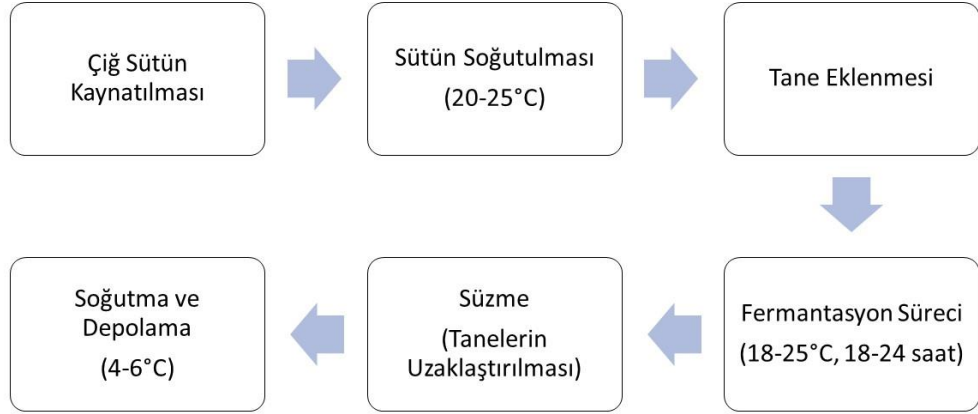
### 2.3. SÜTTEN KEFİR ÜRETİMİ

Kefir genellikle inek, koyun, keçi, deve gibi hayvanların sütlerinden üretilse de günümüzde süte ulaşım zorluğu ve pahalılığı, dini sebepler, veganların ve laktoz intoleransına sahip bireylerin probiyotik ihtiyaçlarına cevap verebilmek gibi bazı nedenlerle şekerli su; elma, soya, ananas, Hindistan cevizi, badem, nar, kavun gibi meyvelerden elde edilen özütler ile süt içermeyen kefirler de üretilmeye başlanmıştır [23,35]. Kefir yağsız, yarım yağlı veya tam yağlı sütlerden elde edilebilir.

Kefir geleneksel yollarla (kefir taneleri ile) veya endüstriyel olarak özel hazırlanmış mayalarla elde edilebilir. Günümüzde marketlerde ticari olarak satılan kuru mayalar bulunsa da evlerde hazırlanan kefirlerde daha çok geleneksel yol ile mayalama tercih edilir. Market raflarında alıcı bulan kefirler üretilirken ise endüstriyel olarak özel hazırlanmış mayalar kullanılır.

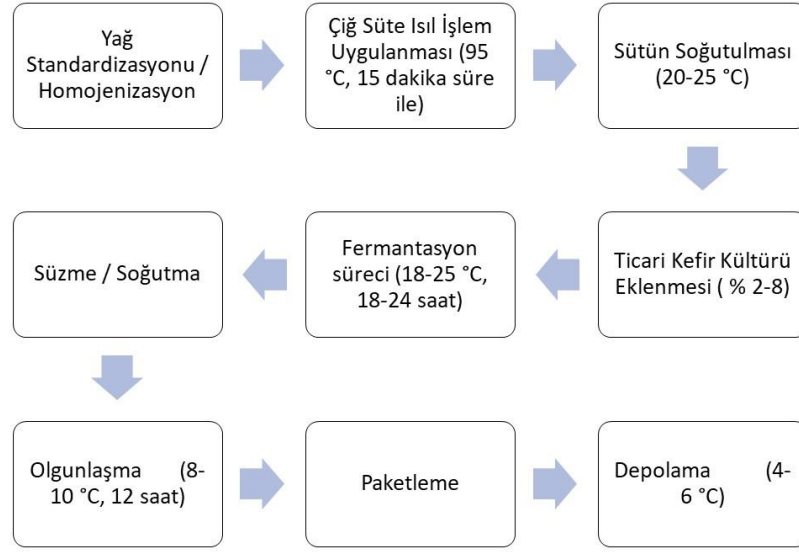
Kefir üretimi için tercih edilecek sütün düşük bakteriyel habitat ve hücre kalıntıları ile kefir mikrobiyomunun yaşamasını ve aktivitelerini engelleyecek antibiyotik benzeri maddelerden yoksun olduğuna dikkat edilmesi gerekir [23].

Genellikle evde kefir üretiminde tercih edilen geleneksel yöntemde kullanılacak süt marketlerden temin edilen pastörize sütler ya da diğer satıcılardan alınan pastörize edilmemiş sütler olabilir. Pastörize sütler taneler eklenmeden ideal sıcaklığa (20-25 °C) gelecek şekilde ısıtılırken açıktan alınan diğer sütler bir süre kaynatılarak dezenfekte edilir. Daha sonra ideal sıcaklığa gelmesi için soğutulur. Soğuyan süte, kefir tanesi süt oranı 1:30-1:50 olacak şekilde eklenmesi önerilse de çoğunlukla deneysel ölçüler kullanılır [28]. Kefir tanelerinin eklenmesinin ardından süt ağzı kapalı bir kaptaki 18-25 °C sıcaklığında 18-24 saat fermantasyona bırakılır. Fermantasyon sonunda kefir tanelerinin hacmini bir miktar artırdığı gözlenir [28]. Kefir oluşumu tamamlandıktan sonra kefir taneleri uzaklaştırılır ve başka üretimlerde kullanılmak üzere saklanır.



Şekil 2. 3. Geleneksel yollarla kefir üretimi.

Endüstriyel kefir üretiminde başlangıç kültürü olarak maliyeti yüksek, üretim ve ürün stabilizasyonu zorluğu olan kefir taneleri yerine standart tat ve kıvam eldesine imkan sağlayan kefir tanelerinden izole edilmiş saf mikroorganizmaların olduğu ticari kültürler kullanılır [28,37]. Endüstriyel üretimde süt, pastörizasyon aşamasından önce daha kıvamlı ve standart ürün elde edilmesi amacıyla yağ standardizasyonuna tabii tutulur. Isıl işlem sonrası, fermantasyon için uygun sıcaklık olan 20-25 °C'ye soğutulur. %2-8 oranında ticari kültür eklenir ve fermantasyona bırakılır. Kefir oluşumu gerçekleştikten sonra ürünler süzülür ve olgunlaşması için bırakılır. Daha sonra paketlenerek depolanır.



Şekil 2. 4. Endüstriyel yollarla kefir üretimi.

Kefir endüstriyel olarak ‘‘Rus Yöntemi’’ denilen bir başka yöntemle daha üretilebilir [35]. Rus yönteminde geleneksel yöntem ile elde edilen kefir taneler uzaklaştırıldıktan sonra kalan süzöntü kullanılır. Elde edilen süzöntü geleneksel yöntemin aksine büyük ölçekli üretime izin verir [35].

## 2.4. KEFİR ve SAĞLIK

Sağlık üzerine birçok önemli katkısı olduğu keşfedilen fermente gıdalara olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Fermente gıdalar; canlı mikroorganizma içeren ya da bunlardan üretilmiş probiyotik gıdalardır [13].

Yapılan çalışmalar ile kefirin sağlık üzerine olumlu etkileri olduğu ortaya konmuştur. Bu etkilerin mekanizmaları üzerine çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Kefirin sağlık üzerindeki faydalarının sebeplerinin ekzopolisakkaritler ve biyoaktif peptitler olduğu/olabileceği yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Ancak hala mekanizması aydınlatılmayan yararlar ve bu yararlarından sorumlu olabilecek fermantasyon sırasında salınan tanımlanmamış biyoaktif moleküller bulunmaktadır [38].

Aynı zaman da kefirin içerdiği laktik asit bakterilerinin güçlü terapötik etkilerinin olduğu saptanmıştır [24]. Kefirdeki mikroorganizmaların düşük pH ve safra asidine

dirençli bir yapıda olduğu, intestinal mukozaya tutunma özelliğinde olduğu ve patojenlere karşı etkin bir antagonistik faaliyet gösterdikleri ortaya konmuştur [28].

Kefir modern tedavi seçeneklerinin bulunmadığı ya da ulaşılamadığı geçmiş dönemlerde hastalık tedavisinde önemli bir araç olarak kullanılmıştır [23].

Kafkas yaşlı nüfusunun sayıca fazla ve yaş ortalamalarının yüksek olmasının nedenlerinden biri kefir olarak görülmektedir [39].

Kefirin faydaları, fermantasyonu ve depolanması süreçlerinde içerdiği mikroorganizmalar kaynaklı sahip olduğu kefiran, ekzopolisakkaritler, organik asitler ve biyoaktif peptidler kefirin teröpatik etkisi ile ilişkilendirilir [22].

## **2.5. KEFİRİN BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNE ETKİSİ**

Beslenmenin bağışıklık üzerinde doğrudan etkisi olduğu bilinmektedir [40]. Kefir içerdiği vitamin (özellikle C vitamini), mineral, serbest aminoasitler ve proteinler ile bağışıklık sistemini önemli ölçüde desteklemektedir. Kefirdeki lipitlerden izole edilen sfingomiyelinin bağışıklık sistemini uyardığı bildirilmiştir [41].

Sebebi bilinmeyen ve hastanın yaşam kalitesini olumsuz etkileyen Crohn Hastalığı ciddi bir sindirim sistemi hastalığıdır [42]. Yılmaz ve arkadaşları kefir ile beslenmenin Crohn Hastalığına etkisini incelediler. Bu çalışma sonucunda kefir tüketen Chron hastası bireylerinin semptomlarında iyileşme ve yaşam kalitesinde artış olabileceği gözlemlendi. Yine bu çalışmada kefirin, hastalarda ki hemoglobin ve ESR gibi biyokimyasal parametrelerin üzerinde olumlu etkisi olduğu gözlemlendi [42].

## **2.6. KEFİRİN ANTİKANSEROJENİK ETKİSİ**

Kanser kontrolsüz bölünerek çoğalan hücrelerin bir araya gelmesi ile oluşan kötü huylu hücre topluluğudur [33]. Hücrelerde, intrinsik ya da çevresel kanserojenik faktörlerin etkisi ile gen mutasyonları sonucu oluşur [43]. Sağlıklı bir hücre

döngüsünde bu tip hücrelerin yaşamasına izin verilmez. Ancak kanser hücreleri bağıışıklık hücrelerinden kaçma yeteneğine sahiptirler [24].

Yapılan bazı çalışmalar ışığında kefirin kısa zincirli bazı yağ asitlerinin üretimi ve pH'ı düşürmesi ile apoptozu ve hücre çoğalması gibi hücreyel yolları etkileyebileceğinden antikanserojenik olduğu söylenebilir [24,33]. Ayrıca mutasyonu ve DNA hasarını azaltması, toksik bileşenleri etkisizleştirmesi, kanser gelişmesine katkısı olan  $\beta$ -glukuronidaz, nitroredüktaz, azoredüktaz enzimlerinin aktifliklerini azaltması gibi yönleri ile antikanser etkisi gösterir [33].

## **2.7. KEFİRİN ANTİMİKROBİYEL ETKİSİ**

Kefirin içerdiği biyoaktif peptidlerin antimikrobiyel etkisi ortaya konmuştur. Ancak kefirin esas antimikrobiyel etkisi özellikle kefiran ve organik asitler olmak üzere ekzopolisakkaritlere atfedilmiştir [22].

Yirmibeşoğlu ve Öztürk'ün yaptığı bir çalışma farklı süt çeşitlerinden (inek ve eşek sütü) yapılan kefirlerin çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etki gösterebileceğini ortaya koydu [44]. Yine Sindi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kefir mikrobiyomundaki laktik asit bakterilerinin ürettiği biyoaktif moleküller olan bakteriyosinlerin birden fazla gıda kaynaklı patojenik mikroorganizma üzerinde antimikrobiyel etki gösterdiğini ortaya kondu [45].

Kefiranın, süt ve süt ürünlerinde de yaygın karşılaşılan ve tümör ile ilişkilendirelen aflotoksini üreten mantarlar üzerinde etkili olduğu gözlemlendi. Aflatoksin üretimini ciddi oranda düşürecek bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır [46,47].

## **2.8. KEFİRİN HİPERTANSİYON ÖNLEYİCİ ETKİSİ**

Kanın damara yaptığı yüksek basınç olarak tanımlanan hipertansiyon kalp krizi, inme, ciddi damar ve kalp hastalıklarının en önemli nedenlerindedir[48,49].

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) kan basıncının artmasını tetikleyen bir dizi metabolik görevlerde yer alır [50]. Süt ürünlerinde ki biyoaktif peptitlerin bazıları ACE için inhibitör görevi görür [38]. Amorim ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, kefirdeki ACE inhibitör varlığını doğrularken kefirin antihipertansif etkisini de ortaya koymuşlardır [38].

## **2.9. KEFİRİN DİĞER GIDALARLA İLİŞKİSİ**

Kadim içecek kefirin sağlık alanında önemi keşfedilmesi ile birlikte diğer gıdaların üretilmesinde ve hazırlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle süt yerine kullanılabilir olması kefire geniş bir kullanım alanı sunmuştur [51]. Süt yerine kefir kullanılabilir ticari olan veya olmayan gıdalar; yoğurt, dondurma ve peynir olarak sıralanabilir. Ayrıca bazı tarhana üretimlerinde, fermante gıda kefirin yoğurdun yerini aldığı görülmüştür [51].

## **2.10. PROTEOMİK**

Bir organizmanın bünyesinde içermiş olduğu tüm genlere genom denir [52]. Genom, organizmanın sahip olduğu bütün özellikleri içinde saklayan geniş bir şifre koleksiyonudur. Canlının hayatını devam ettirmesi için, genomun sahip olduğu şifrelerin ifade edilmesi gereklidir. Bu şifrelerin ifade edilmiş hali olan proteinlere proteom denir. Genom canlıda değişmez bir temel taşı iken proteom oldukça değişkendir ve modifikasyonlar geçirir [53].

Proteom genom tarafından kodlanmış, bir hücrenin, dokunun veya organizmanın sahip olduğu ve eksprese edilmiş tüm proteinleri ifade etmesinin yanında sadece polipeptitleri değil ayrıca proteinlerin uğradığı post transyonal modifikasyonları (PTM) da kapsayan bir terimdir [54].

Proteomun organizma için önemi proteinleri ciddi bir çalışma alanı yapar. Proteomik; proteinlerin ve onların PTM'lerinin tanımlanması, ekstraksiyonu, saflaştırılması, zenginleştirilmesi, miktarlanması, yapılarının ve işlevlerinin aydınlatılması, diğer mikro ve makro biyomoleküllerle ilişkilerinin incelenmesi gibi

birçok önemli noktayı içinde barındıran bir disiplindir [55]. Bu bağlamda üç proteomik alan karşımıza çıkmaktadır; kıyaslamalı, yapısal ve işlevsel [53]. Kıyaslamalı proteomik iki veya daha fazla proteinin nitel ve nicel olarak analizi ile proteinlerin tespit edilmesi, incelenerek karşılaştırmasını yapan alandır. Yapısal proteomik bir proteinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı ile ilgilenen ve etkileşimlerinde fizikokimyasal yapıya odaklanan alandır. İşlevsel proteomik ise bir proteinin bireysel işlevlerini veya diğer proteinler ve biyomoleküller ile etkileşim halindeki işlevlerini inceleyen alandır. İşlevsel proteomik PTM'lere de yoğunlaşmaktadır.

Proteinlerin hastalıkların erken teşhisi, prognozu ve hastalığın gelişimin izlenmesindeki önemi sebebiyle tıbbi çalışmalarda büyük öneme sahiptir. Ayrıca ilaç ve aşı geliştirme alanlarında da hayati bir role sahiptir[55] .

Proteomik analizlerde birçok yöntem kullanılabilir. Bu yöntemler tek boyutlu/iki boyutlu poliakrilamid jel elektroferezini içeren elektroforetik yöntemler, iyon değişim kromatografisi ve afinite kromatografisi gibi kromatografik yöntemler ile kütle spektrometresi (MS) vb. olabilir [55,56]. Son yıllarda proteomik çalışmalar MS odaklı ilerlemektedir.

## **2.11. FOSFOPROTEOMİK**

Bir proteinin organizmada etkin bir şekilde görevini yapabilmesi için sentezlendikten sonra birtakım işlemlere tabi tutulması gerekir [57]. Post transyonel modifikasyon (PTM) denen bu işlemler proteinlere kovalent olarak metil gibi küçük moleküllerin veya karbonhidrat gibi kompleks moleküllerin eklenmesi ile gerçekleşebilir. Bu modifikasyonlara fosforilasyon, glikolizasyon, asetilasyon, açilasyon, prenilasyon gibi çeşitli örnekler verilebilir [57].

Bir proteine ya da peptide fosfat grubunun eklenmesi olan fosforilasyon, protein işlevselliğini düzenlediğinden gen ifadesi, birçok sinyal yolu, hücrel organizasyon gibi önemli roller üstlenir ve en çok rastlanan PTM çeşididir [58,59].

Geri dönüşümlü olan fosforile proteinlerin, fosfoproteomik analizlerinin etkili gerçekleştirilmesi için ekstrakte edilmesinin yanı sıra iyi saflaştırılması ve zenginleştirilmesi gerekir [60]. Ayrıca fosfopeptitlerin tanımlanması ve fosforilasyon bölgelerinin tespiti de bu bağlamda önemlidir. Kütle spektrometrisi fosfoproteomik analizler içinde güçlü bir araçtır [58]. MS, sentezlenmiş proteinin veya peptidin fosforile edildiğini doğrulama, fosforile proteinin tanımlanması ve fosforilasyon bölgesinin tespit edilmesi için özellikle son yıllarda popüleritesi artmış bir cihazdır [60].

## 2.12. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (MS)

Kütle spektrometrisinin gelişen hassasiyeti, çözünürlüğü ile yöntemdeki verimin artması, yazılımların geliştirilmesi, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği kütle spektrometrisini, biyolojik numunelerde protein incelenmesinde birincil araç olmaya itmiştir [61]. Ayrıca kütle spektrometrisi tabanlı proteomik, proteomdaki mutant değişiklikleri de kapsamlı bir şekilde analiz edebilir [62].

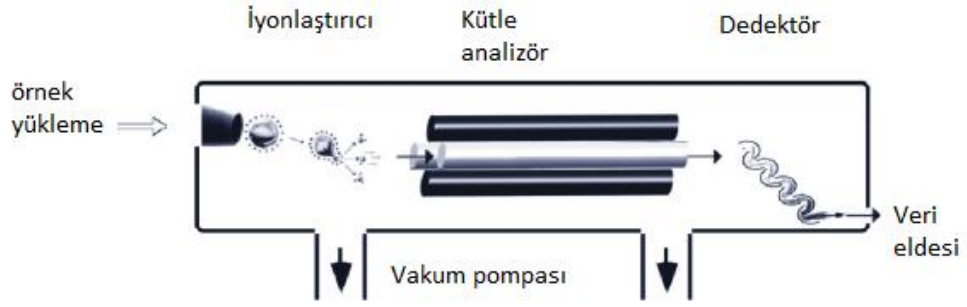
Kütle spektrometrisi tabanlı analizlerde örnek hazırlamada çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Etiketli (labeled) ve etiketsiz (label-free) proteomik bunlara örnek verilebilir. [62]. Etiketli proteomikte protein, peptid veya aminoasitler genellikle ağır izotoplar olmak üzere izotop atomlar yardımı ile işaretlenir ve kütle spektrometresi ile analizi gerçekleştirilir. Oldukça hassas ve güvenilir kabul edilen bir tekniktir.

Kütle spektrometrik analizlerde diğer yaklaşımlar proteomların yukarıdan-aşağı veya aşağıdan-yukarı yaklaşımlarla hazırlanmasıdır [63]. Her bir yaklaşımın kendine özgü avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Aşağıdan-yukarı yaklaşımli proteomikte çalışılacak protein ekstrakte edildikten sonra bir enzim yardımı ile peptitlere sindirilir[64]. Bu sayede proteinlerin tanımlanması, miktarlanması, varsa PTM'in çeşidinin ve konumunun tespiti kolaylıkla yapılır. Yukarıdan-aşağı yaklaşımli proteomikte proteinin ekstraksiyon aşamasından sonra sindirilmez ve bir bütün olarak analiz edilir[63].

MS, hedef moleküldeki iyonun kütle/yük ( $m/z$ ) oranını analiz ederek moleküler ağırlık belirleme ile tanımlama prensibine dayalı bir analiz aracıdır [55]. Kütle



spektrometresi genel bakışta molekülleri gaz fazı iyonlarına dönüştüren iyonlaştırıcı, kütle/yük oranına göre ayrılmasını sağlayan elektriksel veya manyetik alanlı kütle analizörü ve oranın algılanmasını sağlayan dedektörden oluşur [65]. Tespit edilen m/z oranı ile iyon bolluğu odaklı elde edilen ve kütle spektrumu denen grafikte hedef molekülün kütle bilgisine artı olarak miktarı hakkında da bilgi edinilebilir [66].



Şekil 2. 5. Kütle spektrometresinin temel bileşenlerinin şematize hali [66].

Kütle spektrometresinin bileşenleri ve sistemi detaylandırıldığında örnek giriş bölgesi, iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör, vakum pompası ve veri işleme sıralanabilir. Örnek giriş bölgesi molekülün iyon kaynağına gönderilmek üzere koyulduğu kısımdır. İyon kaynağı, çeşitli iyonlaştırma teknikleri ile nötr durumdaki hedef molekülün gaz fazındaki iyonlara dönüştürüldüğü kısımdır. İyonizasyon tekniği için gaz faza iyonlaşmada proteinlerin ve peptitlerin yapısını koruyabilen bu sebeple yumuşak iyonizasyon teknikleri denen matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) veya elektrosprey iyonizasyon (ESI) tercih edilir [63].

- i. **MALDI İyonlaştırma Kaynağı:** MALDI çalışma prensibi, çözücünün gaz fazına geçişi sağlanması ile örneğe lazer ışını gönderilmesine dayanır. Bu sayede iyonlaşan moleküller kütle analizörler yardımı ile konumlanır. Dedektör ile ölçülen veriler ile kütle spektrumu elde edilir.

- ii. ESI İyonlaştırma Kaynağı:** ESI, analiti içeren sıvı fazın gaz fazı iyonlara dönüşümünü doğrudan sağlayan bir sistemdir. Elektriksel gerilim ile sıvı fazın yüklü damlacıklar halinde püskürtülmesine dayanır.

Kütle analizörleri, kütle spektrometrisinde oluşan iyonların ayrılması ve bu iyonların m/z oranının ölçülmesini sağlayan kısımdır. Yaygın kullanılanlar uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF) ve dört kutuplu kütle analizörüdür.

- i. **Dört Kutuplu Analizör:** Bu analizör çeşidinde, dört paralel çubuk üzerinde oluşan voltaj kombinasyonu sayesinde, belirli m/z'ye sahip iyonların detektörden geçişine izin verilir.
- ii. **Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü (TOF):** Oluşan iyonun detektöre ulaşması için gereken sürenin ölçülmesi temeline dayanır. Analitin kütlesi uçuş süresi ile orantılıdır, daha düşük kütleli ağırlığa sahip iyonlar yüksek kütleli ağırlığa sahip olanlara oranla detektöre nispeten hızla ulaşır.

Kütle spektrometrisinde veri işleme dedektörde kaydedilen verilen çeşitli yazılımlar yardımı ile anlamlandırılır.

## BÖLÜM 3

### MATERYAL ve DENEYSEL YÖNTEM

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan kefir, çevre illerdeki süt işletmelerinden temin edilen sütün ticari kefir kültürü eXact®Kefir1 (Chr. Hansen, Danimarka) kullanılarak mayalanması ile elde edildi. Amonyum bikarbonat (ABC), sodyum deoksikolat (SDC), DSC-18 SPE Bulk Packing (C18 katı sorbent), iyodoasetamid (IAA), amonyum format, PHOS-Select™ Iron Affinity Gel, tripsin enzimi, Sigma-Aldrich'ten temin edildi. DL-ditiyotriol (DTT) Gold Biotechnology'den temin edildi. Etanol, metanol, formik asit ve asetonitril (ACN) Carlo Erba'dan temin edildi. Amonyak ve trifloro asetik asit (TFA) Merck'ten temin edildi. Üre Wisent Bioproduts'ten temin edildi. Peptit-N-glikozidaz F (PNGase F) enzimi Promega firmasından, lizil endopeptidaz (Lys-C) enzimi Wako Chemical'dan temin edildi. Çalışmanın aşamalarında kullanılan su deiyonize su olup Expe-Ultrapure su arıtma sistemleri ile elde edildi.

#### 3.2. DENEYSEL YÖNTEM

##### 3.2.1.Çiğ Sütten Kefir Üretimi

Kefir üretiminde ticari kefir kültürü eXact®Kefir1 (Chr. Hansen, Danimarka) kullanıldı. Bu kültürün mikroflora içeriğinde *Debaryomyces hansenii*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp.

*lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc* bulunmaktadır. Çiğ süte 90 °C/10 dakika pastörizasyon işlemi gerçekleştirildi. Pastörize edilen sütler 24 °C' ye soğutulduktan sonra, %2 kefir kültürü inokülasyonu gerçekleştirildi. İnokülasyonun ardından sütler 24 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu tamamlanan kefir örnekleri 4 °C'de depolandı. Üretim üç tekerrürlü olarak yürütüldü. Daha önce Çizelge 3.1.'de belirtilen fermantasyon ve depolanma süreleri sonunda filtrasyonları yapılan kefir örnekleri -80 °C'de saklandı. Fermantasyon sürecinin takibi pH ölçümleri yapılarak değerlendirildi. Deneysel çalışmalar 0., 12. ve 24. fermantasyon zamanları ve 7., 14. ve 28. depolama günleri ile gerçekleştirildi (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3. 1. Kefirin deneylerde kullanılan saat bazında fermantasyon zamanları ve gün bazında depolanma zamanları.

Fermantasyon Zamanları (Saat)	Depolama Zamanları (Gün)
0	7
12	14
24	28

### 3.2.2. Kefirden Kazein Proteinlerinin Ekstraksiyonu

Belirlenen fermantasyon ve depolama periyotlarının her birinden 0,5 mL kefir, 0,5 mL deiyonize su ile seyreltildi. 4.000 rpm hızında 4°C'de bir saat santrifüj edilen örneklerden en üstte oluşan yağ tabaka uzaklaştırıldı. Ortada ki sıvı faz whey proteini ekstraksiyonu için ayrı bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Çöken kazein proteinleri 45 °C'de santrifüjlü vakum konsantratörü ile kurutuldu.

### 3.2.3. Kefirden Whey Proteinlerinin Ekstraksiyonu

Belirlenen fermantasyon ve depolama periyotlarının her birinden whey proteinlerinin eldesi için kazein ekstraksiyonu sırasında oluşan sıvı faz kullanıldı. Alınan hacmin iki katı hacimde %90'lık soğuk etanol eklendi. 4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 4°C'de 10.000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstteki sıvı faz uzaklaştırıldı. Çökelti halindeki whey proteinleri 45 °C'de santrifüjlü vakum konsantratörü ile kurutuldu.

### **3.2.4. Ekstrakte Edilen Proteinlerin Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Kurutulan kazein ve whey örnekleri 750 µL 25 mM ABC'de çözülmüş %1 SDC'de çözüldü. Çözülme işlemi sonikatör yardımı ile 30 saniye boyunca (%20 genlikte, 5s/5s aç/kapa pulse modunda) gerçekleştirildi. 60 °C'de 800 rpm'de 10 dakika termomikser ile inkübe edilen örnekler 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. 20 kat seyreltilen örneklerin bikinkoninik asit (BCA Assay) ile protein tayini yapıldı. BCA protein tahlil reaktiflerinin 25-2000 µg/mL aralığında değişen sığır serum albümini (BSA) içeren konsantrasyonlarından 25 µL ve kefir periyodlarından 25 µL 96 well-plate kuyucuklarına konuldu. 200 µL BCA çalışma reaktifi (WR) eklendi. 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda spektrofotometre yardımı ile 562 nm'de absorbanları okundu.

### **3.2.5. Kefirden Kloroform/Methanol Ekstraksiyon Yöntemi ile Toplam (Kazein + Whey) Protein Ekstraksiyonu**

Belirlenen fermantasyon ve depolama periyodların her birinden 100 µL kefir, 100 µL kloroform, 300 µL deiyonize su ve 400 µL %100 metanol eklenerek 14.000 rfc'de beş dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda peletin üzerindeki sıvı faz uzaklaştırıldı ve 400 µL %100 metanol ilave edilerek tekrar santrifüj edildi. Daha sonra sıvı faz uzaklaştırılarak pelet 45 °C'de basınçlı vakum konsantratörü ile kurutuldu.

### **3.2.6. Ekstrakte Edilen Toplam Proteinlerin Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Kurutulan örnekler 100 µL 8 M ürede çözüldü. Örnekler sonra sonikatör yardımı ile 30 saniye boyunca (%20 genlikte, 5s/5s aç/kapa, pulse modunda) sonike edildi. 20 kat seyreltilen örneklerin bikinkoninik asit (BCA Assay) ile protein tayini yapıldı. BCA protein tahlil reaktiflerinin 25-2000 µg/mL aralığında değişen sığır serum albümini (BSA) içeren konsantrasyonlarından 25 µL ve kefir periyodlarından 25 µL 96 well-plate kuyucuklarına konuldu. 200 µL BCA çalışma reaktifi (WR) eklendi. 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda spektrofotometre yardımı ile 562 nm'de absorpsiyon değerleri okundu.

### **3.2.7. Konsantrasyonu Belirlenen Toplam Proteinlerin Analizler İçin Proteolitik Olarak Parçalanması**

Konsantrasyonu belirlenen proteinlerden 750 µg alındı. 8 M üre eklenerek hacimleri eşitlenen örneklere son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde 25 mM ABC'de çözülmüş 100 mM DDT eklendi ve 37 °C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde 25 mM ABC'de çözülmüş 200 mM IAA eklendi ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra son konsantrasyon 5mM olacak şekilde 25 mM ABC'de çözülmüş 100 mM DDT eklendi ve 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Son üre konsantrasyonu 1,33 M olacak şekilde 25 mM ABC eklendi. Örneklere kütlece protein/enzim oranı 30/1 olacak şekilde tripsin enzimi eklendi. Örnekler 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

### **3.2.8. Elde edilen Peptitlerin Analizleri İçin Tuz Giderimi**

Örneklere 0,75 µL %100 TFA eklendi. 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Sap-Pak Cartridge sırası ile bir kez 1 mL %100 metanol; bir kez 1 mL 80/19,9/0,1, ACN/su/TFA, v/v/v; iki kez 1 mL %0,1 TFA ile yıkandı. Her aşamada basınçlı vakum ile yavaş vakum yapıldı. Örnekler yüklendi ve yavaş vakum yapıldı. Sap-Pak Cartridge beş kez 1 mL %0,1 TFA ile yıkandı. Örneklerin 1 mL 80/19,9/0,1, ACN/su/TFA, v/v/v ile elüsyonu gerçekleştirildi ve örnekler 3 eşit hacme bölünerek santrifüjlü vakum konsantratöründe 45°C'de kurutuldu.

### **3.2.9. Tuzu Uzaklaştırılan Peptitlerin Fosfoproteomik Analizleri için Zenginleştirilmesi**

Kurutulmuş örneklere (250 µg ) 100 µL 50/49,9/0,1, ACN/su/TFA, v/v/v eklendi. Santrifüj tüpüne 50 µL fosfopeptitlere seçici demir afinite jeli (PHOS-Select™ Iron Affinity Gel) eklendi. Jeller iki kez 250 µL 50/49,9/0,1, ACN/su/TFA, v/v/v ile yıkandı. Örnekler demir afinite jel içeren santrifüj tüplerine aktarıldı ve 30 dakika İnkübasyona bırakıldı. Küçük bir parça C8 membran disk pipetlere (20-200 µL) yerleştirildi. Diskler iki kez 200 µL %100 metanol ile yıkandı. İnkübasyon sonunda örnekler diskli pipetlere aktarıldı. 4.000 rpm'de iki dakika santrifüj edildi. Diskli

pipetler üç kez 200 µL 50/49,9/0,1, ACN/su/TFA, v/v/v ile yıkandı. Diskli pipetler 40 µL %1 amonyak ile elüsyon edildi. Pipetler her aşamada 4.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Elüsyon edilmiş örneklere 30 µL %1 formik asit eklendi. Elüsyonlar santrifüjlü vakum konsantratörü ile 45 °C'de kurutuldu ve kütle spektrometrik analizleri öncesinde %0,1 formik asit içeren çözelti içerisinde yeniden çözüldü.

### **3.2.10. Tuzu Uzaklaştırılan Peptitlerin Glikoproteomik Analizler İçin Zenginleştirilmesi**

Kurutulmuş örnekler (250 µg kazein, 250 µg whey) 250 µL 85/14/1, ACN/su/TFA, v/v/v içerisinde çözüldü. Pipetlere (200-1000 µL) küçük bir parça pamuk eklendi. Pamuklar sırası ile üç kez 250 µL su ve 250 µL 85/14/1, ACN/su/TFA, v/v/v ile çek-bırak yöntemi ile yıkandı. Örnekler pamuklu pipetler ile 20 kez çek-bırak yapıldı. Pamuklu pipetler altı kez 250 µL 85/14/1, ACN/su/TFA, v/v/v ile çek-bırak yöntemi ile yıkandı. Pamuklu pipetlerin 250 µL 30/69/1, ACN/su/TFA, v/v/v ile çek-bırak yöntemi ile örneklerin elüsyonu sağlandı. Örnekler 45 °C'de vakum konsantratörü ile kurutuldu.

### **3.2.11. Deamide Olan Glikopeptitlerin Tespiti İçin PNGase F İşemi**

Glikopeptitlerin zenginleştirilmesi işlemi sonrası kurutulan örnekler 49 µL 25 mM ABC içerisinde çözüldü ve 1 µL PNGase F enzimi (0.1 U/µL) ilave edildi. Örneklerin 16 saat 37 °C'de inkübe edilmesi ile deamide olmuş glikopeptitler elde edildi. Deamide olan peptitlerin kütle spektrometrisi ile tespiti ve miktarlanması için örnekler 45 °C'de kurutuldu ve 100 µL %0,1 formik asit içeren su ile yeniden çözüldü.

### **3.2.12. Kloroform/Metanol Yöntemi ile Ekstrakte Edilen Toplam Proteinlerin Fraksiyonlama İşlemi İçin Proteolitik Olarak Peptide Parçalanması**

Konsantrasyonu belirlenen proteinlerden 400 µg alındı. Hacimleri eşitlenecek şekilde 8 M üre eklendi ve son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde 25 mM ABC'de çözülmüş 100 mM DDT eklendikten sonra 37 °C'de bir saat inkübasyona bırakıldı.

Son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde 25 mM ABC'de çözülmüş 200 mM IAA eklendi ve karanlıkta 30 dk. inkübe edildi. Son konsantrasyon 5mM olacak şekilde 25 mM ABC'de çözülmüş 100 mM DDT eklendi ve 10 dk. inkübasyona bırakıldı. Örnekler kütleye protein/enzim oranı 100/1 olacak şekilde 25 mM ABC'de çözülmüş Lys-C enzimi eklendi. 37 °C'de 4 saat inkübe edilen örnekler kütleye protein/enzim oranı 30/1 olacak şekilde tripsin enzimi eklendi. Örnekler 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

### **3.2.13. Fraksiyonlama İşlemi İçin Elde Edilen Peptitlerden Tuz Giderimi**

Sap-pack kolonlar 1 mL metanol ile yıkandıktan sonra kolonlara 100 mg C18 katı sorbent eklendi. Kolonlar 1 mL 80/14,9/0,1; ACN/su/TFA karışımı ile 2 kez; 1 mL %0,1 TFA ile 3 kez yıkandı. Örnekler yüklendi. Kolonlar 1 mL %0,1 TFA ile 4 kez yıkandı. 1 mL 80/14,9/0,1; ACN/su/TFA karışımı ile elüsyon yapılan örnekler iki ayrı eppendorf tüpe bölünerek 45 °C'de vakum konsantratörü kurutuldu. Kolonlara her aşamada basınçlı vakum ile yavaş vakum yapıldı.

### **3.2.14. Tuzu Uzaklaştırılan Peptitlerin Fraksiyonlanması**

Yüksek pH yardımı ile fraksiyonlamada, yükleme çözeltisi olarak kullanılan 10 mM Amonyum Format çözeltisinin pH'ı 10,0'a amonyak yardımı ile ayarlandı. Kurutulan örnekler 200 µL yükleme çözeltisinde çözüldü. 5 mg C18 katı sorbent C18 membran disk içeren sarı pipetlere eklendi. Pipetler bir kez 200 µL %100 metanol; bir kez 200 µL %100 ACN ile santrifüj yardımı ile yıkandı. Örnekler santrifüj yardımı ile yüklendi. Örneklerin Çizelge 3.2.'de verilen elüsyon çözeltileri ile fraksiyonlanması santrifüj yardımı ile gerçekleştirildi. Santrifüj her aşamada 1500Xg'de iki dakika olacak şekilde çalıştırıldı. Elüsyon sonucu elde edilen fraksiyonlar 45 °C'de vakumlu konsantratör ile kurutulan örnekler 75 µL %0,1 Formik Asit ile çözüldükten sonra analiz için saklandı.



Çizelge 3. 2. Fraksiyon sayısı ve her fraksiyonda kullanılan elüsyon çözeltileri, miktarları ve pH'ları.

Fraksiyon Numarası	Kullanılan Elüsyon Çözeltileri, Miktarları ve pH'ları
1	100 µL 5/95; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10); 100 µL 7,5/92,5; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:5).
2	100 µL %10/90; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10); 100 µL 12,5/87,5; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10)
3	100 µL 15/85; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10); 100 µL 17,5/82,5 ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10).
4	100 µL 20/80; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10); 100 µL 22,5/77,5; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10).
5	100 µL 25/75; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10); 100 µL 27,5/72,5; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10).
6	100 µL 30/70; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10); 100 µL 32,5/67,5; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10); 100 µL 35/65; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10); 100 µL 37,5/62,5; ACN/10 mM Amonyum Format (pH:10).
7	100 µL 40/60; ACN/10 mM Amonyum

	Format (pH:10); 100 µL 50/50; ACN/10 mM Amonyum
	Format (pH:10); 100 µL 60/40; ACN/10 mM Amonyum
	Format (pH:10); 100 µL70/30; ACN/10 mM Amonyum
	Format (pH:10); 100 µL 80/20; ACN/10 mM Amonyum
	Format (pH:10).

### 3.2.15. nLC-ORBITRAP ile Kütle Spektrometrik Analizlerin Gerçekleştirilmesi

Kütle spektrometrik analizler, Ultimate 3000 RSLC nano sıvı kromatografisi sistemi (Dionex/Thermo Scientific) ile birlikte çalışan easy-nano source entegre Thermo QExactive Plus cihazı ile gerçekleştirildi. Proteomik ve fosfoproteomik analizler için ortalama 1-2 µg peptit ve fosfopeptit karışımları cihaza enjekte edildi. Kromatografik ayırma sisteminde, Acclaim PepMap 100 tuzak kolonunu (100 µm × 5 cm, parçacık boyutu 5 µm, Dionex/Thermo Scientific) ve Acclaim PepMap RSLC C18 nano ayırma kolonunu (75 µm × 75 cm, parçacık boyutu 3 µm, Dionex/Thermo Scientific) kullanıldı. Hareketli faz olarak A) (%2 ACN içeren %0,1 Formik Asit çözeltisi) ve B) (%0,1'lik formik asit çözeltisi içeren %80 ACN) çözücüleri gradient elüsyon olarak kullanıldı. Gradient elüsyonda B çözücüsünün %6'dan %40'a lineer olarak whey/casein protein fraksiyonları ve fosfoproteomik örnekler için 90 dakikada ulaşması şeklinde programlandı. Toplam proteomik analizlerde ise B çözücüsünün %5'ten %40'a lineer olarak 120 dakikada ulaşması şeklinde program uygulandı. Kütle spektrometrik analizlerinde tam kütle spektrumları 375-2000 arasında alındı ve en yüksek intensitenin elde edildiği optimum kütle spektrum parametreleri altında HCD (yüksek çarpışma ile ayrıştırma) modu kullanılarak gerçekleştirildi (NCE=29). AGC target değerleri proteomik analizlerde MS1 ve MS2 için  $3 \times 10^6$  ve  $2 \times 10^5$  olarak ayarlandı. Fosfoproteomik ve Glikoproteomik analizlerde ise bu değerler MS1 ve MS2 için sırasıyla  $2 \times 10^5$  ve  $2 \times 10^4$  olarak belirlendi. Elde edilen ham veriler MaxQuant yazılımı işlendi ve etiketsiz miktarlama yapıldı.

### 3.2.16. MaxQuant, Perseus ve GraphPad Prism ile Proteomik Veri Analizleri

Kütle spektrometrik analiz ile edilen veriler MaxQuant 1.6.17 yazılımını kullanarak analiz edildi. MaxQuant parametrelerinde ORBITRAP cihazları için kullanılan “default” kütle spektrometrik parametrelerde değişiklik yapılmadı. Label Free Quantification (LFQ) için gerekli minimum peptit sayısı 2 olarak ayarlandı. Sığır ve Kefir proteomları UNIPROT sisteminden indirildi ve veri tabanı olarak kullanıldı. Enzim olarak tripsin seçildi. Whey ve Kazein proteinden elde edilen veriler sırasıyla fraksiyon 1 ve 2 olarak sisteme tanıtılarak birlikte analiz edildi. MaxQuant analizleri sonucuda her bir tespit edilen protein ve bu proteinlere ait sekans, skor, LFQ intensite vb. bilgileri tablolar halinde elde edildi. Fosfoproteomik analizler için fosfopeptitlere ait LFQ intensite verileri elde edilmiştir.

Elde edilen LFQ intensite verileri ilk olarak Perseus yazılımını kullanarak değerlendirilmiştir. Her bir periyod için 3 deneysel tekrarlar elde edilmiş LFQ intensite verileri yazılıma tanıtılmış ve periyoda göre gruplandırılmıştır. LFQ intensitelerin  $\log(2x)$  dönüşümü yapıldıktan sonra her bir periyod için tespit edilen LFQ intensitesi var/yok olmasına göre filtrelenmiştir. Bu kapsamda, her bir tespit edilen protein/fosfopeptit için tüm periyodlar için tekrarlar en az 1 tane LFQ tespit edilecek şekilde filtreleme gerçekleştirilmiştir. Veriler istatistiksel değerlendirme ve görselleştirme için GraphPad Prism yazılımına aktarılmıştır.

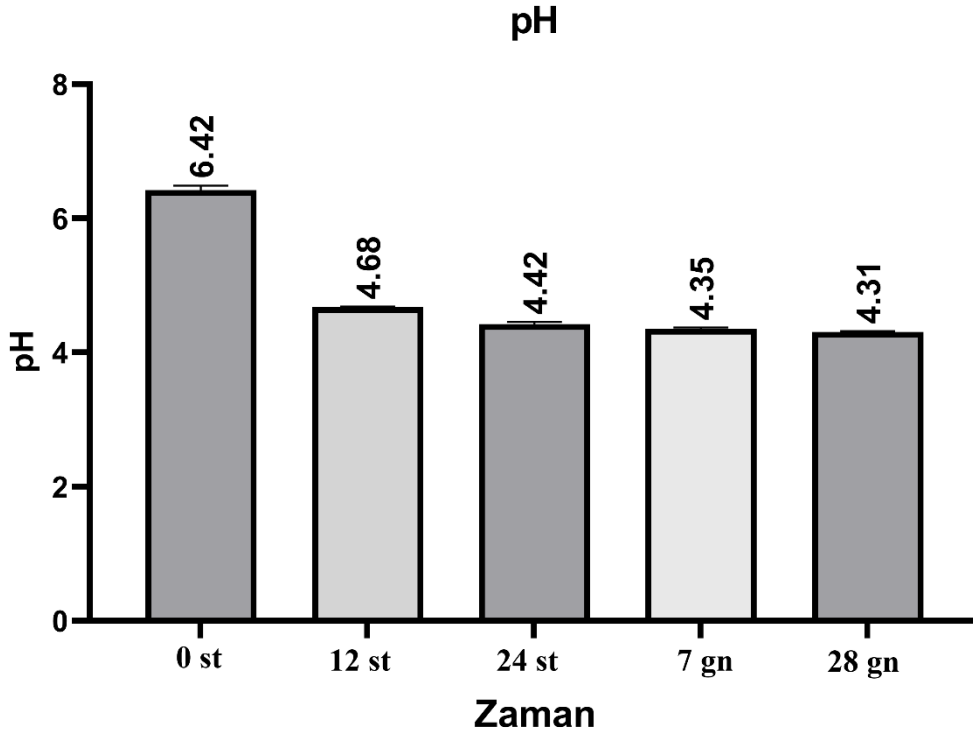
GraphPad Prism 9 yazılımını şekillerin hazırlanmasında ve istatistiksel değerlendirmelerde kullanılmıştır. Two-way Anova testleri yapılarak zaman periyodları arasında anlamlı değişikliklerin olup olmadığı kontrol edilmiştir. p değeri 0.05’den küçük olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## BÖLÜM 4

### BULGULAR ve TARTIŞMA

#### 4.1. KEFİRİN BELİRTİLEN SÜREÇLERDEKİ PH ÖLÇÜMÜ

Çizelge 3.1.' de belirtilen fermantasyon süreçlerinde (0., 12. ve 24. saatler ile 7., ve 28. günler) pH, üç farklı kefir örneği için üç tekrarlı olarak ölçülmüştür. Ölçümler standart sapmaları alınarak grafikleştirilmiştir. 0.saat için 6,42 olarak ölçülen pH'ın, ilerleyen süreçlerde azaldığı belirlenmiştir. pH ölçümleri ile elde edilen grafik Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4. 1. Belirtilen süreçlerde kefir için ölçülen pH.

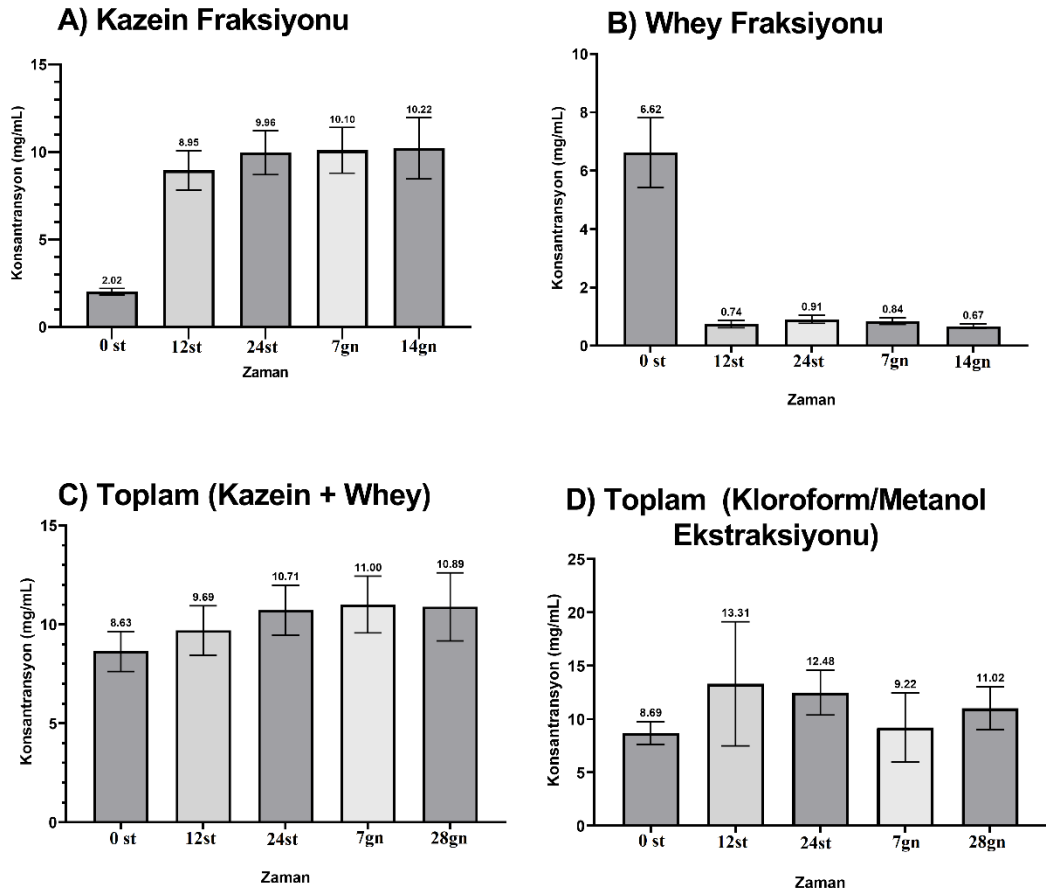
Al ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kefir pH'sının mayalama gününden sonra düşmesi bu tezin sonuçlarını desteklemektedir. Depolanma günlerindeki pH farklılıkları ise kefir mayasındaki mikroorganizma farklılığı veya depolanmanın potansiyel farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir [67].

#### **4.2. BELİRTİLEN SÜREÇLERDE WHEY VE KAZEİN PROTEİNLERİNİN KONSANTRASYON ÖLÇÜMÜ**

0., 12. ve 24. saatler ile 7., ve 28. günler için kurutulan kazein ve whey protein fraksiyonlarının ayrı ayrı %1 SDC içerisinde çözülmesinden sonra BCA Assay yöntemi ile miktarları ölçüldü. Ölçümler her periyot için iki tekniksel tekrar ile gerçekleştirildi ve bu tekrarların ortalaması alınarak konsantrasyonlar belirlendi. Daha sonra kazein ve whey proteinleri için belirlenen ortalama konsantrasyonlar toplanarak toplam protein konsantrasyonu belirlendi. Konsantrasyonlar Şekil 4.2.'de grafikleştirildi.

0., 12. ve 24. saatler ile 7., ve 28. günler için kefir proteinleri kloroform/metanol yöntemi ile ayrıca ekstrakte edilmiş ve elde edilen proteinlerin konsantrasyon ölçümü her periyot için iki tekniksel tekrar ile gerçekleştirildi ve bu tekrarların ortalaması alınarak konsantrasyonlar belirlendi. Konsantrasyonlar şekil 4.2.'de grafikleştirilmiştir.

Analiz sonrası, ilerleyen süreçlerde kazein fraksiyonu konsantrasyonunun arttığı gözlenmiştir. Bunun sebebi pH'nın düşmesi ile kazein misellerinin daha kompakt bir yapıya sahip olmasıdır ve bunun sonucu olarak santrifüj ile çökmenin artmasıdır [68]. Kazein fraksiyonu konsantrasyonu (3 kattan fazla) artarken whey fraksiyonu konsantrasyonu (3 kattan fazla) azalmıştır. Bu konsantrasyon farklarından su ile seyrelterek yapılan santrifüjün kazein ve whey proteinlerinin ayrışmasını tam sağlayamadığı söylenebilir.



Şekil 4. 2. Belirtilen süreçlerde proteinlerin konsantrasyonları: A, B ve C BCA Assay yöntemi, D kloroform metanol yöntemi. A) Kazein Fraksiyonu, B) Whey Fraksiyonu ve C) Toplam (Kazein+Whey) Fraksiyonu. D) Toplam (Kloroform/Metanol Ekstraksiyonu).

### 4.3. SÜT PROTEİNLERİNDE BELİRTİLEN SÜREÇLERDEKİ DEĞİŞİMİNİN KÜTLE SPEKTROMETRESİ TEMELLİ ETİKETSİZ MİKTARLAMA YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

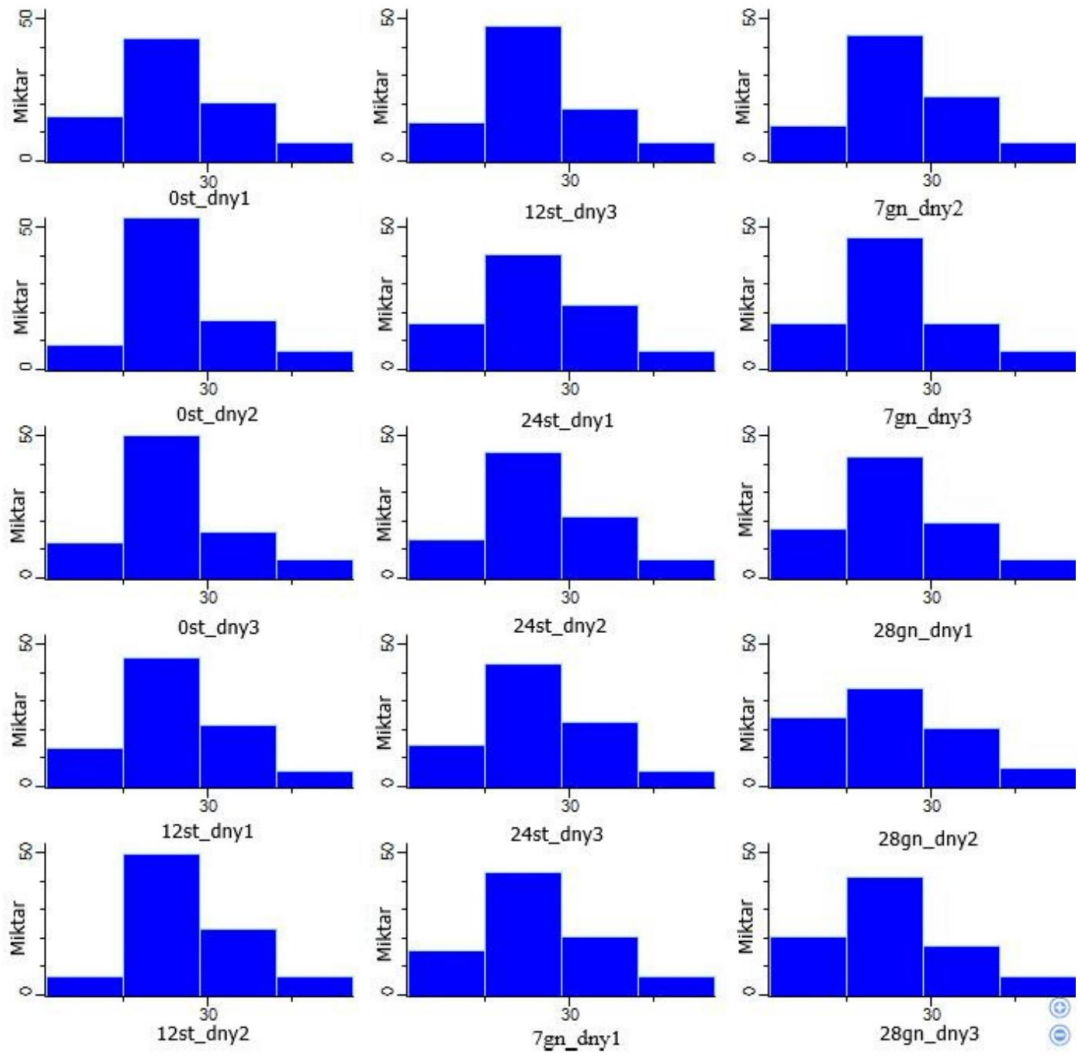
Yöntem kısmında anlatılan kloroform/metanol yöntemi ile ekstrakte edilen proteinlerin Lys-C ve tripsin enzimleri ile muamelesinden elde edilen peptitlerin fraksiyonlaması yapılmıştır. Her bir tekrar için yedi adet olmak üzere beş periyot için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak 105 adet örnek çalışmada analiz edilmiştir. Elde edilen veriler MaxQuant yazılımı ile işlendikten sonra Perseus yazılımına istatistiksel analizler için aktarılmıştır. Analiz sonucuna göre 170 adet süt

proteini tespit edilmiştir. Bu rakam tek analizlere kıyasladığımızda oldukça yüksektir.

Tespit edilen proteinler LFQ intensite değerlerine göre filtrelendiğinde 87 adet süt proteini miktarlanabilmiştir. Miktarlanan proteinler, -Şekil 4.5’de verilen ısı haritası grafiğindeki proteinlerin sırası ile- Çizelge Ek A.1’de listelenmiştir. 0. saat sabit tutulmak üzere yapılan student t test sonuçlarına göre 0-12 saat aralığında 3, 0-24 saat aralığında 39, 0-7 gün aralığında 41 ve 0-28 gün aralığında 42 adet proteinde anlamlı değişiklikler saptanmıştır. 24. Saatten itibaren 23 adet proteinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmiştir. Anlamlı değişiklik belirlenen proteinlerin listesi çizelge 4.1’de verilmiştir.

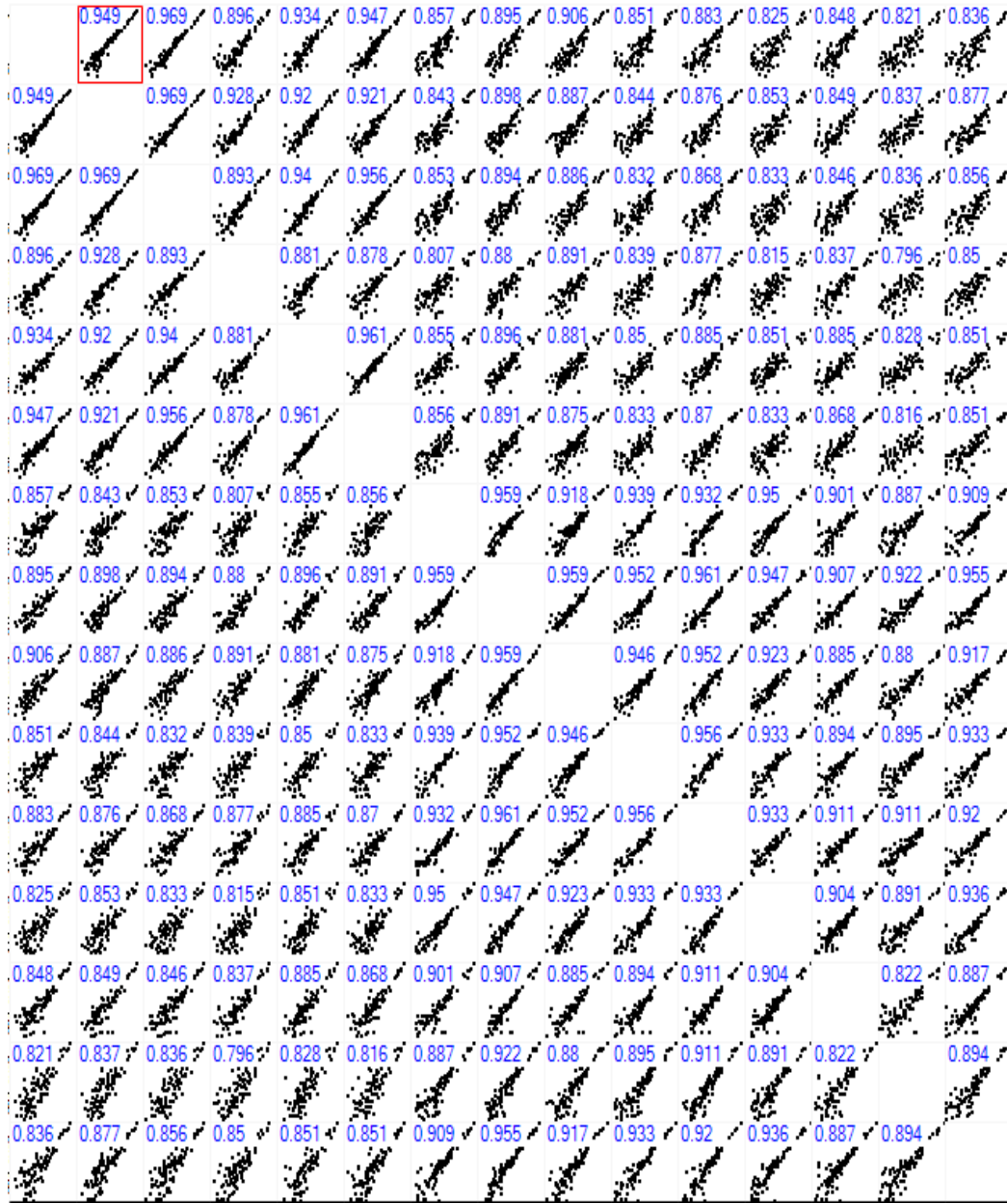
0.,12. ve 24. saatler ile 7. ve 28. günler için elde edilen verilerden çeşitli grafikler elde edilmiştir. İstatiksel analizler öncesinde ilk olarak verilerin dağılımları incelenmiştir. Elde edilmiş verilerin gruplandırılarak miktarlarının sütun grafiğine dönüştürülmesi ile elde edilen Şekil 4.3’de ki histogram grafiği, verilerin normal olarak dağıldığını bize göstermektedir.

Şekil 4.4’de ki Pearson korelasyon yaklaşımı uygulanarak elde edilen çoklu dağılım grafiği ise periyotlar arasındaki korelasyonu göstermektedir. Pearson korelasyonu normal dağılıma sahip verilere uygulanır ve veriler arasında doğrusal ilişki olup olmadığı, ilişkinin yönü ve şiddeti hakkında bilgi verir [69]. Pearson korelasyon katsayısı 0,8’den yüksek ise veriler arası güçlü korelasyon varlığından bahsedilir[70]. Bu sebeple Pearson korelasyon yaklaşımı uygulanarak elde edilen grafikte veriler arasındaki korelasyonun yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu da periyotlar arasında benzer proteinlerin analizlerde tespit edildiğini bize göstermektedir.



Şekil 4. 3. Belirtilen süreçlerdeki süt proteinlerine ait histogram grafiği.





Şekil 4. 4. Belirtilen süreçlerdeki kefir örneklerine ait çoklu dağılım grafiği (Pearson korelasyon dağılımı).

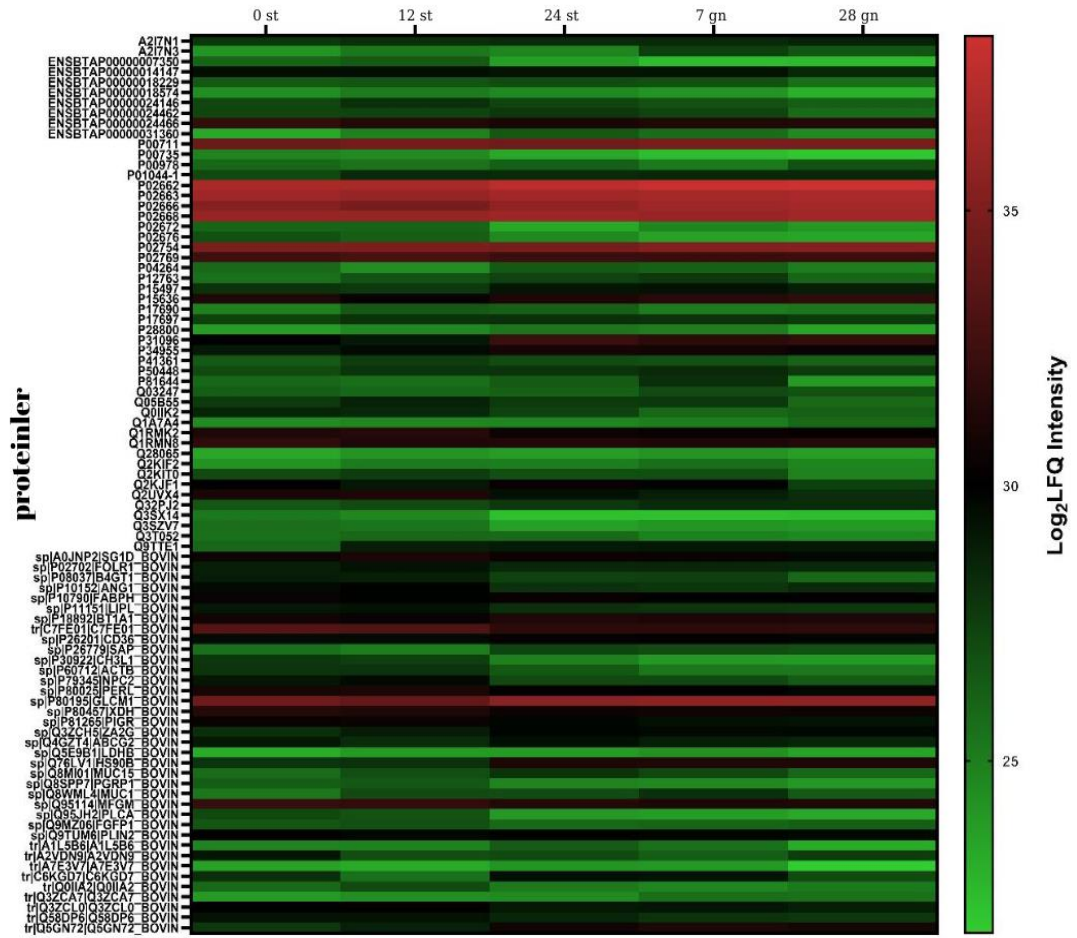
Çizelge 4.1’de periyotlar arasında anlamlı değişiklik gösteren süt proteinlerinin listesi verilmiştir. Tüm periyotlardaki miktarlanabilen proteinlerin dağılımı ise Şekil 4.5’de verilmiştir. Burada miktarsal değişimlerin durumu ile ilgili bilgiler verilmiştir. Log2 LFQ intensitesine bağlı olarak proteinlerin değişimleri renk skalasına bağlı olarak sıralanmıştır.

Çizelge 4. 1. Anlamlı değişiklik saptanan proteinlerin listesi.

<b>0-12 saat</b>	<b>0-24 saat</b>	<b>0-7 gün</b>	<b>0-28 gün</b>
Alpha-2-HS-glycoprotein	ENSBTAP00000007350	Serpin A3-7	Serpin A3-5
Apolipoprotein A-IV	ENSBTAP00000024466	ENSBTAP00000007350	ENSBTAP00000007350
Odorant-binding protein-like	Prothrombin	ENSBTAP00000024466	ENSBTAP00000018229
	Alpha-S1-casein	Prothrombin	Prothrombin
	Fibrinogen alpha chain	Alpha-S1-casein	Kininogen-1
	Fibrinogen beta chain	Alpha-S2-casein	Alpha-S1-casein
	Alpha-2-HS-glycoprotein	Beta-casein	Alpha-S2-casein
	Apolipoprotein A-I	Fibrinogen beta chain	Beta-casein
	Beta-2-glycoprotein 1	Alpha-2-HS-glycoprotein	Kappa-casein
	Alpha-2-antiplasmin	Apolipoprotein A-I	Fibrinogen alpha chain
	Osteopontin	Clusterin	Fibrinogen beta chain
	Alpha-1-antiproteinase	Alpha-2-antiplasmin	Beta-lactoglobulin
	Factor XIIa inhibitor	Osteopontin	Apolipoprotein A-I
	Serotransferrin	Alpha-1-antiproteinase	Protease 1
	Q1RMK2	Factor XIIa inhibitor	Osteopontin
	Complement C3	Apolipoprotein A-II	Alpha-1-antiproteinase
	Apolipoprotein A-IV	Q1RMK2	Serotransferrin
	Gelsolin	Immunoglobulin light	Q1RMK2

		chain, lambda gene cluster	
	Serpin A3-1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	Complement C3
	Beta-1,4-galactosyltransferase 1	Complement C3	Apolipoprotein A-IV
	Angiogenin-1	Apolipoprotein A-IV	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
	Lipoprotein lipase	Gelsolin	Serpin A3-1
	Lactoferrin	Serpin A3-1	Secretoglobin family 1D member
	Prosaposin	Angiogenin-1	Beta-1,4-galactosyltransferase 1
	Chitinase-3-like protein 1	Lactoferrin	Angiogenin-1
	NPC intracellular cholesterol transporter 2	Prosaposin	Lactoferrin
	Lactoperoxidase	Chitinase-3-like protein 1	Chitinase-3-like protein 1
	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1	Actin, cytoplasmic 1	Actin, cytoplasmic 1
	Xanthine dehydrogenase/oxidase	NPC intracellular cholesterol transporter 2	NPC intracellular cholesterol transporter 2
	Polymeric immunoglobulin receptor	Lactoperoxidase	Lactoperoxidase
	Zinc-alpha-2-glycoprotein	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1
	Heat shock protein HSP 90-beta	Xanthine dehydrogenase/oxidase	Xanthine dehydrogenase/oxidase
	Mucin-15	Zinc-alpha-2-	Zinc-alpha-2-

		glycoprotein	glycoprotein
	Peptidoglycan recognition protein 1	Heat shock protein HSP 90-beta	Heat shock protein HSP 90-beta
	Mucin-1	Peptidoglycan recognition protein 1	Peptidoglycan recognition protein 1
	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha	Mucin-1	Lactadherin
	Annexin	Lactadherin	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha
	KIAA0020 protein	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha	Perilipin-2
	Ribonuclease 4	KIAA0020 protein	Odorant-binding protein-like
	Alpha-1-acid glycoprotein	Ribonuclease 4	Cysteine-rich secretory protein 2
		Alpha-1-acid glycoprotein	Ribonuclease 4
			Alpha-1-acid glycoprotein

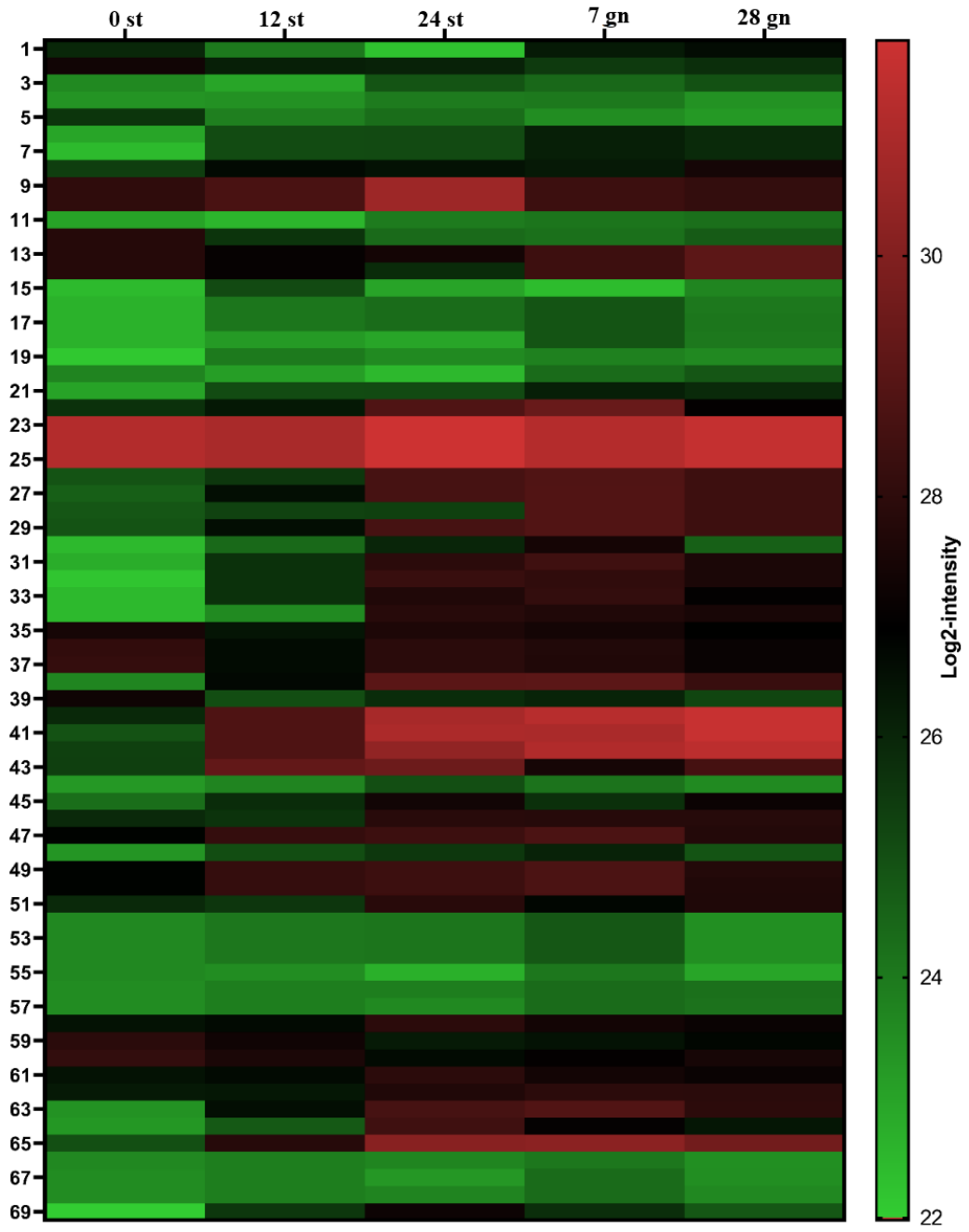


Şekil 4. 5. Süt proteinlerinin miktarısal değişimini gösteren ısı haritası.

Dallas ve arkadaşlarının sığır sütü kefir üzerine kütle spektrometrisi temelli peptidomik çalışmalar yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda süt proteinlerinin kefir taneleri tarafından sindirildiğini göstermişlerdir [71]. Yine Izquierdo-González ve arkadaşlarının keçi sütü kefir üzerine yaptıkları proteomik analiz çalışmasında protein miktarının azaldığı gösterilmiştir [72]. Her iki çalışmanın sonucu bu tez ile paraleldi

#### **4.4. SÜT PROTEİNLERİNE AİT FOSFOPEPTİTLERİN BELİRTİLEN SÜREÇLERDEKİ DEĞİŞİMLERİNİN KÜTLE SPEKTROMETRESİ TEMELLİ ETİKETSİZ MİKTARLAMA YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

Kloroform/metanol ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilen proteinlerin proteolitik parçalanması ve daha sonra zenginleştirilmesi ile elde edilen fosfopeptitlerin kütle spektrometresi ile analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler MaxQuant yazılımı ile işlendikten sonra veriler ilk olarak Perseus yazılımı ile incelendi. Ayrıca veriler GraphPad prism yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Kloroform/metanol ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiş proteinler ile yapılan çalışmada 117 adet fosfopeptit tespit edilmiştir. Tespit edilen fosfopeptitlerin yapılan veri filtremeleri sonucunda 69 adeti miktarlanabilmiştir. Her bir fosfopeptide ait elde edilen intensite değerleri ilk olarak görsel olarak değerlendirilmiştir. 0., 12. ve 24. saatler ile 7. ve 28. günler için elde edilen verilerden Log<sub>2</sub> LFQ intensite değerlerine göre ısı haritası grafiği elde edilen grafik Şekil 4.6'da verilmiştir. İstatiksel analizler 12. ve 24.saatler ile 7. ve 28.günler için referans noktası 0. saat olarak alınan student t testi analizleri ile yapılmıştır. 0-12. saat aralığında anlamlı olarak değişen bir fosfopeptit bulunamazken, 0-24 saat aralığında 7, 0-7 gün aralığında 23, 0-28 gün aralığında 13 adet fosfopeptitte anlamlı değişiklik saptanmıştır. Tespit edilen fosfopeptitler Şekil 4.6'da ki ısı haritası grafiğindeki sırası ile Çizelge Ek A.2'de listelenmiştir ve anlamlı olarak değişen fosfopeptitler işaretlenmiştir



Şekil 4. 6. Kloroform/metanol ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen fosfopeptitlerin intensitelerdeki değişimini gösteren ısı haritası.

#### **4.5. SÜT PROTEİNLERİNE AİT BELİRTİLEN SÜREÇLERDEKİ DEAMİDE OLMUŞ (POTANSİYEL GLİKOPEPTİTLERİN) PEPTİTLERİN DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

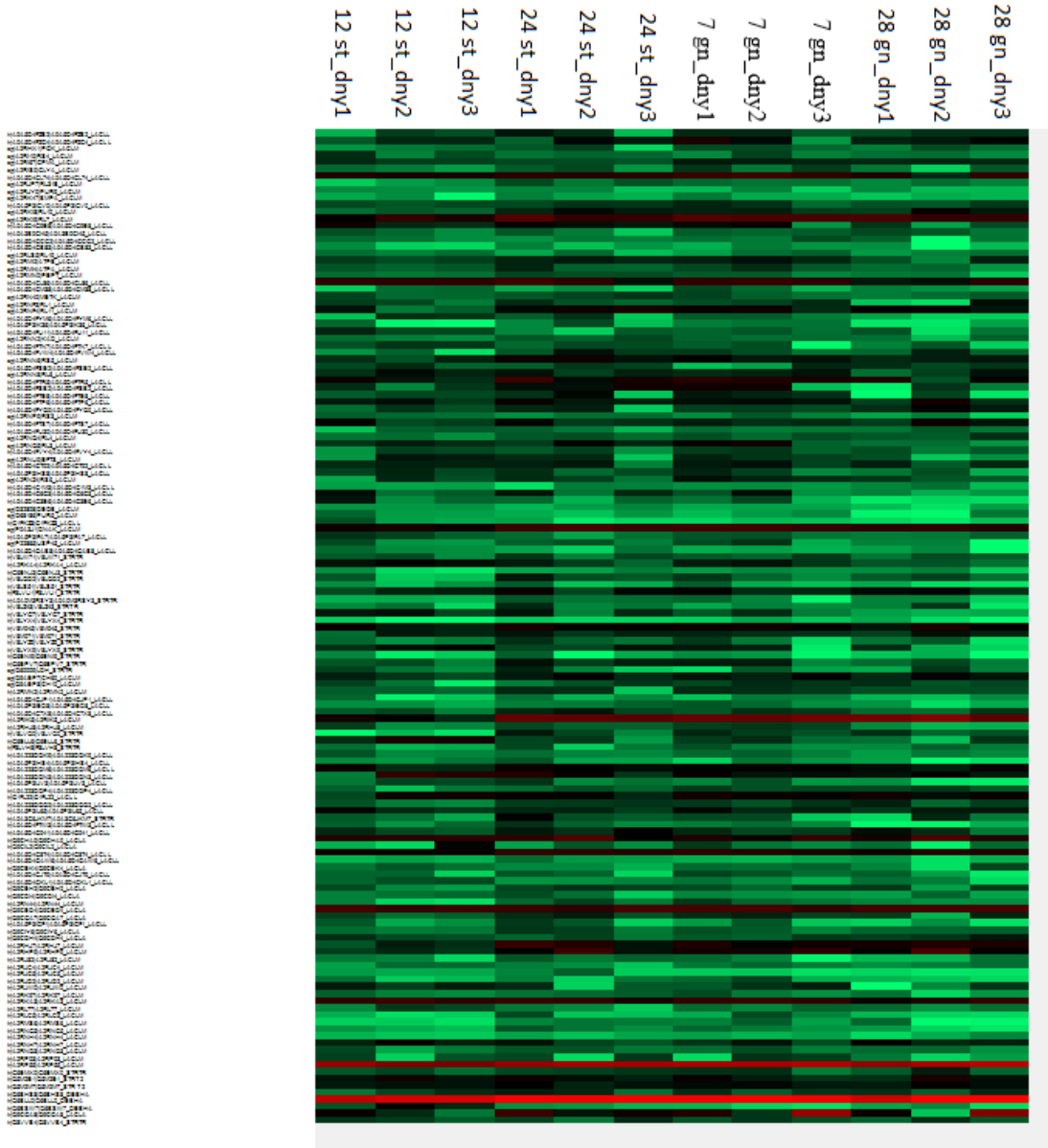
Kloroform/metanol ekstrakte yöntemi ile elde edilen peptitler üzerine yapılan analizlerde 70 adet deamide olmuş peptit belirlenmiştir. Deamide olmuş peptitler incelendiğinde 36 adet peptitin bu yapıya uyduğu belirlenmiştir. Çizelge Ek A.3'te tespit edilen deamide olmuş peptitlerin bir listesi görülmektedir.

Miktarlanabilmiş deamide olmuş peptit sayısının beklenenden düşük olmasının sebebi çok fazla periyodun olması nedeniyle kütle spektrometrik analizlerdeki kısıtlılık olarak söylenebilir. Burada veriye bağlı olarak analizler gerçekleştiğinden deamide olmuş bir peptit, bir periyotta cihaz tarafından tespit edilebilirken periyotların bazılarında tespit edilememektedir. İstatiksel çalışmalarda da tüm periyotlarda miktarlanan, yani intesite bilgisi edilen deamide peptitlere odaklanıldığından bu sayı oldukça düşmektedir.

#### **4.6. SÜTE SALINAN KEFİR ORİJİNLİ PROTEİNLERİN KÜTLE SPEKTROMETRESİ TEMELLİ ETİKETSİZ MİKTARLAMA YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

Yötem kısmında anlatılan kloroform/metanol yöntemi ile ekstrakte edilen proteinlerin Lys-C ve tripsin enzimleri ile muamelesinden elde edilen peptitlerin fraksiyonlaması yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 398 adet kefir temelli protein çalışmada tespit edilmiştir. Bu proteinlerin 141 adeti etiketsiz olarak yapılan çalışmada miktarlanabilmiştir. Burada herhangi bir istatiksel analiz yapılmamış sadece proteinlerin değişimleri incelenmiştir. Analizde 12. ve 24.saatler ile 7. gün ve 28.günlerin periyotları 0.saat ile karşılaştırılmıştır. Çizelge Ek A.1'de tespit edilip miktarlanan proteinlerin listesi verilmektedir. Şekil 4.7'de 12. ve 24. saatler ile 14. ve 28. günler için kefirde sütte salınan proteinlerin değişimlerini gösteren bir ısı haritası paylaşılmaktadır. Çizelge Ek A.4'te fraksiyonlama yöntemi ile tespit edilen kefirde sütte geçen kefir mikroorganizmasına ait proteinlerin listesi verilmektedir.



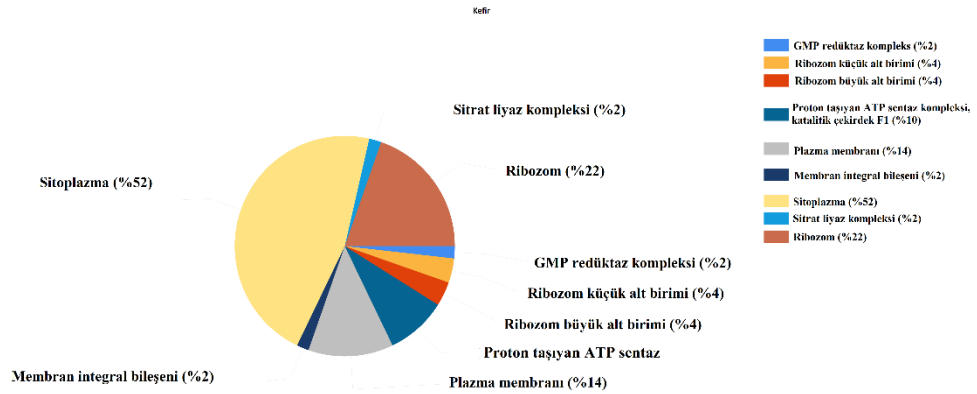


Şekil 4. 7. Kefirden süte salınan proteinlerin miktarsal değişimlerini ifade eden ısı haritası.

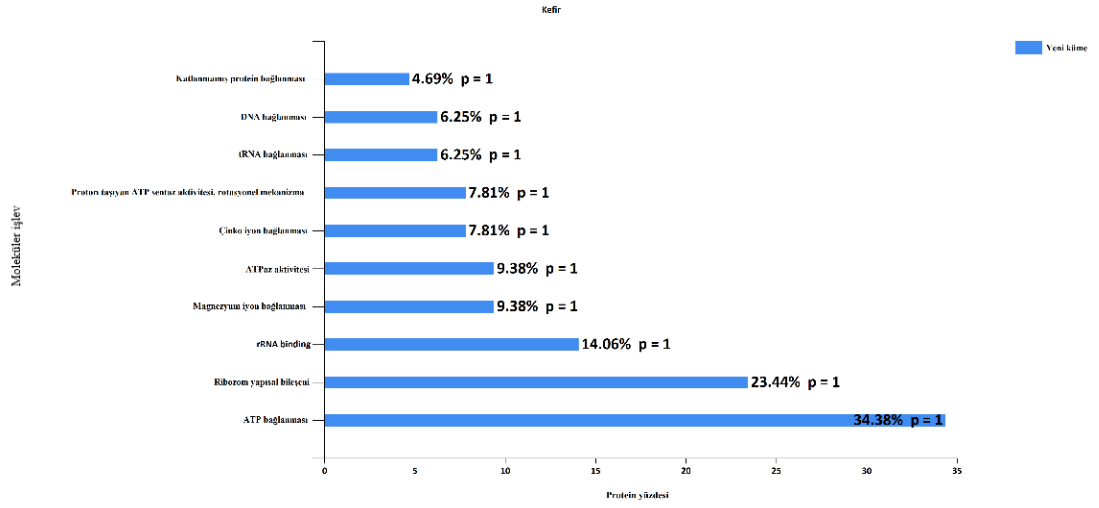
Dallas ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kefir tanesi kaynaklı proteinlerin ortama salındığını ve süt proteini orijinli peptit bolluğunun değiştiğini ortaya koymuştur, elde edilen sonuçlar bu çalışmada elde edilen sonuçlarla paralellik göstermiştir [71]. Yine Izquierdo-González ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar hem Dallas ve arkadaşlarını hem de bu tezi destekler niteliktedir [72].

#### 4.7. TESPİT EDİLEN KEFİR PROTEİNLERİN BİYOİNFORMATİK YAKLAŞIMLA FONKSİYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

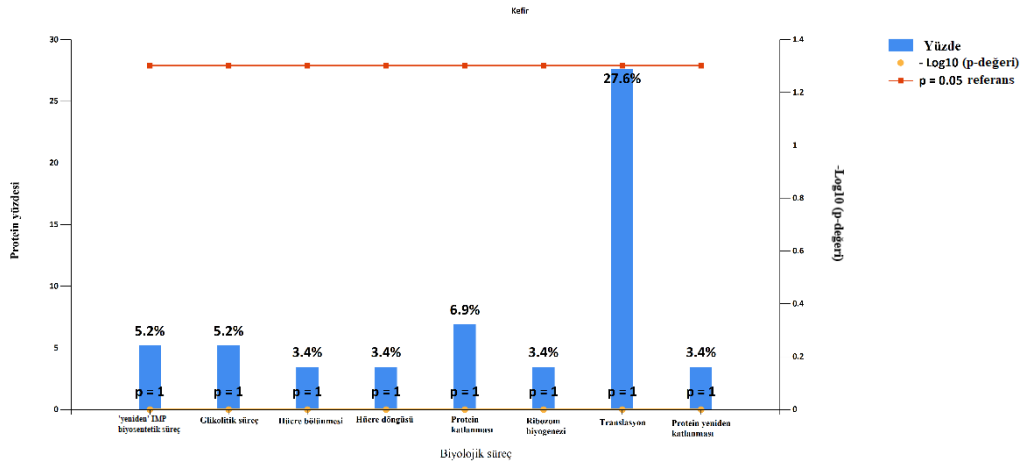
Çalışmada kütle spektrometrisi temelli proteomik yaklaşımla tespit edilen kefir proteinlerinin işlevlerine göre sınıflandırılması Funrich yazılımı kullanılarak incelenmiştir [73]. Bu yazılım, tespit edilen proteinlerin veri tabanlarında bulunan işlevlerine göre zenginleştirmektedir. İlk olarak kefirde sütte salınan proteinlerin hücresel bileşenlerine göre sınıflandırılmıştır (Şekil 4.8). Analiz sonrasında kefir proteinlerinin %52'lik bir kısmının hücre sitoplazmasında bulunan proteinlerden, %22 ribozom proteinlerinden ve %14 plazma membranı proteinlerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Yine kefir mikroflorasından sütte salınan proteinlerin moleküler işlevlerine göre sınıflandırıldığında (Şekil 4.9) ATP bağlanmasında görevli proteinlerin %34,38 ile en yüksek yüzdeye sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4. 8. Kefir mikroflorasından sütte salınan proteinlerin hücresel bileşenlerine göre sınıflandırılması.



Şekil 4. 9. Kefir mikroflorasından süte salınan proteinlerin moleküler işlevlerine göre sınıflandırılması.



Şekil 4. 10. Kefir mikroflorasından süte salınan proteinlerin biyolojik süreçlerde yer aldığı görevlerine göre sınıflandırılması.

## BÖLÜM 5

### SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tezinde kefirin belirli fermantasyon ve depolama süreçlerinde süt kökenli kazein ve whey proteinlerinin miktarlanması ile incelenmesi, yine bu süreçlerdeki fosfoproteinlerin ve glikoproteinlerin belirlenmesi ile anlamlı değişikliklerin saptanması incelenmiştir. Tez kapsamındaki deney ve analizlerin incelenmesi ile kazein proteinlerinin nötr pH'da tam ayırlamadığı, pH'ın düşmesi ile birlikte daha yüksek oranda çöktüğü buna bağlı olarak santrifüj ile daha yüksek oranda ayrıldığı saptanmıştır. Buna ek olarak süreç boyunca toplam (kazein+ whey) protein konsantrasyonunun incelenmesi ile konsantrasyonda anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır. Karşılaştırmalı yapılan fosfoproteomik analizlerde anlamlı farklılar belirlenmiş ve bunlara bulgularda değinilmiştir. Yapılan glikoproteomik analizlerde deamide olmuş peptitlerin incelenmesinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Fraksiyonlama yöntemi ile elde edilen süt proteinleri incelendiğinde anlamlı farklılıklar belirlenmiş ve bunlara bulgularda değinilmiştir. Ayrıca kefir orijinli süte salınan proteinler incelenmiş saptanan proteinler ve anlamlı değişikliklere bulgularda değinilmiştir.

Kefirin sık tüketimi, sağlığa etkileri, literatür araştırması ve bu tez kapsamında elde edilen veriler ışığında kefirin içeriğindeki proteomların fonksiyon analizleri, aydınlatılamamış moleküllerin oluşum mekanizmaları, diğer moleküller ile etkileşimleri gibi literatürde eksiklik içeren konular gelecek çalışmalar için iyi bir çalışma alanı olabilir.

## KAYNAKLAR

1. Cristea, I. M., Gaskell, S. J., and Whetton, A. D., "Proteomics techniques and their application to hematology", *Blood*, 103 (10): 3624–3634 (2004).
2. Sevimli, T. S., Tıp, S., Dekanlığı, F., Binası, M., Kampüsü, D., Sevimli, M., and Özçelik, N., "Meme kanserinde protein ekspresyon değişimleri ve önemi Protein expression changes in breast cancer and their importance", *Dicle Med J Www.Diclemedj.Org Cilt*, 40 (1): 161–168 (2013).
3. Haldun BAL, S., Budak, F., Üniversitesi Tıp Fakültesi, U., DURUSOY Kan Merkezi, R., Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, U., Anabilim Dalı, M., Bilim Dalı, İ., and Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, T., "Genomik, Proteomik Kavramlarına Genel Bakış ve Uygulama Alanları", *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 39 (1): 65–69 (2013).
4. NENNİ, M., ÇELEBİER, M., and SÜSLÜ, İ., "Proteomik Çalışmalara Genel Bakış", *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 40 (1): 48–58 (2020).
5. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., and Rasool, M. H., "Proteomics: Technologies and Their Applications", *Journal Of Chromatographic Science*, 55 (2): 182–196 (2017).
6. Eldrid, C. and Thalassinou, K., "Developments in tandem ion mobility mass spectrometry", *Biochemical Society Transactions*, 48 (6): 2457–2466 (2020).
7. Loos, G., van Schepdael, A., and Cabooter, D., "Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis", *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, And Engineering Sciences*, 374 (2016): (2016).
8. El-Aneel, A., Cohen, A., and Banoub, J., "Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers", <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>, 44 (3): 210–230 (2009).
9. Chen, C. H. (Winston), "Review of a current role of mass spectrometry for proteome research", *Analytica Chimica Acta*, 624 (1): 16–36 (2008).
10. Sakin, Y. S. and Tanoglu, A., "Prebiotics and Their Effects on Human Health [Prebiyotikler ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri]", *Prebiotics Prebiyotikler Review*, 5: 210–233 (2016).
11. Gülbandilar, A., Okur, M., Dönmez, M., Üniversitesi-Altıntaş, D., Yüksekokulu-Kütahya, M., Üniversitesi, D., Fakültesi-Kütahya, M., Yazar, S., and Tarihi, G., "Fonksiyonel Gıda Olarak Kullanılan Probiyotikler ve Özellikleri",

12. TAŞDEMİR, A., "Probiyotikler, Prebiyotikler, Sinbiyotikler", *Sağlık Akademisi Kastamonu*, 2 (1): 71–88 (2017).
13. Yazar, S., Köroğlu, Ö., Bakir, E., Uludağ, G., Köroğlu, S., Sinan DAYISOYLU, K., Fakültesi, Z., Mühendisliği Bölümü, G., Fazıl Şehir Hastanesi, N., and Kliniği, K., "Kefir ve Sağlık", *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 18 (1): 2015 (2015).
14. Leite, A. M. de O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., and Paschoalin, V. M. F., "Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage", *Brazilian Journal Of Microbiology*, 44 (2): 341 (2013).
15. Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., and Peluzio, M. D. C. G., "Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits", *Nutrition Research Reviews*, 30 (1): 82–96 (2017).
16. Vieira, C. P., Rosario, A. I. L. S., Lelis, C. A., Rekowsky, B. S. S., Carvalho, A. P. A., Rosário, D. K. A., Elias, T. A., Costa, M. P., Foguel, D., and Conte-Junior, C. A., "Bioactive Compounds from Kefir and Their Potential Benefits on Health: A Systematic Review and Meta-Analysis", *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2021: (2021).
17. Üniversitesi, E., Fakültesi, Z., and Teknolojisi Bölümü, S., "SÜT PROTEİNLERİ KAYNAKLI BİYOAKTİF PEPTİTLER", *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8 (2): 195–203 (2002).
18. Tarhan, Ö. and Campanella, O. H., "Microstructure and rheology of whey protein based hydrogels", *Hacettepe Journal Of Biology And Chemistry*, 48 (3): 301–307 (2020).
19. KOÇAK, C. and GÜRSEL, A., "Kefir", *Gıda*, 6 (4): (1981)
20. Yalçın, N. F. and IŞIK, M. K., "Kefir; Ürün Özellikleri ve İnsan Sağlığına Etkisi", *Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3 (1): 439–452 (2017).
21. Tomar, O., Çağlar, A., and Akarca, G., "Kefir ve Sağlık Açısından Önemi", *AKU J. Sci. Eng.*, 17: 27202–834 (2017).
22. Vieira, C. P., Rosario, A. I. L. S., Lelis, C. A., Rekowsky, B. S. S., Carvalho, A. P. A., Rosário, D. K. A., Elias, T. A., Costa, M. P., Foguel, D., and Conte-Junior, C. A., "Bioactive Compounds from Kefir and Their Potential Benefits on Health: A Systematic Review and Meta-Analysis", *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2021: (2021).
23. Azizi, N. F., Kumar, M. R., Yeap, S. K., Abdullah, J. O., Khalid, M., Omar, A. R., Osman, M. A., Mortadza, S. A. S., and Alitheen, N. B., "Kefir and Its Biological Activities", *Foods*, 10 (6): (2021).

24. Sharifi, M., Moridnia, A., Mortazavi, D., Salehi, M., Bagheri, M., and Sheikhi, A., "Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties", *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 34 (11): (2017).
25. Khamnaeva, N. I., Tsyrenov, V. Zh., Gongorova, V. S., and Shalygina, A. M., "Biosynthesis of biologically active substances in kefir grains.", *Molochnaya Promyshlennost'*, (No. 4): (2000).
26. Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., and Afreen, A., "Kefir and health: a contemporary perspective", *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 53 (5): 422–434 (2013).
27. Farag, M. A., Jomaa, S. A., El-wahed, A. A., and El-seedi, H. R., "The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety", *Nutrients*, 12 (2): (2020).
28. Koyu, E. B. and Demirel, Z. B., "Fonksiyonel Bir Besin: Kefir", *Beslenme Ve Diyet Dergisi*, 46 (2): 166–175 (2018).
29. KARABIYIKLI, Ş., "Geleneksel ve fonksiyonel bir gıda olan kefirin mikrobiyolojik profili", *Journal Of Agricultural Faculty Of Gaziosmanpasa University*, 33 (2016–1): 75–75 (2016).
30. Nielsen, B., Gürakan, G. C., and Ünlü, G., "Kefir: a multifaceted fermented dairy product", *Probiotics And Antimicrobial Proteins*, 6 (3–4): 123–135 (2014).
31. "(PDF) Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects", [https://www.researchgate.net/publication/46032412\\_Kefir\\_A\\_Probiotic\\_Dairy-Composition\\_Nutritional\\_and\\_Therapeutic\\_Aspects](https://www.researchgate.net/publication/46032412_Kefir_A_Probiotic_Dairy-Composition_Nutritional_and_Therapeutic_Aspects) (2022).
32. Gündüz, G., Biyoloji, M., Dalı, A., Fakültesi, F. E., Üniversitesi, A., and Türkiye, A., "Mikrobiyom, Kefir ve Yaşlanma", *Batı Karadeniz Tıp Dergisi*, 1 (3): 119–124 (2017).
33. Antikarsinojenik Rolü, K., Teknik Üni, K., Bil Fak, S., and ve Diyetetik Böl, B., "Kefirin Antikanserojenik Rolü", *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5 (2): 73–82 (2020).
34. GUZEL-SEYDİM, Z., WYFFELS, J. T., SEYDİM, A. C., and GREENE, A. K., "Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation+", *International Journal Of Dairy Technology*, 58 (1): 25–29 (2005).
35. Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., and Soccol, C. R., "Milk kefir: composition,

- microbial cultures, biological activities, and related products", *Frontiers In Microbiology*, 6 (OCT): (2015).
36. Garrote, G. L., Abraham, A. G., and de Antoni, G. L., "Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study", *LWT - Food Science And Technology*, 30 (1): 77–84 (1997).
  37. Nejati, F., Junne, S., and Neubauer, P., "A Big World in Small Grain: A Review of Natural Milk Kefir Starters", *Microorganisms*, 8 (2): (2020).
  38. Amorim, F. G., Coitinho, L. B., Dias, A. T., Friques, A. G. F., Monteiro, B. L., Rezende, L. C. D. de, Pereira, T. de M. C., Campagnaro, B. P., de Pauw, E., Vasquez, E. C., and Quinton, L., "Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules", *Food Chemistry*, 282: 109–119 (2019).
  39. Karaffová, V., Mudroňová, D., Mad'ar, M., Hřčková, G., Faixová, D., Gancarčíková, S., Ševčíková, Z., and Nemcová, R., "Differences in Immune Response and Biochemical Parameters of Mice Fed by Kefir Milk and *Lactobacillus paracasei* Isolated from the Kefir Grains", *Microorganisms*, 9 (4): (2021).
  40. Vinderola, G., Perdigon, G., Duarte, J., Thangavel, D., Farnworth, E., and Matar, C., "Effects of kefir fractions on innate immunity", *Immunobiology*, 211 (3): 149–156 (2006).
  41. de Moreno de LeBlanc, A., Matar, C., Farnworth, E., and Perdigon, G., "Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir", *Cytokine*, 34 (1–2): 1–8 (2006).
  42. Yılmaz, İ., Enver Dolar, M., and Özpınar, H., "Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial", *The Turkish Journal Of Gastroenterology : The Official Journal Of Turkish Society Of Gastroenterology*, 30 (3): 242–253 (2019).
  43. BARBAROS, M. B. and DİKMEN, M., "Kanser immünoterapisi", *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 31 (4): 177–182 (2015).
  44. Yirmibeşoğlu, S. S. S. and Tefon Öztürk, B. E., "Comparing microbiological profiles, bioactivities, and physicochemical and sensory properties of donkey milk kefir and cow milk kefir", *Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences*, 44: 774–781 (2020).
  45. Sindi, A., Badsha, M. B., Nielsen, B., and Ünlü, G., "Antimicrobial Activity of Six International Artisanal Kefirs Against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, and *Staphylococcus aureus*", *Microorganisms*, 8 (6): (2020).



46. AYAR, A. and SERT, D., "SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNE AFLATOKSİN BULAŞMA KAYNAKLARI VE ALINMASI GEREKEN ÖNLEMLER", *Akademik Gıda*, 1 (3): 11–13 (2003).
47. Ismaiel, A. A., Ghaly, M. F., and El-Naggar, A. K., "Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*", *Current Microbiology*, 62 (5): 1602–1609 (2011).
48. Tanik, N., Doç Savaş SARIKAYA, Y., Doç Asuman ÇELİKBİLEK, Y., Doç Yurdanur AKYÜZ, Y., Doç, Y., Doç Nermin TANIK Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Y., Anabilim Dalı, N., Üniversitesi, B., Fakültesi, T., and Anabilim Dalı, K., "İNME, HİPERTANSİYON VE BEYİN YARIKÜRESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ", *Bozok Tıp Dergisi*, 5 (2): 31–34 (2015).
49. "Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi HİPERTANSİYON VE EVDE BAKIM Papatya (DEMİRCİ) KARAKURT\* Mağfiret KARA\*\*", (2007).
50. de Oliveira, M. R., Silva, T. J., Barros, E., Guimarães, V. M., Baracat-Pereira, M. C., Eller, M. R., dos Reis Coimbra, J. S., and de Oliveira, E. B., "Anti-Hypertensive Peptides Derived from Caseins: Mechanism of Physiological Action, Production Bioprocesses, and Challenges for Food Applications", *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 185 (4): 884–908 (2018).
51. "Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi » Makale » Kefir ve Kefir Kullanılarak Yapılan Bazı Ürünler", <https://dergipark.org.tr/tr/pub/harranziraat/issue/18453/194277> (2022).
52. Ng, P. C. and Kirkness, E. F., "Whole genome sequencing", *Methods In Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 628: 215–226 (2010).
53. "Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi » Makale » Proteomik Çalışmalara Genel Bakış", <https://dergipark.org.tr/tr/pub/hujpharm/issue/54931/734510> (2022).
54. "Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi » Makale » Genomik, Proteomik Kavramlarına Genel Bakış ve Uygulama Alanları", <https://dergipark.org.tr/tr/pub/uutfd/issue/35292/391706> (2022).
55. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., and Rasool, M. H., "Proteomics: Technologies and Their Applications", *Journal Of Chromatographic Science*, 55 (2): 182–196 (2017).
56. Chandramouli, K. and Qian, P.-Y., "Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity", *Human Genomics And Proteomics : HGP*, 2009 (1): (2009).

57. "Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi » Makale » Posttranslasyonel Modifikasyon ve Protein Fonksiyonu", <https://dergipark.org.tr/tr/pub/uluvfd/issue/13518/163521> (2022).
58. Wu, H.-Y. and Liao, P.-C., "Analysis of Protein Phosphorylation Using Mass Spectrometry", *Chang Gung Med J*, 31: 217–244 (2008).
59. Lee, C. R., Park, Y. H., Min, H., Kim, Y. R., and Seok, Y. J., "Determination of protein phosphorylation by polyacrylamide gel electrophoresis", *Journal Of Microbiology*, 57 (2): 93–100 (2019).
60. Ozlu, N., Akten, B., Timm, W., Haseley, N., Steen, H., and Steen, J. A. J., "Phosphoproteomics", *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology And Medicine*, 2 (3): 255–276 (2010).
61. Rozanova, S., Barkovits, K., Nikolov, M., Schmidt, C., Urlaub, H., and Marcus, K., "Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview", *Methods In Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2228: 85–116 (2021).
62. Gstaiger, M. and Aebersold, R., "Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology", *Nature Reviews. Genetics*, 10 (9): 617–627 (2009).
63. Gregorich, Z. R., Chang, Y. H., and Ge, Y., "Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up?", *Pflugers Archiv : European Journal Of Physiology*, 466 (6): 1199–1209 (2014).
64. Cassidy, L., Kaulich, P. T., Maaß, S., Bartel, J., Becher, D., and Tholey, A., "Bottom-up and top-down proteomic approaches for the identification, characterization, and quantification of the low molecular weight proteome with focus on short open reading frame-encoded peptides", *Proteomics*, 21 (23–24): (2021).
65. "Proteomic Analysis: Why and How?-Web of Science Core Collection", <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000170852400006> (2022).
66. Gary Siuzdak, "The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology", (2006).
67. AL, A. and YILDIZ, K., "Kefirde Asitlik Değişimi ve Serum Ayrılmasında Meyvelerin Etkisi", *Bilim Armonisi*, 1 (1): 35–38 (2018).
68. Liu, Y. and Guo, R., "PH-dependent structures and properties of casein micelles", *Biophysical Chemistry*, 136 (2–3): 67–73 (2008).

69. Armstrong, R. A., "Should Pearson's correlation coefficient be avoided?", *Ophthalmic & Physiological Optics : The Journal Of The British College Of Ophthalmic Opticians (Optometrists)*, 39 (5): 316–327 (2019).
70. Schober, P. and Schwarte, L. A., "Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation", *Anesthesia And Analgesia*, 126 (5): 1763–1768 (2018).
71. Dallas, D. C., Citerne, F., Tian, T., Silva, V. L. M., Kalanetra, K. M., Frese, S. A., Robinson, R. C., Mills, D. A., and Barile, D., "Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins", *Food Chemistry*, 197 (Pt A): 273–284 (2016).
72. Izquierdo-González, J. J., Amil-Ruiz, F., Zazzu, S., Sánchez-Lucas, R., Fuentes-Almagro, C. A., and Rodríguez-Ortega, M. J., "Proteomic analysis of goat milk kefir: Profiling the fermentation-time dependent protein digestion and identification of potential peptides with biological activity", *Food Chemistry*, 295: 456–465 (2019).
73. Pathan, M., Keerthikumar, S., Ang, C. S., Gangoda, L., Quek, C. Y. J., Williamson, N. A., Mouradov, D., Sieber, O. M., Simpson, R. J., Salim, A., Bacic, A., Hill, A. F., Stroud, D. A., Ryan, M. T., Agbinya, J. I., Mariadason, J. M., Burgess, A. W., and Mathivanan, S., "FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool", *Proteomics*, 15 (15): 2597–2601 (2015).

## **EK AÇIKLAMALAR A.**

### **SONUÇLAR**

Çizelge Ek A. 1. Fraksiyonlama yöntemi ile tespit edilen süt proteinleri ve değişimlerine ait istatistiksel analiz sonucu.

No:	T: 1Majority protein IDs	Protein İsmi	C: Student's T-test Significant 12h_0h	C: Student's T-test Significant 24h_0h	C: Student's T-test Significant 7d_0h	C: Student's T-test Significant 28d_0h	C: Student's T-test significant	N: Mol. weight [kDa]	N: Score	N: MS/MS count	N: -Log Student's T-test p-value 12h_0h	N: -Log Student's T-test p-value 24h_0h	N: -Log Student's T-test p-value 14d_0h	N: -Log Student's T-test p-value 28d_0h
1	A2I7N1	Serpin A3-5				+	28d_0h	46.397	282.12	139	0.473023	0.73175	1.13062	1.37335
2	A2I7N3	Serpin A3-7				+	14d_0h	46.941	332.99	16	0.216719	0.141115	1.47119	1.11344
3	ENSBTAP0000007350			+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	192.99	202.08	81	0.346565	1.59447	4.17535	2.03432
4	ENSBTAP00000014147							11.756	323.31	116	0.001571	0.220158	0.21736	0.557351
5	ENSBTAP00000018229					+	28d_0h	53.661	184.68	105	0.278108	0.478256	0.437885	1.33209
6	ENSBTAP00000018574	Serpin family D member 1						55.207	177.57	44	0.9694	0.247713	0.202049	0.597504

7	ENSBTAP000 00024146							164.34	32 3. 31	132	1.39998	0.087492	0.979211	0.251743
8	ENSBTAP000 00024462							46.543	87 .0 67	90	0.032695	0.391851	0.107877	0.297887
9	ENSBTAP000 00024466			+	+		14d_0h;24 h_0h	43.9	32 3. 31	1088	1.13901	3.2838	1.53588	1.08874
10	ENSBTAP000 00031360							54.678	11 2. 47	60	0.413678	1.00121	0.730159	0.292988
11	P00711	Alpha-lactalbumin						14.186	32 3. 31	3299	0.503877	0.211838	0.677843	0.653292
12	P00735	Prothrombin		+	+	+	14d_0h;24 h_0h;28d_0h	70.505	17 7. 05	36	0.400376	1.41852	2.22306	1.78062
13	P00978	Protein AMBP						39.234	35 .4 43	22	0.103239	0.050286	0.140353	0.288126
14	P01044-1	Kininogen-1				+	28d_0h	68.889	20 7. 92	124	1.36879	1.14088	1.09759	1.40724
15	P02662	Alpha-S1-casein		+	+	+	14d_0h;24 h_0h;28d_0h	22.975	32 3. 31	2402 7	0.068301	3.02393	2.31429	2.90102
16	P02663	Alpha-S2-casein			+	+	14d_0h;28 d_0h	24.348	32 3.	9085	2.22261	0.459877	1.53222	2.28506

									31					
17	P02666	Beta-casein			+	+	14d_0h;28d_0h	23.583	32 3. 31	1141 3	0.980546	1.14182	2.14737	2.5051
18	P02668	Kappa-casein				+	28d_0h	18.974	32 3. 31	1631 4	0.210163	1.05632	0.130588	2.38326
19	P02672	Fibrinogen alpha chain		+		+	24h_0h;28d_0h	67.011	32 3. 31	91	0.033682	2.2007	0.639666	1.86604
20	P02676	Fibrinogen beta chain		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	56.44	32 3. 31	80	0.265173	2.11841	1.7355	1.13698
21	P02754	Beta-lactoglobulin				+	28d_0h	18.281	32 3. 31	1051 2	0.271873	0.36007	1.08407	1.35712
22	P02769	Albumin						69.293	32 3. 31	2492	2.03523	0.270948	1.02183	0.429334
23	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1						66.017	32 3. 31	101	0.399376	0.300518	0.162765	0.530866
24	P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein	+	+	+		12h_0h;14d_0h;24h_0h	38.418	32 3. 31	68	3.01318	2.96178	3.26134	0.178975
25	P15497	Apolipoprotein A-I		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	30.276	32 3. 31	341	0.371562	1.67174	2.78098	1.7039

26	P15636	Protease 1				+	28d_0h	68.124	32 3. 31	406	1.85374	0.048478	1.07928	1.23057
27	P17690	Beta-2-glycoprotein 1		+			24h_0h	38.252	10 9. 69	57	1.4024	1.50429	0.158511	0.207833
28	P17697	Clusterin				+	14d_0h	51.113	32 3. 31	153	1.26922	1.04629	1.58981	0.090051
29	P28800	Alpha-2-antiplasmin		+	+		14d_0h;24 h_0h	54.71	43 .3 36	29	0.899875	3.35366	2.97036	0.085762
30	P31096	Osteopontin		+	+	+	14d_0h;24 h_0h;28d_0h	30.904	32 3. 31	190	0.568487	1.84832	1.33047	2.04953
31	P34955	Alpha-1- antiproteinase		+	+	+	14d_0h;24 h_0h;28d_0h	46.103	32 3. 31	206	1.49692	3.44606	2.14304	1.90678
32	P41361	Antithrombin-III						52.347	32 3. 31	123	1.49999	0.709667	0.327245	0.12517
33	P50448	Factor XIIa inhibitor		+	+		14d_0h;24 h_0h	51.723	32 3. 31	211	1.58835	1.58138	2.33611	0.89168
34	P81644	Apolipoprotein A-II				+	14d_0h	11.202	70 .8 65	22	0.077041	0.135206	1.4729	0.373477
35	Q03247	Apolipoprotein E						35.979	32 3.	107	0.264975	0.112664	1.04468	0.37066



								31						
36	Q05B55	IGK protein						26.59	32 3. 31	121	2.4679	0.042593	0.239977	0.406643
37	Q0IIK2	Serotransferrin		+		+	24h_0h;28d_0h	77.738	32 3. 31	413	0.153792	1.3055	1.04123	1.52426
38	Q1A7A4	Complement component C5a						188.74	4. 42 3	30	0.143673	0.12359	0.374029	0.48647
39	Q1RMK2			+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	65.056	32 3. 31	706	0.482547	1.34453	1.32812	1.54099
40	Q1RMN8	Immunoglobulin light chain, lambda gene cluster				+	14d_0h	24.536	32 3. 31	421	1.51635	1.14062	1.50233	0.544601
41	Q28065	C4b-binding protein alpha chain						68.886	21 .9 46	32	1.25759	0.170632	1.16217	0.444411
42	Q2KIF2	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1				+	14d_0h	38.348	15 6. 93	40	1.15563	1.14651	1.53826	0.580742
43	Q2KIT0	Protein HP-20 homolog						20.646	11 5. 04	55	0.549518	0.567812	0.330691	0.842476
44	Q2KJF1	Alpha-1B-glycoprotein						53.553	17 0. 76	44	0.800902	0.351836	0.060006	0.430377

45	Q2UVX4	Complement C3		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	187.37	323.31	1174	0.244722	1.5695	1.80618	1.5442
46	Q32PJ2	Apolipoprotein A-IV	+	+	+	+	12h_0h;14d_0h;24h_0h;28d_0h	43.017	323.31	220	3.02437	1.3188	2.68461	1.92946
47	Q3SX14	Gelsolin		+	+		14d_0h;24h_0h	85.686	176.66	64	0.212574	2.18558	2.32811	1.11544
48	Q3SZV7	Hemopexin						52.295	60.634	45	0.065247	1.20068	0.850962	0.782505
49	Q3T052	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4				+	28d_0h	101.51	323.31	108	0.214845	0.213992	0.357845	1.18697
50	Q9TTE1	Serpin A3-1		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	46.203	323.31	121	1.67023	1.72974	1.78625	1.47338
51	A0JNP2	Secretoglobin family 1D member				+	28d_0h	11.294	90.178	95	0.625261	0.314587	0.161784	1.57593
52	P02702	Folate receptor alpha						27.921	323.31	198	1.34733	0.952888	0.882457	1.0548
53	P08037	Beta-1,4-galactosyltransferase 1		+		+	24h_0h;28d_0h	44.842	323.31	122	0.045341	1.7203	0.868201	2.33592
54	P10152	Angiogenin-1		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	16.969	323.31	118	0.261794	1.42107	1.22217	1.23875

							0h		31					
55	P10790	Fatty acid-binding protein, heart						14.779	32 3. 31	282	0.470465	0.045381	0.980991	0.389889
56	P11151	Lipoprotein lipase		+			24h_0h	53.377	32 3. 31	302	0.141112	2.18888	0.989088	0.974377
57	P18892	Butyrophilin subfamily 1 member A1						59.276	32 3. 31	980	0.648815	0.892506	0.558106	0.597218
58	C7FE01	Lactoferrin		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	76.274	32 3. 31	1789	0.381745	2.57815	2.00566	3.08729
59	P26201	Platelet glycoprotein 4						52.94	32 3. 31	324	0.124843	0.980817	0.848387	0.407623
60	P26779	Prosaposin		+	+		14d_0h;24h_0h	58.051	29 1. 07	89	0.187699	1.87144	1.47679	0.891515
61	P30922	Chitinase-3-like protein 1		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	43.031	32 3. 31	81	0.33846	2.05498	1.52842	2.22607
62	P60712	Actin, cytoplasmic 1			+	+	14d_0h;28d_0h	41.736	32 3. 31	99	0.052961	1.08519	1.86956	3.66641
63	P79345	NPC intracellular cholesterol transporter 2		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	16.64	24 9. 89	128	0.7268	2.51339	1.18514	1.78097

64	P80025	Lactoperoxidase		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	80.641	32 3. 31	546	0.612881	1.29723	1.68875	1.20644
65	P80195	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	17.151	32 3. 31	2781	0.861402	2.07919	2.0191	1.25217
66	P80457	Xanthine dehydrogenase/oxidase		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	146.79	32 3. 31	1519	1.07224	2.29878	2.79743	2.29426
67	P81265	Polymeric immunoglobulin receptor		+			24h_0h	82.434	32 3. 31	638	0.124786	1.79055	0.9642	0.816153
68	Q3ZCH5	Zinc-alpha-2-glycoprotein		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	33.851	32 3. 31	379	1.35555	1.98669	1.79685	2.51961
69	Q4GZT4	Broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2						72.724	32 3. 31	325	1.36849	0.527252	0.299209	0.83725
70	Q5E9B1	L-lactate dehydrogenase B chain						36.723	23 .9 64	25	0.637005	0.508563	0.850407	0.137159
71	Q76LV1	Heat shock protein HSP 90-beta		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	83.252	7. 37 08	92	0.177189	3.19735	3.52551	2.15776
72	Q8MI01	Mucin-15		+			24h_0h	35.715	32 3.	48	0.835815	1.42886	0.570257	0.0372

								31						
73	Q8SPP7	Peptidoglycan recognition protein 1			+	+	14d_0h;28d_0h	21.063	87.532	64	0.193924	1.02118	1.28625	1.32041
74	Q8WML4	Mucin-1		+	+		14d_0h;24h_0h	58.091	211.13	67	1.88503	1.34646	2.04336	0.822892
75	Q95114	Lactadherin			+	+	14d_0h;28d_0h	47.41	323.31	1363	0.15117	1.19122	3.25956	1.42919
76	Q95JH2	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	32.005	323.31	36	0.194529	2.52128	2.15769	3.56901
77	Q9MZ06	Fibroblast growth factor-binding protein 1						26.188	211.28	75	0.115126	0.389368	0.146946	0.171606
78	Q9TUM6	Perilipin-2				+	28d_0h	49.368	323.31	581	0.695905	0.632072	0.721691	1.12936
79	A1L5B6	Annexin		+			24h_0h	36.073	32.2	67	0.087081	1.33604	0.615515	0.812009
80	A2VDN9	KIAA0020 protein		+	+		14d_0h;24h_0h	73.344	2.7558	25	0.587337	2.60013	2.8707	0.886822
81	A7E3V7	Guanine nucleotide-binding protein, beta-						37.029	23.518	29	0.107248	0.180941	0.113032	0.554417

		1 subunit												
82	C6KGD7	Histatherin					7.2184	27 6. 5	61	0.688345	0.920252	0.816709	0.173699	
83	Q0IIA2	Odorant-binding protein-like	+		+	12h_0h;28d_0h	19.604	23 5. 72	33	3.65631	1.23047	0.356786	1.17083	
84	Q3ZCA7	G protein subunit alpha i3					40.536	7. 55 82	40	0.117957	0.145022	0.674457	0.64005	
85	Q3ZCL0	Cysteine-rich secretory protein 2			+	28d_0h	27.453	32 3. 31	153	0.413873	1.06607	0.802335	2.33517	
86	Q58DP6	Ribonuclease 4		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	16.938	32 3. 31	138	0.002707	1.37637	1.54591	1.40267
87	Q5GN72	Alpha-1-acid glycoprotein		+	+	+	14d_0h;24h_0h;28d_0h	23.158	32 3. 31	249	0.362562	1.6853	3.74763	2.31135

Çizelge Ek A. 2. Kloroform/metanol ekstraksiyon yöntemi ile tespit edilen fosfopeptitlerin değişimlerine ait istatiks el analiz sonucu.

T: T: id	T: T: Phospho (STY) Probabilities	T: T: Protein	C: Student's T-test Significant 12h_0h	C: Student's T-test Significant 24h_0h	C: Student's T-test Significant 7d_0h	C: Student's T-test Significant 28d_0h	C: Student's T-test significant	T: C: Charge	T: C: Amino acid	T: N: Localization prob	T: N: PEP	T: N: Score	T: N: Score for localization	T: M: Number of Phospho (STY)	T: N: Position
1	VNELS(1)KDIGS(1)ES(1)T(1)EDQAMEDIK	P02662		+			24h_0h	3	S	1	4.42 E-231	266.2	66.045	1;2;3;4	46
2	Y(1)KVPQLEIVPNS(1)AEER	P02662						2	S	1	3.53 E-181	247.5	26.148	1;2	115
3	TVDMES(0.987)T(0.013)EVFTK	P02663						2	S	0.987366	2.58 E-134	212.1	198.52	1;2;3;4;5	143
4	NMAINPS(1)KENLCSTFK	P02663						2	S	1	5.60 E-118	204.52	204.52	1;2	31
5	FQS(1)EEQQQT(1)EDELQDK	P02666						2	S	1	0	342.42	47.288	1;2	35
6	VNELS(1)KDIGS(1)ES(1)T(1)EDQAMEDIK	P02662			+	+	28d_0h;7d_0h	3	S	1	4.42 E-231	266.2	66.045	1;2;3;4	46
7	VNELS(1)KDIGS(1)ES(1)T(1)EDQAMEDIK	P02662			+		7d_0h	3	S	1	8.97 E-181	244.22	66.045	1;2;3;4	48
8	VNELS(1)KDIGS(1)ES(1)T(1)EDQAMEDIK	P02662						3	S	1	8.97 E-181	244.22	66.045	1;2;3;4	41
9	EQLS(1)T(1)S(1)EENSKK	P02663						2	S	1	2.05 E-70	152.32	112.5	1;2;3;4;5	129
10	EQLS(1)T(1)S(1)EENSKK	P02663						2	S	0.999996	2.05 E-70	152.32	112.5	1;2;3;4;5	131
11	RELEELNVPGEIVES(1)LS(1)S(1)S(1)EESITR	P02666						2	S	0.999999	4.06 E-119	199.15	178.85	2;3;4	15
12	RELEELNVPGEIVES(1)LS(1)S(1)S(1)EESITR	P02666			+		7d_0h	2	S	0.999999	4.47 E-	222.42	178.85	2;3;4	17

											159				
13	RELEELNVPGEIVES(1)LS(1)S(1)S(1)EESITR	P02666						2	S	0.99999 9	5.06 E- 182	236. 6	178.85	2;3;4	18
14	RELEELNVPGEIVES(1)LS(1)S(1)S(1)EESITR	P02666						2	S	0.99999 8	5.06 E- 182	236. 6	178.85	2;3;4	19
15	IRIS(1)HELDS(0.002)AS(0.553)S(0.446)EVN	P31096						2	S	0.99999 7	2.81 E-32	117. 18	93.51	2;3	251
16	ISHELDS(1)AS(0.927)S(0.073)EVN	P31096			+	+	28d_0h;7d_0h	2	S	0.99961 6	4.76 E-31	110. 08	99.215	2;3	256
17	IRIS(0.999)HELDS(0.014)AS(0.994)S(0.993)EVN	P31096			+	+	28d_0h;7d_0h	2	S	0.99384 2	2.81 E-32	117. 18	96.163	2;3	258
18	IRIS(0.993)HELDS(0.021)AS(0.993)S(0.994)EVN	P31096			+	+	28d_0h;7d_0h	2	S	0.99367 1	1.37 E-23	105. 31	105.31	2;3	259
19	NLQIS(1)NEDLS(1)KEPS(1)IS(1)REDLIS(1)K	sp P80195 GLCM1 _BOVIN						3	S	1	8.30 E- 101	192. 1	26.573	2;3;4; 5	47
20	NLQIS(1)NEDLS(1)KEPS(1)IS(1)REDLIS(1)K	sp P80195 GLCM1 _BOVIN						3	S	1	9.97 E-44	128. 94	26.573	2;3;4; 5	52
21	VNELS(1)KDIGS(1)ES(1)T(1)EDQAMEDIK	P02662			+	+	28d_0h;7d_0h	3	T	1	3.37 E- 127	194. 67	66.045	2;3;4	49
22	EQLS(1)T(1)S(1)EENSCK	P02663			+		7d_0h	2	T	1	3.78 E-57	147. 28	112.5	2;3;4; 5	130
23	VNELS(1)KDIGS(1)ES(1)T(1)EDQAMEDIK	P02662						3	S	1	4.42 E- 231	266. 2	66.045	1;2;3; 4	46
24	VNELS(1)KDIGS(1)ES(1)T(1)EDQAMEDIK	P02662						3	S	1	8.97 E- 181	244. 22	66.045	1;2;3; 4	48
25	VNELS(1)KDIGS(1)ES(1)T(1)EDQAMEDIK	P02662						3	S	1	8.97 E- 181	244. 22	66.045	1;2;3; 4	41
26	EQLS(1)T(1)S(1)EENSCK	P02663						2	S	1	2.05 E-70	152. 32	112.5	1;2;3; 4;5	129
27	EQLS(1)T(1)S(1)EENSCK	P02663						2	S	0.99999 6	2.05 E-70	152. 32	112.5	1;2;3; 4;5	131
28	EQLS(0.97)T(0.515)S(0.515)EENS(1)KK	P02663						2	S	1	9.23 E-45	130. 25	100.31	3;4;5	135
29	TVDMES(0.987)T(0.013)EVFTK	P02663						2	S	0.98736 6	2.58 E- 134	212. 1	198.52	1;2;3; 4;5	143



30	NANEEY(0.001)S(1)IGS(1)S(1)S(1)EES(1)AEVATEEVK	P02663			+		7d_0h	2	S	0.999768	1.38E-85	168.75	168.3	3;4;5	53
31	NANEEYSIGS(1)S(1)S(1)EES(1)AEVATEEVK	P02663		+	+	+	24h_0h;28d_0h;7d_0h	2	S	0.999977	3.19E-138	210.62	170.42	3;4;5	56
32	NANEEYSIGS(1)S(1)S(1)EES(1)AEVATEEVK	P02663		+	+	+	24h_0h;28d_0h;7d_0h	2	S	0.999977	3.19E-138	210.62	170.42	3;4;5	57
33	NANEEYSIGS(1)S(1)S(1)EES(1)AEVATEEVK	P02663		+	+	+	24h_0h;28d_0h;7d_0h	2	S	0.999992	3.19E-138	210.62	170.42	3;4;5	58
34	NANEEYSIGS(1)S(1)S(1)EES(1)AEVATEEVK	P02663		+	+	+	24h_0h;28d_0h;7d_0h	2	S	0.999996	1.47E-101	186.7	170.42	3;4;5	61
35	NTMEHVS(1)S(1)S(1)EESIS(0.992)QET(0.008)YK	P02663						2	S	0.999999	7.58E-101	190.03	171.24	3;4;5	8
36	NTMEHVS(1)S(1)S(1)EESIS(0.999)QET(0.001)YK	P02663				+	28d_0h	2	S	1	7.58E-101	190.03	171.37	2;3;4;5	9
37	NTMEHVS(1)S(1)S(1)EESIS(0.999)QET(0.001)YK	P02663						2	S	1	7.58E-101	190.03	171.37	2;3;4;5	10
38	KNTMEHVS(1)S(1)S(1)EES(1)IIS(1)QETYKQEK	P02663		+	+	+	24h_0h;28d_0h;7d_0h	2	S	0.999996	1.86E-57	147.35	121.14	3;4;5	13
39	NTMEHVS(1)S(1)S(1)EES(1)IIS(1)QETYKQEK	P02663				+	28d_0h;7d_0h	3	S	0.999811	7.58E-101	186.06	103.86	3;4;5	16
40	RELEELNVPGEIVES(1)LS(1)S(1)S(1)EESITR	P02666				+	7d_0h	2	S	0.999999	4.06E-119	199.15	178.85	2;3;4	15
41	RELEELNVPGEIVES(1)LS(1)S(1)S(1)EESITR	P02666				+	28d_0h;7d_0h	2	S	0.999999	4.47E-159	222.42	178.85	2;3;4	17
42	RELEELNVPGEIVES(1)LS(1)S(1)S(1)EESITR	P02666						2	S	0.999999	5.06E-182	236.6	178.85	2;3;4	18
43	RELEELNVPGEIVES(1)LS(1)S(1)S(1)EESITR	P02666						2	S	0.999998	5.06E-182	236.6	178.85	2;3;4	19
44	RELEELNVPGEIVES(0.754)LS(0.754)S(0.754)S(0.754)EES(0.776)IT(0.21)R	P02666						2	S	0.775899	2.29E-13	79.93	33.947	4	22
45	TS(0.001)QLT(0.01)DHS(0.963)KET(0.029)NS(0.943)S(0.057)ELS(0.994)KELT(0.003)PK	P31096						3	S	0.943134	4.32E-43	129.04	107.58	2;3;4	194

46	ET(0.917)NS(0.082)S(0.002)ELS(1)KELTPK	P31096				+	28d_0h	2	S	0.999878	3.48E-54	143.97	143.97	2;3;4	198
47	IRIS(1)HELDS(0.002)AS(0.553)S(0.446)EVN	P31096				+	7d_0h	2	S	0.999997	2.81E-32	117.18	93.51	2;3	251
48	ISHELDS(1)AS(0.927)S(0.073)EVN	P31096				+	7d_0h	2	S	0.999616	4.76E-31	110.08	99.215	2;3	256
49	IRIS(0.999)HELDS(0.014)AS(0.994)S(0.993)EVN	P31096				+	7d_0h	2	S	0.993842	2.81E-32	117.18	96.163	2;3	258
50	IRIS(0.993)HELDS(0.021)AS(0.993)S(0.994)EVN	P31096				+	7d_0h	2	S	0.993671	1.37E-23	105.31	105.31	2;3	259
51	KTSQLTDHS(1)KET(0.03)NS(0.925)S(0.045)ELSK	P31096				+	28d_0h	3	S	0.999865	4.32E-43	125.79	125.79	2;3;4	189
52	LPVKPT(0.066)S(0.984)S(0.982)GS(0.984)S(0.984)EEK	P31096						2	S	0.984111	1.47E-32	113.69	71.451	3;4	7
53	LPVKPT(0.065)S(0.984)S(0.984)GS(0.984)S(0.984)EEKQLNKK	P31096						2	S	0.983657	1.47E-32	113.69	113.69	2;3;4	8
54	LPVKPT(0.148)S(0.88)S(0.981)GS(0.993)S(0.998)EEK	P31096						2	S	0.993356	1.47E-32	113.69	77.367	3;4	10
55	LPVKPT(0.151)S(0.895)S(0.968)GS(0.987)S(0.999)EEK	P31096						2	S	0.998672	1.47E-32	113.69	78.529	3;4	11
56	RSNVQS(0.009)PDAT(0.988)EEDFT(0.066)S(0.943)HIES(0.993)EEMHDAPK	P31096						3	S	0.943244	3.39E-28	107.63	76.402	3	168
57	S(0.007)NVQS(0.066)PDAT(0.918)EEDFT(0.571)S(0.438)HIES(1)EEMHDAPK	P31096						3	S	0.999918	3.39E-28	107.63	87.803	2;3	172
58	NLQIS(1)NEDLS(1)KEPS(1)IS(1)REDLIS(1)K	sp P80195 GLCM1_BOVIN						3	S	1	8.30E-101	192.1	26.573	2;3;4;5	56
59	NLQIS(1)NEDLS(1)KEPS(1)IS(1)REDLIS(1)K	sp P80195 GLCM1_BOVIN						3	S	1	1.84E-43	122.49	26.573	2;3;4;5	58
60	NLQIS(1)NEDLS(1)KEPS(1)IS(1)REDLIS(1)K	sp P80195 GLCM1_BOVIN						3	S	1	8.30E-101	192.1	26.573	2;3;4;5	47
61	NLQIS(1)NEDLS(1)KEPS(1)IS(1)REDLIS(1)K	sp P80195 GLCM1_BOVIN						3	S	1	9.97E-44	128.94	26.573	2;3;4;5	52
62	VNELS(1)KDIGS(1)ES(1)T(1)EDQAMEDIK	P02662						3	T	1	3.37E-127	194.67	66.045	2;3;4	49
63	EQLS(1)T(1)S(1)EENSCK	P02663				+	7d_0h	2	T	1	3.78E-57	147.28	112.5	2;3;4;5	130
64	T(1)VDMES(0.954)T(0.046)EVFTK	P02663						2	T	1	1.96E-98	192.65	192.65	2;3;4;5	138
65	<b>KNT(1)MEHVS(1)S(1)S(1)EES(0.002)IIS(0.997)QET(0.001)YK</b>	P02663				+	<b>24h_0h;28d_0h;7d_0h</b>	3	T	1	1.90E-56	149.71	144.23	3;4;5	3

66	LPVKPT(0.852)S(0.787)S(0.787)GS(0.787)S(0.787)EEKQLNN K	P31096							2	T	0.85226	1.15 E-11	78.6 53	78.653	3;4	6
67	RSNVQS(0.001)PDAT(0.998)EEDFT(0.604)S(0.604)HIES(0.79 3)EEMHDAPK	P31096							3	T	0.99792 4	3.39 E-28	107. 63	96.563	2;3	162
68	S(0.032)NVQS(0.142)PDAT(0.379)EEDFT(0.76)S(0.76)HIES(0 .926)EEMHDAPK	P31096							3	T	0.7603	3.39 E-28	107. 63	32.79	3	167
69	NANEEY(0.903)S(0.907)IGS(0.759)S(0.759)S(0.759)EES(0.9 09)AEVAT(0.004)EEVK	P02663							3	Y	0.90260 4	1.51 E-17	83.0 88	44.616	3;4;5	52

Çizelge Ek A. 3. Tespit edilmiş deamide olmuş glikopeptitlerin listesi (Kloroform/metanol ekstraksiyon yöntemi ile).

	<b>Protein İçindeki Pozisyonlar</b>	<b>Protein</b>	<b>Deamidasyon Numarası</b>	<b>Amino Asit</b>	<b>Deamidasyon (N) Olasılıkları</b>	<b>Peptid Pozisyonları</b>	<b>Yük</b>	<b>Kütle Hatası (ppm)</b>
1	318;318	A2I7N1	1	N	SN(0.003)YELN(0.997)DTLSQMGIK	6	2	-2,44
2	267;179	ENSEMBL:ENSBTAP00000024466	1	N	EEQFN(1)STYR	5	2	-0,42362
3	71;90	P00711	1;2	N	DDQNPSSN(1)ICN(1)ISCDK	9	3	-1,4847
4	74;93	P00711	1;2	N	DDQNPSSN(1)ICN(1)ISCDK	12	3	-1,4847
5	156	P12763	1	N	LCPDCPLLAPLN(1)DSR	12	2	0,15469
6	92	P17690	1	N	VCPFAGILEN(1)GTVR	10	2	-1,4044
7	346	P17697	1	N	MLN(1)TSALLK	3	2	-0,73928
8	105	P34955	1	N	GLGFN(1)LELAEEIHK	5	3	-1,7906
9	176	P50448	1	N	VSLEHLLSYPQN(1)FSCVHHALR	12	5	-0,058924
10	187	Q1RMK2	2	N	FN(1)N(1)STVSSER	2	2	0,20327
11	188	Q1RMK2	1;2	N	FN(1)N(1)STVSSER	3	2	0,20327
12	423	Q1RMK2	1	N	HLN(1)DTFSAR	3	2	0,38777
13	152	Q2KIU3	1	N	LGLMKN(1)DTQILEK	6	2	-0,41954
14	122	Q3KUS7	1	N	AAYYN(1)LSDEISFR	5	2	0,20838

15	219	Q3SZV7	1	N	FDPVTGEVN(1)STYPR	9	2	0,77154
16	100	Q9TTE1	1	N	FN(1)LTEIQEK	2	2	-0,5208
17	87	sp A0JNP2 SG1D_BOVIN	1	N	ILLN(1)CTVTDVK	4	2	0,74494
18	90	sp P08037 B4GT1_BOVIN	1	N	GVAPPPPLQN(1)SSKPR	10	3	-0,36077
19	73	sp P11151 LIPL_BOVIN	1	N	TPEDTAEDTCHLIPGVTESVAN(0.001)CHF(0.999)HSSK	26	4	-0,027745
20	225;234;252;252; 252	tr Q6LBN7 Q6LBN7_BOVIN	1;2	N	DQYELLCLN(1)N(1)SR	9	2	0,46158
21	209;218;236;236; 236	tr Q6LBN7 Q6LBN7_BOVIN	2	N	ETTVFEN(1)LPEKADRQYELLCLN(0.766)N(0.234)SR	7	4	0,53711
22	417	sp P26201 CD36_BOVIN	1	N	HNYIVPILWLN(1)ETGTIGDEKAEMFR	11	3	2,1991
23	321	sp P26201 CD36_BOVIN	1	N	N(1)CTLYGVLDIGK	1	2	0,96041
24	106	sp P80025 PERL_BOVIN	1	N	DTTLTN(1)VTDPDLTALSWEVGCAPVPLVK	6	3	1,2227
25	358	sp P80025 PERL_BOVIN	1	N	KPSPCEFIN(1)TTAR	9	3	-0,85763
26	241	sp P80209 CATD_BOVIN	1	N	GSLMFHN(1)VTR	7	2	0,47709
27	697;706	tr Q9GK49 Q9GK49_BOVIN		N	SN(1)LTVLR	2	1	0,96369
28	83	sp P81265 PIGR_BOVIN	1	N	AN(0.97)LTN(0.03)FPESGTFVVDISHLTHK	2	4	0,04519
29	86	sp P81265 PIGR_BOVIN	1	N	AN(0.341)LTN(0.659)FPESGTFVVDISHLTHK	5	4	0,41297
30	44	sp Q8MI01 MUC15_BOVIN	1	N	TMEN(1)QSVPLESK	4	2	0,61456
31	384	sp Q8WML4 MUC1_BOVIN	1;2	N	ITN(0.002)LQFN(0.998)SSLEN(1)PQTSYYQELQR	7	2	0,58056

32	389	sp Q8WML4 MUC1_BOVIN	1;2	N	ITN(0.002)LQFN(0.998)SSLEN(1)PQTSYYQELQR	12	2	0,58056
33	225	sp Q95114 MFGM_BOVIN	2	N	IFIGN(1)VN(0.991)N(0.01)SGLK	5	2	0,74489
34	227	sp Q95114 MFGM_BOVIN	1;2	N	IFIGNVN(1)NSGLK	7	2	-0,50912
35	228	sp Q95114 MFGM_BOVIN	2	N	IFIGN(0.006)VN(0.995)N(0.999)SGLK	8	2	2,5102
36	155	sp Q9MZ06 FGFP1_BOVIN	1	N	LVN(1)STLIR	3	2	-0,38715

Çizelge Ek A. 4. Fraksiyonlama yöntemi ile tespit edilen kefirden süte geçen kefir mikroorganizmasına ait proteinler.

<b>T: Majority protein IDs</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>N: Peptide s</b>	<b>N: Razor + unique peptide s</b>	<b>N: Unique peptide s</b>	<b>N: Sequen ce coverag e [%]</b>	<b>N: Unique + razor sequence coverage [%]</b>	<b>N: Unique sequenc e coverag e [%]</b>	<b>N: Mol. weight [kDa]</b>	<b>N: Q- value</b>	<b>N: Score</b>	<b>N: Inte nsity</b>	<b>N: MS/M S count</b>
A0A5D4FZ B2	UPF0297 protein D8K17_000790	2	2	2	33	33	33	10.169	0	70.04 2	4.74E +09	31
A0A5D4FZ G4	50S ribosomal protein L28	3	3	3	42.2	42.2	42.2	7.173	0.003135	7.186	1.88E +09	15
A2RHX1	Phosphoglycerate kinase	20	2	1	69.8	8.5	5	42.107	0	60.09	2.85E +09	33
A2RI10	30S ribosomal protein S4	13	13	8	64	64	39.4	23.196	0	147.3 2	2.87E +09	54
A2RI67	2,3-bisphosphoglycerate- dependent phosphoglycerate mutase	8	8	7	51.5	51.5	46.4	26.313	0	75.84 6	5.34E +09	77
A2RIS0	Serine hydroxymethyltransferase	12	12	12	49.2	49.2	49.2	44.822	0	57.13 6	2.85E +09	61
A0A5D4GL 74	Enolase	26	26	21	70.9	70.9	55.7	46.911	0	323.3 1	7.88E +10	411
A2RJP7	50S ribosomal protein L31 type B	4	4	3	69.1	69.1	51.9	9.352	0	76.95 3	2.19E +09	33
A2RJY0	Bifunctional purine	12	12	10	32.2	32.2	29	57.158	0	31.37	1.36E	41

	biosynthesis protein PurH										7	+09	
A2RK47	ABC transporter nucleoside-binding protein BmpA	8	8	8	27.1	27.1	27.1	36.861	0	16.314	7.51E+08		23
A0A5P3IGV0	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	17	17	16	75.9	75.9	75.9	35.805	0	175.58	6.09E+09		86
A2RKI8	50S ribosomal protein L10	6	6	2	53.8	53.8	16.4	18.115	0	323.31	7.71E+09		86
A2RKI9	50S ribosomal protein L7/L12	7	7	4	74.4	74.4	38.8	12.374	0	265.78	5.05E+10		149
A0A5D4G9E8	Triosephosphate isomerase	6	6	6	48.8	48.8	48.8	26.905	0	323.31	1.04E+10		79
A0A3B0GI45	50S ribosomal protein L27	3	3	3	39.4	39.4	39.4	10.033	0	63.525	1.73E+09		27
A0A5D4GC G2	50S ribosomal protein L21	3	3	3	29.8	29.8	29.8	11.423	0	10.589	1.73E+09		29
A0A5D4GB83	UPF0210 protein D8K17_004585	6	6	6	18	18	18	46.772	0	14.658	9.52E+08		28
A2RLS5	50S ribosomal protein L19	5	5	1	39.5	39.5	9.6	13.101	0	10.439	1.33E+09		39
A2RMI2	ATP synthase subunit beta	21	21	4	67	67	14.5	50.866	0	323.31	1.15E+10		179
A2RMI4	ATP synthase subunit alpha	10	10	6	24.2	24.2	15.8	54.309	0	124.27	5.76E+09		92
A2RMN0	Peptidase T	10	10	10	39.7	39.7	39.7	45.945	0	99.778	1.93E+09		41



A0A5D4GL86	Elongation factor Tu	26	26	18	74.4	74.4	55.7	43.211	0	323.31	6.66E+10	409
A0A5D4GM38	30S ribosomal protein S15	5	5	5	53.9	53.9	53.9	10.343	0	70.755	1.55E+09	25
A2RN40	S-adenosylmethionine synthase	10	10	10	29.6	29.6	29.6	42.973	0	37.468	2.81E+09	53
A2RNF3	50S ribosomal protein L1	8	8	2	42.8	42.8	9.6	23.949	0	51.873	3.14E+09	48
A2RNF4	50S ribosomal protein L11	5	5	3	44.7	44.7	33.3	14.689	0	71.35	1.08E+10	73
A0A5D4FYM6	50S ribosomal protein L17	4	4	3	36.5	36.5	26.2	14.255	0	323.31	2.67E+09	22
A0A5P3IK36	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	8	8	7	32.4	32.4	29.5	34.194	0	310.3	1.33E+09	35
A0A5D4FU11	50S ribosomal protein L36	2	2	1	44.7	44.7	26.3	4.421	0.002674	4.4775	1.31E+09	13
A2RNN2	Adenylate kinase	8	8	8	55.8	55.8	55.8	23.675	0	261.9	3.09E+09	57
A0A5D4FTN7	50S ribosomal protein L15	9	9	9	50.3	50.3	50.3	15.376	0	271.64	3.02E+09	28
A0A5D4FVW4	50S ribosomal protein L30	2	2	2	47.5	47.5	47.5	6.193	0	52.949	1.7E+09	24
A2RNN6	30S ribosomal protein S5	10	10	5	66.1	66.1	47	17.582	0	323.31	1.4E+10	164
A0A5D4FSE2	50S ribosomal protein L18	4	4	4	44.3	44.3	44.3	12.39	0	323.31	2.22E+09	25

A2RNN8	50S ribosomal protein L6	8	8	2	59	59	19.1	19.284	0	243.19	4.79E+09	68
A0A5D4FT R5	30S ribosomal protein S8	5	5	4	38.6	38.6	29.5	14.685	0	226.19	1.34E+10	56
A0A5D4FS B2	50S ribosomal protein L5	7	7	6	48.3	48.3	43.9	20.006	0	53.975	6.55E+09	60
A0A5D4FT E8	50S ribosomal protein L24	2	2	2	36.6	36.6	36.6	10.877	0	52.208	4.4E+09	22
A0A5D4FT P6	50S ribosomal protein L14	5	5	3	34.4	34.4	21.3	12.922	0	81.233	5.12E+09	49
A0A5D4FY Q0	50S ribosomal protein L29	2	2	2	33.3	33.3	33.3	7.859	0	84.627	3.75E+09	24
A2RNP9	30S ribosomal protein S3	10	10	10	49.3	49.3	49.3	24.017	0	323.31	4.1E+09	71
A0A5D4FT S7	50S ribosomal protein L22	5	5	5	54.8	54.8	54.8	12.469	0	120.83	5.19E+09	65
A0A5D4FU 30	30S ribosomal protein S19	5	5	2	55.4	55.4	34.8	10.57	0	32.422	3.19E+09	55
A2RNQ4	50S ribosomal protein L4	7	7	1	40.9	40.9	6.2	22.363	0	67.447	3.01E+09	50
A2RNQ5	50S ribosomal protein L3	5	5	5	37.2	37.2	37.2	21.918	0	271.86	3.83E+09	49
A0A5D4FV Y4	30S ribosomal protein S10	7	7	7	52.9	52.9	52.9	11.742	0	44.192	4.94E+09	55
A2RNU9	Elongation factor Ts	13	13	5	52	52	20.8	36.739	0	323.31	7.89E+09	69

A0A5D4GT02	30S ribosomal protein S2	13	13	11	62.4	62.4	54.1	28.538	0	233.16	9.27E+09	93
A0A5P3IHS8	Glucose-6-phosphate isomerase	14	14	12	48.9	48.9	44.4	49.594	0	278.15	4.38E+09	69
A2RNZ4	30S ribosomal protein S6	6	6	6	76.3	76.3	76.3	11.307	0	308.44	5.61E+09	52
A0A5D4G1M3	30S ribosomal protein S9	3	2	2	22.3	16.9	16.9	14.098	0.002457	3.2081	1.04E+09	20
A0A5D4G6G3	Elongation factor G	23	23	18	50.1	50.1	39.4	77.955	0	255.07	6.19E+09	93
A0A5D4G3E6	30S ribosomal protein S7	9	9	7	65.2	65.2	50.3	17.683	0	127.08	1.9E+09	24
O32808	Phosphopentomutase	5	5	5	17.3	17.3	17.3	45.817	0	18.035	6.89E+08	24
O68186	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	4	4	3	19.1	19.1	15	36.291	0	35.42	7.26E+08	22
G1FKZ3	Oligopeptide transporter F	8	8	8	35.1	35.1	35.1	35.985	0	29.973	4.62E+08	25
P0A3J1	Chaperone protein DnaK	26	26	15	62.9	62.9	34.4	64.947	0	323.31	8.21E+10	507
A0A5P3IFA7	Superoxide dismutase	6	6	6	51.5	51.5	51.5	23.254	0	57.66	2.03E+09	31
P22865	Secreted 45 kDa protein	10	10	10	29.9	29.9	29.9	47.363	0	161.18	2.94E+09	50
A0A5D4GAB8	Protein GrpE	5	5	5	24.6	24.6	24.6	20.581	0	13.424	1.77E+09	25

V8LW71	DNA-binding protein HU	4	4	4	56	56	56	9.605	0	125.4 9	2.03E +09	44
A2RKA4	L-lactate dehydrogenase	11	11	11	45.8	45.8	45.8	35.05	0	323.3 1	1.33E +10	95
G6ENJ3	50S ribosomal protein L18	2	2	2	29.7	29.7	29.7	12.938	0	56.35 2	5.85E +08	20
V8LQD2	30S ribosomal protein S5	9	5	2	57.3	43.9	14.6	17.051	0	187.0 6	2.99E +09	44
V8LS51	50S ribosomal protein L1	5	3	3	27.9	20.1	20.1	24.478	0	63.79 5	9.14E +08	18
F8LVU1	50S ribosomal protein L7/L12	6	6	6	62.3	62.3	62.3	12.36	0	107.8	8.12E +09	55
A0A0M3RS Y3	50S ribosomal protein L10	9	9	9	64.1	64.1	64.1	17.463	0	136.5 4	1.52E +09	42
V8LZ43	Triosephosphate isomerase	7	7	7	50	50	50	26.629	0	93.80 8	1.51E +09	37
V8LYG7	Elongation factor Tu	20	13	13	61.8	45.2	45.2	43.866	0	194.1 8	6.22E +09	63
V8LYX4	Ribosome-recycling factor	2	2	2	11.4	11.4	11.4	20.561	0.002336	2.72	2.27E +08	13
V8M045	Chaperonin GroEL	29	29	26	76.3	76.3	68.1	56.922	0	323.3 1	2.84E +10	264
V8M071	Co-chaperonin GroES	5	5	5	69.5	69.5	69.5	9.912	0	135.2 9	9.96E +09	88
V8LYZ9	Chaperone protein DnaK	21	14	8	47.9	29.8	18.5	64.795	0	62.93 7	2.92E +09	50

V8LYX9	30S ribosomal protein S9	3	3	2	25.4	25.4	20	14.239	0	24.97 3	2.38E +09	22
G6ENI9	50S ribosomal protein L5	8	8	5	62.2	62.2	45.6	19.829	0	55.45 7	7.61E +08	26
G6EPV7	Phosphoglycerate kinase	19	13	12	64.4	42.1	39.8	42.217	0	132.3 9	4.48E +09	53
Q60009	L-lactate dehydrogenase	10	10	10	43	43	43	35.428	0	65.85 6	1.59E +09	34
Q9AEP7	Chaperonin GroEL	28	26	25	69.7	63.3	63.3	57.196	0	323.3 1	1.7E+ 10	195
Q9AEP8	Co-chaperonin GroES	5	5	5	62.8	62.8	62.8	10.199	0	80.49 5	2.67E +09	36
A2RMN2	Inorganic diphosphatase	4	4	4	25.5	25.5	25.5	34.099	0	323.3 1	3.15E +09	41
A0A5D4GJ P1	GMP synthase [glutamine- hydrolyzing]	8	8	7	22	22	20.1	56.78	0	20.39 2	7.98E +08	36
A0A5P3IE D8	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	4	4	4	28.1	28.1	28.1	22.082	0	56.03 3	1.35E +09	33
A0A5D4G7 X8	Trigger factor	13	13	3	51.3	51.3	14.3	46.93	0	247.6 9	7.84E +09	97
A2RIK5	DNA-binding protein HU	4	4	4	51.6	51.6	51.6	9.676	0	33.22 4	4.03E +10	125
A2RHJ8	Phosphoenolpyruvate- protein phosphotransferase	18	18	15	45.6	45.6	38.3	62.576	0	323.3 1	3.97E +09	72
V8LVQ0	Phosphocarrier protein HPr	4	3	3	39.1	39.1	39.1	8.919	0	233.4	3.73E +09	50

G6ELL6	Multidrug resistance ABC transporter ATP-binding and permease protein	1	1	1	5.3	5.3	5.3	15.032	0.002294	2.651	6.22E+09	28
F8LVH8	Glutamate dehydrogenase	14	14	14	39.1	39.1	39.1	48.297	0	139.9	2.13E+09	42
A0A223DQK9	Universal stress protein UspA	7	7	7	58.6	58.6	58.6	15.907	0	28.199	2.05E+09	63
A0A5P3IHS4	6-phospho-beta-galactosidase	10	10	10	27.4	27.4	27.4	54.046	0	24.332	2.37E+09	43
A0A223DQM6	Tagatose 1,6-diphosphate aldolase	17	17	17	61.7	61.7	61.7	36.492	0	323.31	3.63E+10	244
A0A223DQN3	Galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB	6	6	2	43.9	43.9	21.6	18.926	0	163.86	2.93E+10	127
A0A5P3IJV3	Neutral endopeptidase	17	17	17	41.5	41.5	41.5	71.527	0	177.08	4.6E+09	62
A0A223DQP4	Tagatose-6-phosphate kinase	9	9	9	56.5	56.5	56.5	33.249	0	156.68	2.35E+09	42
G1FL22	Galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA	8	8	8	64.5	64.5	64.5	15.25	0	323.31	2.92E+10	164
A0A223DQQ2	PTS lactose transporter subunit IIA	2	2	2	34.3	34.3	34.3	11.489	0	147.68	3.28E+09	46
A0A5P3IL65	Oligopeptide ABC transporter, periplasmic oligopeptide-binding protein OppA	22	22	7	44	44	20.3	65.653	0	89.87	7.03E+09	101
A0A3G6JKM7	ATP-dependent Clp protease ATP-binding	25	25	25	48.4	48.4	48.4	77.198	0	213.59	5.14E+09	87

	subunit												
A0A5D4FTW3	50S ribosomal subunit assembly factor BipA	11	11	5	22.5	22.5	11.1	68.257	0	35.716	2.07E+09	38	
A0A5D4G041	50S ribosomal protein L13	8	8	5	75.7	75.7	53.4	16.195	0	114.36	6.38E+09	65	
Q9CHA0	30S ribosomal protein S1	20	20	20	60.8	60.8	60.8	44.709	0	323.31	1.9E+10	135	
Q9CIL2	Oligopeptide ABC transporter substrate binding protein	6	6	6	14.1	14.1	14.1	59.697	0	20.365	2.4E+09	26	
A0A5D4G8T4	Phosphoglycerate kinase	22	22	3	77.6	77.6	11.3	42.066	0	323.31	5.55E+10	313	
A0A5D4GAW6	Fe-S_biosyn domain-containing protein	4	2	2	51.2	26.4	26.4	13.564	0.0033	8.1599	4.65E+08	14	
Q9CEK4	Usp domain-containing protein	7	7	7	64.8	64.8	64.8	15.7	0	141	1.64E+09	34	
A0A5D4GJT9	Peptide deformylase	6	6	6	32.7	32.7	32.7	23.769	0	25.034	1.28E+09	35	
A0A5D4GKL1	Thioredoxin	3	3	3	55.8	55.8	55.8	11.672	0	227.51	1.08E+09	18	
Q9CEH2	Cell division protein FtsZ	12	12	11	37.9	37.9	34.5	43.988	0	323.31	4.78E+09	74	
Q9CDI4	Usp domain-containing protein	5	5	5	45.5	45.5	45.5	15.983	0	142.72	1.99E+09	47	
A2RN44	DUF4097 domain-containing protein	5	5	5	11.9	11.9	11.9	40.904	0	12.495	1.12E+09	29	

Q9CED4	Fructose-bisphosphate aldolase	13	13	11	45.6	45.6	42.3	31.989	0	323.3 1	5.8E+ 10	239
Q9CGA7	Citrate lyase alpha chain	17	17	15	44.7	44.7	40	55.44	0	323.3 1	5.79E +09	106
A0A5P3IGF1	NADP-dependent malic enzyme	14	14	14	61.1	61.1	61.1	40.475	0	72.79 2	1.45E +09	40
Q9CIY6	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	21	21	18	63.7	63.7	57.8	52.826	0	173.7 3	5.94E +09	110
Q9CDH4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	17	1	1	72	5.1	5.1	35.819	0	64.17 2	1.36E +09	32
A2RHJ7	Phosphocarrier protein HPr	5	5	1	81.8	81.8	43.2	9.126	0	154.6 7	2.02E +10	133
A2RHP9	Major cold shock protein	4	4	2	69.2	69.2	29.2	7.138	0	81.97 9	5.67E +09	24
A2RJ82	PTS system mannose-specific EIIAB component	8	8	7	27.1	27.1	21.3	35.063	0	58.00 3	1.32E +09	30
A2RJC4	Proline dipeptidase	8	8	7	37.8	37.8	35.1	39.959	0	117.1 6	1.31E +09	38
A2RJC5	Catabolite control protein A	7	7	7	31	31	31	36.684	0	97.56 7	8.59E +08	21
A2RJD2	Adenylosuccinate lyase	10	10	10	31.6	31.6	31.6	49.735	0	45.56 1	9.36E +08	31
A2RJW0	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	9	9	9	45.8	45.8	45.8	27.505	0	31.42 1	2.57E +09	46
A2RK97	UTP--glucose-1-phosphate	9	9	9	31.6	31.6	31.6	35.002	0	96.40	1.83E	36



	uridylyltransferase									5	+09	
A2RKA3	Pyruvate kinase	26	26	5	76.1	76.1	17.3	54.285	0	323.3 1	7.42E +10	455
A2RL77	Alpha-acetolactate decarboxylase	4	4	4	40.3	40.3	40.3	24.848	0	110.3 9	1.79E +09	21
A2RLC5	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	10	10	10	27.6	27.6	27.6	65.827	0	41.00 1	1.02E +09	34
A2RMS6	Uncharacterized protein	8	8	8	25.2	25.2	25.2	39.713	0	74.25 2	1.38E +09	33
A2RNG5	Acetate kinase	6	6	6	22	22	22	43.144	0	26.61 6	8.79E +08	18
A2RNH4	Glucokinase	5	5	2	19.8	19.8	8	33.756	0	12.27 1	5.73E +08	24
A2RNH7	Non-heme iron-binding ferritin	8	8	2	66.9	66.9	22.3	16.595	0	323.3 1	6.34E +09	68
A2RNQ3	50S ribosomal protein L23	8	8	8	66	66	66	10.801	0	323.3 1	3.49E +09	57
A2RP03	Glutamine synthetase	14	14	2	40.1	40.1	9	49.742	0	95.62	2.49E +09	62
A2RP55	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	18	18	2	74.1	74.1	7.1	35.819	0	323.3 1	1.7E+ 11	460
G6EMX0	Pyruvate kinase	15	11	11	44.8	35.4	35.4	54.51	0	323.3 1	4.78E +09	79
Q5M2E1	Fructose-bisphosphate	11	9	2	54.6	51.2	17.1	31.554	0	323.3	1.06E	87

	aldolase									1	+10	
Q5M2M7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	18	16	16	79.1	74.2	74.2	37.194	0	323.3 1	1.42E +10	124
Q6BHS8	DEHA2G16082p	1	1	1	6	6	6	17.367	0	69.68 5	6E+0 9	33
Q6BLL0	DNA-directed DNA polymerase	1	1	1	0.5	0.5	0.5	153.45	0.003322	8.186 2	2.74E +11	781
Q6BSW7	DEHA2D05412g	6	6	6	16.8	16.8	16.8	41.670	0	143.7 4	3.29E +09	31
Q9CGA8	Citrate lyase subunit beta	8	8	8	35.5	35.5	35.5	33.307	0	74.90 9	1.73E +10	58
Q8VVB4	Enolase	21	16	16	65.9	50.7	50.7	47.007	0	230.0 5	9.84E +09	120

## ÖZGEÇMİŞ

Sena AKSOY lise eğitimini Vakıfbank Zübeyde Hanım Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde 2019 yılında tamamladı. Yüksek lisans eğitimini Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı'nda "Kütle Spektrometrisi Temelli Proteomik Yaklaşımlar Kullanılarak Kefirin Detaylı Karakterizasyonu" adlı tezini tamamlayarak mezun oldu.