

**KEFİRİN FERMANTASYONU VE DEPOLANMASI
SÜREÇLERİNDE SÜT PROTEİN N-GLİKANLARI VE
SERBEST SÜT OLİGOSAKKARİTLERİ
PROFİLLERİNDEKİ DEĞİŞİMİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF CHANGES IN MILK PROTEIN N-
GLYCAN AND FREE MILK OLIGOSACCHARIDE
PROFILES DURING KEFIR FERMENTATION AND
STORAGE PROCESSES**

BUSE AKLAR

PROF. DR BEKİR SALİH

Tez Danışmanı

DR. ÖĞRETİM ÜYESİ HACI MEHMET KAYILI

Eş Danışman

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

ÖZET

KEFİRİN FERMANTASYONU VE DEPOLANMASI SÜREÇLERİNDE SÜT PROTEİN N-GLİKANLARI VE SERBEST SÜT OLİGOSAKKARİTLERİ PROFİLLERİNDEKİ DEĞİŞİMİN İNCELENMESİ

Buse AKLAR

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir SALİH

Eş Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Hacı Mehmet KAYILI

Mayıs 2022, 86 sayfa

Kefir, kökeni Kafkas dağlarına dayanan kadim bir besin kaynağıdır. Kefir, çoğunlukla kefir mikroorganizmalarının inek sütü kullanılarak fermentasyonu ile üretilir. Kefirin insan sağlığına faydalarını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Kefir üretimi sırasında sütün önemli bileşenlerinde meydana gelen değişiklikler net olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada, kefirin fermentasyonu ve depolanması süreçlerinde süt glikoproteinleri *N*-glikanlarının ve sütte bulunan serbest süt oligosakkaritlerin süreç içerisindeki değişimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kefirin fermentasyonu ve depolanması sırasında belirlenen her bir süre için *N*-glikanlar süt glikoproteinlerinden enzimatik bir süreçle ekstrakte edilmiş ve MALDI-MS ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde sütte bulunan serbest süt oligosakkaritler de kefirin fermentasyonu ve depolanması süreçlerinde örneklerden ekstrakte edilmiş ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Toplamda 57 adet *N*-glikan ve 19 serbest süt oligosakkariti analizlerde karakterize edilmiş ve süreç

içerisindeki değişimleri belirlenmiştir. İstatiksel analizler sonucunda 7 farklı *N*-glikan türünde H5N4, H8N2, H5N4F1, H4N5F1, H3N6F1, H9N2, H4N5S1F1 ve 2 farklı oligosakkarit tipinde (laktoz-, -Hex2 ve trioz-, -Hex3) süreç içerisinde anlamlı değişikliklerin olduğunu göstermiştir ($p<0.05$). Bu çalışmanın kefir üzerine yapılacak kliniksel ve mekanistik çalışmaların detaylı değerlendirilmesine yardımcı olması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kefir, N-Glikan, Serbest Süt Oligosakkaritleri, Kütle Spektrometrisi.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF CHANGES IN MILK PROTEIN N-GLYCAN AND FREE MILK OLIGOSACCHARIDE PROFILES DURING KEFIR FERMENTATION AND STORAGE PROCESSES

Buse AKLAR

Master of Science, Department of CHEMISTRY

Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH

Co- Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hacı Mehmet KAYILI

May 2022, 86 sayfa

Kefir is an ancient food source based on the Caucasus mountains. Kefir is mainly produced by fermentation of kefir microorganisms using cow's milk. There are many studies showing the benefits of kefir to human health. The changes that occur in important components of milk during kefir production are not clearly known. In this study, it was aimed to examine the differences of *N*-glycans found in milk glycoproteins and free milk oligosaccharides in the process during the fermentation and storage of kefir. For this purpose, *N*-glycans were extracted from milk glycoproteins by an enzymatic process for each period during the fermentation and storage of kefir and their analyzes were performed by MALDI-MS. Similarly, free milk oligosaccharides in milk were also extracted from samples during fermentation and storage of kefir and analyzed. In total, 57 *N*-

glycans and 19 free milk oligosaccharides were characterized in the analysis, and their changes in the process were determined. Statistical analyzes showed that there were significant changes in 7 different *N*-glycan types H5N4, H8N2, H5N4F1, H4N5F1, H3N6F1, H9N2, H4N5S1F1, and two different oligosaccharide types (lactose, Hex2, and triose, Hex3) during the process ($p < 0.05$). This study is expected to assist in the detailed evaluation of clinical and mechanistic studies on kefir.

Keywords: Kefir, N-Glycan, Free Milk Oligosaccharides, Mass Spectrometry.

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitim hayatım boyunca desteğini üzerimden eksik etmeyen, engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yoluma ışık tutan ve her zaman bana güven veren, kendisi ile çalışmaktan gurur ve onur duyduğum çok saygıdeğer hocam Prof. Dr. Bekir SALİH'e sabrı, içtenliği ve bana karşı olan güveni için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmalarım için bana her türlü desteği veren, yardımları ve bana öğrettikleri için değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Hacı Mehmet KAYILI'ya sabrı, samimiyeti, ilgi ve alakası için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans yapmak için beni cesaretlendiren, umutsuzluğa kapıldığımda beni ayağa kaldıran, dertlerime ortak olan, fikirlerine ve önerilerine önem verdiğim çok sevgili hocalarım Dr. Öğretim Üyesi Mehmet ATAKEY ve Dr. Ülkü Güler'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım için bana yardımcı olan İzzet Avcı'ya ve aynı çalışma ortamını paylaştığımız SAREG grubunun üyeleri olan sevgili çalışma arkadaşlarıma bana vermiş oldukları destek ve yardımları için teşekkür ederim.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 219Z217). Destekleri için TÜBİTAK'a teşekkür ederiz. Ayrıca lisans üstü eğitimim boyunca bursiyer olarak bana finansal destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Kimya'ya olan ilgimin ve yeteneğimin ortaya çıkmasında büyük payı olan, lise hocam Ali ÇETİNER'e üzerimdeki emekleri için minnettarım.

Beni yetiştiren, her koşulda yanımda olan ve bugünlere gelmemde çok emek sarf eden canım aileme tüm emekleri için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kefirin Tarihçesi	3
2.1.1. Kefir Tanesi ve Kefirin Kimyasal Yapısı	3
2.1.2. Kefir Üretimi.....	7
2.1.3. Kefirin Sağlık Üzerine Etkileri	9
2.2. Post Translasyonel Modifikasyonlar	11
2.3. Glikozilasyon	12
2.4. Glikomik ve Önemi	17
2.5 Süt Serbest Oligosakkaritleri ve Önemi.....	17
2.6 Kütle Spektrometrisi	18
2.6.1 Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma-Kütle Spektrometrisi (MALDI-MS).....	20
2.6.2. Kütle Spektrometrik Glikan Analizleri İçin Örnek Hazırlama Yöntemleri	21
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	23
3.1. Kullanılan Kimyasallar	23
3.2. Kefir Üretimi	23

3.3. Kefirden Toplam Protein Ekstraksiyonu (Kloroform/Metanol Ekstraksiyon Yöntemi İle)	24
3.4. Süt Proteinlerinden <i>N</i> -glikanların Salınması	24
3.5. <i>N</i> -glikanların 2-Aminobenzoik asit (2-AA) ile Etiketlenmesi	24
3.6. 2-AA ile Etiketlenmiş <i>N</i> -glikanların Selüloz ve Gözenekli Grafitize Karbon Malzemeleri İçeren Katı Faz Ekstraksiyon Kartuşları ile Saflaştırılmaları 25	
3.7. Serbest Süt Oligosakkaritlerinin Kefir Örneklerinden Ekstraksiyonu.....	25
3.8. MALDI-TOF/TOF-MS Analizleri	26
3.9. MALDI-TOF/TOF-MS Veri Analizleri.....	27
3.10. İstatiksel Analizler	27
4.1. Süt Proteinleri <i>N</i> -Glikanlarının MALDI-MS ile Karakterizasyonları.....	28
4.2. Kefirin Fermantasyonu ve Depolanması Süreçlerinde Süt Protein <i>N</i> - glikanlarındaki Değişimin İncelenmesi	32
4.3. Serbest Süt Oligosakkaritlerinin MALDI-MS ile Karakterizasyonları	35
4.4. Kefirin Fermantasyonu ve Depolanması Süreçlerinde Süt Serbest Oligosakkarit Profillerindeki Değişimin İncelenmesi.....	38
6. KAYNAKLAR.....	42
EKLER	48
EK 1 –İstatiksel analizlerde anlamlı değişiklik gösterdiği belirlenen <i>N</i> - glikanlara ait sonuçlar (çiğ süt kontrol grubu olarak belirlenmiştir).....	48
Ek-2.İstatiksel analizlerde anlamlı değişiklik gösterdiği belirlenen <i>N</i> -glikanlara ait sonuçlar (0. saat kontrol grubu olarak belirlenmiştir).....	54
EK 3 –İstatiksel analizlerde anlamlı değişiklik gösterdiği belirlenen serbest süt oligosakkaritlerine ait sonuçlar (çiğ süt kontrol grubu olarak belirlenmiştir).	56
EK 4 –İstatiksel analizlerde anlamlı değişiklik gösterdiği belirlenen serbest süt oligosakkaritlerine ait sonuçlar (0. saat süt kontrol grubu olarak belirlenmiştir).	57
EK 5 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	58
EK 6 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu	59
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Kefir tanelerinin morfolojisi (A) ve mikroskop yapısı (B). Kefir tanesinin dış tabakası (a); kefir tanesinin iç tabakası (b) [13].	4
Şekil 2.2.	Kefiranın kimyasal yapısı [14].	6
Şekil 2.3.	Geleneksel kefir üretim basamakları [10].	7
Şekil 2.4.	Endüstriyel kefir üretim basamakları [10].	8
Şekil 2.5.	Bazı post translasyonel modifikasyon türlerinin şematik gösterimi.	12
Şekil 2.6.	<i>N</i> - ve <i>O</i> - bağlı glikozilasyon birimlerinin şematik gösterimi.	14
Şekil 2.7.	Sırasıyla yüksek mannozlu, kompleks ve hibrit <i>N</i> -glikan yapılarının şematik gösterimi.	16
Şekil 2.8.	Kütle spektrometrisinin temel bileşenleri.	18
Şekil 2.9.	MALDI-TOF/MS çalışma prensibinin şematik gösterimi [65].	21
Şekil 4.1.	Bir kefir örneğinden izole edilen 2-AA ile etiketlenmiş <i>N</i> -glikanların MALDI-MS analizi. İntensite değeri yüksek olan <i>N</i> -glikanlar şekilsel olarak gösterilmiştir.	29
Şekil 4.2.	Hex3HexNAc5dHex1 glikanına ait MS/MS spektrumu.	29
Şekil 4.3.	Hex4HexNAc3dHex1 glikanına ait MS/MS spektrumu.	30
Şekil 4.4.	<i>N</i> -glikanların periyotlar arasındaki değişimini gösteren ısı haritası grafiği.	33
Şekil 4.5.	Kefirin fermantasyonu ve depolanması süreçlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gösteren <i>N</i> -glikanlardaki miktarsal değişim.	34
Şekil 4.6.	Sütte bulunan serbest süt oligosakkaritlerine ait MALDI-MS spektrumu.	35
Şekil 4.7.	Hex2 oligosakkaritine ait MS/MS spektrumu.	36
Şekil 4.8.	Hex2NeuAc1 oligosakkaritine ait MS/MS spektrumu.	36
Şekil 4.9.	Serbest süt oligosakkaritlerinin periyotlar arasındaki değişimini gösteren ısı haritası grafiği.	38
Şekil 4.10.	Laktoz (Hex2) ve Trioz (Hex3) serbest süt oligosakkaritlerinin kefirin fermantasyonu ve depolanması süreçlerindeki değişim.	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Kefirin kimyasal bileşimi ve besin değerleri [6, 11].	5
Çizelge 2.2.	Monosakkaritlerin kısaltmaları ve kimyasal yapı/sembol gösterimi.	15
Çizelge 3.1.	Belirlenen zaman aralıkları.	23
Çizelge 4.1.	MALDI-MS analizleri sonucunda tespit edilen <i>N</i> -glikanlar.	30
Çizelge 4.2.	MALDI-MS analizleri sonucunda tespit edilen serbest süt oligosakkaritleri. Tüm iyonlar $[M + Na]$ şeklindedir.	37



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

m	Kütle
z	Yük sayısı
mg	Miligram
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
mM	Milimolar
kV	Kilovolt

Kısaltmalar

AAB	Asetik Asit Bakterileri
ACN	Asetonitril
Asn	Asparajin
Da	Dalton
DHB	2,5-Dihidroksi Benzoik Asit
ER	Endoplazmik Retikulum
ESI	Elektrosprey İyonlaştırma
Fuc	Fukoz
Gal	Galaktoz
GalNAc	<i>N</i> -Asetil Galaktozamin
Glc	Glikoz
GlcNAc	<i>N</i> -Asetil Glikozamin
GlcNAcT	<i>N</i> -Asetil Glikozamin Transferans

Hex	Heksoz
LAB	Laktik Asit Bakterileri
Man	Mannoz
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma
MS	Kütle Spektrometrisi
NeuAc	<i>N</i> -Asetil Nöraminik Asit
PNGase F	<i>N</i> -Glikozidaz F
PTM	Post Translasyonel Modifikasyon
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Ser	Serin
TFA	Trifloroasetik Asit
Thr	Threonin
TOF	Uçuş Zamanlı

1. GİRİŞ

Kefir; inek, koyun, keçi ve manda sütüne, karnabahar/mısır patlağı benzeri ve beyaz-fildişi renkteki kefir tanelerinin eklenmesiyle elde edilen, hafif asidik bir karaktere sahip olan fermente bir süt ürünüdür. Eski çağlarda şifa amaçlı tüketilen kefir ilk olarak Kafkas Dağları'nda üretilmiştir ve buradan dünyaya yayılmıştır. ABD, Japonya, Orta ve Kuzey Avrupa'da ise birçok hastalığı kontrol altına almak amacıyla kefiri, besleyici ve tedavi amaçlı tüketmişlerdir. Günümüzde ise kefir; antimutajenik, antikarsinojenik, sindirim sistemini düzenleme, laktoz intoleransında iyileşme ve bağışıklık sisteminin uyarılması gibi özellikleri nedeniyle son yıllarda sağlık amaçlı tüketimi artan fermente süt ürünlerinden birisidir. Yapılan birçok çalışma, kefirin sağlığa olan faydalarını kanıtlamıştır. Her geçen gün bu çalışmalara bir yenisı eklenmekte ve kefirin yeni özellikleri belirlenmektedir. Kefirin bu önemli özelliklerinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmalar olsa da halen süreç içerisindeki değişimler tam anlamıyla aydınlatılabılmış değildir. Bu nedenle, bu süreçte gizli kalan her noktanın belirlenmesi kefirin sağlığa olan etkilerinin daha iyi anlaşılması açısından önemlidir. Literatürde kefirin fermantasyonu ve depolanması süreçlerinde kullanılan sığır sütündeki değişimleri irdelleyen çalışma sayısı yok denecek kadar azdır.

İnek sütü içeriğinde birçok bileşeni barındırmaktadır. Bu bileşenler arasında proteinler ve serbest süt oligosakkaritleri önemli bir yer tutar. Süt proteinleri birçok açıdan eşsiz özellik göstermektedir. Özellikle süt proteinlerindeki protein sentezinde translasyon basamağından sonra gerçekleşen ve post-translasyonel modifikasyon olarak adlandırılan değişimler süt proteinlerinin işlevlerini yerine getirmesinde anahtar rol oynamaktadır. Süt proteinlerinde en sık görülen modifikasyon olan glikozilasyon süt proteinlerin kararlılığına etki etmektedir. Proteinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmektedir ve onlara doğal formlarının gösteremeyeceği farklı özellikler katmaktadır. Süt proteinleri, birçok önemli işlevde aktif rol alırlar. Özellikle bağışıklık sistemine katkıda bulunurlar. Kefirin üretimi esnasında süte proteazların salındığı yapılan peptidomik

Çalışmalardan belirlenmiştir. Ayrıca, şüt bileşimindeki farklı türlere etki eden enzimler de bilinmektedir. Bu nedenle kefir üretiminde ştn bileşenlerine etki edebilecek birçok mekanizma bulunmaktadır. Bu etkilerin incelenmesi sayesinde bu bileşenlerdeki değişimin gözlemlenmesi, kefirin kullanılmasınn avantajları hakkında ve kefirin üretim mekanizması hakkında bilgi verebilir. Bu nedenle bu tez kapsamında, kefirin fermentasyonu ve depolanması süreçlerinde kullanılan sığır ştnn temel bileşenlerindeki değişimlerin güçlü biyoanalitik yöntemler ve ileri kütle spektrometrik teknikler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır. Kütle spektrometresi yüksek kütle ayırıcılığına, hassasiyetine ve doğruluğuna sahip bir sistemdir. Yumuşak iyonlaştırma teknikleri ile birlikte kullanımı sayesinde uygulama alanı çok genişlemiştir.

Bu tez kapsamında, kefirin fermentasyonu ve depolanması süreçlerinde şt protein *N*-glikanlarının ve serbest şt oligosakkaritlerinin süreç içerisindeki değişimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. *N*-glikanlara ait değişimi incelemek amacıyla öncelikle belirlenen her bir süre için (iğ şt, 0. saat, 6. saat, 12. saat, 18. saat, 24. saat, 1. gün, 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 28. gün) kloroform/metanol ekstraksiyon yöntemi ile örneklerden protein ekstraksiyonu gerçekleştirilip daha sonra şt proteinlerinden *N*-glikanları saflaştırmak amacıyla PNGase F enzimi ile enzimatik deglikozilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra *N*-glikanlar 2-Aminobenzoik asit (2AA) ile etiketlenmiş ve sonrasında 2-AA etiketli *N*-glikanların saflaştırılmaları selüloz ve gözenekli grafitize karbon malzemeleri içeren katı faz ekstraksiyon kartuşları ile gerçekleştirilmiştir. Analizler MALDI-TOF/TOF-MS sistemi kullanılarak negatif iyonlaşma modunda gerçekleştirilmiştir. Serbest şt oligosakkaritlerindeki değişimi incelemek için kefir örneklerinden ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Gözenekli grafitize karbon katı faz kartuşları ile saflaştırıldıktan sonra analizleri MALDI-TOF/TOF-MS ile gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kefirin Tarihçesi

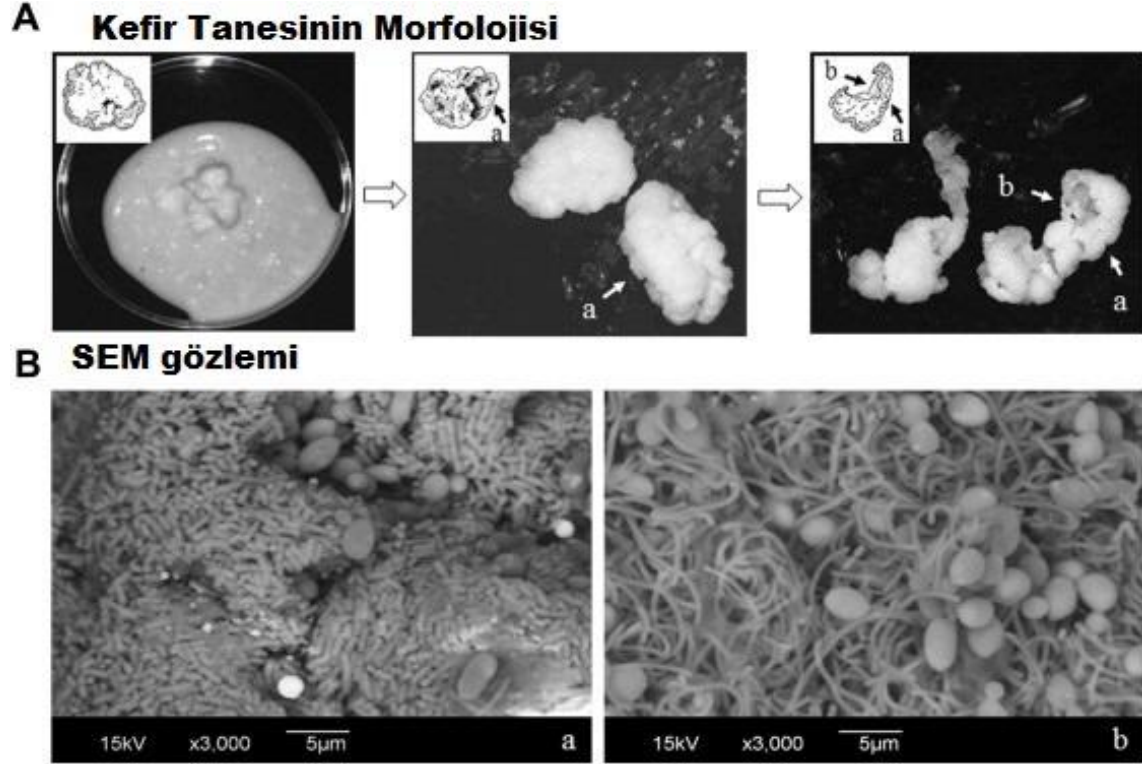
Kefir, fermente bir süt ürünü olup tadı hafif ekşidir. Alkollü ve gazlı olan bu içeceğin orijini Kafkas Dağları'na dayanmaktadır. En eski probiyotik gıdalardan biri olan kefirin kullanımı M.Ö. 2000'li yıllara kadar dayanmaktadır [1-4]. Türkçe kökenli bir kelime olan kefir, “keyf” kelimesinden türetilmiştir ve “keyif veren”, “hoşa giden” anlamlarına gelmektedir. Çok eski çağlardan beri şifa amaçlı tüketildiği bilinen kefirin, ilk kez Kuzey Kafkasya'da yaşayan çobanlar tarafından üretildiği ve yapımının saklı tutulduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [5-7]. Çobanların, dağlarda gezerken yanlarında taşıdıkları deri tulumlardaki sütün mayalandığını keşfettikleri ve daha sonra bu sütün içerisine kefir taneleri ekleyerek bilinçli bir şekilde kefir yapmaya başladıkları söylenmektedir. 20. yüzyılın başlarında Irina Sakharova adında bir Rus kadının, Kafkas bir prensten kefir taneleri almasıyla, Rusya'da kefir yapılmaya başlandığı ve buradan da Avrupa'ya yayıldığı bildirilmektedir [5].

Amerika Birleşik Devletleri, Japonya, İngiltere, Finlandiya, İsveç, Norveç, Almanya, Polonya ve Macaristan gibi ülkelerde kefir üretimi ve tüketimi gittikçe artmış olup [8], günümüzde ise insanlar; sindirim sistemini düzenleme, kolesterolü düşürme, laktoz intoleransında iyileşme ve kan şekerini düzenleme gibi daha pek çok faydalı etkileri olması sebebiyle kefiri diyet listelerine dahil etmektedirler.

2.1.1. Kefir Tanesi ve Kefirin Kimyasal Yapısı

Kefir kültürü, kefir granülü gibi isimlerle de bilinen kefir danesi/tanesi; sarımtırak/beyaz-fildişi renktedir. Görünüş olarak karnabakar çiçeğine benzeyen kefir danesi şekilsiz, yuvarlak uçlu, jelatinimsi, yarı sert yapıda olup granül boyutları genel olarak 0,3 – 3,5 cm arasında değişkenlik göstermektedir [9-12]. Koçak C. ve Gürsel A. 1981 yılındaki yayınında kefir danesinin elde edilmesini: “Kefir taneleri, Kafkasya'da keçi tulumu içinde, inek sütünün dana ve koyun şirdenleri ile

pihtılaştırılması sonucunda elde edilir. Pihtılaştırmanın yapıldığı tulumun iç yüzeyinde birkaç hafta sonra süngerimsi bir kabuk tabakası oluşur. Bu kabuk tabakası alınır ve bölünerek kurutulur. Kurutma sonucunda oluşan küçük topaklar kefir daneleridir” şeklinde açıklamışlardır [12].



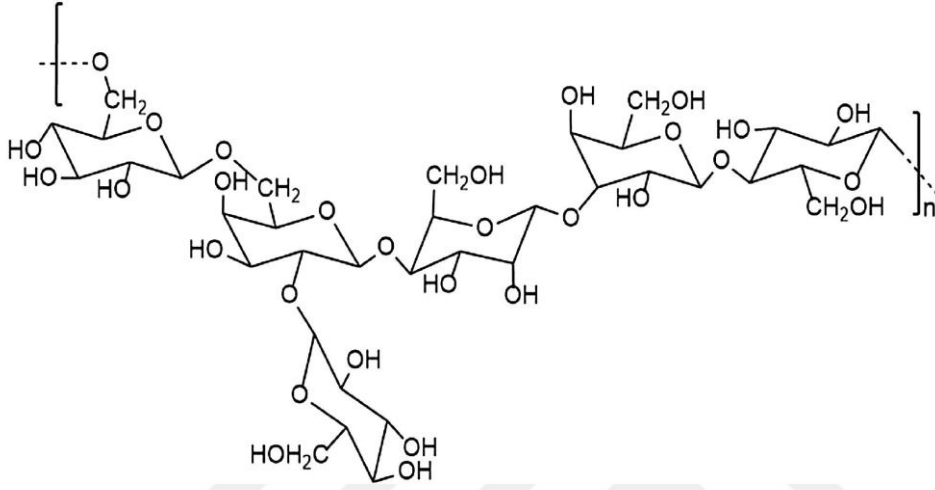
Şekil 2.1. Kefir tanelerinin morfolojisi (A) ve mikroskop yapısı (B). Kefir tanesinin dış tabakası (a); kefir tanesinin iç tabakası (b) [13].

Kefir taneleri, %4 lipid, %12 kül, %46 kefiran olarak adlandırılan mukopolisakkarit, %34 toplam protein içermektedir. İçeriğinde ayrıca B ve K vitaminleri, triptofan, kalsiyum, fosfor ve magnezyum bulunmaktadır [14, 15]. Kefirin besinsel bileşimi, kullanılan sütün türünden (inek, keçi, koyun, manda vb.), fermantasyon süresinden ve sıcaklığından ve depolama/saklama süreçlerinden etkilenir. Genel olarak kefirin yapısında bulunan diğer kimyasal bileşenler ve besin değerleri Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Kefirin kimyasal bileşimi ve besin değerleri [6, 11].

Bileşen	Miktar(100g)	Bileşen	Miktar(100g)
Enerji	65kcal	Esansiyel Amino Asitler (g)	
Yağ(%)	3,5	Triptofan	0,05
Protein	3,3	Fenilalanin+Tirozin	0,35
Laktoz(%)	4	Lösin	0,34
Su	87,5	İsolösin	0,21
Süt Asidi (g)	0,8	Treonin	0,17
Etil Alkol (g)	0,9	Metionin+Sistin	0,12
Laktik Asit (g)	1	Lisin	0,27
Kolesterol (mg)	13	Valin	0,22
Fosfatidler (mg)	40		
Vitaminler (mg)		İz Elementler	
A	0,06	Demir (mg)	0,05
Karoten	0,02	Manganez (µg)	5
B ₁	0,04	Çinko (mg)	0,36
B ₂	0,17	Bakır (µg)	12
B ₆	0,05	Molibden (µg)	5,5
B ₁₂	0,5		
Niasin	0,09		
C	1		
D	0,08		
E	0,11		
Mineraller (g)		Aromatik Bileşenler	
Kalsiyum	0,12	Asetaldehit	
Fosfor	0,1	Diastil	
Magnezyum	12	Aseton	
Potasyum	0,15		
Sodyum	0,05		
Klorit	0,1		

Kefiran, eşit miktarda glikoz ve galaktoz monomerleri ile kefir tanelerini oluşturan ana polisakkarittir [16]. Kefiran, kefir tanelerinde bulunan mikroorganizmalar arasındaki bağlantıyı sağlar. Kefiranın kimyasal yapısı, bir veya iki şeker kalıntısının rastgele eklendiği düzenli bir pentasakkarit biriminden oluşan dallı bir hekza- veya heptasakkarit tekrarlayan birimlerden oluşur (Şekil 2.2) [17].



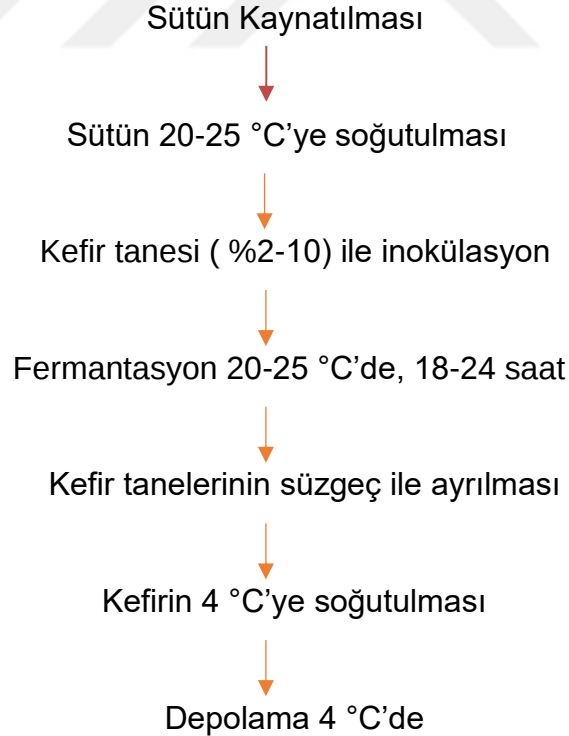
Şekil 2.2. Kefiranın kimyasal yapısı [14].

Kefir taneleri, laktik asit bakterileri (LAB), asetik asit bakterileri (AAB), mayalar ve mantarlar gibi mikrobiyal türlerin simbiyotik bir şekilde bulunduğu karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu mikrobiyal türler homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri ve laktozu fermente edebilen ve laktozu fermente edemeyen mayalar olmak üzere dört gruba ayrılır [18, 19]. Laktozu fermente edemeyen mayalar kefir tanesinin iç kısmında bulunurken laktozu fermente edebilen bakteriler yüzeye yakın bölgelerde bulunurlar [11]. Kefir tanelerindeki homofermentatif laktobasillerin ana fonksiyonu, laktozun fermantasyonu ve laktik asit üretimi iken, heterofermentatif laktobasillerin fonksiyonu, etanol ve karbondioksit (CO₂) üretimidir. CO₂, anaerobik bir ortam yaratarak, mevcut moleküler oksijenin yerini alır ve laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitesine katkıda bulunur [20]. Kefirden izole edilen bazı LAB'ler şunlardır:

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefir*. Kefir tanelerinden izole edilen mayalar arasında ise *Kluyveromyces marxianus*, *Torula kefir*, *Saccharomyces exiguus* ve *Candida lambica* bulunur [21]. Kefirin mikrobiyal içeriği de kefirin besinsel bileşimi gibi kullanılan sütün türü (inek, koyun, manda, keçi vb.), depolama/saklama koşulları, fermentasyon süresi ve sıcaklığına göre değişim göstermektedir [22].

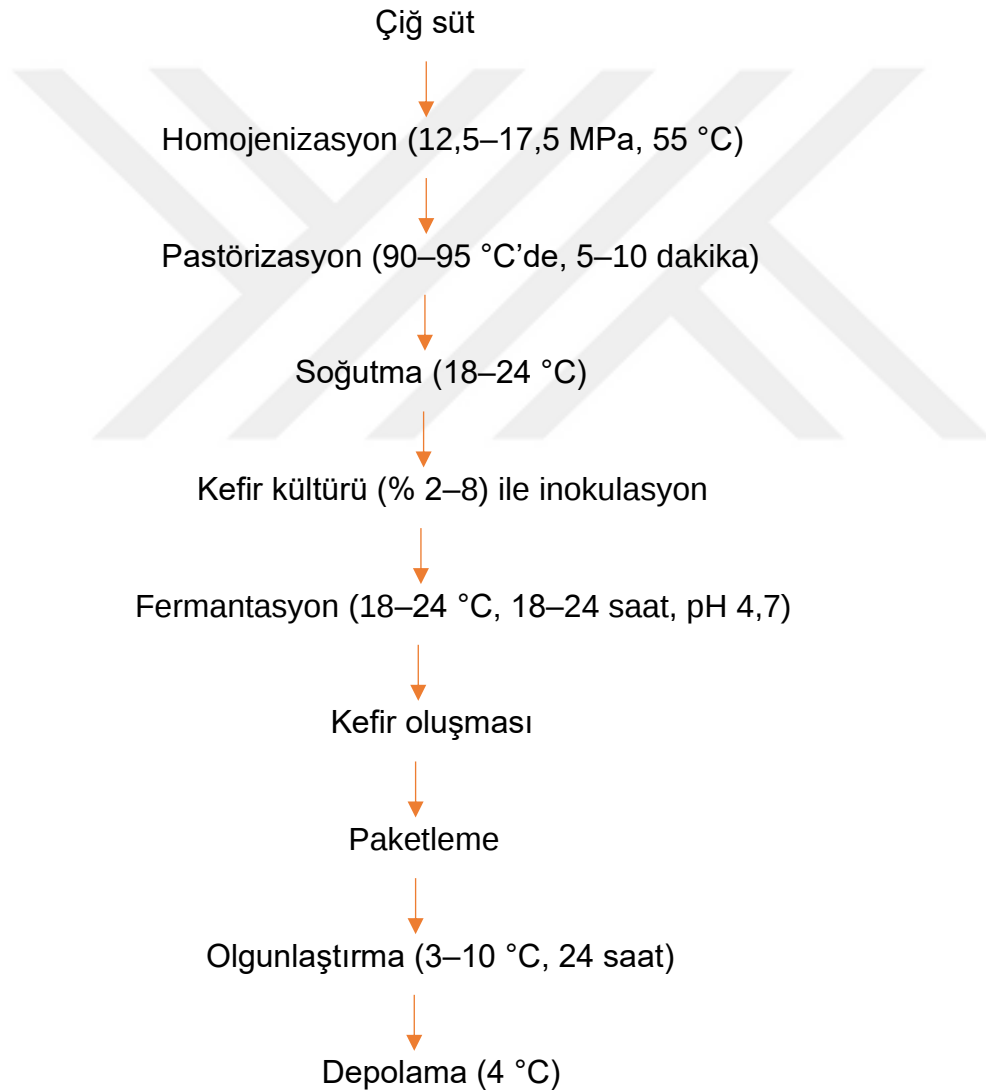
2.1.2. Kefir Üretimi

Kefir üretimi için literatürde birçok metot bulunmaktadır. Bu metotlardan en çok kullanılan yöntemlerden biri geleneksel kefir üretimi bir diğeri ise ticari/endüstriyel kefir üretimidir. Her iki yöntemde de kefir üretiminin bazı aşamaları birbirleriyle benzerlik göstermektedir.



Şekil 2.3. Geleneksel kefir üretim basamakları [10].

Endüstriyel kefir daha çok Rus stili kefirin pastörize süte %2-3 oranında aşılması ve ardından kuluçka ve olgunlaşmaya tabi tutulmasıdır. Her geçiş, kefirin mikrobiyal bileşiminde bir değişikliğe ve içeceğin kalitesinde bir düşüşe neden olur. Rus stili kefir ise geleneksel kefir ürününün alınması, tanelerinin ayıklanması ve pastörize süte %1-3 konsantrasyonunda aşılması ve ardından kuluçka ve olgunlaşmaya tabi tutulmasıyla yapılır [23]. Endüstriyel kefir üretim aşamaları Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Endüstriyel kefir üretim basamakları [10].

2.1.3. Kefirin Sağlık Üzerine Etkileri

Probiyotiklerin kullanımı yüzyıllardan beri insanlık tarafından bilinmekte olup günümüzde çeşitli gıda ürünlerine odaklanan araştırmalarla insan sağlığına olan faydalarının arayışı artmaktadır [24]. Bu amaçla araştırmacılar, fermente süt ürünlerinden elde edilen probiyotiklere artan bir ilgi duymaktadır. Fermente süttten elde edilen biyoaktif bileşenler ve probiyotikler, diğer gıdalardan elde edilen diğer nutrasötik bileşenlere kıyasla nispeten daha güvenli kabul edilir. Kültüre edilmiş fermente süt, kefir, yoğurt, lahana turşusu ve kültür sütü gibi gıda ürünleri probiyotik özelliklerinden dolayı uzun süredir kullanılmaktadır. Bunlardan 21. yüzyılın yoğurdu olarak adlandırılan kefir, benzersiz ve karmaşık probiyotik özellikleri nedeniyle gıda alanında araştırma yapan bilim insanlarının ilgisini büyük ölçüde çekmiştir [25].

Yapılan çalışmalarda kefirin aşağıda sıralanan önemli özellikleri tespit edilmiştir.

Güzel-Seydim ve arkadaşları (2006) farklı kimyasal mutajenler kullanılarak yaptıkları bir çalışmada kefir, yoğurt ve süütün antimutajenik aktiviteleri test etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda yoğurt ve kefirin antimutajenik etkilerinin fermente edilmemiş süte göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir [26] [27].

Laktoz sindirimini ve toleransını iyileştirmek için yoğurt gibi fermente süt gıdalarının kullanımı uzun yıllardır tavsiye edilmektedir. Steven R. Hertzler ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışmada kefirin laktoz sindirim bozukluğu olan erişkinlerde laktoz sindirimini ve toleransını iyileştirip iyileştirmediğini belirlemişlerdir ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yaygın olarak bulunan bir kefir markasının, laktoz sindirimini iyileştirmek için yoğurda bir alternatif olarak kullanılabileceğini söylemişlerdir. [28]

Antioksidan aktiviteler, bağışıklık sistemini güçlendirmek gibi insan sağlığı için birçok faydalı fonksiyonla ilişkilidir. Zhina Chen ve arkadaşları (2015) yaptıkları

Çalışmada Tibet kefir taneleri tarafından süt fermentasyonu sırasında sentezlenen ekzopolisakkaritin kimyasal ve fiziksel özelliklerini ve antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Kefir taneleri ile fermente edilen sütün içerisinde biriken ekzopolisakkaritin yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir [29]. Yapılan bir başka araştırmada ise tay sütü kullanılarak üretilen kefirde izole edilen ve ekzopolisakkarit üreten suşların antioksidan aktivite gösterdikleri ve ekzopolisakkaritin ortamdaki uzaklaştırılması ile antioksidan aktivitenin azaldığı bildirilmiştir [30].

Birçok alışma, LAB tarafından üretilen fermente süt ürünlerinin hem hayvanlarda hem de insan modellerinde bağışıklık tepkilerini iyileştirme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Kefirde LAB içeren probiyotik mikroorganizmalar, bağışıklık sisteminin uyarılmasında ve ayrıca ishalin tedavisinde faydalı etkilere sahiptir [31].

Mee-Young Lee ve arkadaşlarının (2007) yaptığı araştırmada bronşiyal astım modeli kullanarak, kefirin astımlı fareler üzerindeki anti-alerjik ve anti-inflamatuar etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak kefirin alerjik inflamasyonu baskıladığını ve kefirin alerjik hava yolu inflamasyonu olan hastalarda tedavi olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir [32].

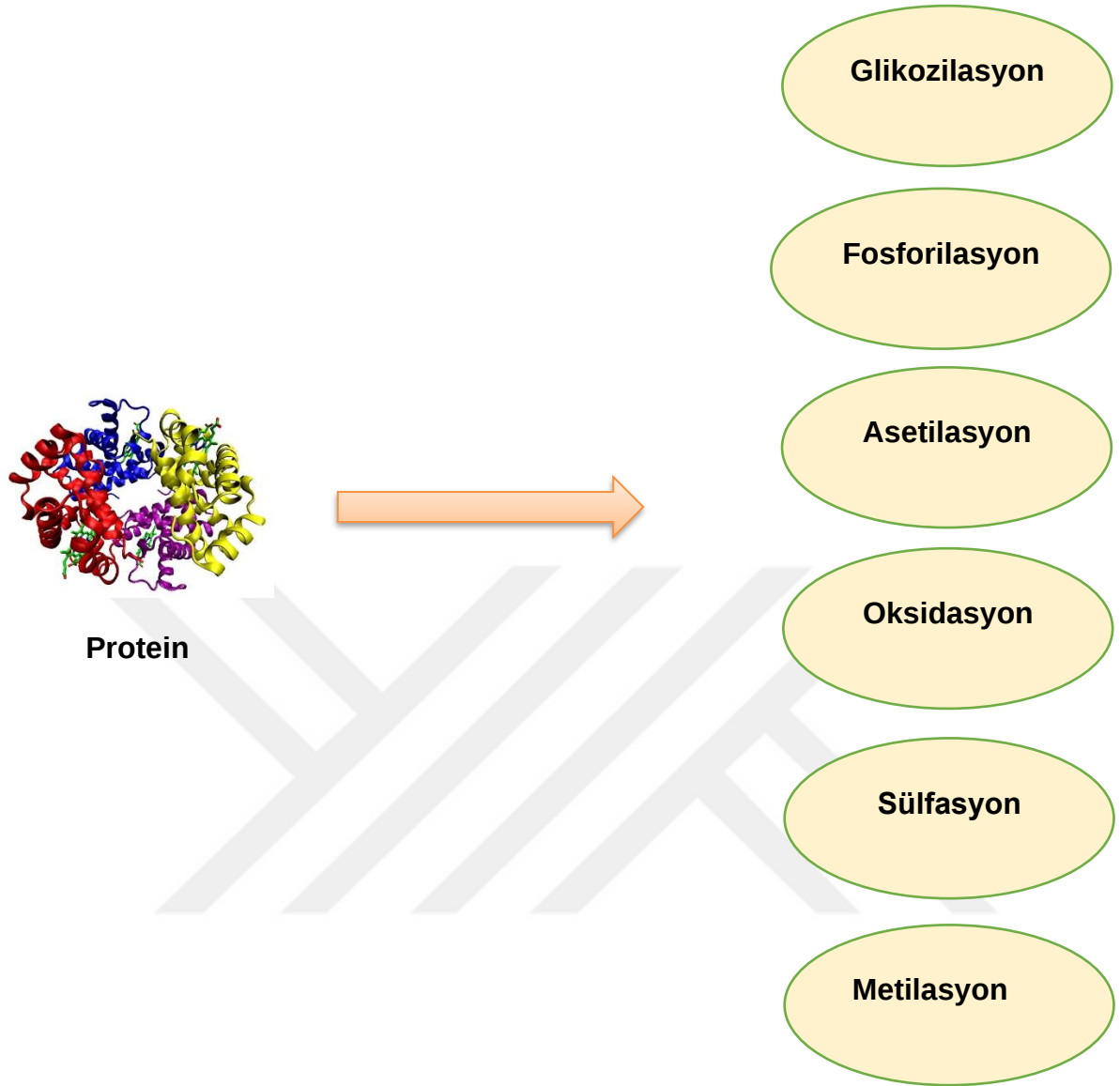
Kefir protein, kalsiyum, vitamin açısından zengindir. Birçok alışma kefir tüketmenin faydalarını araştırmıştır ve düzenli tüketildiğinde bağırsak rahatsızlıklarını gidermeye, bağırsak hareketini artırmaya, şişkinliği azaltmaya ve sindirim sisteminin genel sağlığını iyileştirmeye yardımcı olabilecek doğal bir probiyotik olduğu gösterilmiştir [33].

Ulusal Kefir Derneği'ne göre hamile ve emziren kadınlar kefir tüketebilir. Kefir, besinlerin emilimini destekler, bağışıklığı artırır, vücudun hormonal değişikliklere adapte olmasına yardımcı olur ve aşırı maya büyümesi gibi enfeksiyonları önler.

Ayrıca hamile kadınların kefir tüketmesi, B grubu Beta Streptokok adı verilen bir bakterinin aşırı üremesini önleyebilir [34].

2.2. Post Translasyonel Modifikasyonlar

Hücrelerde, hücresel büyümeyi, üremeyi ve hayatta kalmayı yöneten çok sayıda birbiriyle ilişkili dinamik moleküler süreç gerçekleşir. Post translasyonel modifikasyonlar (PTM'ler) bir hücrenin biyolojik düzenlenmesinde önemli roller üstlenir. PTM'ler genellikle mRNA'lardan translasyondan sonra oluşan proteinlerin enzimatik, kovalent kimyasal modifikasyonlarıdır. Proteinlerin kimyasal modifikasyonları oldukça önemlidir çünkü bir proteinin fiziksel veya kimyasal özelliklerini, aktivitesini, yapısını, hücresel konumunu veya stabilitesini potansiyel olarak değiştirirler. PTM'ler, substrata özgü enzimler tarafından katalizlenirler. Translasyon sonrası modifikasyonlar, amino asit yan zincirlerinde veya proteinin C- veya N-terminallerinde meydana gelebilir. Mevcut bir fonksiyonel grubu değiştirerek veya fosfat gibi yeni bir grup ekleyerek 20 standart amino asidin kimyasal repertuarını genişletebilirler. Bazı PTM'ler, protein fonksiyonunu tersine çevrilebilir şekilde kontrol etmek için dinamik olarak eklenebilir ve çıkarılabilir. 400'den fazla spesifik protein modifikasyonu tanımlanmıştır ve bu sayı her geçen gün artmaktadır [35-37]. Bu modifikasyonlar arasında yaygın olarak en çok bilinen PTM'ler glikozilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, metilasyon, sülfasyon, oksidasyon ve übikitinasyon olarak söylenebilir [35].



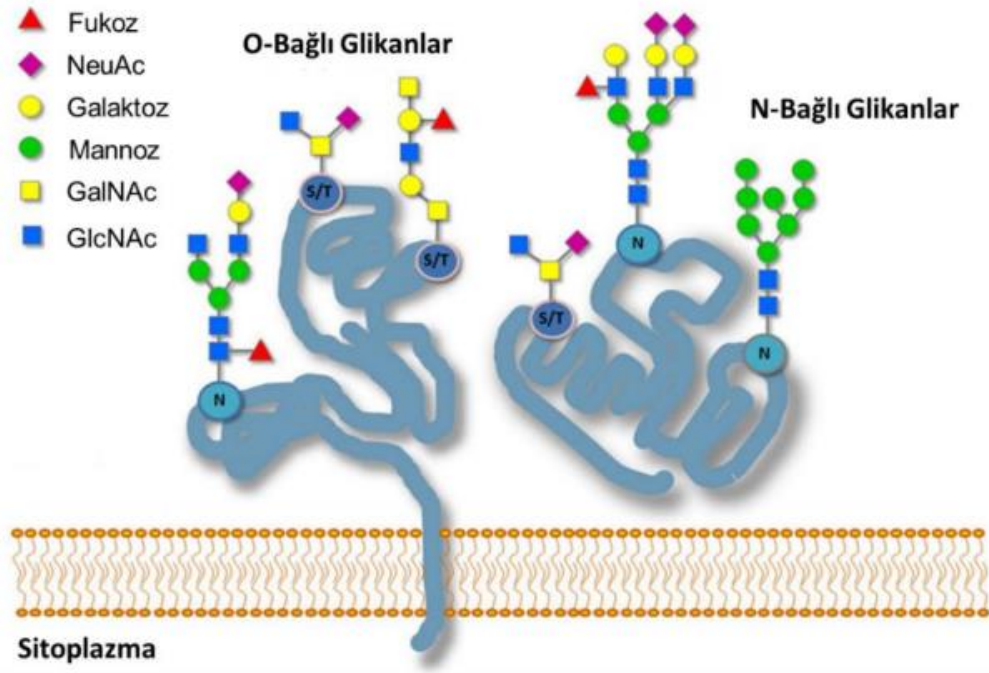
Şekil 2.5. Bazı post translasyonel modifikasyon türlerinin şematik gösterimi.

2.3. Glikozilasyon

Glikozilasyon, proteinlere diğer proteinler ve hücrelerle etkileşimleri için gerekli yapısal çeşitlilik sağlayan bir post translasyonel modifikasyondur [38]. Oligosakkaritlerin proteinlere bağlanarak glikoproteinleri oluşturması işlemine glikozilasyon denir. Glikozilasyon ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde ve salgılanan proteinlerde meydana gelir, ayrıca plazma proteinlerinin yaklaşık %50'si glikozilasyona uğramaktadır [39, 40]. Yapısında karbonhidrat grubu

bulunduran proteinlere glikoprotein; karbonhidrat gruplarının birbirine bağlanmasıyla oluşan formlara da glikan adı verilmektedir. Glikozilasyon, proteinin fonksiyonel aktivitesini değiştirerek glikoproteinlere, hücre uyarımı, hücre-hücre etkileşimi ve sinyal taşınımı gibi faaliyetlerde çeşitli fonksiyonlar kazandırmaktadır. Glikozilasyon sırasında meydana gelen mutasyonların tespiti çok önemlidir. Protein yapılarında normal olmayan bir şekilde meydana gelen glikozilasyonun, kanser, bağışıklık sistemi ve genetik hastalıklar üzerinde çok önemli etkileri olduğu tespit edilmiştir [41].

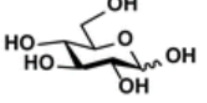
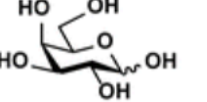
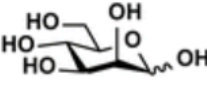
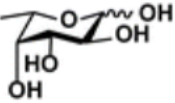
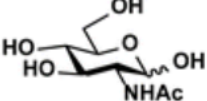
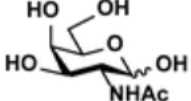
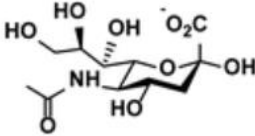
Protein glikozilasyonu, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtında bir seri enzimin katalizlemesiyle meydana gelmektedir. Ökaryotik glikanlar genellikle *N*-glikanlar ve *O*-glikanlar olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılırlar. İki monosakkariti birbirine bağlayan bağa glikozidik bağ denir [42]. Eğer karbonhidrat birimleri, asparajin amino asitinin yan zincirindeki amit azotuna *N*-glikozidik bağıyla bağlanıyorsa bu değişim *N*-bağlı glikozilasyon, serin veya treonin amino asitlerinin hidroksil gruplarına glikozidik (*O*-bağlı) olarak bağlanıyorsa da *O*-bağlı glikozilasyon olarak adlandırılır [41, 43].



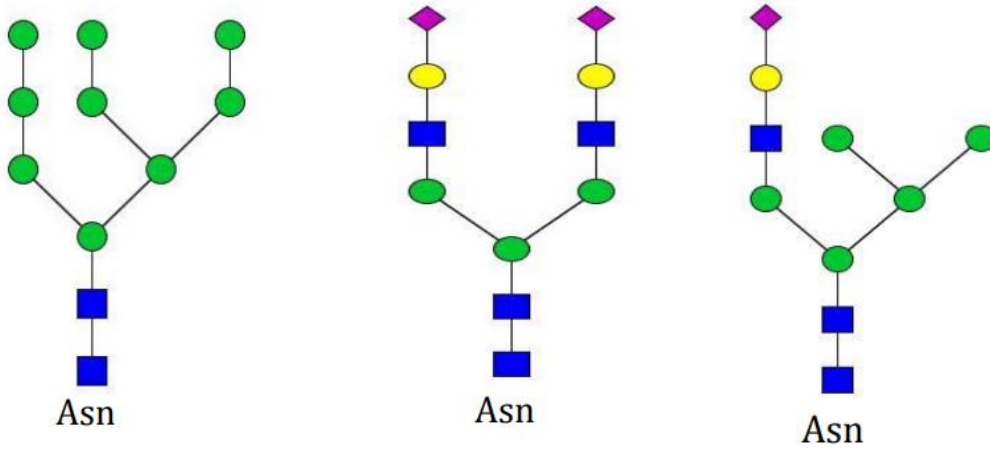
Şekil 2.6. N- ve O- bağılı glikozilasyon birimlerinin şematik gösterimi.

Glikoproteinlerin karbonhidrat kısımları, Şekil 2.6.'da gösterildiği gibi farklı şekil ve renkler ile ifade edilmektedir ve bu birimler başlıca 7 monosakkaritten oluşmaktadır. Bu monosakkaritlerin glikoprotein yapıları üzerindeki sıralanma ve bağlanma farklılıkları, protein yapılarına bağlı çok çeşitli oligosakkaritlerin proteinde oluşmasını sağlar. Bu durum, proteinin fiziksel ve kimyasal yapısında değişikliğe yol açarak farklı özellikler kazanmasına sebep olmaktadır. Glikoproteinlerde başlıca; glikoz, galaktoz, mannoz, fukoz, N-asetil glikozamin, N-asetil galaktozamin ve N-asetil nöraminik asit monosakkarit birimleri yer almaktadır (Çizelge 2.2). Glikoproteinlerin, beyin gelişimi, kanser metastazi, viral iltihap ve kalp ritim bozukluğu gibi fizyopatolojik plethorada önemli biyokimyasal etkilerinin olduğu belirlenmiştir [41].

Çizelge 2.2. Monosakkaritlerin kısaltmaları ve kimyasal yapı/sembol gösterimi.

Monosakkarit	Kısaltma	Kimyasal Yapı/Sembol
Glikoz	Glc	  Glc
Galaktoz	Gal	  Gal
Mannoz	Man	  Man
Fukoz	Fuc	  Fuc
N-asetil glikoz amin	GlcNAc	  GlcNAc
N-asetil galaktozamin	GalNAc	  GalNAc
N-asetil nöraminik asit	NeuAc	  Neu5Ac

En bol ve iyi tanımlanmış glikozilasyon türlerinden biri, yaklaşık %70 dolulukla Asn–X–Ser/Thr (X prolin olmamalıdır) konsensüs motifinde meydana gelen *N*-bağlı glikozilasyondur [44]. *N*-glikanlar, ortak bir pentasakkarit çekirdeğini paylaşan ve anten sayısındaki değişiklikler, terminal glikan kalıntıları ve çekirdek modifikasyonları nedeniyle önemli ölçüde mikro-heterojenlik sunan büyük kompleks ve dallı glikanlardır [45]. Tüm *N*-glikanlar, amino aside bağlandıkları bölgede üç mannoz ve iki *N*-asetil glikozaminden oluşan ortak bir çekirdek şeker dizisini paylaşırlar. Üç tipe ayrılırlar: birinci tip sadece mannoz kalıntılarına sahip olan oligomannoz veya yüksek mannoz adı verilen çekirdeğe tutunur, ikinci tip *N*-asetilglikozamintransferazların (GlcNAcT'ler) oluşturduğu antenleri içeren kompleks denilen çekirdeğe bağlanır ve çekirdeğin bir koluna sadece mannoz kalıntılarının bağlı olduğu üçüncü tip ve diğer mannoz kolunda hibrit adı verilen bir veya iki anten bulunur. *N*-glikozilasyon, memeli proteinlerinin en yaygın PTM'sidir ve katlanma, stabilite, çözünürlük ve hücre içi trafik gibi proteinin özelliklerini etkileyen çeşitli fonksiyonel rollere sahiptir [46] [47].



Şekil 2.7. Sırasıyla yüksek mannozlu, kompleks ve hibrit *N*-glikan yapılarının şematik gösterimi.

2.4. Glikomik ve Önemi

Glikozilasyon, hücre içerisinde enzimatik süreçlerle proteinlerin yapılarına glikan olarak adlandırılan yapıların bağlanmasıdır [48]. Bu bağlanma, bağlanma bölgesine ve bağlanılan amino aside göre iki farklı tipte olmaktadır. Glikan, bir glikoproteinde glikozilasyon bölgesinde bulunan oligosakkarit birimlerini ifade etmektedir. Birbirinden farklı 9 farklı monosakkarit birbirlerine glikozidik bağla bağlanarak glikan birimlerini oluşturmaktadır. Buradaki bağlanma çeşitliliği sayesinde oldukça farklı yapıda glikanlar bir glikozilasyon bölgesinde görülmektedir. Glikanlar hücre içerisinde gerçekleşen birçok faaliyette aktif rol alır [49]. Özellikle bir proteinin proteazlar tarafından korunmasında, immünolojik cevabın oluşturulmasında ve hücre-hücre, hücre-patojen gibi etkileşimlerin gerçekleştirilmesinde çok önemli işlevleri yürütürler [50]. Glikan birimlerinin bir örnek içerisindeki mikroheterojinitesinin tespiti, (glikozilasyon bölgesindeki glikan çeşitliliği) o örneğin glikomu olarak adlandırılır (burada süt glikomu) ve bahsedilen işlevlerin anlaşılması açısından önemlidir.

2.5 Süt Serbest Oligosakkaritleri ve Önemi

Süt bileşenleri içerisinde serbest oligosakkaritler (proteine bağlı olmayan yapılar) önemli bir yer tutar. Süt bileşiminde üçüncü en büyük bileşenidir [51]. Son zamanlarda, insan süt oligosakkaritleri, biyoaktif moleküller arasında yeni bir sınıfta tanımlanmıştır [52]. Özellikle insan sütü serbest oligosakkaritlerin çok önemli işlevleri bulunmaktadır. Bu tür işlevlere; prebiyotik aktivite, anti-patojenik etki, anti-adhezif aktivite, anti-enflamatuar özellikler, hücre yüzeyi glikanlarının modifikasyonu ve büyüme ile ilişkili özellikler verilebilir [51, 53, 54]. İnsan sütüyle kıyaslandığında sığır serbest süt oligosakkaritlerinin miktarı daha düşüktür [55]. Ayrıca sığır sütünde bulunan bazı monosakkaritler insan sütünde bulunmamaktadır (fukozlanmış oligosakkaritler sığır sütünde bulunmamaktadır).

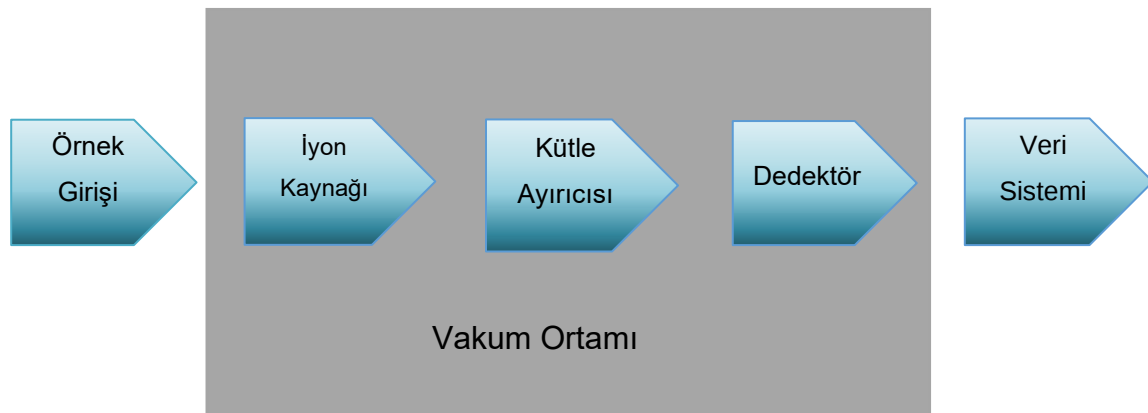
Siyalik asit içeren monosakkaritler sığır sütünde insan sütünden farklı olarak gözlemlenmektedir [56]. Her ne kadar insan sütünün sığır sütü ile kıyaslandığında karşılaştırılamayacak üstünlükleri bulunsu da anne sütüne erişiminin mümkün olmadığı durumlarda sığır sütü yeni doğanlar için iyi bir besin

kaynağıdır. Sığır sütünde bulunan serbest oligosakkaritler içerisinde siyalik asit içeren monosakkaritler yeni doğanların beyin gelişimine katkısı ve patojenlerin bağırsaklara bağlanmasını engelleyici özellikleri olduğu bildirilmiştir [57]. Ayrıca siyalik asit içeren oligosakkaritler, gıda ve ilaç endüstrisi için iyi bir katkı maddesidir [58].

2.6 Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrisi (MS), tüm analitik yöntemlerin yaygın kullanım alanına sahip, kuvvetli bir analitik yöntemdir. Maddelerin elementel bileşimlerinin belirlenmesinde; anorganik, organik ve biyolojik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında; karmaşık karışımların nitel ve nicel analizlerinde; katı yüzeylerinin yapılarının ve bileşimlerinin aydınlatılmasında; bir numunedeki atomların izotopik oranlarının bulunmasında oldukça yararlı bir yöntemdir. Günümüzde, kütle spektrometreleri, polipeptitlerin, proteinlerin ve diğer yüksek mol kütleli biyopolimerlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır.

Kütle spektrometrisinin temel prensibi, uygun herhangi bir yöntemle inorganik veya organik bileşiklerden iyonlar üretmek, bu iyonları kütle-yük oranlarına (m/z) göre ayırmak ve bunları ilgili m/z ve bolluklarına göre kalitatif ve kantitatif olarak tespit etmektir. Analit, spektrometre içerisinde uçucu hale getirilir ve ondan oluşan gaz fazı iyonları m/z oranlarına göre ayrılır ve genellikle elektriksel olarak tespit edilir.



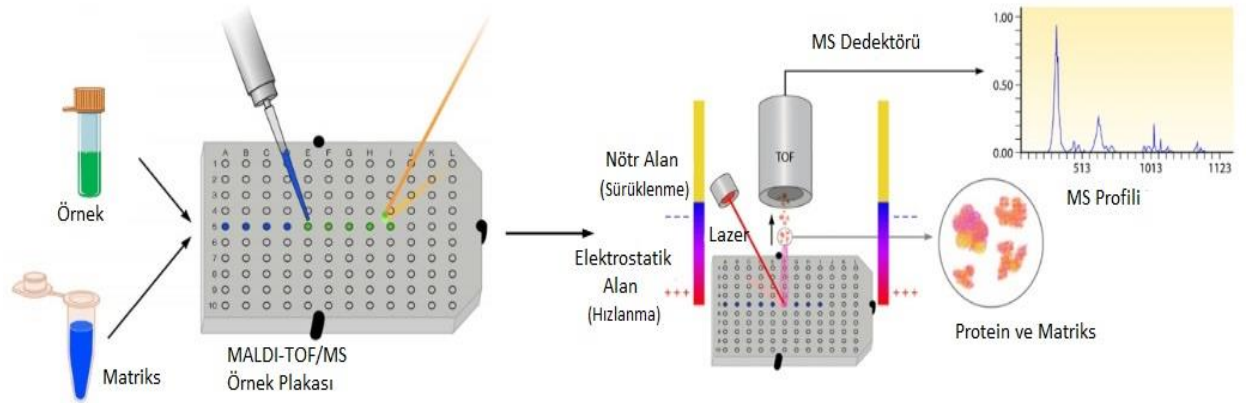
Şekil 2.8. Kütle spektrometrisinin temel bileşenleri.

Bir kütle spektrometresinde örnek girişi, iyonlaştırma kaynağı, kütle ayırıcısı, dedektör ve veri analiz sistemi bileşenleri yer almaktadır. Kütle spektrometresinde iyonlaştırma kaynağı, kütle ayırıcısı ve dedektörler yüksek vakum altında tutulmaktadır. Yüksek vakum ortamının sağladığı avantajlar arasında; viskoz (zor buharlaşan) bir örneğin, vakum sayesinde daha düşük sıcaklıkta kaynaması; ortamda hava molekülleri az olduğu için azot, oksijen gibi elementlerin girişimlerini engellemesi ve vakum sayesinde sistemdeki kirliliklerin giderilmesiyle saf spektrumların elde edilmesi sayılabilir. Kütle spektrometrik analizde ilk basamak, analitten gaz fazında iyonlar elde etmektir ve kütle spektrometrik analizin başarısı, bu iyonlaşma basamağına bağlıdır. Günümüzde kütle spektrometrik analiz için kullanılan birçok iyonizasyon kaynağı mevcuttur. Bu kaynaklar, gaz-faz ve desorpsiyon kaynakları olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Gaz-faz kaynaklarıyla, numune önce buharlaştırılır; daha sonra iyonlaştırılır. Desorpsiyon kaynakları ise, katı veya sıvı haldeki numuneyi direkt olarak gaz halde iyonlara dönüştürür. Desorpsiyon kaynaklı kütle spektrometrelerinin en önemli avantajlarından biri, termal olarak kararsız ve uçucu olmayan örneklere de uygulanabilmesidir. Desorpsiyon kaynakları içerisinde en bilindik olanı matriks yardımcı lazer desorpsiyon /iyonlaştırmadır (MALDI).

İyonlar farklı kütle/yük oranlarına sahiptirler ve bu iyonları ayırabilmek için kütle ayırıcıları kullanılır. Kütle ayırıcıları, küçük kütle farklarını ayırt edebilecek duyarlıkta olmalıdır. Ayrıca kütle ayırıcısı, kolayca ölçülebilir iyon akımları elde etmek için yeterli sayıda iyon geçişi sağlayabilmelidir. Kütle spektrometresinde kullanılan kütle ayırıcıları arasında uçuş zamanlı (time-of-flight, TOF), dört kutuplu (quadrupole, Q), iyon tuzağı (ion trap, IT), fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans (fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR) ve orbitrap yer almaktadır [59, 60].

2.6.1 Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma-Kütle Spektrometrisi (MALDI-MS)

MALDI, birkaç 100 kDa moleküler kütleye kadar büyük organik moleküllerin iyonlarını üreten bir yumuşak iyonlaştırma tekniğidir. Uçuş zamanlı (TOF) kütle ayırıcısı ile birlikte özellikle karışımlarda ve ham numunelerde peptitler, proteinler, oligosakaritler ve oligonükleotitler gibi biyopolimerlerin tespiti ve karakterizasyonu için tercih edilen bir tekniktir. MALDI-MS, tuzlar ve tamponlar gibi yaygın kirleticilere karşı oldukça toleranslıdır [61, 62]. Şu anda protein çalışmalarında yaygın olarak kullanılan iki iyonlaştırma tekniği, uçuş zamanlı kütle ayırıcısı ile kombinasyon halinde MALDI ve çeşitli kütle ayırıcıları ile kombinasyon halinde elektrosprey iyonlaştırmadır (ESI). MALDI-TOF-MS analizi, bir analitin (bir protein, peptit veya karışım) çözücüsü, uygun bir matriks çözücü ile kütle spektrometrik plaka üzerine uygulanmasıdır. Matriks, bir UV lazerinden gelen enerjinin çoğunu emebilen ve analitleri iyonize etmeye yardımcı olmak için bir proton kaynağı görevi görebilen bir bileşiktir. Kristalizasyondan sonra, matriks analit tabakası kısa bir lazer darbesi ile ısıtılır, bu da matriks ve analit moleküllerinin ve iyonlarının desorpsiyonu ile sonuçlanır [63]. Lazer enerjisi, ısıtılmış kristalin yapısal bozunmasına neden olur ve iyonların bir elektrik alanı tarafından özütlendiği bir parçacık bulutu oluşturur. Elektrik alanı boyunca ivmeyi takiben, iyonlar alan içermeyen bir yoldan sürüklenir ve sonunda dedektöre ulaşır. Şekil 2.9'da tüm süreç şematik olarak gösterilmiştir. İyonların ayrılması, iyonların tüpün sonunda bulunan dedektöre ulaşma zamanları farkı ile ölçülür. Ağırlıklı olarak tek yüklü, parçalanmamış iyonlar üretildiğinden, ana iyon kütleleri, karmaşık veri işlemeye gerek kalmadan elde edilen spektrumdan kolayca belirlenebilir [64]. TOF cihazlarının diğer kütle ayırıcısı tiplerine göre üstünlükleri vardır. Bunlar arasında, cihazın sağlamlığı, basitliği, iyon kaynağına erişim kolaylığı ve ayrılabilir iyon kütlelerinin hemen hemen sınırsız olması sayılabilir.



Şekil 2.9. MALDI-TOF/MS çalışma prensibinin şematik gösterimi [65].

2.6.2. Kütle Spektrometrik Glikan Analizleri İçin Örnek Hazırlama Yöntemleri

MALDI-TOF MS, son yirmi yılda peptit ve proteinlerin, polimerlerin, oligonükleotitlerin ve diğer uçucu olmayan, düşük moleküler kütleli bileşiklerin kesin moleküler kütle tayini için yaygın olarak kullanılmaktadır. MALDI, pikomol ve femtomol duyarlılığında moleküler ağırlık bilgisi elde etmenin hızlı ve basit bir yöntemidir. MALDI'nin, yüksek duyarlılığı ve 10^6 Daltona kadar tek yüklü moleküler iyonların belirlenmesine izin veren doğrusal TOF analizörünün teorik sınırsız m/z aralığı nedeniyle glikoproteinlerin ve yüksek kütleli proteinlerin tespiti için çok uygun olduğu bilinmektedir [66].

Glikoproteinlerin glikan zincirlerinin yapısal analizine yönelik protokoller genellikle ilk adım olarak karbonhidrat zincirlerinin protein omurgasından salınmasını içerir. N-glikanların salınımı için hem kimyasal hem de enzimatik yöntemler kullanılabilir. Bu kimyasal salım birkaç önemli dezavantaja sahiptir. İlk olarak, peptit bağları yok edildiğinden, proteinle ilgili bilgiler kaybolur. İkinci olarak, yeniden asetilasyon aşamasına ihtiyaç duyulur. Bu nedenlerle, genellikle bir enzim kullanılarak yumuşak koşullar altında glikan salınımının gerçekleştirilmesi arzu edilir. Birkaç enzim ticari olarak mevcuttur ve en popüler ikisi PNGase F ve endoglikozidaz H'dır (Endo H). PNGase F, bozulmamış glikan zincirini, kolaylıkla indirgeyici glikana dönüştürülen glikosilamin olarak ayırır. Birkaç istisna dışında hemen hemen tüm proteine N-bağlı karbonhidratları serbest bırakır [67]. Doğal

olarak salınan karbonhidratlar hidrofilik olduğundan ve nötr ile asidik arasında değiştiğinden, iyon baskılanmasını en aza indirmek için bunları MS'den önce asitliklerine göre ayırmak en iyisidir. MALDI, analit moleküllerinin 2,5-dihidroksibenzoik asit gibi bir organik matriks ile karıştırılmasını gerektirir. Karışımın küçük bir hacmi (1-2 μ L) metal bir hedef üzerinde kurutularak kristallerin oluşması sağlanır. Hedef, bir kütle spektrometresinin iyon kaynağına yerleştirilir. MALDI kullanımında tek yüklü iyonlar baskındır. MALDI MS, numune hazırlama avantajına ve tuzlara ve diğer kirleticilere nispeten yüksek toleransa sahiptir. Ancak asidik (sialillenmiş, sülfatlanmış veya fosforile edilmiş) doğal karbonhidratlar MALDI ile iyonlaştırma sırasında parçalanmaya uğrarlar. Permetilasyon, MALDI işlemi sırasında glikanları parçalanmaya karşı korur. Permetilasyon ve indirgeyici aminasyon, glikanların kütle spektral analizi için çok etkili türevlendirme araçlarıdır [68].

MALDI-MS'de glikanların iyon verimini iyileştirmenin en basit yolu, matriks moleküllerini değiştirmektir. Tipik durumlarda, 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB) matriksi, α -siyano-4-hidroksisinamik asit (CHCA) matriksinden ziyade glikanları iyonlaştırmak için daha uygundur. Glikanların iyon verimini arttırmak için çeşitli katı ve sıvı matriksler rapor edilmiştir. İyonlaşma verimliliğini artırmanın başka bir yolu da türevlendirmedir (etiketleme). Glikanların indirgeyici ucunun kimyasal etiketlemesi orijinal olarak ultraviyole (UV) veya floresan dedektörlerle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi için geliştirilmiştir. Etiketleme reaktiflerinin çoğu, ürünlerin hidrofobikliğini artıran aromatik yapılara sahiptir; bu nedenle, indirgeyici ucun etiketlenmesi, tipik olarak MALDI-MS'de iyonlaşma verimliliğini artırır [69]. Yaygın etiketler arasında 2- aminobenzamit (2-AB), 2-amino benzoik asit (2-AA) ve prokainamid bulunur. 2-AA etiketi bir negatif yüke sahip olmasından dolayı negatif mod MALDI analizlerinde asidik glikanların yanı sıra yüksüz glikanlara da negatif yük sağladığı için analizlerini kolaylaştırır [41, 70].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Dimetil sülfoksit (DMSO), sodyum dodesil sülfat, sodyum siyanoborhidrür, trifloro asetik asit (TFA), asetik asit, Sigma Aldirch (St. Louis, MO USA); asetonitril, Carlo Erba Reagents S.A.S (Paris, France); kloroform, metanol, Merck; PNGase F enzimi Promega firmasından satın alınmıştır. Bu tez çalışmasında tüm deneyler de-iyonize su sistemi (Güney Kore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Kefir Üretimi

219Z217 numaralı TÜBİTAK 1001 projesi ve bu tez kapsamında kefir üretimi aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır.

Kefir üretiminde ticari kefir kültürü eXact®Kefir1 (Chr. Hansen, Danimarka) kullanıldı. Bu kültürün mikro flora 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 dk. pastörizasyon işlemi gerçekleştirildi. Pastörize edilen sütler 24 °C' a soğutulduktan sonra, %2 kefir kültürü inokülasyonu gerçekleştirildi. İnokülasyon yapılan sütler 24 °C 'ta 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnokülasyonu tamamlanan kefir örnekleri 4°C 'ta depolandı. Üretim üç tekrarlı olarak yürütüldü. Aşağıdaki çizelgede belirtilen zaman aralıklarında inkübasyon ve depolanma süresi sonunda filtrasyonları yapılan kefir örnekleri -80°C'ta saklandı. Fermantasyon sürecinin takibi pH ölçümleri yapılarak değerlendirildi.

Çizelge 3.1. Belirlenen zaman aralıkları.

Fermantasyon Süreci (Saat)	Depolanma Süreci (Gün)
Çiğ Süt	
0 (Pastörizasyon sonrası, fermantasyon öncesi)	1
6	7

12	14
18	21
24	28

3.3. Kefirden Toplam Protein Ekstraksiyonu (Kloroform/Metanol Ekstraksiyon Yöntemi İle)

Belirlenen fermantasyon ve depolama periyodlarının her birinden 100 µL kefir, 100 µL kloroform, 300 µL deiyonize su ve 400 µL metanol 14.000 rfc'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda sıvı faz uzaklaştırıldı. Protein içeren peletin üzerine 400 µL metanol ilave edildi. Santrifüj sonunda sıvı faz uzaklaştırıldı ve pelet 45°C'ta speedVac konsantratör ile kurutuldu.

3.4. Süt Proteinlerinden *N*-glikanların Salınması

50 µL %1 SDS içinde çözünen ekstrakte edilmiş proteinlerin denatürasyon işlemi, örneklerin 90°C'ta 10 dakika inkübasyonu ile gerçekleştirildi. Sonrasında çözeltiye 25 µL %2 Igepal-CA630 ve 25 µL 5X PBS ilave edildi. Enzimatik deglikozilasyonun gerçekleşmesi için 1 U PNGase F enzimi ilave edildi ve örnekler 37°C'ta bir gece bekletildi.

3.5. *N*-glikanların 2-Aminobenzoik asit (2-AA) ile Etiketlenmesi

Glikoproteinlerden *N*-glikanlar uzaklaştırıldıktan sonra örnekler 2-Aminobenzoik asit ile etiketlendi. Bu işlem için ilk olarak 48 mg/mL konsantrasyonunda 2-AA (di-metil sulfoksit/asetik asit içerisinde, 10:3, v:v) ve 63 mg/mL (-DMSO içerisinde) sodyum siyanoborhidrür (-NaCNBH₃-) çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden sırasıyla 50 µL 2-AA ve 50 µL NaCNBH₃ alınarak glikan salınımı gerçekleştirilen kefir örneklerine ilave edildi. Etiketleme işlemi örneklerin 65°C'ta 2 saat inkübasyonu ile gerçekleştirildi.

3.6. 2-AA ile Etiketlenmiş *N*-glikanların Selüloz ve Gözenekli Grafitize Karbon Malzemeleri İçeren Katı Faz Ekstraksiyon Kartuşları ile Saflaştırılmaları

2-AA etiketli *N*-glikanlar ilk olarak selüloz içeren katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırılmıştır. Örnekler son hacimlerinde %85 ACN olacak şekilde %100 ACN'den ilave edilmiştir. Yaklaşık 20 mg selüloz katı faz ekstraksiyon kartuşlarına aktarıldı. Sonrasında kartuşlar ilk olarak 1 mL %100 su ile ve %85 ACN ile 2 kez yıkandı. Örnekler kartuşlara ilave edildi ve malzeme ile etkileşmesi için 5 dakika bekletildi. Sonrasında selüloz içeren kartuşlar 3 kez %1 TFA içeren %85'lik ACN ile ve %85 ACN çözeltileri ile yıkandı. Bu sayede fazla etiketin ve diğer kimyasalların uzaklaştırılması sağlanmış oldu. Bu işlem sonrasında 2-AA etiketli *N*-glikanların elüsyonu 0.75 mL su ile gerçekleştirildi. Örnekler 0.75 µL TFA ilave edildikten sonra gözenekli grafitize karbon ile saflaştırma işlemine geçildi.

Yaklaşık 20 mg içeren karbon malzeme kartuş içerisine alındı. İlk olarak karbon içeren kartuşlar 1 mL %0,1 TFA içeren %80 ACN ve %0,1 TFA içeren su ile 2 kez yıkandı. Sonrasında selüloz ile saflaştırılmış örnekler karbon içeren kartuşlar içerisine ilave edildi. Etkileşme olabilmesi için örnekler 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında karbon içeren kartuşlar 5 kez %0,1 TFA içeren su ile yıkandı. 2-AA etiketli glikanların elüsyonu, 0.75 mL %0,1 TFA içeren %80 ACN ile gerçekleştirildi. Sonrasında örnekler hızlı vakum kurutucu ile 45°C'ta kurutuldu.

3.7. Serbest Süt Oligosakkaritlerinin Kefir Örneklerinden Ekstraksiyonu

İlk olarak, 0.5 mL her bir örnekten alınarak 2500 × g ve 4°C'ta 30 dakika santrifüj edilerek kefir örneklerinden yağ tabakası uzaklaştırıldı. 200 µL kefir örneğine 534 µL kloroform ve 266 µL metanol eklendi. Örneklerin 2500 × g ve 4 °C 'ta 30 dakika santrifüj sonucu oluşan faz ayrımında pelet üstündeki sıvı ayrı bir santrifüj tüpüne aktarıldı. 500 µL -24°C'ta soğutulmuş etanol ilave edilerek -24°C'ta 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu örnekler 2500 × g ve 4 °C 'ta 30 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı faz ayrı bir santrifüj tüpüne aktarılarak 35°C'ta kurutuldu.

Kurutulan örnekler 250 µL su ile çözüldü. 0,2 g/ mL C18 katı sorbenti içeren Sap-pak kolonlar 500 µL %100 ACN ve 500 µL deiyonize su ile üçer kez yıkandı. Örnekler yüklenerek 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 750 µL deiyonize su ile elüsyon işlemi gerçekleştirildi. Elüsyon sonrası elde edilen oligosakkarit örnekleri ayrıca PGC kartuşlar kullanılarak aşağıda anlatıldığı gibi saflaştırıldı. Peptitlerin elüsyonu 750 µL 80/19,9/0,1; ACN/deiyonize su/TFA; v/v/v ile gerçekleştirildi. Peptitler ileriki analizlerde kullanılmak amacıyla saklandı.

Serbest süt oligosakkaritlerini içeren elüsyonlar PGC ile ayrıca saflaştırıldı. 0,2 g/mL karbon içeren kolonlar sırası ile 500 µL %80 ACN ve 500 µL %0,1 TFA ile 3 kez yıkandı. Örnekler yüklenerek 5 dakika inkübasyon sonunda yavaş vakum yapıldı. Daha sonra kolonlar 500 µL %0,1 TFA ile üçer kez yıkandı. 750 µL 80/19,9/0,1; ACN/deiyonize su/TFA; v/v/v ile elüsyonu gerçekleştirilen örnekler 35 °C'ta kurutuldu.

3.8. MALDI-TOF/TOF-MS Analizleri

Elüsyon çözeltisinin 1 µL'si MTP 384 Anchor örnek tutucusuna damlatılarak kurutuldu. Bu aşamadan sonra hacimce 1/1 oranında asetonyitril/H₂O içerisinde hazırlanmış ve %0.1 orto-fosforik asit içeren 5 mg DHB matriksi (2-5 dihidroksi benzoik asit) çözeltisinden 1 µL alınarak bu örnek spotunun üzerine ilave edildi. Kristalleşme oluşuncaya kadar bekletildikten sonra MALDI kütle spektrometrisi analizleri, Bruker rapifleX™ MALDI Tissue typer™ (Almanya, Bremen) cihazı ile gerçekleştirildi. Analizler negatif iyonlaşmada refletron modunda en az 8000 lazer atışı toplanarak gerçekleştirildi. Her analiz öncesi Bruker rapifleX™ MALDI Tissue typer™ kütle spektrometresinin bir peptit karışımı ile kütle kalibrasyonu gerçekleştirildi. Hızlandırma voltajı (25kV) uygulanarak 1000-4000 kütle aralığında kütle spektrumları elde edilmiştir. Tespit edilen N-glikanlarının yapı doğrulamalarını gerçekleştirmek amacıyla LIFT modunda MS/MS spektrumları elde edilmiştir.

Serbest süt oligosakkaritlerin analizi pozitif iyonlaşma modunda 300-3000 Da aralığında gerçekleştirildi. Matriks olarak gene DHB (5 mg mL⁻¹ ACN/1 mM NaCl içerisinde hazırlanmış) analizlerde kullanıldı. Tespit edilen serbest süt

oligosakkaritlerin analizlerinin bileşenlerinin doğrulaması LIFT modunda MS/MS spektrumları elde edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.9. MALDI-TOF/TOF-MS Veri Analizleri

Tespit edilen her bir *N*-glikan kütlesinin alan bilgisine bağlı olarak her bir tür için süt glikomunda tespit edilen *N*-glikanların göreceli bollukları hesaplanmıştır. Bu amaçla tespit edilen *N*-glikanlarının alanlarının spektrumlardan izolasyonu için python dilinde yazılmış bir yazılım olan MassyTools programı kullanılmıştır [71]. Spektrumlar program için uygun formata dönüştürüldükten sonra (.xy) yazılıma *N*-glikan bilgileri, kütle kalibrasyon bilgileri ve ekstraksiyon kriterleri tanıtılmıştır. Yazılım otomatik olarak *N*-glikan piklerin altında kalan alanları dikkate alarak her bir *N*-glikanın göreceli bolluğunu hesaplamıştır. Sonrasında veriler Graphpad Prism yazılımı kullanarak görselleştirilmiştir ve istatistiksel analizleri yapılmıştır.

Serbest süt oligosakkaritlerin analizlerinde her tespit edilen oligosakkarit bileşeninin alanı Flex Analysis yazılımı kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Sonrasında göreceli bolluğu toplam alan normalizasyon yaklaşımı kullanılarak hesaplanmıştır. Göreceli bolluklar kefirin üretim ve depolanmaları süreci içerisinde istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.10. İstatistiksel Analizler

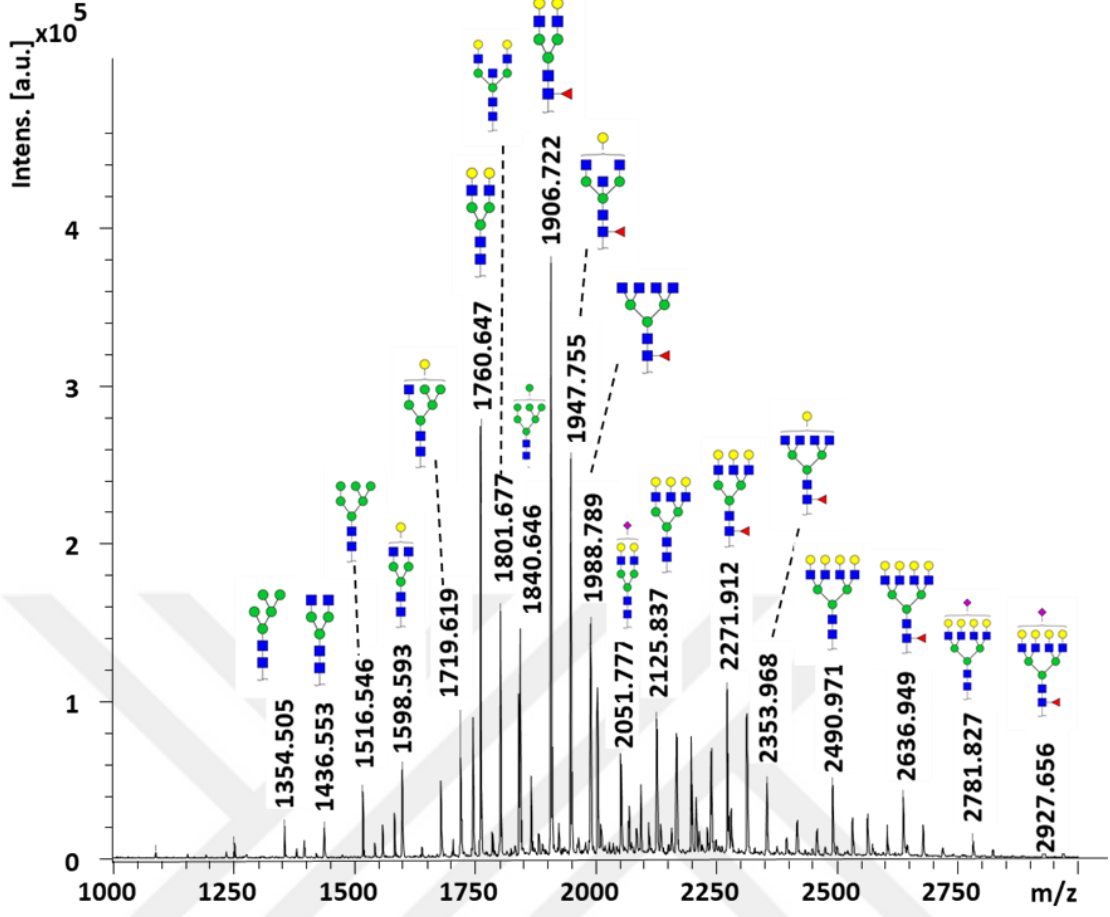
Kefirin fermantasyonu ve depolanması süreçlerinde *N*-glikanların ve serbest süt oligosakkaritlerin göreceli miktarlarında meydana gelen değişimlerin incelenmesinde anlamlı değişiklerin tespiti için GraphPad Prism yazılımı kullanılmıştır. 2way Anova testleri yapılarak süreç içerisinde anlamlı değişikler belirlenmiştir. $p < 0.05$ değerini sağlayan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Anlamlı değişim gösteren veriler yazılım kullanılarak görsel hale getirildi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

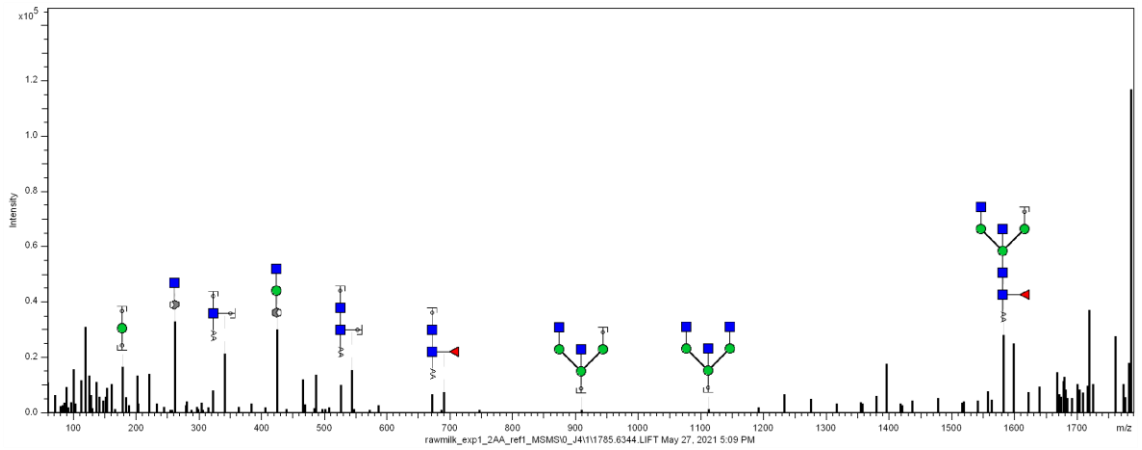
4.1. Süt Proteinleri *N*-Glikanlarının MALDI-MS ile Karakterizasyonları

Çalışmanın ilk aşamasında kefir örneklerinden proteinler yöntemde bahsedildiği gibi kloroform/metanol yöntemi kullanılarak ekstrakte edildi. Sonrasında elde edilen (gliko-)proteinlerden glikanların salınması için PNGase F enzimi ile glikanlar uzaklaştırıldı. Glikanların MALDI-MS ile verimli analizleri için 2-AA etiketi ile glikanlar etiketlendi. Etiketleme sonrasında 2-AA etiketli *N*-glikanlar sırasıyla selüloz ve grafitize karbon içeren katı faz ekstraksiyon kartuşlarından geçirilerek saflaştırıldı. Bu aşamadan sonra 2-AA etiketli *N*-glikanların analizi MALDI-MS ile negatif iyonizasyon modunda gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda her bir kefir örneğinin MALDI analizlerine ait spektrumlar elde edilmiştir. İlk olarak elde edilen veriler Protein Scape yazılımına aktarılmıştır. Burada GlycoQuest algoritması kullanılarak MS1 düzeyinde glikanların tanımlanması yapılmıştır. Sonrasında MALDI-MS analizlerinde LIFT modu kullanılarak MS1 düzeyinde tespit edilen 2-AA etiketli *N*-glikanlara MS/MS analizleri yapılmıştır. Bu analizler *N*-glikan yapılarının belirlenebilmesi için gereklidir. Bu analizler sonucunda Şekil 4.1'de belirtilen glikanlar tespit edilmiştir. Tespit edilen *N*-glikanları içeren liste Çizelge 4.1'de görülmektedir. Toplam 57 adet *N*-glikan tanımlanmıştır. Bunların yapılarının 41 tanesi MS/MS düzeyinde doğrulanmıştır. Şekil 4.2 ve 4.3'de yazılım tarafından tanımlanmış parçalanma ürünlerini içeren örnek MS/MS spektrumları görülmektedir. Analizlerde yüksek mannoz, hibrit ve kompleks tipte *N*-glikanlar belirlenmiştir. Ayrıca fukoz içeren *N*-glikanlar da belirlenmiştir. İki antenli türlerin yanı sıra üç ve dört antenli kompleks tipte *N*-glikanların yapıları da çalışmada doğrulanmıştır.

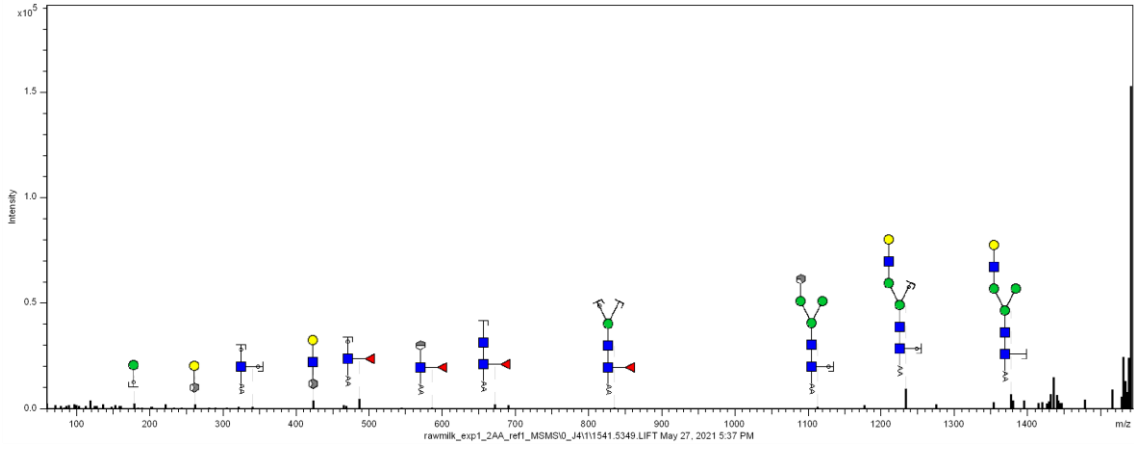
Bu analizler sonucunda oluşan toplam *N*-glikan profilini içeren bir MALDI-MS spektrumu Şekil 4.1'de görülmektedir. Bu analizler sonrasında tespit edilen her bir *N*-glikanın alanı MassyTools yazılımı ile ekstrakte edilmiştir. Bu analizler sonucunda her bir *N*-glikanın göreceli bolluğu toplam alan normalizasyon yaklaşımı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu işlemler sonrasında ileri analizler için veriler GraphPad yazılımına yüklenmiştir.



Şekil 4.1. Bir kefir örneğinden izole edilen 2-AA ile etiketlenmiş *N*-glikanların MALDI-MS analizi. İntensite değeri yüksek olan *N*-glikanlar şekilsel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Hex3HexNAc5dHex1 glikanına ait MS/MS spektrumu.



Şekil 4.3. Hex4HexNAc3dHex1 glikanına ait MS/MS spektrumu.

Çizelge 4.1. MALDI-MS analizleri sonucunda tespit edilen *N*-glikanlar.

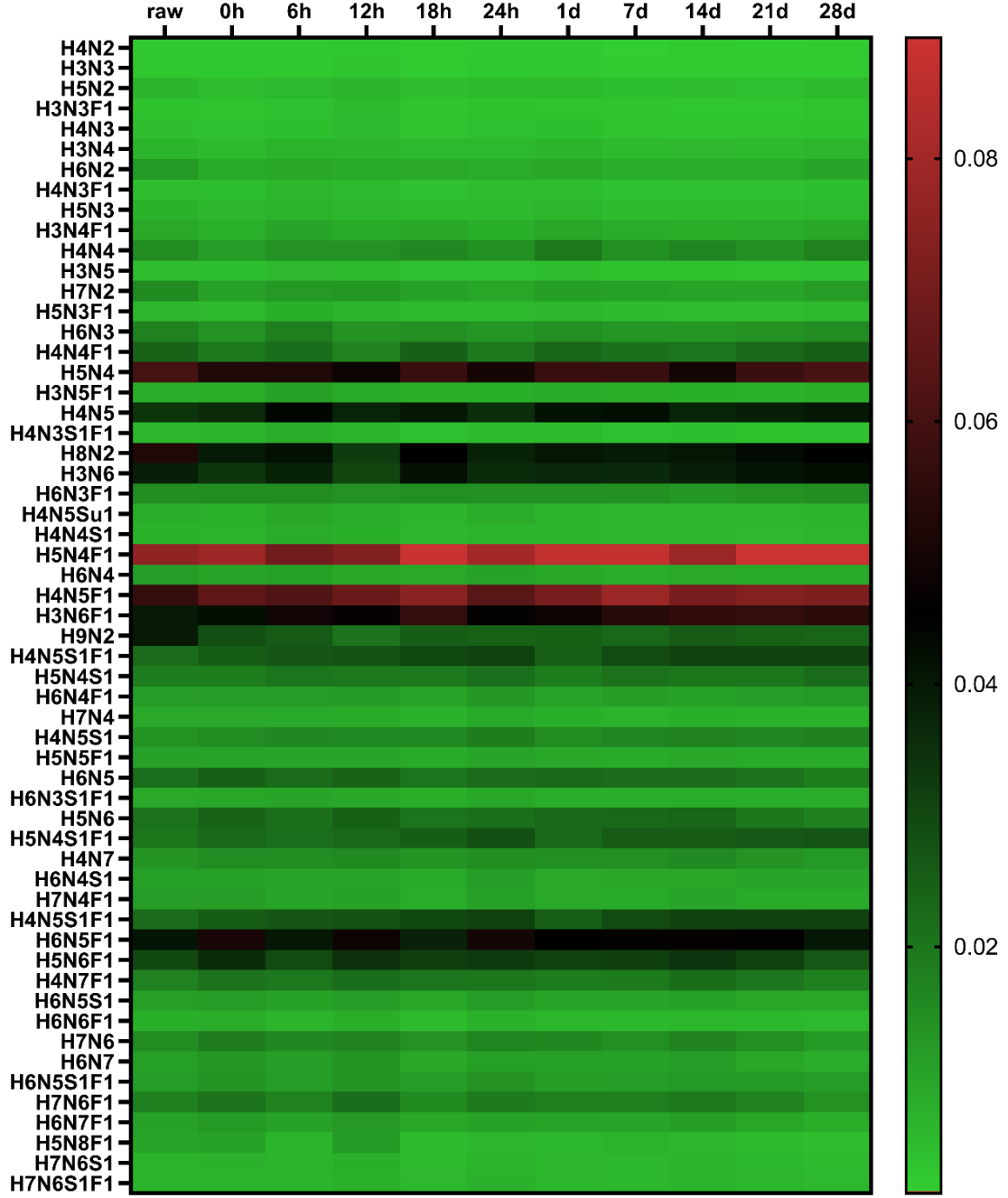
	Glikan Bileşeni	m/z ölçülen	m/z teorik	Δ MH+ [Da]	Δ m/z [ppm]	Skor	Sekans [%]
1	Hex4HexNAc2-AA	1192.460	1192.426	0.034	28.36		
2	Hex3HexNAc3-AA	1233.471	1233.453	0.019	15.21		
3	Hex5HexNAc2-AA	1354.469	1354.479	-0.010	-7.38	53	58
4	Hex3HexNAc3dHex1-AA	1379.496	1379.510	-0.014	-10.40		
5	Hex4HexNAc3-AA	1395.494	1395.506	-0.012	-8.41	27	17
6	Hex3HexNAc4-AA	1436.511	1436.532	-0.021	-14.49	61	50
7	Hex6HexNAc2-AA	1516.511	1516.532	-0.021	-13.60	64	53
8	Hex4HexNAc3dHex1-AA	1541.535	1541.563	-0.029	-18.48	34	21
9	Hex5HexNAc3-AA	1557.532	1557.558	-0.026	-16.65	38	39
10	Hex3HexNAc4dHex1-AA	1582.564	1582.590	-0.026	-16.30	57	47
11	Hex4HexNAc4-AA	1598.560	1598.585	-0.025	-15.37	49	51
12	Hex3HexNAc5-AA	1639.574	1639.611	-0.038	-22.86	26	18
13	Hex7HexNAc2-AA	1678.543	1678.585	-0.042	-24.79	32	22
14	Hex5HexNAc3dHex1-AA	1703.584	1703.616	-0.032	-18.92	27	15
15	Hex6HexNAc3-AA	1719.591	1719.611	-0.020	-11.78	60	49
16	Hex4HexNAc4dHex1-AA	1744.630	1744.643	-0.013	-7.32	37	24
17	Hex5HexNAc4-AA	1760.621	1760.638	-0.016	-9.33	72	77

18	Hex3HexNAc5dHex1-AA	1785.634	1785.669	-0.035	-19.55	47	42
19	Hex4HexNAc5-AA	1801.651	1801.664	-0.013	-7.24	57	47
20	Hex4HexNAc3NeuAc1dHex1-AA	1832.657	1832.659	-0.002	-0.93		
21	Hex8HexNAc2-AA	1840.630	1840.637	-0.008	-4.18	52	48
22	Hex3HexNAc6-AA	1842.691	1842.691	0.000	0.16	52	59
23	Hex6HexNAc3dHex1-AA	1865.678	1865.669	0.009	4.58	40	28
24	Hex4HexNAc5S1-AA	1881.631	1881.621	0.010	5.48	31	21
25	Hex4HexNAc4NeuAc1-AA	1889.668	1889.680	-0.012	-6.26		
26	Hex5HexNAc4dHex1-AA	1906.692	1906.696	-0.004	-2.11	59	54
27	Hex6HexNAc4-AA	1922.667	1922.691	-0.023	-12.04	32	30
28	Hex4HexNAc5dHex1-AA	1947.723	1947.722	0.001	0.30	51	42
29	Hex3HexNAc6dHex1-AA	1988.752	1988.749	0.004	1.90	59	51
30	Hex9HexNAc2-AA	2002.715	2002.690	0.024	12.18	42	37
31	Hex4HexNAc5S1dHex1-AA	2027.697	2027.679	0.018	8.66		
32	Hex5HexNAc4NeuAc1-AA	2051.755	2051.733	0.021	10.44	37	25
33	Hex6HexNAc4dHex1-AA	2068.788	2068.748	0.039	19.02		
34	Hex7HexNAc4-AA	2084.751	2084.743	0.008	3.85		
35	Hex4HexNAc5NeuAc1-AA	2092.758	2092.760	-0.002	-0.93		
36	Hex5HexNAc5dHex1-AA	2109.785	2109.775	0.010	4.82	31	32
37	Hex6HexNAc5-AA	2125.784	2125.770	0.014	6.78	59	49
38	Hex6HexNAc3NeuAc1dHex1-AA	2156.784	2156.764	0.019	8.96	31	17
39	Hex5HexNAc6-AA	2166.824	2166.796	0.027	12.53	47	43
40	Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-AA	2197.803	2197.791	0.012	5.53	42	21
41	Hex4HexNAc7-AA	2207.824	2207.823	0.001	0.31	22	25
42	Hex6HexNAc4NeuAc1-AA	2213.794	2213.786	0.008	3.52		
43	Hex7HexNAc4dHex1-AA	2230.813	2230.801	0.011	5.13		
44	Hex4HexNAc5NeuAc1dHex1-AA	2238.821	2238.818	0.003	1.45	25	17
45	Hex6HexNAc5dHex1-AA	2271.840	2271.828	0.012	5.36	56	48
46	Hex5HexNAc6dHex1-AA	2312.834	2312.854	-0.021	-8.85	24	34
47	Hex4HexNAc7dHex1-AA	2353.904	2353.881	0.023	9.95	26	21
48	Hex6HexNAc5NeuAc1-AA	2416.873	2416.865	0.008	3.17	19	8

49	Hex6HexNAc6dHex1-AA	2474.916	2474.907	0.009	3.65		
50	Hex7HexNAc6-AA	2490.744	2490.902	-0.158	-63.40	49	61
51	Hex6HexNAc7-AA	2531.913	2531.929	-0.015	-6.01	25	22
52	Hex6HexNAc5NeuAc1dHex1-AA	2562.887	2562.923	-0.037	-14.28	27	15
53	Hex7HexNAc6dHex1-AA	2636.976	2636.960	0.016	6.02		
54	Hex6HexNAc7dHex1-AA	2677.879	2677.987	-0.107	-40.02	21	13
55	Hex5HexNAc8dHex1-AA	2718.995	2719.013	-0.018	-6.72		
56	Hex7HexNAc6NeuAc1-AA	2781.957	2781.998	-0.040	-14.47		
57	Hex7HexNAc6NeuAc1dHex1-AA	2927.978	2928.055	-0.078	-26.60		

4.2. Kefirin Fermantasyonu ve Depolanması Süreçlerinde Süt Protein N-glikanlarındaki Değişimin İncelenmesi

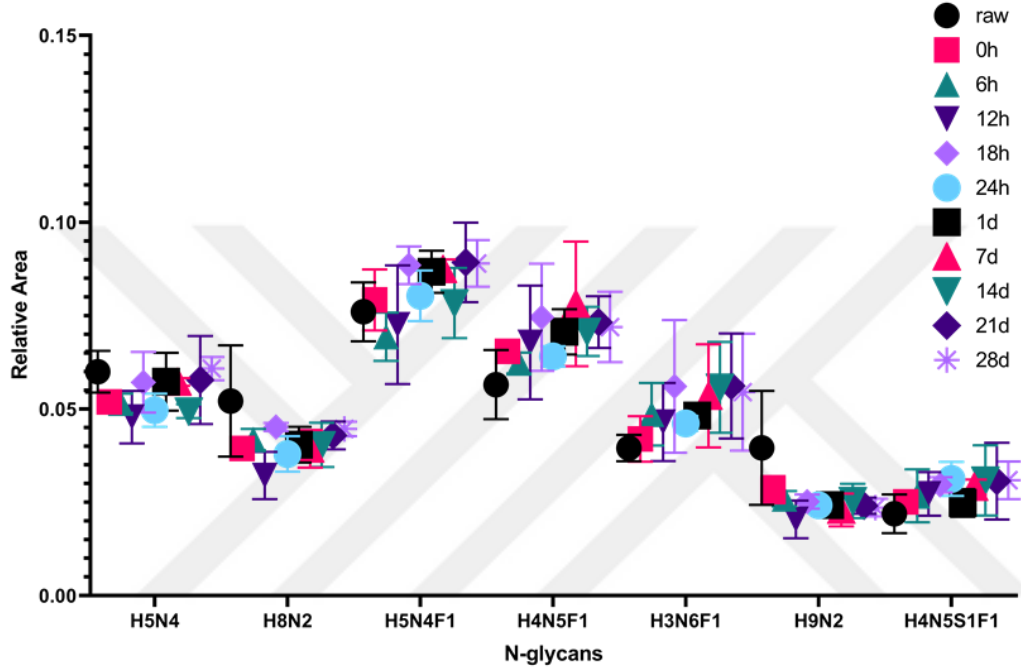
Toplam alan normalizasyonu sonucu elde edilen veriler ilk olarak ham istatistik göstergeler kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler ısı haritasında değerlendirilmiş ve periyotlar arasındaki farklar tespit edilmeye çalışılmıştır. Şekil 4.4.'de tespit edilen glikanlar ve göreceli miktarlarına göre değişimleri görülmektedir. Renk skalası N-glikanların göreceli miktarlarını ve süreç boyunca değişimini ifade etmektedir. Ayrıca elde edilen veriler üzerine daha detaylı değerlendirmelerin yapılabilmesi için 2way Anova testleri (Dunnett's çoklu karşılaştırmalı) yapılmıştır. Süreç boyunca anlamlı olarak değişen N-glikanlar belirlenmiştir (p değeri 0.05'den küçük olan değerler anlamlı kabul edilmiştir). İlk olarak çiğ süt referans noktası olarak kabul edilmiş ve çiğ sütte tespit edilen her bir N-glikan türü için elde edilen göreceli alan ortalamaları, süreç içerisindeki N-glikan ortalama göreceli alanlarıyla kıyaslanmıştır. Yapılan analizler sonucunda H5N4, H8N2, H5N4F1, H4N5F1, H3N6F1, H9N2, H4N5S1F1 glikan tiplerinde kefirin fermantasyonu ve depolanması süreçlerinde anlamlı değişiklikler belirlenmiştir. Ek1'de istatistiksel değişiklik sonucunda anlamlı değişiklik gösteren N-glikanlara ait bir liste verilmiştir.



Şekil 4.4. *N*-glikanların periyotlar arasındaki değişimini gösteren ısı haritası grafiği.

Şekil 4.5'te anlamlı değişim gösteren *N*-glikanlara ait bir grafik verilmiştir. Burada yüksek mannoz içeren *N*-glikanlardaki (H8N2 ve H9N2) çiğ süt ve pastörize edilmiş süt arasında miktarsal açıdan önemli sayılabilecek değişimler belirlenmiştir. Örneğin, çiğ sütte H8N2 ve H9N2 *N*-glikanları için göreceli alanları 0.052 ± 0.015 ve 0.040 ± 0.015 olarak bulunmuştur. Bu oranla pastörize edilmiş

sütte H8N2 ve H9N2 *N*-glikanları için 0.039 ± 0.002 ve 0.028 ± 0.036 olarak bulunmuştur. Benzer durum diğer Şekil 4.5'de verilen diğer *N*-glikan türleri için de gözlenmiştir. Bazı *N*-glikan türlerinde çiğ süte kıyasla anlamlı artışlar da görülmüştür.



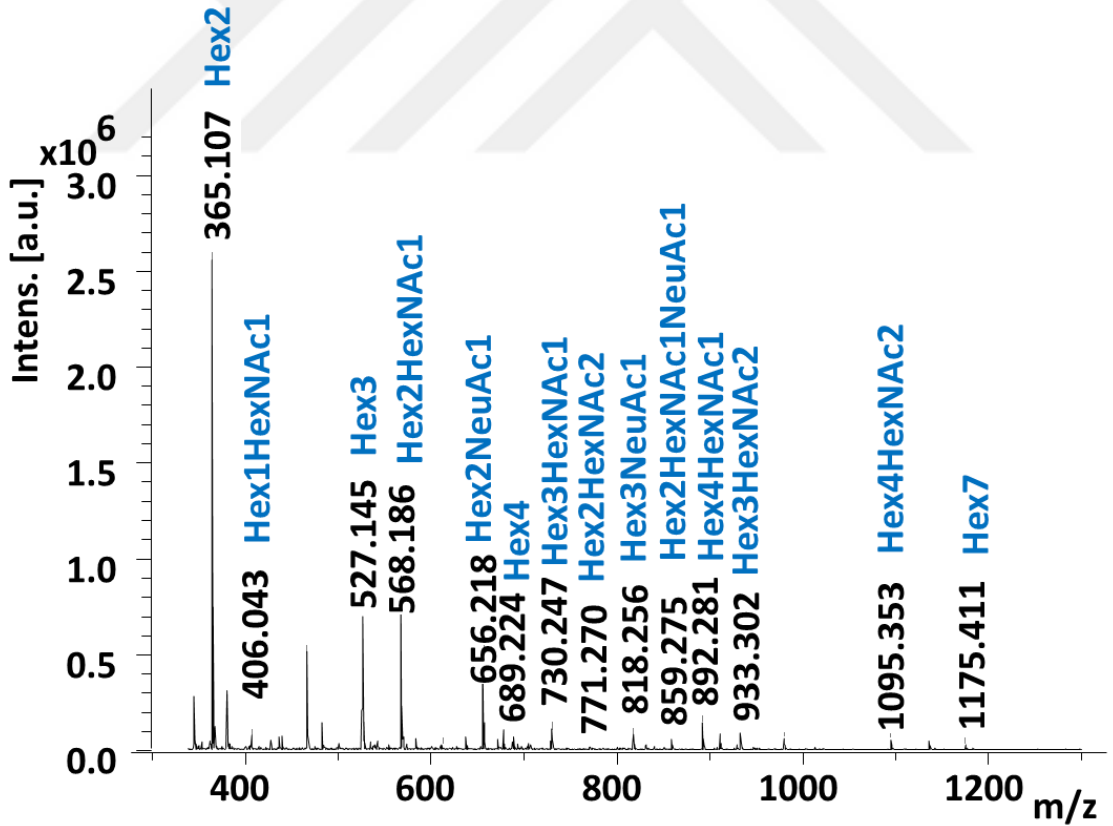
Şekil 4.5. Kefirin fermantasyonu ve depolanması süreçlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gösteren *N*-glikanlardaki miktarsal değişim.

Kontrol grubu olarak 0.saat dikkate alındığında ise kefirin fermantasyonu ve depolanması süreçlerinde H5N4F1, H4N5F1, H3N6F1, H6N5F1 *N*-glikanlarında anlamlı değişiklikler içeren periyotlar belirlenmiştir. Ek2'de bu değişimleri gösteren bir liste verilmiştir. Literatürde ısısal işlem geçirmiş ve çiğ süt protein profillerinin incelendiği çalışmalarda pastörizasyon işleminde protein profillerinde değişimlerin olduğu vurgulanmıştır [72]. Özellikle ısısal işlem görmüş sütte süt serum ve kazein proteinleri arasındaki etkileşiminin arttığı anlamlı olarak belirlenmiştir. Bu etkileşimlerin söz konusu olması, whey protein konsantrasyonlarındaki değişimle de ayrıca ilgili çalışmada gösterilmiştir. Çiğ süt ile ısısal işlem görmüş süt arasındaki *N*-glikan profillerinde bazı *N*-glikan tiplerinde

görülen değişimler bu etkileşimlerin sonucu olduğu düşünülebilir. Kefirin fermentasyonu ve depolanması sürecinde *N*-glikanlardaki değişimde ise kefir mikroflorasından salınan enzimlerin rolü olduğu söylenebilir.

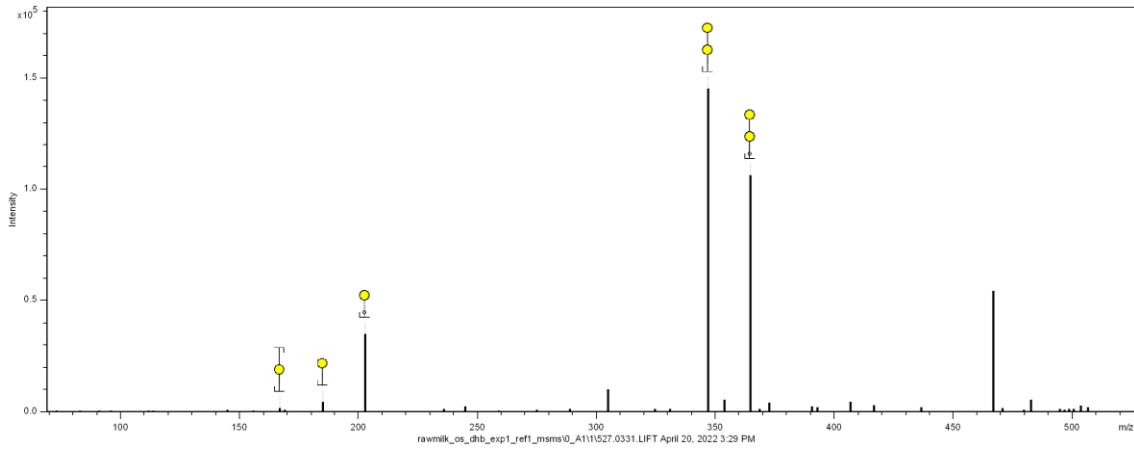
4.3. Serbest Süt Oligosakkaritlerinin MALDI-MS ile Karakterizasyonları

Sütte bulunan serbest süt oligosakkaritleri tezin yöntem kısmında belirtildiği gibi her bir çiğ süt ve kefir örneklerinden ekstrakte edildi. Gözenekli grafitize karbon ile saflaştırıldıktan sonra analizler MALDI-MS ile gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda süt bileşeninde bulunan serbest süt oligosakkaritlerine ait kütle bilgileri elde edildi. Bileşenlerinin doğrulanması için MALDI-MS LIFT modunda MS/MS analizleri yapıldı. Şekil 4.6'da serbest süt oligosakkaritlerinin analizleri sonrasında elde edilen bir MALDI kütle spektrumu görülmektedir. Toplam 19 adet serbest süt oligosakkarit profili çalışmada karakterize edilmiştir.

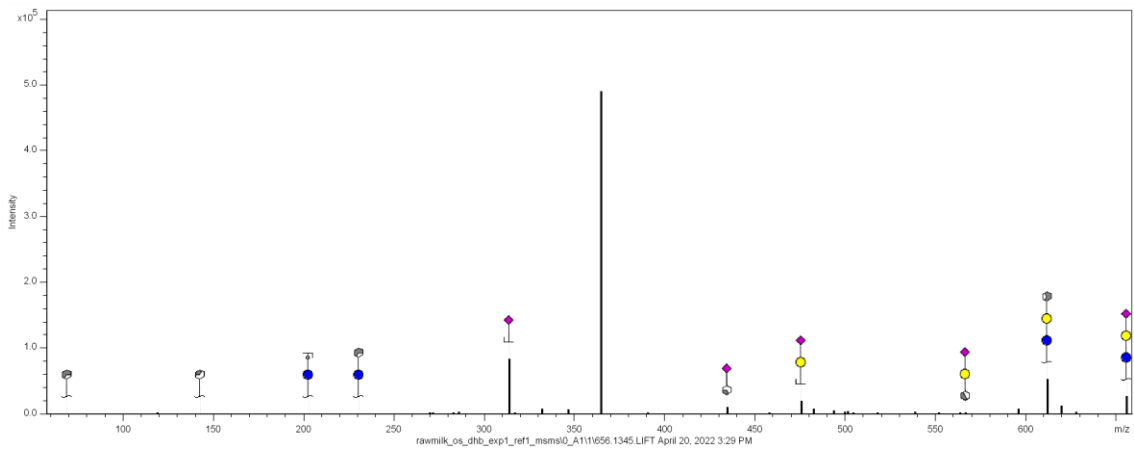


Şekil 4.6. Sütte bulunan serbest süt oligosakkaritlerine ait MALDI-MS spektrumu.

Serbest süt oligosakkarit bileşenlerine ait yapılar glikoproteinlerde bulunan *N*-glikan yapıları ile kıyaslandığında çok daha basit şekerleri içermektedir. Analizler sonucunda siyalik asit içeren yapılar da tespit edilmiştir (Şekil 4.6., NeuAc: *N*-asetil neraminik asit). Yapı doğrulamaları için yapılan çalışmalarda 12 adet serbest süt oligosakkaritinin MS/MS spektrumları elde edilebilmiş ve yapıları doğrulanmıştır. *N*-glikan analizlerine benzer şekilde Protein Scape yazılımı kullanılarak oligosakkarit yapılarına ait parçalanma ürünleri tespit edilmiştir. Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de 2 farklı oligosakkarit yapısına ait MS/MS spektrumları ve anotasyonu görülmektedir.



Şekil 4.7. Hex2 oligosakkaritine ait MS/MS spektrumu.



Şekil 4.8. Hex2NeuAc1 oligosakkaritine ait MS/MS spektrumu.

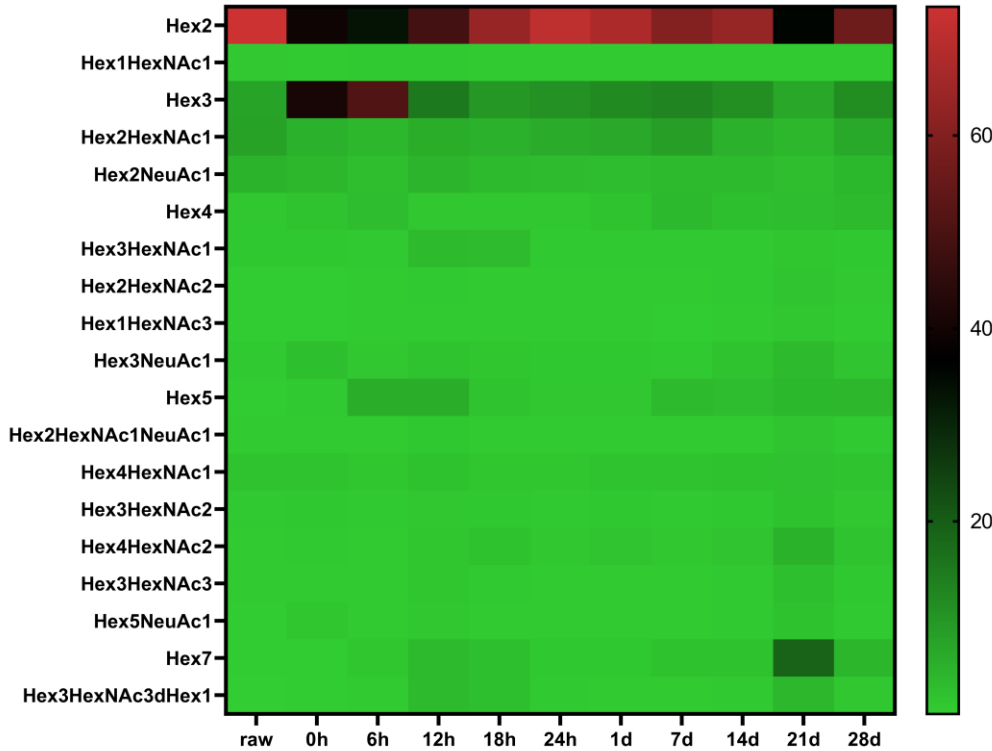
Çalışmada 19 adet serbest süt oligosakkarit profili elde edilmiştir. Tespit edilen serbest süt oligosakkaritlerine ait bir liste Çizelge 4.2’de verilmektedir. Liste incelendiğinde serbest süt oligosakkaritlerin çoğunlukla nötr yapılardan oluştuğu gözlenmiştir. Bu durum daha önce literatürde yapılan çalışmalarda da belirtilmektedir [57]. Bu bakımdan elde edilen sonuçlar literatürde daha önce yapılan çalışmalarla örtüşmektedir.

Çizelge 4.2. MALDI-MS analizleri sonucunda tespit edilen serbest süt oligosakkaritleri. Tüm iyonlar [M + Na] şeklindedir.

	Bileşen	m/z ölçülen	m/z hesaplan an	Δ MH+[Da]	Skor (MS/MS)	Sekan s [%]
1	Hex2	365.107	365.105	0.002	89	133
2	Hex1HexNAc1	406.043	406.132	-0.089		
3	Hex3	527.145	527.158	-0.013	125	217
4	Hex2HexNAc1	568.186	568.185	0.001	106	130
5	Hex2NeuAc1	656.218	656.201	0.017	64	44
6	Hex4	689.224	689.211	0.013	90	244
7	Hex3HexNAc1	730.247	730.238	0.010	67	72
8	Hex2HexNAc2	771.270	771.264	0.006		
9	Hex1HexNAc3	812.081	812.291	-0.210		
10	Hex3NeuAc1	818.256	818.254	0.003	24	29
11	Hex5	851.256	851.264	-0.008		
12	Hex2HexNAc1NeuAc 1	859.275	859.280	-0.005	31	23
13	Hex4HexNAc1	892.281	892.290	-0.009	52	64
14	Hex3HexNAc2	933.302	933.317	-0.015		
15	Hex4HexNAc2	1095.353	1095.370	-0.016	61	84
16	Hex3HexNAc3	1136.386	1136.396	-0.010	54	100
17	Hex5NeuAc1	1142.347	1142.359	-0.012		
18	Hex7	1175.411	1175.370	0.042	36	48
19	Hex3HexNAc3dHex1	1282.496	1282.454	0.042		

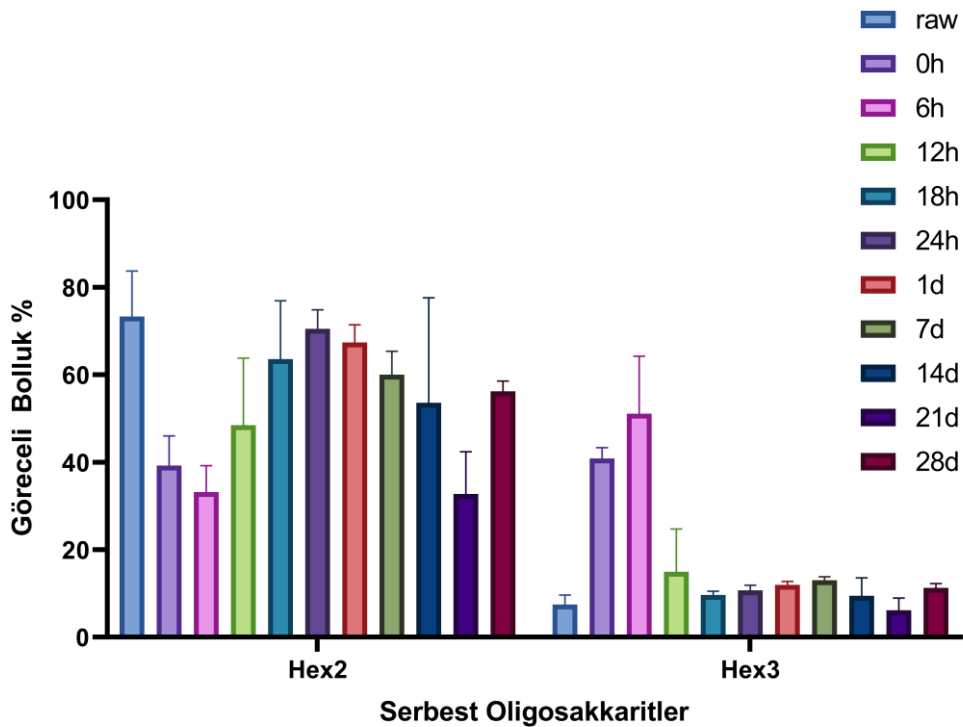
4.4. Kefirin Fermantasyonu ve Depolanması Süreçlerinde Süt Serbest Oligosakkarit Profillerindeki Değişimin İncelenmesi

Çalışmanın bu kısmında *N*-glikan analizlerinde olduğu gibi kefirin fermantasyonu ve depolanması süreçlerinde her bir örneğin oligosakkarit profili çıkarıldı. Tespit edilen her oligosakkaritin alanı Flex Analysis yazılımı kullanılarak ekstrakte edildi. Toplam alan normalizasyon yaklaşımı kullanılarak göreceli bollukları her bir periyot için hesaplandı. Sonrasında istatistiksel analizler için Graphpad Prism yazılımına veriler yüklendi. 2way Anova testleri yapılarak anlamlı değişiklikler tespit edildi. İstatistiksel analizler öncesinde yüzde göreceli bolluk açıdan periyotlar arasındaki farklılıkların net olarak görülebilmesi için tespit edilen oligosakkarit profillerine ait bir ısı haritası grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.9). Burada beklenildiği gibi laktoz (Hex2) oligosakkarit yapısının diğer oligosakkarit yapılarına kıyasla daha bol olarak inek sütünde bulunduğu gözlenmiştir. Bunun haricinde trioz (Hex3) oligosakkaritinin de süreç boyunca miktarı yüksek olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Serbest süt oligosakkaritlerinin periyotlar arasındaki değişimini gösteren ısı haritası grafiği.

İstatiksel analizlerde *N*-glikanlardakine benzer şekilde ilk olarak çiğ süt kontrol grubu alınarak değişimler incelenmiştir. Analiz sonucuna göre laktoz ve trioz oligosakkarit profillerinde anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir. Burada çiğ süt ile pastörize süt arasında miktarı bol olarak bulunan oligosakkaritler arasında bir değişim olduğu görülmektedir. 0.saat referans noktası alınarak yapılan istatiksel değerlendirmede ise benzer şekilde süreç içerisinde laktoz ve trioz oligosakkarit yapılarında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Ek3’de anlamlı farklılık gösteren serbest oligosakkaritlere ait istatiksel sonuçlar verilmiştir. Şekil 4.10’da miktarı yüksek olarak bulunan ve anlamlı değişiklik gösterdiği belirlenen 2 temel oligosakkarit yapılarının süreç içerisindeki göreceli bollukları görülmektedir. Laktoz ve trioz miktarında çiğ süt ve ısıtılmış süt arasında ciddi oranda bir değişim belirlenmiştir. Süreç içerisinde ise laktozun göreceli bolluğunda 6.saat itibariyle düşme fermantasyonun 12-24 saat aralığında ise artış belirlenmiştir. Depolanma süreçlerinde ise belli oranda azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.10. Laktoz (Hex2) ve Trioz (Hex3) serbest süt oligosakkaritlerinin kefirin fermantasyonu ve depolanması süreçlerindeki değişim.

Kefirin fermantasyonu sürecinde salınan enzimlerin mikrobiyal aktivitelerinin kefirde yüksek oranda bulunan oligosakkarit profillerinde değişime sebep olduğu düşünülmektedir. Özellikle kefir üretimi sırasında laktoz enziminin parçalanmasından sorumlu enzimin salınması (beta-galaktosidaz) sütteki laktoz miktarını azaltmaktadır [25]. Diğer yandan, çalışmada laktozun göreceli miktarında ciddi bir azalma ilk olarak çiğ süt ve ısısal işlem görmüş süt arasında belirlenmiştir.

Köse, M. (2018), yaptığı çalışmada kefirin mikrobiyal içeriği, şeker kompozisyonu ve laktik asit içeriğini belirlemiştir. Bu çalışma sonucunda, laktozun, fermantasyon 4. saatinden itibaren parçalanmaya başladığını ve değerinin azaldığını tespit etmiştir. Laktozun parçalanma ürünü olan galaktoz ve glikozun ise 8. saatten itibaren değerlerinin yükselmeye başladığını, 12. saatte en yüksek değere ulaştıklarını ve 12. saatten sonra ise değerlerinin azalmaya başladığını göstermiştir [73].

Kefirin fermantasyonu ve depolanması esnasında gerçekleşen mikrobiyal büyüme, birçok biyoaktif bileşenin süte salınmasına sebep olmaktadır. Bunların içerisinde enzimler önemli roller üstlenir. Bu enzimlerin ve özellikle de kefir içerisinde bulunan mikroorganizmalardan salınan proteazların aktiviteleri, süt proteomunu değiştirebilir. Nitekim literatürde kefir üzerine yapılan peptidomik çalışmalar, bu gerçeği vurgulamaktadır.

Dallas, D. C., ve arkadaşları (2016), yaptıkları çalışmada süt proteinlerinin kefir kaynaklı bozunmasını peptidomiklerle incelemişlerdir ve kefir organizmalarının, süt proteinlerinden 609 peptit saldıgını tespit etmişlerdir. Doğal süt enzimlerinin, proteinleri kefir mikroorganizmalarından daha az parçaladığı ve kefirin, tüketici sağlığını etkileyebilecek fonksiyonel peptitler içerdiği sonucuna ulaşmışlardır [74].

5. SONUÇLAR

- Bu tez kapsamında kefirin fermantasyonu ve depolanması süreçlerinde kefirin üretim aşamasında kullanılan inek sütü glikoproteinlerine ait *N*-glikanların ve sütte bulunan serbest süt oligosakkarit profilinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmalar sonucunda inek sütü glikoproteinlerine ait 57 adet *N*-glikan yapısı karakterize edilmiştir. Tespit edilen *N*-glikanların 41 adetinin yapılarının ikili MS/MS analizleri gerçekleştirilmiş ve yapıları doğrulanmıştır.
- Kefirin fermantasyonu depolanması süreçlerinde süt glikoproteinlerine ait *N*-glikanların değişimleri incelendiğinde H5N4, H8N2, H5N4F1, H4N5F1, H3N6F1, H9N2, H4N5S1F1 glikan tiplerinde değişimler belirlenmiştir. Çiğ süt ve ısıtılmış süt arasında yukarıda belirtilen glikan tipleri arasında anlamlı farklılıklar belirlenmiştir.
- Çalışmada 19 adet serbest süt oligosakkarit MALDI-MS ile karakterize edilmiştir. Tespit edilen oligosakkaritlerin 11 adetinin yapısı ikili MS/MS analizleri ile doğrulanmıştır. Kefirin fermantasyonu depolanması süreçlerinde serbest süt oligosakkarit profillerindeki değişim incelendiğinde laktoz (Hex2) ve trioz (Hex3) oligosakkarit profillerinde anlamlı değişiklikler belirlenmiştir.
- Literatürden bilindiği kadarıyla bu tez kapsamında ilk kez kefirin fermantasyonu ve depolanması süreçlerinde süt glikoproteinlerine ait *N*-glikanlar ve serbest süt oligosakkaritleri kütle spektrometrik bir yöntemle incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler kefir üretiminin fizyokimyasal süreci hakkında detaylı bilgiler vererek kefir üzerine yapılacak kliniksel çalışmalar için yeni kapılar açabilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Ebner, J., Arslan, A. A., Fedorova, M., Hoffmann, R., Küçükçetin, A., Pischetsrieder, M., Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains, *Journal of proteomics*, 117, 41-57, **2015**.
- [2] Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L., Chemical and microbiological characterisation of kefir grains, *Journal of dairy research*, 68, 639-652, **2001**.
- [3] Lv, J.-p., Wang, L.-M., Bioactive components in kefir and koumiss, *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*, 251, **2009**.
- [4] Grønnevik, H., Falstad, M., Narvhus, J. A., Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage, *International Dairy Journal*, 21, 601-606, **2011**.
- [5] Gaware, V., Kotade, K., Dolas, R., Dhamak, K., Somwanshi, S., Nikam, V., Khadse, A., Kashid, V., The magic of kefir: a review, *Pharmacologyonline*, 1, 376-386, **2011**.
- [6] Yalçın, N. F., Işık, M. K., Kefir; ürün özellikleri ve insan sağlığına etkisi, *Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3, 439-452, **2017**.
- [7] Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., Kefir mikroflorası ile laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve genetik özellikleri, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1, 49-69, **2003**.
- [8] Hijyeni, B., Anar, Ş., Kefir ve özellikleri, **1999**.
- [9] Al-Mohammadi, A.-R., Ibrahim, R. A., Moustafa, A. H., Ismaiel, A. A., Abou Zeid, A., Enan, G., Chemical Constitution and Antimicrobial Activity of Kefir Fermented Beverage, *Molecules*, 26, p.2635, **2021**.
- [10] Dinç, A. Y., Şireli, U. T. T. D., "Kefirin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi," Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi , **2008**.
- [11] Ürkek, B., Erkaya, T., Şengül, M., Kefir: Bileşimi, Üretimi, Probiyotik ve Terapötik Özellikleri, *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, **2011**.
- [12] Koyu, E. B., Demirel, Z. B., Fonksiyonel Bir Besin: Kefir, *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 46, 166-175, **2018**.
- [13] Wang, S.-Y., Chen, K.-N., Lo, Y.-M., Chiang, M.-L., Chen, H.-C., Liu, J.-R., Chen, M.-J., Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain, *Food microbiology*, 32, 274-285, **2012**.

- [14] de Oliveira, A. P., dos Santos, G. A., Nomura, C. S., Naozuka, J., Elemental chemical composition of products derived from kefir fermented milk, *Journal of Food Composition and Analysis*, 78, 86-90, **2019**.
- [15] Rosa, D. D., Dias, M. M., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., Maria do Carmo, G. P., Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits, *Nutrition research reviews*, 30, 82-96, **2017**.
- [16] Yegin, Z., Yurt, M. N. Z., Tasbasi, B. B., Acar, E. E., Altunbas, O., Ucak, S., Ozalp, V. C., Sudagidan, M., Determination of bacterial community structure of Turkish kefir beverages via metagenomic approach, *International Dairy Journal*, p.105337, **2022**.
- [17] Moradi, Z., Kalanpour, N., Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications: A review, *Carbohydrate polymers*, 223, p.115100, **2019**.
- [18] Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C. R., Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products, *Frontiers in microbiology*, p.1177, **2015**.
- [19] Beshkova, D., Simova, E., Simov, Z., Frengova, G., Spasov, Z., Pure cultures for making kefir, *Food microbiology*, 19, 537-544, **2002**.
- [20] Vardjan, T., Lorbeg, P. M., Rogelj, I., Majhenič, A. Č., Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains, *Journal of dairy science*, 96, 2729-2736, **2013**.
- [21] Witthuhn, R., Schoeman, T., Britz, T., Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation, *International dairy journal*, 15, 383-389, **2005**.
- [22] Karatepe, P., Yalçın, H., Kefirli sağlık, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4, 23-30, **2014**.
- [23] Nielsen, B., Gürakan, G. C., Ünlü, G., Kefir: a multifaceted fermented dairy product, *Probiotics and antimicrobial proteins*, 6, 123-135, **2014**.
- [24] Zajšek, K., Goršek, A., Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora, *Food and Bioprocess Processing*, 88, 55-60, **2010**.
- [25] Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., Afreen, A., Kefir and health: a contemporary perspective, *Critical reviews in food science and nutrition*, 53, 422-434, **2013**.
- [26] Guzel-Seydim, Z., Seydim, A., Greene, A., Taş, T., Determination of antimutagenic properties of acetone extracted fermented milks and

changes in their total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids, *International journal of dairy technology*, 59, 209-215, **2006**.

- [27] K ro lu,  ., Bakır, E., Uluda , G., K ro lu, S., Dayısoylu, K., Kefir ve sa lık, *KS  Do a Bilimleri Dergisi*, 18, 26-30, **2015**.
- [28] Hertzler, S. R., Clancy, S. M., Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion, *Journal of the American Dietetic association*, 103, 582-587, **2003**.
- [29] Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y., Wang, Z., Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation, *International Dairy Journal*, 43, 15-21, **2015**.
- [30]  ınar, K., Yıldız, H., "Farklı konsantrasyonlarda maviyemi  ilavesiyle  retilen kefirlerin depolama s resince mikrobiyolojik, fizikokimyasal ve in vitro antioksidan kapasitesindeki de i imin tespiti," Nev ehir Hacı Bekta  Veli  niversitesi, 2019.
- [31] Turkmen, N., Kefir as a functional dairy product, *Dairy in human health and disease across the lifespan*, Elsevier373-383, **2017**.
- [32] Lee, M.-Y., Ahn, K.-S., Kwon, O.-K., Kim, M.-J., Kim, M.-K., Lee, I.-Y., Oh, S.-R., Lee, H.-K., Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model, *Immunobiology*, 212, 647-654, **2007**.
- [33] Shen, Y., Kim, D.-H., Chon, J.-W., Kim, H., Song, K.-Y., Seo, K.-H., Nutritional effects and antimicrobial activity of kefir (Grains), *Journal of Dairy Science and Biotechnology*, 36, 1-13, **2018**.
- [34] John, S. M., Deeseenthum, S., Properties and benefits of kefir-A review, *Songklanakarın Journal of Science & Technology*, 37, **2015**.
- [35] Farley, A. R., Link, A. J., Identification and quantification of protein posttranslational modifications, *Methods in enzymology*, 463, 725-763, **2009**.
- [36] Jensen, O. N., Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry, *Current opinion in chemical biology*, 8, 33-41, **2004**.
- [37] Streets, A., Ong, A., Post-translational modifications of the polycystin proteins, *Cellular Signalling*, 72, p.109644, **2020**.
- [38] Verhelst, X., Dias, A. M., Colombel, J.-F., Vermeire, S., Van Vlierberghe, H., Callewaert, N., Pinho, S. S., Protein glycosylation as a diagnostic and prognostic marker of chronic inflammatory gastrointestinal and liver diseases, *Gastroenterology*, 158, 95-110, **2020**.

- [39] Ramazi, S., Zahiri, J., Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods, *Database*, 2021, **2021**.
- [40] Yalçın, A., Posttranslasyonel modifikasyon ve protein fonksiyonu, *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 31, 29-38, **2012**.
- [41] Kayılı, H. M., "Glikopeptitlerin Kütle Spektrometrik Analizleri İçin Yeni Bir Biyoanalitik Yöntem Geliştirilmesi ve İnsan C1-Inhibitör Proteininin Ayrıntılı Bölgeye Özgü Glikozilasyon Analizinin Gerçekleştirilmesi," Doktora Tezi Doktora, Kimya Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2016.
- [42] Shajahan, A., Heiss, C., Ishihara, M., Azadi, P., Glycomic and glycoproteomic analysis of glycoproteins—a tutorial, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409, 4483-4505, **2017**.
- [43] Aizpurua-Olaizola, O., Toraño, J. S., Falcon-Perez, J. M., Williams, C., Reichardt, N., Boons, G.-J., Mass spectrometry for glycan biomarker discovery, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 100, 7-14, **2018**.
- [44] Goth, C. K., Petäjä-Repo, U. E., Rosenkilde, M. M., G protein-coupled receptors in the sweet spot: glycosylation and other post-translational modifications, *ACS pharmacology & translational science*, 3, 237-245, **2020**.
- [45] Etxebarria, J., Reichardt, N.-C., Methods for the absolute quantification of N-glycan biomarkers, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860, 1676-1687, **2016**.
- [46] Yaman, M. E., Aladağ, E., KAYILI, H. M., KADIOĞLU, Y., Salih, B., N-Glycosylation Profiles of the Green Microalgae *Chlorella Zofingiensis*, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 49, 147-155, **2021**.
- [47] Cao, L., Diedrich, J. K., Ma, Y., Wang, N., Pauthner, M., Park, S.-K. R., Delahunty, C. M., McLellan, J. S., Burton, D. R., Yates, J. R., Global site-specific analysis of glycoprotein N-glycan processing, *Nature protocols*, 13, 1196-1212, **2018**.
- [48] Ohtsubo, K., Marth, J. D., Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease, *Cell*, 126, 855-867, **2006**.
- [49] Varki, A., Biological roles of glycans, *Glycobiology*, 27, 3-49, **2017**.
- [50] Varki, A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology*, 3, 97-130, **1993**.
- [51] Hickey, R. M., The role of oligosaccharides from human milk and other sources in prevention of pathogen adhesion, *International Dairy Journal*, 22, 141-146, **2012**.

- [52] Wu, S., Grimm, R., German, J. B., Lebrilla, C. B., Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides, *Journal of proteome research*, 10, 856-868, **2011**.
- [53] Hickey, R., Harnessing milk oligosaccharides for nutraceutical applications, *Dairy-Derived Ingredients*, Elsevier 308-343, **2009**.
- [54] Kunz, C., Rudloff, S., Health promoting aspects of milk oligosaccharides, *International Dairy Journal*, 16, 1341-1346, **2006**.
- [55] Bongers, M. E., De Lorijn, F., Reitsma, J. B., Groeneweg, M., Taminiau, J. A., Benninga, M. A., The clinical effect of a new infant formula in term infants with constipation: a double-blind, randomized cross-over trial, *Nutrition journal*, 6, 1-7, **2007**.
- [56] Zivkovic, A. M., Barile, D., Bovine milk as a source of functional oligosaccharides for improving human health, *Advances in Nutrition*, 2, 284-289, **2011**.
- [57] Tao, N., DePeters, E., Freeman, S., German, J., Grimm, R., Lebrilla, C. B., Bovine milk glycome, *Journal of dairy science*, 91, 3768-3778, **2008**.
- [58] Nakamura, T., Kawase, H., Kimura, K., Watanabe, Y., Ohtani, M., Arai, I., Urashima, T., Concentrations of sialyloligosaccharides in bovine colostrum and milk during the prepartum and early lactation, *Journal of Dairy Science*, 86, 1315-1320, **2003**.
- [59] Holler, F. J., Skoog, D.A., Crouch, S.R. (2007). *Enstrümantal Analiz*.
- [60] Glish, G. L., Vachet, R. W., The basics of mass spectrometry in the twenty-first century, *Nature reviews drug discovery*, 2, 140-150, **2003**.
- [61] Kaufmann, R., Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology, *Journal of biotechnology*, 41, 155-175, **1995**.
- [62] Tholey, A., Heinzle, E., Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry—applications and perspectives, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 386, 24-37, **2006**.
- [63] Roepstorff, P., MALDI-TOF mass spectrometry in protein chemistry, *Proteomics in functional genomics*, 81-97, **2000**.
- [64] Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D., MALDI-TOF mass spectrometry, *Molecular biotechnology*, 26, 147-163, **2004**.
- [65] <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm> Erişim Tarihi: 15.02.2022.

- [66] Morelle, W., Michalski, J.-C., Glycomics and mass spectrometry, *Current pharmaceutical design*, 11, 2615-2645, **2005**.
- [67] Morelle, W., Faid, V., Chirat, F., Michalski, J.-C., Analysis of N-and O-linked glycans from glycoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry, *Glycomics*, 3-21, **2009**.
- [68] Zaia, J., Mass spectrometry and the emerging field of glycomics, *Chemistry & biology*, 15, 881-892, **2008**.
- [69] Nishikaze, T., Sensitive and structure-informative N-glycosylation analysis by MALDI-MS; ionization, fragmentation, and derivatization, *Mass Spectrometry*, 6, A0060-A0060, **2017**.
- [70] Pallister, E., "Enzymatic Remodelling of Glycans & Glycan Analysis," University of Manchester, 2021.
- [71] Jansen, B. C., Reiding, K. R., Bondt, A., Hipgrave Ederveen, A. L., Palmblad, M., Falck, D., Wührer, M., MassyTools: a high-throughput targeted data processing tool for relative quantitation and quality control developed for glycomic and glycoproteomic MALDI-MS, *Journal of proteome research*, 14, 5088-5098, **2015**.
- [72] Čurlej, J., Zajác, P., Čapla, J., Golian, J., Benešová, L., Partika, A., Fehér, A., Jakabová, S., The Effect of Heat Treatment on Cow's Milk Protein Profiles, *Foods*, 11, p.1023, **2022**.
- [73] Köse, M., Kefir Fermantasyonu Süresince Mikrobiyal Metabolizma İle Bazı Galaktooligosakkaritler Dahil Karbonhidrat Profillerindeki Değişimin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği, Süleyman Demirel Üniversitesi, **2018**.
- [74] Dallas, D. C., Citerne, F., Tian, T., Silva, V. L., Kalanetra, K. M., Frese, S. A., Robinson, R. C., Mills, D. A., Barile, D., Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins, *Food chemistry*, 197, 273-284, **2016**.

EKLER

EK 1 –İstatiksel analizlerde anlamlı değişiklik gösterdiği belirlenen *N*-glikanlara ait sonuçlar (çiğ süt kontrol grubu olarak belirlenmiştir).

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
H5N4					
raw - 0h	0.008	0.0002394 to 0.01595	Evet	*	0.0398
raw - 6h	0.008	0.0005981 to 0.01631	Evet	*	0.0278
raw - 12h	0.012	0.004296 to 0.02001	Evet	***	0.0003
raw - 18h	0.003	-0.005024 to 0.01069	Hayır		0.9337
raw - 24h	0.010	0.002476 to 0.01819	Evet	**	0.0032
raw - 1d	0.003	-0.005175 to 0.01054	Hayır		0.9518
raw - 7d	0.003	-0.005105 to 0.01061	Hayır		0.9439
raw - 14d	0.011	0.002724 to 0.01844	Evet	**	0.0024
raw - 21d	0.002	-0.005625 to 0.01009	Hayır		0.9860
raw - 28d	-0.001	-0.008681 to 0.007033	Hayır		0.9996
H8N2					

raw - 0h	0.013	0.004827 to 0.02054	Evet	***	0.0001
raw - 6h	0.010	0.002473 to 0.01819	Evet	**	0.0033
raw - 12h	0.020	0.01206 to 0.02778	Evet	****	<0.0001
raw - 18h	0.007	-0.0009122 to 0.01480	Hayır		0.1119
raw - 24h	0.014	0.006319 to 0.02203	Evet	****	<0.0001
raw - 1d	0.012	0.003834 to 0.01955	Evet	***	0.0005
raw - 7d	0.013	0.004927 to 0.02064	Evet	***	0.0001
raw - 14d	0.012	0.003877 to 0.01959	Evet	***	0.0005
raw - 21d	0.009	0.001344 to 0.01706	Evet	*	0.0125
raw - 28d	0.007	-0.0003909 to 0.01532	Hayır		0.0716
H5N4F1					
raw - 0h	-0.003	-0.01104 to 0.004677	Hayır		0.8783
raw - 6h	0.007	-0.001191 to 0.01452	Hayır		0.1400
raw - 12h	0.003	-0.004394 to 0.01132	Hayır		0.8202
raw - 18h	-0.012	-0.02032 to - 0.004605	Evet	***	0.0002

raw - 24h	-0.004	-0.01214 to 0.003576	Hayır		0.6120
raw - 1d	-0.011	-0.01858 to - 0.002863	Evet	**	0.0020
raw - 7d	-0.011	-0.01924 to - 0.003528	Evet	***	0.0008
raw - 14d	-0.002	-0.01021 to 0.005504	Hayır		0.9792
raw - 21d	-0.013	-0.02107 to - 0.005358	Evet	****	<0.0001
raw - 28d	-0.013	-0.02082 to - 0.005102	Evet	****	<0.0001
H4N5F1					
raw - 0h	-0.009	-0.01678 to - 0.001065	Evet	*	0.0170
raw - 6h	-0.006	-0.01365 to 0.002065	Hayır		0.2640
raw - 12h	-0.011	-0.01915 to - 0.003442	Evet	***	0.0009
raw - 18h	-0.018	-0.02587 to - 0.01016	Evet	****	<0.0001
raw - 24h	-0.008	-0.01541 to 0.0003062	Hayır		0.0664
raw - 1d	-0.014	-0.02200 to - 0.006284	Evet	****	<0.0001
raw - 7d	-0.022	-0.02948 to - 0.01376	Evet	****	<0.0001
raw - 14d	-0.014	-0.02209 to - 0.006374	Evet	****	<0.0001

raw - 21d	-0.017	-0.02459 to - 0.008882	Evet	****	<0.0001
raw - 28d	-0.015	-0.02329 to - 0.007580	Evet	****	<0.0001
H3N6F1					
raw - 0h	-0.002	-0.01031 to 0.005399	Hayır		0.9719
raw - 6h	-0.009	-0.01691 to - 0.001200	Evet	*	0.0147
raw - 12h	-0.007	-0.01480 to 0.0009086	Hayır		0.1115
raw - 18h	-0.017	-0.02438 to - 0.008666	Evet	****	<0.0001
raw - 24h	-0.007	-0.01445 to 0.001263	Hayır		0.1480
raw - 1d	-0.009	-0.01654 to - 0.0008268	Evet	*	0.0219
raw - 7d	-0.014	-0.02182 to - 0.006109	Evet	****	<0.0001
raw - 14d	-0.016	-0.02410 to - 0.008384	Evet	****	<0.0001
raw - 21d	-0.017	-0.02445 to - 0.008736	Evet	****	<0.0001
raw - 28d	-0.015	-0.02281 to - 0.007099	Evet	****	<0.0001
H9N2					
raw - 0h	0.011	0.003345 to 0.01906	Evet	**	0.0011

raw - 6h	0.014	0.005781 to 0.02149	Evet	****	<0.0001
raw - 12h	0.019	0.01129 to 0.02701	Evet	****	<0.0001
raw - 18h	0.014	0.006533 to 0.02225	Evet	****	<0.0001
raw - 24h	0.015	0.007526 to 0.02324	Evet	****	<0.0001
raw - 1d	0.015	0.007446 to 0.02316	Evet	****	<0.0001
raw - 7d	0.017	0.008779 to 0.02449	Evet	****	<0.0001
raw - 14d	0.014	0.006342 to 0.02205	Evet	****	<0.0001
raw - 21d	0.015	0.007617 to 0.02333	Evet	****	<0.0001
raw - 28d	0.016	0.008131 to 0.02384	Evet	****	<0.0001
H4N5S1F1					
raw - 0h	-0.003	-0.01105 to 0.004665	Hayır		0.8761
raw - 6h	-0.005	-0.01266 to 0.003051	Hayır		0.4753
raw - 12h	-0.005	-0.01321 to 0.002504	Hayır		0.3489
raw - 18h	-0.008	-0.01560 to 0.0001139	Hayır		0.0556
raw - 24h	-0.009	-0.01721 to - 0.001500	Evet	*	0.0105

raw - 1d	-0.003	-0.01079 to 0.004927	Hayır		0.9202
raw - 7d	-0.007	-0.01501 to 0.0007076	Hayır		0.0943
raw - 14d	-0.009	-0.01680 to - 0.001083	Evet	*	0.0167
raw - 21d	-0.009	-0.01662 to - 0.0009098	Evet	*	0.0201
raw - 28d	-0.009	-0.01684 to - 0.001122	Evet	*	0.0160
H6N5F1					
raw - 0h	-0.010	-0.01775 to - 0.002037	Evet	**	0.0056
raw - 6h	0.000	-0.007570 to 0.008143	Hayır		0.9999
raw - 12h	-0.007	-0.01518 to 0.0005326	Hayır		0.0811
raw - 18h	0.003	-0.005309 to 0.01040	Hayır		0.9647
raw - 24h	-0.009	-0.01700 to - 0.001289	Evet	*	0.0133
raw - 1d	-0.005	-0.01265 to 0.003063	Hayır		0.4783
raw - 7d	-0.006	-0.01356 to 0.002154	Hayır		0.2800
raw - 14d	-0.006	-0.01386 to 0.001851	Hayır		0.2281
raw - 21d	-0.005	-0.01309 to 0.002626	Hayır		0.3753

raw - 28d	0.000	-0.007417 to 0.008296	Hayır		0.9998
-----------	-------	-----------------------	-------	--	--------

Ek-2.İstatiksel analizlerde anlamlı değişiklik gösterdiği belirlenen N-glikanlara ait sonuçlar (0. saat kontrol grubu olarak belirlenmiştir).

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
H4N2					
0h - raw	-0.00019	-0.008044 to 0.007669	Hayır		>0.9999
0h - 6h	-0.00035	-0.008209 to 0.007505	Hayır		0.9999
0h - 12h	-0.0007	-0.008559 to 0.007154	Hayır		0.9997
0h - 18h	0.000413	-0.007444 to 0.008270	Hayır		0.9998
0h - 24h	-0.00011	-0.007967 to 0.007746	Hayır		>0.9999
0h - 1d	2.30E-05	-0.007834 to 0.007880	Hayır		>0.9999
0h - 7d	0.000672	-0.007184 to 0.008529	Hayır		0.9997
0h - 14d	0.000401	-0.007456 to 0.008258	Hayır		0.9998
0h - 21d	0.000539	-0.007317 to 0.008396	Hayır		0.9997
0h - 28d	0.000428	-0.007429 to 0.008285	Hayır		0.9998

H3N3					
0h - raw	-0.00018	-0.008039 to 0.007674	Hayır		>0.9999
0h - 6h	-0.00017	-0.008031 to 0.007683	Hayır		>0.9999
0h - 12h	-0.00052	-0.008380 to 0.007333	Hayır		0.9997
0h - 18h	0.000494	-0.007362 to 0.008351	Hayır		0.9997
0h - 24h	1.87E-05	-0.007838 to 0.007875	Hayır		>0.9999
0h - 1d	0.000119	-0.007738 to 0.007975	Hayır		>0.9999
0h - 7d	0.000749	-0.007107 to 0.008606	Hayır		0.9996
0h - 14d	0.000589	-0.007267 to 0.008446	Hayır		0.9997
0h - 21d	0.000621	-0.007236 to 0.008478	Hayır		0.9997
0h - 28d	0.000443	-0.007414 to 0.008299	Hayır		0.9998
H5N2					
0h - raw	-0.00177	-0.009624 to 0.006089	Hayır		0.9963
0h - 6h	-0.00088	-0.008741 to 0.006972	Hayır		0.9996
0h - 12h	-0.00183	-0.009690 to 0.006023	Hayır		0.996
0h - 18h	0.0001	-0.007756 to 0.007957	Hayır		>0.9999
0h - 24h	-0.00037	-0.008229 to 0.007485	Hayır		0.9998
0h - 1d	-0.00063	-0.008484 to 0.007229	Hayır		0.9997
0h - 7d	0.000351	-0.007506 to 0.008208	Hayır		0.9999
0h - 14d	0.000243	-0.007614 to 0.008099	Hayır		0.9999
0h - 21d	0.000578	-0.007279 to 0.008434	Hayır		0.9997

0h - 28d	-0.00055	-0.008406 to 0.007308	Hayır		0.9997
H3N3F1					
0h - raw	-0.00043	-0.008282 to 0.007432	Hayır		0.9998
0h - 6h	-0.00055	-0.008408 to 0.007305	Hayır		0.9997
0h - 12h	-0.00191	-0.009770 to 0.005943	Hayır		0.9929
0h - 18h	0.000326	-0.007531 to 0.008183	Hayır		0.9999
0h - 24h	-0.00035	-0.008205 to 0.007509	Hayır		0.9999
0h - 1d	-0.00027	-0.008129 to 0.007584	Hayır		0.9999
0h - 7d	0.000161	-0.007696 to 0.008017	Hayır		>0.9999
0h - 14d	0.000493	-0.007364 to 0.008350	Hayır		0.9997
0h - 21d	0.000448	-0.007409 to 0.008305	Hayır		0.9998
0h - 28d	-0.00019	-0.008043 to 0.007670	Hayır		>0.9999

EK 3 –İstatiksel analizlerde anlamlı değişiklik gösterdiği belirlenen serbest süt oligosakkaritlerine ait sonuçlar (çiğ süt kontrol grubu olarak belirlenmiştir).

Dunnett's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Hex2					
raw - 0h	34.070	29.88 to 38.26	Evet	****	<0.0001
raw - 6h	40.150	35.96 to 44.34	Evet	****	<0.0001
raw - 12h	24.810	20.62 to 28.99	Evet	****	<0.0001
raw - 18h	9.712	5.524 to 13.90	Evet	****	<0.0001
raw - 24h	2.777	-1.411 to 6.964	Hayır		0.388
raw - 1d	5.903	1.716 to 10.09	Evet	**	0.001

raw - 7d	13.280	8.593 to 17.96	Evet	****	<0.0001
raw - 14d	9.992	5.600 to 14.38	Evet	****	<0.0001
raw - 21d	37.570	33.18 to 41.96	Evet	****	<0.0001
raw - 28d	17.110	12.43 to 21.79	Evet	****	<0.0001
Hex3					
raw - 0h	-33.380	-37.57 to -29.19	Evet	****	<0.0001
raw - 6h	-43.660	-47.84 to -39.47	Evet	****	<0.0001
raw - 12h	-7.498	-11.69 to -3.311	Evet	****	<0.0001
raw - 18h	-2.215	-6.402 to 1.972	Hayır		0.657
raw - 24h	-3.272	-7.459 to 0.9157	Hayır		0.211
raw - 1d	-4.488	-8.676 to -0.3010	Evet	*	0.029
raw - 7d	-5.544	-10.23 to -0.8626	Evet	*	0.011
raw - 14d	-3.521	-7.912 to 0.8711	Hayır		0.188
raw - 21d	0.659	-3.732 to 5.051	Hayır		0.999
raw - 28d	-3.797	-8.478 to 0.8849	Hayır		0.178

EK 4 –İstatiksel analizlerde anlamlı değişiklik gösterdiği belirlenen serbest süt oligosakkaritlerine ait sonuçlar (0. saat süt kontrol grubu olarak belirlenmiştir).

Dunnett's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Hex2					
0h - raw	-34.070	-38.26 to -29.88	Evet	****	<0.0001
0h - 6h	6.077	1.889 to 10.26	Evet	***	0.001
0h - 12h	-9.267	-13.45 to -5.079	Evet	****	<0.0001
0h - 18h	-24.360	-28.55 to -20.17	Evet	****	<0.0001

0h - 24h	-31.300	-35.48 to -27.11	Evet	****	<0.0001
0h - 1d	-28.170	-32.36 to -23.98	Evet	****	<0.0001
0h - 7d	-20.800	-25.48 to -16.12	Evet	****	<0.0001
0h -14d	-24.080	-28.47 to -19.69	Evet	****	<0.0001
0h - 21d	3.498	-0.8934 to 7.890	Hayır		0.194
0h - 28d	-16.960	-21.65 to -12.28	Evet	****	<0.0001
Hex3					
0h - raw	33.380	29.19 to 37.57	Evet	****	<0.0001
0h - 6h	-10.280	-14.46 to -6.089	Evet	****	<0.0001
0h -12h	25.880	21.69 to 30.07	Evet	****	<0.0001
0h - 18h	31.170	26.98 to 35.35	Evet	****	<0.0001
0h - 24h	30.110	25.92 to 34.30	Evet	****	<0.0001
0h - 1d	28.890	24.70 to 33.08	Evet	****	<0.0001
0h -7d	27.840	23.15 to 32.52	Evet	****	<0.0001
0h -14d	29.860	25.47 to 34.25	Evet	****	<0.0001
0h -21d	34.040	29.65 to 38.43	Evet	****	<0.0001
0h - 28d	29.580	24.90 to 34.26	Evet	****	<0.0001

EK 5 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

Aklar, B., Hayatu, A., Kayılı, H.M., Atakay, M., Kırmacı, H.A., Salih, B. (2022) "Investigation Of Changes In The N-Glycan Profiles Of Milk Glycoproteins In Fermentation And Storage Processes of Kefir", 4. International Congress On Life, Social, And Health Sciences In A Changing World, Çevrimiçi, Türkiye, (Şubat 2022).