

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKŞİHAMURLARDAN İZOLE EDİLEN
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN GLUTEN ÜZERİNE
PROTEOLİTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Seda GÜRE

Danışman: Prof. Dr. Sami ÖZÇELİK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA – 2009**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Ekşihamur Fermantasyonu	4
2. 1. 1. Ekşihamurun Teknik Özellikleri	6
2. 1. 1. 1. Gluten Proteinlerinin Kimyasal Yapıları	6
2. 1. 1. 2. Kıvam	8
2. 1. 1. 3. Sıcaklık	8
2. 1. 1. 4. Substrat	9
2. 1. 2. Ekşihamur Fermantasyonunda Rol Alan Mikroorganizmalar	10
2. 1. 3. Mikrobiyal Etkileşimler	13
2. 2. Ekşihamur Laktobasillerinin Ürüne Etkileri	14
2. 2. 1. Laktobasillerin Aroma Oluşumuna Katkısı	14
2. 2. 2. Laktobasillerin Hamur Yapısına Katkısı	15
2. 2. 3. Ekşihamur Laktobasilleri Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddeler	16
2. 2. 4. Ekşihamur Laktobasilleri Tarafından Antibesin Faktörlerinin İndirgenmesi ...	16
2. 3. Ekşihamurdaki Proteolitik Aktiviteler	17
2. 3. 1. Buğday ve Çavdar Unlarının Proteazları	17
2. 3. 2. Ekşihamur Laktik Asit Bakterileri (LAB)'nin Peptid Kullanımı ve Proteolitik Sistem	17
2. 3. 2. 1. Gluten Depolimerizasyonu ve Disülfid Bağlarının İndirgenmesi	18
2. 3. 2. 2. Ekşihamurun Fungal Enzimlerle Kombinasyonu	19
2. 4. Çölyak Hastalığı (Gluten Sensitiv Enteropati)	19

2. 4. 1. Hastalık Tablosu (Patogenez)	21
2. 4. 2. Çölyak Hastalığının Belirtileri (Semptomlar)	21
2. 4. 3. Çölyak Hastalığının Teşhisi	22
2. 4. 4. Çölyak Hastalığının Tedavisi	22
2. 5. Glutensiz Diyet	23
2. 5. 1. Türkiye’de Glutensiz Ürün Piyasası	25
2. 5. 2. Glutensiz Ürün Formülasyonları	26
2. 5. 3. Kalıntı Gluten Tehlikesi	27
2. 6. Ekşihamur LAB’nin Proteolitik Etkilerinin Gözlenmesi	28
3. MATERYAL ve METOD	30
3. 1. Materyal	30
3. 1. 1. Ekşihamur Örnekleri	30
3. 1. 2. İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri	30
3. 1. 3. Hazırlanan Ekşihamurlar	30
3. 2. Metodlar	31
3. 2. 1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	31
3. 2. 2. Glutenli Plak Testi	32
3. 2. 2. 1. Glutenli Besiyerinin Hazırlanması	32
3. 2. 2. 2. Kültürlerin Hazırlanması	33
3. 2. 2. 3. Kültürlerin Endo- ve Ekzo-enzimlerinin Eldesi	33
3. 2. 2. 4. Glutenli Besiyerine Aşılama (İnokülasyon)	34
3. 2. 2. 5. Plakların Boyanması ve Boyanın Uzaklaştırılması	34
3. 2. 3. API 50 CHL Tanımlama Testi	35
3. 2. 3. 1. API 50 CH Testinin Prensibi	35
3. 2. 3. 2. Kültürlerin Hazırlanması	36
3. 2. 3. 3. Aşılama Materyalinin (İnokulumun) Hazırlanması	36
3. 2. 3. 4. Şeritlere Aşılama	37
3. 2. 4. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinden Ekşihamur Yapımı	37
3. 2. 5. Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	38
3. 2. 5. 1. SDS-PAGE’in Çalışma Prensibi	38

3. 2. 5. 2. Ekşihamurlardan Proteinlerin Ekstraksiyonları	39
3. 2. 5. 3. SDS-PAGE Uygulaması	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	42
4. 1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon Sonuçları	42
4. 2. Gluten Plak Testi Sonuçları	43
4. 3. API 50 CHL Tanımlama Testi Sonuçları	44
4. 4. SDS-PAGE Sonuçları	48
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	55
6. KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	63

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EKŞİHAMURLARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN GLUTEN ÜZERİNE PROTEOLİTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Seda GÜRE

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Jüri: Prof. Dr. Sami ÖZÇELİK (Danışman)
Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER
Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Ekşihamur, tipik özellikleri başlıca laktik asit bakterileri ve mayalardan oluşmuş mikrobiyotasından gelen bir hamurdur. Yaptığımız çalışmada, farklı fırınlardan toplanan ekşihamurlardan, laktik asit bakterileri izole edilmiş ve API 50 CHL test kitleri kullanılarak *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactococcus lactis*, *Weissella confusa* ve *Pediococcus pentosaceus* olmak üzere beş farklı tür tespit edilmiştir. Bu türlerin gluten üzerine proteolitik etkilerinin araştırılması için ekzoenzimlerini ve endoenzimlerini ayrı ayrı ve karışık halde içeren preparatlar hazırlanarak oyuk agarlı glutenli besiyerinde bu preparatların aşılacağı oyukların etrafında inkübasyon sonunda zon oluşumu incelenmiştir. Ancak zon oluşumu hiçbirinde gözlenmemiştir. Bakteri kültürlerinden ekşihamurlar yapılarak nötral ve asit ilave edilmiş kontrol hamurları ile birlikte 30 °C'de inkübe edilmişlerdir. 24 sa ve 48 sa sonlarında hamurlardan buğday depo proteini olarak adlandırılan gluteni oluşturan iki temel fraksiyon, gliadin ve glutenin proteinleri izole edilmiştir. SDS-PAGE jellerinde izole edilen proteinlerin oluşturdukları bantlar incelendiğinde, bakteri aşılama hamurlarda her iki protein fraksiyonlarında hidroliz gözlenmiştir. Proteolitik aktivite 48 sa boyunca etkili olmuştur. Özellikle *Pc. pentosaceus*, *Lb. curvatus* ve *Lb. plantarum*'un gliadin üzerine proteolitik aktiviteleri gözlenmiştir. Glutenli besiyerinde zon oluşumunun gözlenmemesinin nedeni, laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitelerinin büyük moleküllü proteinler yerine peptidler üzerine etkili olması olabilir.

Laktik asit bakterilerinin gluten proteinleri üzerine proteolitik aktiviteleri, glutenin çölyak hastaları üzerine toksik özellik gösteren fraksiyonlarının parçalanması bakımından öneme sahiptir. Bu nedenle çölyaklılar için formüle edilen glutensiz veya gluteni azaltılmış ürünlerde ekşihamur kullanımı, hem ürünün teknik özelliklerini geliştirecek, hem de kalıntı gluten riskini azaltacaktır.

Anahtar Kelimeler: Ekşihamur, Laktik Asit Bakterileri, Gluten, Gliadin, Glutenin, Proteoliz, Çölyak Hastalığı, SDS-PAGE

2009, 65 sayfa

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

DETERMINATION OF PROTEOLYTIC EFFECTS OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM SOURDOUGHS ON GLUTEN

Seda GÜRE

Süleyman Demirel University Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Food Engineering

Thesis Committee: Prof. Dr. Sami ÖZÇELİK (Supervisor)
Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER
Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Sourdough is reported to be a dough whose typical characteristics are mainly due to its microflora, basically represented by lactic acid bacteria (LAB) and yeasts. In our study, LAB are isolated from sourdoughs that we collected from different bakerys. Five species are determined as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactococcus lactis*, *Weissella confusa* and *Pediococcus pentosaceus* by using API 50 CHL test kits. These species are tested for their proteolytic activities on gluten by gluten plate tests. Their endoenzyme and exoenzyme preparations are inoculated in wells on gluten containing agar medium, seperately and in combination. But no zone formation is ocured on any of plates. Cultures of isolated bacteria are used to make sourdoughs. They are incubated with neutral and chemically asidified control doughs at 30 °C. After 24 and 48 hours, gliadin and glutenin proteins which are two fractions of gluten, major storage protein of the wheat grain, are isolated from sourdoughs and control doughs. According to protein bands on SDS-PAGE gels, both protein fractions are hydrolyzed in fermented sourdoughs. Proteolytic activity is observed during 48 hours fermentation. Especially, *Pc. pentosaceus*, *Lb. curvatus* and *Lb. plantarum* species had proteolytic activities on gliadin. A reason for no zone formation on gluten plates may be the fact that proteolytic activities of LAB are mainly due to peptide hydrolysis rather than the degradation of high molecular weight proteins.

Proteolytic acitivities of LAB on gluten is considered to be important in point of degradation of toxic fractions of gluten for celiac patients. Therefore, use of sourdough in gluten-free or gluten-reduced products which are formulated for celiac patients, can reduce the risk of gluten contamination in the product as well as improve technical properties of products.

Key Words: Sourdough, Lactic Acid Bacteria, Gluten, Gliadin, Glutenin, Proteolisis, Celiac Disease, SDS-PAGE

2009, 65 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamda beni bilgi ve tecrübesiyle yönlendiren değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Sami ÖZÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda bana yardımcı olan ve beni bilgilendiren değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Yasin TUNCER'e katkı ve ilgilerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca benden esirgemediği destek ve yardımlarından dolayı sevgili arkadaşlarım Esra ARTAN'a ve Tuğba DEDEBAŐ'a teşekkür ederim.

1560-YL-07 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında arkamda duran en büyük destekçim olan değerli aileme ve sevgili arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Seda GÜRE
ISPARTA, 2009

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Ekşihamur üretim işlemleri	5
Şekil 2.2 Sağlıklı bir bireyin intestinal epitel dokusu ve villuslar; çölyak hastalarında intestinal epitelde görülen villusların harabiyeti	20
Şekil 4.1 Ekşihamurlardan izole edilen mikroorganizmaların mikroskop görüntüleri .	42
Şekil 4.2 Glutenli besiyerinin inkübasyon sonrası görünüşleri	44
Şekil 4.3 Farklı kültürlerin aşılacağı API kitlerinin inkübasyon sonucu görünüşleri	47
Şekil 4.4 Ekşihamurlardan 24 sa inkübasyon sonunda izole edilen gliadin proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüleri	49
Şekil 4.5 Ekşihamurlardan 48 sa inkübasyon sonunda izole edilen gliadin proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüleri	50
Şekil 4.6 Ekşihamurlardan 24 sa inkübasyon sonunda izole edilen glutenin proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüleri	51
Şekil 4.7 Ekşihamurlardan 48 sa inkübasyon sonunda izole edilen glutenin proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüleri	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Fermente ekşihamurda bulunan <i>Lactobacillus</i> türleri	11
Çizelge 2.2 Ekşihamur tipleri ve mikroflorası	11
Çizelge 3.1 API 50 CH test kitinde yer alan substrat karbonhidratlar	36
Çizelge 3.2 Kontrol hamurlarının ve ekşihamurların hazırlanmasında kullanılan formülasyon	37
Çizelge 3.3 SDS-PAGE Uygulamasında kullanılan çözeltiler	41
Çizelge 4.1 Ekşihamurlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin morfolojik özellikleri	43
Çizelge 4.2 API şeritlerinde kültürlerin gelişmelerine bağlı olarak gözlenen pozitif ve negatif sonuçlar	45
Çizelge 4.3 İzole edilen kültürlerin tespit edilen türleri	46

1. GİRİŞ

Ekşihamur, içeriğinde çeşitli laktik asit bakterilerini ve bazı mayaları barındıran ve bu mikroorganizmaların canlılığına bağlı olarak yeni hamur yapımında sürekli yenilenebilen ve özelliklerini bu mikrofloranın metabolik aktivitelerinden alan, düşük pH'a sahip (pH ~4) bir hamurdur.

Ekşihamurdan *Leuconostoc* (genellikle *Leuconostoc mesenteroides*), *Weissella*, *Pediococcus* (genellikle *Pediococcus pentosaceus*), *Lactococcus*, *Enterococcus* ve *Streptococcus* cinslerine ait türler izole edilse de, ekşihamurda en sık gözlenen bakteriler *Lactobacillus* suşlarıdır. *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. pontis* ve *Lb. reuteri* ekşihamurlardan en sık izole edilen laktobasillerdir (Gül vd., 2005; De Vuyst ve Neysens, 2005; Gerez vd., 2006; Corsetti ve Settanni, 2007).

Ekşihamur kullanımı, en eski biyoteknolojik işlemlerdendir. Ekşihamur fermantasyonu fırıncılık ürünlerinin üretiminde önemini korumaktadır. Çünkü; ekşihamur, ekmek hamurunun daha iyi işlenebilmesini sağlayarak teknolojik özelliklerini; fitat hidrolizi ve serbest amino asit artışlarına bağlı olarak besinsel özelliklerini; ekmek hacmi, ekmek içi yapısı ve benzersiz aroması gibi organoleptik özelliklerini iyileştirmede ve raf ömrünün uzamasında önemli rol oynar. Ekşihamur laktik asit bakterilerinin (LAB'nin) ekmek kalitesini etkileyen metabolik aktiviteleri şunlardır:

1. Proteolitik aktiviteleri,
2. Uçucu aroma bileşenlerinin ve aroma öncü maddelerinin oluşumu,
3. Kızarmış aromasını arttıran arjinin metabolizması,
4. Antibakteriyel bileşiklerin, antifungal maddelerin üretimi ve
5. Ekmek yapısını, bayatlamasını ve raf ömrünü etkileyen eksopolisakkaritlerin üretimi gibi aktivitelerdir (De Vuyst ve Neysens, 2005) .

Buğdayda depo proteini olan gluten kompleksi, başlıca iki grup proteinden oluşur: Gliadin (prolamin) ve Glutenin (glutelin). Prolaminler % 50-70'lik alkolde çözünebilen proteinlerdir. Glutelinler ise seyreltik asit ve baz çözeltilerinde çözünen proteinlerdir.

Çölyak hastalığı ya da **glutene duyarlı enteropati**, insanlarda oldukça sık görülen otoimmün karakterli ve besin kökenli bir ince barsak hastalığıdır. Hastalığı olan kişilerde gluten içeren gıdaların diyetten eklenmesinden sonra ince barsaklardaki villus adı verilen parmaklı çıkıntılar vücudun bu maddeye karşı oluşturduğu iltihabi bir reaksiyon sonrasında hasar görür ve yok olur. Böylece diğer besinlerin sindirimi ve emilimi de bozulur ve malabsorpsiyon (kötü emilim) sendromu denilen bir hastalık tablosu ortaya çıkar. Demir, folik asit, kalsiyum ve yağda çözünen vitaminler gibi önemli besin maddelerinin absorpsiyonu düşer (Ulusoy vd., 2002; Kutlu, 2005; Katina vd., 2005).

Mukozal hasardan prolaminler sorumlu tutulmasına rağmen son yıllarda glutenin'in de mukozal hasara yol açabileceği gösterilmiştir (Ulusoy vd., 2002; Erdil ve Ateş, 2005).

Günümüzde tüm çölyaklı hastaların glutensiz diyetten tam olarak uyması ve ömür boyu sürdürmesi gerekmektedir. Gluten genellikle ekmek yapımı için yapısal protein olarak tanımlanır. Gluten olmadığında, kolay ufalanır yapıda, soluk renkli ve diğer kalite bozukluklarına sahip bir ekmek elde edilir. Son yıllarda glutensiz fırıncılık ürünlerinin yapısını, ağız hissini, reolojisini, aromasını, kabul edilebilirliğini ve raf ömrünü geliştirmek için bazı katkıların kullanımı üzerine çok fazla çalışma yapılmaktadır. Bazı ülkelerde (ABD ve Kanada gibi), glutensiz diyet hiç gluten içermez ve pirinç ve mısır gibi doğal olarak glutensiz olan ürünlerden yapılır. Diğer bazı ülkelerde ise (İskandinav ülkeleri ve İngiltere gibi), glutensiz diyet; glutensiz diyet sunulan ancak yine de düşük miktarlarda toksik prolaminler içerebilen buğday nişastası gibi katkıları içerir (Thompson, 2001).

LAB'nin proteolitik aktivitesi, çölyak hastalığında etkili olan gluten (gliadin) kaynaklı belirli allerjen bileşenleri azaltmak için bir araç olabilir (Rollán vd., 2005). Bunun

yanında, ekşihamur fermantasyonundaki proteoliz ile ilgili bilgiler, fermantasyon işlemlerinin optimizasyonunu kolaylaştırır. Böylece, ekmeklerin ve diğer tahıl ürünlerinin aroma ve yapısının geliştirilmesinde fayda sağlar.

Bu çalışmada, ekşihamur teknolojisi, mikrobiyolojisi ve fonksiyonlarından bahsedilmiştir. Buğday proteinleri ve bunların tüketimleriyle toksik özellik gösterdikleri çölyak hastalığı hakkında bilgi verilmiştir. Ekşihamur fermantasyonunda aktif proteolitik sistemden bahsedilmiş ve bunların gluten proteinleri üzerine parçalayıcı etkileri ile ilgili çalışmalara yer verilmiştir. Ayrıca Isparta ilinde farklı fırınlardan toplanan ekşihamurların mikrobiyal içeriği araştırılmış, bunların tanımlamaları yapılmıştır. Tanımlanan farklı bakteri kültürleriyle yarı-sıvı formda ekşihamurlar fermente edilerek fermantasyon sonrası gluten muhteviyatı, fermente edilmeyen nötr ve kimyasal yolla asitlendirilmiş hamurlar ile kıyaslanarak gluten proteolizi araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Ekşihamur Fermantasyonu

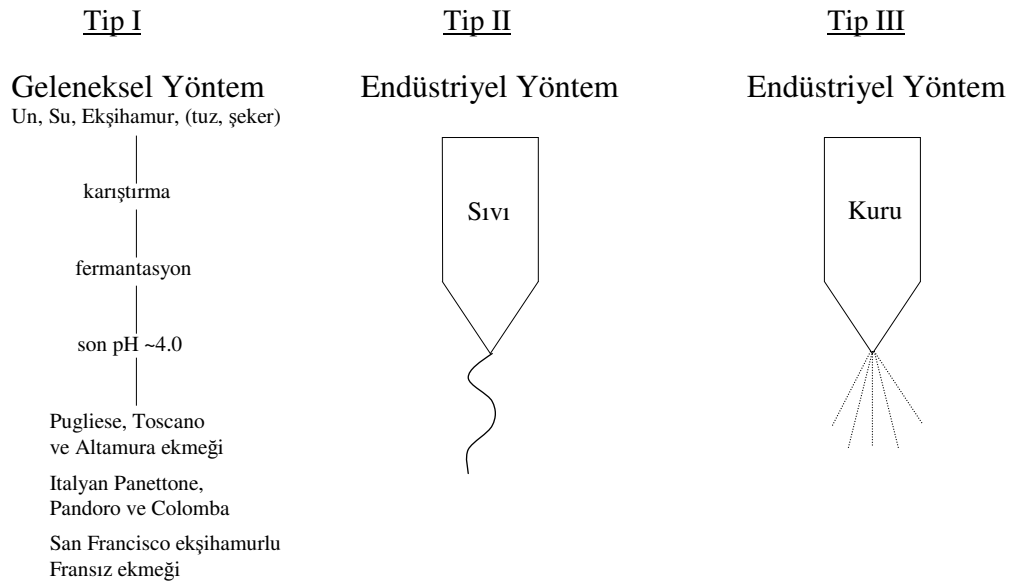
Ekşihamur, tipik özellikleri, başlıca laktik asit bakterileri ve mayalardan oluşmuş mikroflorasından gelen bir hamur olarak tanımlanır. Mikrobiyal bileşimi sayesinde böyle bir hamur metabolik olarak aktiftir ve tekrar aktive edilebilir (Corsetti ve Settanni, 2007).

Ekşihamur kullanımı, en eski biyoteknolojik işlemlerdendir. Bunun ana fonksiyonu daha gazlı bir hamur parçası ve daha hacimli bir ekmek üretmek için hamuru kabartmasıdır (Decock ve Cappelle, 2005). Daha sonraları hamurun kabartılması için bira mayası kullanılmaya başlanmıştır. Ekşihamur ekmeği 5000 yıldır Avrupalıların diyetinin bir parçası olmasına rağmen, kabartılmış hamurun pişirilmesine dair ilk kanıtlar MÖ 1500'lerde Mısırlılara ait duvar resimlerinde görülmektedir (Corsetti ve Settanni, 2007).

Buğday unu ekmeği üretimi 19. yy'da, bir gluten ağı oluşturmak üzere unun ve suyun yavaşça karıştırılmasıyla başlayan ve uzun süreli fermantasyon uygulanan uzun bir işlemdir. Yavaş karıştırma ve uzun dinlendirme sürelerine bağlı olarak ekmeklerde çok hoş bir aroma oluşmaktaydı. Sonraki dönemlerde ilk fermantasyon basamağı olan kitle fermantasyonu, fırıncılığın mekanizasyonu ile ya kısaltılmış ya da tamamen kaldırılmıştır. Buna bağlı olarak aroma kayıplarının telafi edilebilmesi için bazı fırınlarda kurutulmuş ekşihamur ilavesi uygulanmaktadır (Decock ve Cappelle, 2005).

Ekşihamur üretim yöntemi, uygulanan teknolojiye göre tip I, tip II ve tip III olmak üzere 3 grup altında incelenebilir: (Şekil 2.1). Tip I ekşihamurlar önceki fermantasyondan bir parça kullanılarak tekrar fermente edilen ekşihamurdur. Bunlar geleneksel yöntemlerle üretilirler ve mikroorganizmaları aktif bir fazda tutmak üzere sürekli, günlük tazelemelerle karakterize edilir. Tip II ekşihamurlar, fermantasyonu başlatmak için adapte olmuş suşların kullanıldığı, endüstriyel tip ekşihamurdur. Bu ekşihamur sıvı

olabilir, böylece endüstriyel fırıncılıkta kolayca pompalanabilir. Bunlar, uzun fermantasyon periyodlarıyla (2-5 gün) ve bazen işlemi hızlandırmak için 30 °C'den yüksek sıcaklıklarla karakterize edilen yarı-akışkan silo preparatlarıdır. Tip III ekşihamurlar kurutma işlemine dayanıklı laktik asit bakterilerini (heterofermentatif *Lb. brevis* ve fakültatif heterofermentatif *Pc. pentosaceus* ve *Lb. plantarum* suşları) içeren kurutulmuş preparasyonlardır. Ekmek yapımında asitlendirici katkılar ve aroma taşıyıcılar olarak kullanılırlar. Kurutma işlemi (sprey kurutma veya tamburlu kurutma) ekşihamurun raf ömrünü uzatır. Kalitenin sabit olması ve ekşihamurun taze üretilmesine bağlı olarak son ürün farklılıkları olmaması nedenleriyle bu tip ekşihamurlar endüstriyel fırıncılıkta sıklıkla kullanılır. Tip III ekşihamurlar, günümüzün yüksek teknoloji fırıncılık endüstrisinde otantik ekmek tadını katmak için en uygun yoldur. Tip I ekşihamurlardan farklı olarak, tip II ve tip III ekşihamurlarda kabartma ajanı olarak ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) ilavesi gereklidir (Decock ve Cappelle, 2005; De Vuyst ve Neysens, 2005; Kitahara vd., 2005; Corsetti ve Settanni, 2007).



Şekil 2.1. Ekşihamur üretim işlemleri (Corsetti ve Settanni, 2007)

Ekşihamurun kendine özgü pek çok özelliği, içerdiği laktik asit bakterilerinin metabolik aktivitelerine dayanır. Laktik asit fermantasyonu, proteoliz, uçucu bileşenlerin sentezi, antifungal ve anti-rop özellikleri, ekşihamur fermantasyonundaki en önemli aktivitelerdendir. Ayrıca, tahıl ürünlerindeki karbonhidratlar, nitrojen kaynakları, mineraller, lipidler, serbest yağ asitleri ve enzim aktiviteleri gibi endojen faktörler ve sıcaklık, hamur verimi, oksijen, fermantasyon süresi ve ekşihamur üretme basamaklarının sayısı gibi işlem parametreleri ekşihamurun mikroflorasını ve kabartılmış fırın ürünlerinin özelliklerini belirgin şekilde etkiler (Corsetti ve Settanni, 2007).

2. 1. 1. Ekşihamurun Teknik Özellikleri

2. 1. 1. 1. Gluten Proteinlerinin Kimyasal Yapıları

Tahıllarda bulunan proteinler çözünürlükleri bakımından; prolaminler, glutelinler, albuminler, globulinler ve diğer proteinler (başlıca proteoz) olmak üzere 5 gruba ayrılırlar. Albuminler suda çözünürler. Ayrıca sıcaklıkla koagüle olurlar. Globulinler saf suda ve yüksek tuz konsantrasyonlarında çözünmezken, seyreltik tuz çözeltilerinde çözünebilirler, ısıyla koagüle olurlar. Prolaminler % 50-70'lik alkolde çözünebilir proteinlerdir. Glutelinler ise seyreltik asit ve baz çözeltilerinde çözünen proteinlerdir ve iki fraksiyon da ısıyla koagüle olurlar. Proteozlar ise suda çözünen fakat ısıyla koagüle olmayan, bu nedenle hidrolizasyonla meydana gelen proteinlerdir (Pylar, 1988).

Prolamin ve glutelin proteinleri farklı tahıl cinslerinde molekül yapılarındaki farklılıklar nedeniyle ayrı isimlerle adlandırılırlar. Buğday prolaminine “gliadin”, çavdardakine “sekalin”, mısırdakine “zein”, arpadağakine “hordein”, yulaftakine “avenin” adı verilir. Yulafta bulunan avenin genetik olarak secalin ve hordeinden daha az glutene benzer (Hoseney, 1994; Erdil ve Ateş, 2005).

Gliadin glutamin ve proline zengin protein moleküllerinin karışımından meydana gelmiştir. Gliadinler elektroforetik olarak moleküler ağırlıklarına göre dört ayrı gruba ayrılırlar: alfa (α), beta (β), gama (γ) ve omega (ω) gliadinler. Ancak amino asit dizilimlerine göre α - ve β -gliadinlerin aynı gruba düştüğü görülmüştür (Wieser, 2007). Bunların hepsi çölyak hastalarında toksik etki gösterirler. Mukozal hasardan prolaminler sorumlu tutulmasına rağmen son yıllarda glutenin'in de mukozal hasara yol açabileceği gösterilmiştir (Ulusoy vd., 2002; Erdil ve Ateş, 2005).

Gliadinler benzer özelliklere sahip geniş bir protein grubudur. Molekül ağırlıkları ortalama olarak 40000 Da' dur (28000-55000 Da arasında değişir) ve tek zincirli proteinlerdir. Glutenin proteinleri ise, heterojen bir protein grubudur. Yüksek molekül ağırlıklı (HMW) altbirim (MW=67000-88000 Da) ve düşük molekül ağırlıklı (LMW) altbirim (MW=32000-35000 Da) olarak farklılık göstermektedir. Glutenin fraksiyonu zincir içi disülfid bağlarıyla bağlanmış protein kümelerini kapsar ve 100000 den 10 milyonun üzerine kadar farklı boyutlara sahiptirler. Gliadin ve glutenin, gluten kompleksini oluşturarak hamurun reolojik özelliklerine etki ederler. Fakat işlevleri farklıdır. Sulandırılmış gliadinler düşük elastikiyete sahiptir ve gluteninlerden daha az yapışkandır. Uzamaya karşı direnç göstermezler. Bu nedenle gliadinler hamurun başlıca viskozitesine ve uzayabilirliğine katkıda bulunurlar. Buna karşın, sulandırılmış gluteninler hem yapışkan hem de elastiktir ve hamurun dayanıklılığında ve elastikiyetinden sorumludurlar. Gluteninlerin molekül ağırlıklarının dağılımı, hamur özelliklerinin ve ekmek pişirme kalitesinin başlıca belirleyicisidir. "Glutenin makropolimerleri" olarak tanımlanan en geniş polimerler hamur özelliklerine en fazla katkıyı sağlar ve buğday unundaki miktarları (\approx 20-40 mg/g) hamur dayanıklılığı ve somun hacmi ile kuvvetle ilişkilidir. Hamurun viskoelastik özelliklerini kazanması ve kaliteli bir son ürün için, her iki fraksiyonun da (gliadinler ve gluteninler) uygun bir karışımı gereklidir (Wieser, 2007; Gänzle vd., 2008).

Bu yapısal özellikleri nedeniyle gluten, hamurda yapı oluşturucu zorunlu proteindir ve pek çok fırıncılık ürünlerinin görünüşüne ve iç yapısına katkıda bulunur. Gluten

matriksi, hamurun elastikiyet, uzayabilirlik, uzamaya karşı direnç, yoğurma toleransı ve gaz tutma kapasitesi gibi önemli reolojik özelliklerinin başlıca belirleyicisidir (Lazaridou vd., 2007).

2. 1. 1. 2. Kıvam

Ekşihamurlar, kıvam yönünden farklılık gösterebilirler. Ekşihamur fermantasyonu, katı bir hamur olarak veya unun su içerisinde süspansiyonu şeklinde gerçekleştirilebilir. Un ve su arasındaki bu orana “Hamur Verimi” (HV) denir ve şu şekilde ifade edilir:

$$HV = \frac{(un\ miktarı + su\ miktarı) \times 100}{un\ miktarı} \quad (2.1)$$

Buğday ekşihamurları için HV değeri şunu ifade eder: HV 160 olan bir buğday ekşihamuru katı bir hamurken; HV 200 olan hamur sıvı bir ekşihamurdur (Decock ve Cappelle, 2005).

Ekşihamurun HV değeri, ekşi hamurun aroma profilini de önemli derecede etkilemektedir. Daha katı bir ekşihamurda (düşük HV değerli) daha fazla asetik asit, daha az laktik asit üretilir. Laktik asitin aroması nisbeten daha hafifken asetik asit keskin bir asit tadına sahiptir ve hemen algılanır. Aynı zamanda ekşihamurun HV değerinden asitlenme hızı da etkilenir. Yüksek HV değerlerinde daha hızlı bir asitlenme meydana gelir. Bunun nedeni de muhtemelen üretilen organik asitlerin ortama daha iyi difüzyonudur (Decock ve Cappelle, 2005).

2. 1. 1. 3. Sıcaklık

Fermantasyon sırasındaki ikinci önemli parametre sıcaklıktır. Asitlenme hızına sıcaklık da etki eder. Ayrıca sıcaklığın ekşihamurun mikrobiyal içeriğine de etkisi vardır. Önceki ekşihamurun bir parçası, bir sonraki fermantasyonun aşılınması için kullanıldığında

sıcaklığın önemi artar. Sıcaklığa dikkat edilmezse ekşihamur yenilemelerinde mikrofloranın bir kısmı kaybedilebilir (Decock ve Cappelle, 2005).

2. 1. 1. 4. Substrat

Ekşihamur fermantasyonunda kullanılan substrat, özellikle un, ekşihamurun son aromasını ve asitliğini etkileyen dördüncü parametredir (Decock ve Cappelle, 2005).

Kül İçeriği: Kepek fraksiyonu daha fazla mineral ve mikro besinler içerir. Bunlar da laktik asit bakterilerinin gelişimi için önemlidir. Kül aynı zamanda ekşihamur sisteminin tamponlama kapasitesini de etkiler. Bu tamponlama kapasitesine bağlı olarak, daha yüksek bir toplam titre edilebilen aktivite (TTA)'ye ulaşılabilir.

$$TTA = \frac{0,1 N NaOH \text{ miktarı}}{10 g \text{ ekşihamur}} \quad (\text{pH } 8,4' \text{ e ulaşmak için}) \quad (2.2)$$

Bu TTA değeri, ekşihamur fermantasyonu boyunca üretilen organik asitlerin toplam miktarını gösterir (Decock ve Cappelle, 2005).

Düşme Sayısı (Falling Number): Unun düşme sayısı, unun enzimatik aktivitesinin bir göstergesidir. Daha düşük değerler unda daha yüksek amilaz aktivitesini gösterir. Bu durumda, mikroflora için daha fazla serbest şeker açığa çıkacaktır. Ancak çok yüksek amilaz aktivitesi ekmekçilikte istenmez. Çünkü ekmek içinin yapışkan ve ekmek hacminin düşük olmasına neden olur (Decock ve Cappelle, 2005).

2. 1. 2. Ekşihamur Fermantasyonunda Rol Alan Mikroorganizmalar

Fermente gıda uygulamalarının çoğunda laktik asit bakterilerinin homofermentatif türlerinin kullanılmasına karşın, ekşihamur fermantasyonunda heterofermentatif türler büyük bir rol oynar. Şimdiye kadar, ekşihamurdan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin 50'ye yakın farklı türü rapor edilmiştir. Ekşihamurdan *Leuconostoc* (genellikle *Leuconostoc mesenteroides*), *Weissella*, *Pediococcus* (genellikle *Pediococcus pentosaceus*), *Lactococcus*, *Enterococcus*, ve *Streptococcus* cinslerine ait türler izole edilse de, bu ekosistemde en sık gözlenen bakteriler *Lactobacillus* suşlarıdır. *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *L. pontis* ve *L. reuteri* ekşihamurlardan en sık izole edilen laktobasillerdir. Son zamanlarda tanımlanan *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus mindensis*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus rossiae*, *Lactobacillus acidifarinae*, *Lactobacillus zymae*, *Lactobacillus hamnesii*, *Lactobacillus mantensis*, *Lactobacillus siliginis* türleri ilk olarak ekşihamurlardan izole edilmişlerdir (De Vuyst ve Neysens, 2005; Gül vd., 2005; Gerez vd., 2006; Kitahara vd., 2005; S.-ur-Rehman vd., 2006; Corsetti ve Settanni, 2007; Zotta vd., 2007).

Zorunlu ve fakültatif heterofermentatif ve zorunlu homofermentatif türlerden oluşan ekşihamur laktobasilleri (Çizelge 2.1), tip I, tip II, tip III ekşihamurlar ve tip 0 hamur ile ilişkilidir (Çizelge 2.2). Başlıca fermentasyon ajanı ekmek mayası olan tip 0 hamur, ekşihamur teknolojisi ile üretilmez (Corsetti ve Settanni, 2007).

Çizelge 2.1. Fermente ekşihamurda bulunan *Lactobacillus* türleri (Corsetti ve Settanni, 2007)

Zorunlu heterofermentatif	Fakültatif heterofermentatif	Zorunlu homofermentatif
<i>Lb. acidifarinae</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. amylovorus</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. delbrueckii subsp.delbrueckii</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. paralimentarius</i>	<i>Lb. farciminis</i>
<i>Lb. frumenti</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. mindensis</i>
<i>Lb. fructivorans</i>		<i>Lb. crispatus</i>
<i>Lb. hilgardii</i>		<i>Lb. johnsonii</i>
<i>Lb. panis</i>		<i>Lb. amyolyticus</i>
<i>Lb. pontis</i>		
<i>Lb. reuteri</i>		
<i>Lb. rossiae</i>		
<i>Lb. sanfranciscensis</i>		
<i>Lb. siliginis</i>		
<i>Lb. spicheri</i>		
<i>Lb. zymae</i>		

Çizelge 2.2. Ekşihamur tipleri ve mikroflorası (Arendt vd., 2007)

LAB		Mayalar	
Tip I	Tip II	Tip I	Tip II
Dominant			
<i>Lb. sanfranciscensis</i>	<i>Lb. pontis</i> <i>Lb. panis</i>	<i>C. humilis</i>	-
Genellikle İzole Edilenler			
<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>S. exiguous</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. crispatus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Issatchenkia</i>
<i>Lb. fructivorans</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Issatchenkia</i>	<i>orientalis</i>
<i>Lb. paralimentarius</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>orientalis</i>	
<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. reuteri</i>		
<i>Lb. plantarum</i>			
<i>Lb. pontis</i>			
<i>Lb. spicheri</i>			
<i>Lc. mesenteroides</i>			
<i>W. confusa</i>			
Diğer Tespit Edilenler			
<i>Lb. hammesii</i>	<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>Lb. mindensis</i>	<i>Lb. frumenti</i>	<i>C. boidinii</i>	
<i>Lb. mantensis</i>	<i>Lb. johnsonii</i>	<i>Debaromyces hansenii</i>	
<i>Lb. rossiae</i>	<i>Lb. mucosae</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	
<i>Pediococcus spp.</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Galactomyces</i>	
<i>W. cibaria</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>geotrichum</i>	
		<i>Torulaspota</i>	
		<i>pretoriensis</i>	
C.: <i>Candida</i> ; Lb.: <i>Lactobacillus</i> ; Lc.: <i>Leuconostoc</i> ; S.: <i>Saccharomyces</i> ; W.: <i>Weissella</i>			

Glukozdan başlayarak, homofermentatif laktik asit bakterileri glikoliz (homolaktik fermantasyon) yoluyla başlıca laktik asit üretirken, heterofermentatif laktik asit bakterileri laktik asitin yanında CO₂, asetik asit ve/veya etanol (elektron akseptörü olarak görev yapan ilave substratların varlığına bağlı) üretir (Corsetti ve Settanni, 2007).

Ekşihamurlarda genellikle mayalar da laktik asit bakterileri ile ilişkilidir ve maya/LAB oranı genellikle 1:100'dür (De Vuyst ve Neysens, 2005). Ekşihamurlarda bulunan mayalar 20'den fazla türe aittir. Sıklıkla baskın bulunan *S. cerevisiae* (S.-ur-Rehman vd., 2006) genellikle ekmek mayası ilavesiyle gelir (Corsetti vd., 2001). Ekşihamurda laktik asit bakterileriyle ilişkili tipik mayalar, *Saccharomyces exiguus*, *Candida humilis* (daha önce *Candida milleri* olarak tanımlanmıştır), *Candida kruseri*, *Pichia norvegensis*, *Hansenula anomala*, *Torulopsis holmii* ve *Issatchenkia orientalis* (*Candida kruseri*)'dir (Gül vd., 2005; Corsetti ve Settanni, 2007).

Bulunan türlerin sayısı ve tipindeki çeşitlilik; hamur hidrasyonu (hamur verimi-HV), kullanılan tahıl tipi, mayalanma sıcaklığı gibi bazı faktörlere bağlıdır (Corsetti ve Settanni, 2007). Geleneksel hamur yapımında ekşihamur laktobasillerinin baskın olarak bulunmasına bazı faktörler etkilidir. Birincisi, karbonhidrat metabolizmaları, hamurdaki başlıca enerji kaynakları olan maltoz ve fruktoza iyi adapte olmuştur. İkincisi, gelişmeleri için gerekli şartlar, sıcaklık ve pH bakımından ekşihamur fermantasyonu sırasında oluşan koşullarla uyum sağlamaktadır. Üçüncü olarak, ekşihamur laktobasilleri, asit, yüksek/düşük sıcaklıklar, yüksek ozmotik basınç/dehidrasyon, oksidasyon ve yetersiz besin gibi olumsuz koşulları yenebilmek için bazı stres cevap mekanizmalarına sahiptir. Bu üç faktör, bu türlerin rekabet gücünü ve ortama adaptasyonunu arttırır. Dördüncü olarak, antimikrobiyal bileşenlerin, hem organik asitlerin (laktat, asetat ve diğerleri), hem de protein yapıdaki bileşenlerin (bakteriyosinler gibi) üretimi, rekabet güçlerini arttırır ve bunların ekşihamur fermantasyonlarında stabil olarak kalmalarına yardımcı olur (De Vuyst ve Neysens, 2005).

Laktik asit bakterilerinin hem homofermentatif hem de heterofermentatif türleri, daha çok hamurun asidifikasyonuna katkı sağlarken, mayalar öncelikle kabartmadan sorumludur. Bununla birlikte, heterofermentatif laktik asit bakterilerinin de kabartma işlemine kısmen katkıda bulunduğu bilinmektedir (Gobbetti vd., 1995; Corsetti ve Settanni, 2007).

2. 1. 3. Mikrobiyal Etkileşimler

Tüketici ve endüstri taleplerini karşılamaya çalışırken ekşihamurların bölgesel özelliklerinin çeşitliliğini koruyabilmek için birbiri ile ilişkili laktik asit bakterilerinin ve mayaların stabilitesini sağlamak gereklidir. Laktobasiller ile mayalar arasındaki antagonistik ve sinerjik etkileşimlerin önemi karbonhidratların ve amino asitlerin metabolizması ve karbondioksit üretimine dayanır (De Vuyst ve Neysens, 2005). Laktik asit bakterileri ve mayalar arasındaki stabil ortak metabolizma pek çok gıdada yaygındır. Bu durum fermente edilemeyen bazı substratların (örn. nişasta) belirli mikroorganizmalar tarafından kullanılmasına olanak sağlar, ve böylece kompleks gıda ekosistemlerine mikrobiyal uyumu artırır (Corsetti ve Settanni, 2007).

San Francisco Fransız ekmeği ve Panettone *Lb. sanfranciscensis* ve *S. exiguus* arasında benzersiz ve sıkı bir ortaklıkla karakterize olur. San Francisco ekmeği, Kaliforniya bölgesinde geleneksel bir üründür. Gerçek bir San Francisco ekşihamurunda çok tipik bir mikroflora bulunur. Ortamda *Lactobacillus sanfranciscensis* baskın laktik asit bakterisidir. Bu, maltoz varlığında çok iyi gelişebilen heterofermantatif bir laktik asit bakterisidir. Bu bakteri, maltaz-negatif olan ve asidik ortama iyi adapte olmuş bir maya olan *Candida milleri* ile genellikle simbiyotik bir yaşam gösterir. Bu mayanın maltaz-negatif özelliklerine bağlı olarak, laktik asit bakterisi rakabet etmeden un enzimleri ve mikrobiyal enzimlerle nişastanın hidrolizi sonucu açığa çıkan maltozu kullanır. Maltozu maltoz-fosforilaz enzimi ile hidrolize ederek, glukoz-1-fosfat oluşturur, bu da daha sonra hücrede glukozu metabolize olur. Bakteri, bu oluşan serbest monoşekerleri hücre içinde birikmesini engellemek için hücre dışına salar ve mayaya bırakır (Decock ve Cappelle,

2005). Bu geleneksel ekmeği üretmenin yolu, ekşihamuru çok düşük sıcaklıklarda uzun bir süre fermente etmektir. Keskin bir asetik asit aroması gelişir. Son hamur elde edildiğinde un ağırlığına göre ekşihamurun % 100'e kadarı kullanılır ve düşük sıcaklıkta (4°C) gece boyunca ikinci kez fermente edilir. Yüksek asitliğe bağlı olarak, hamur yüzeyinde küçük kabarcıklar görülür. Daha sonra ekmek çok fazla buhar kullanılarak fırınlanır ve çok gevrek, kırmızimsı ve tipik balık gözleri görünömlü bir kabuk oluşur (Corsetti ve Settanni, 2007).

2. 2. Ekşihamur Laktobasillerinin Ürüne Etkileri

2. 2. 1. Laktobasillerin Aroma Oluşumuna Katkısı

Buğday ekmeğinin aromasının, hammaddenin doğasından, fermantasyon ve pişirme koşullarından etkilendiği sanılmaktadır. Genelde, fırında pişirme işlemi ekmek kabuğunun tipik aromasını etkilerken, hamur fermantasyonu ekmek içi aromasının gelişiminde esastır. Ayrıca uygulanan formölasyon ve coğrafik orijin de, farklı coğrafik alanlarda tüketilen ekmeklerin aromasında farklılık yaratır (S.-ur-Rehman vd., 2006; Corsetti ve Settanni, 2007; Gänzle vd., 2008).

En fazla aroma maddesi, kuşkusuz pişirme esnasında oluşur. Yine de, kabul edilebilir bir aroma elde edebilmek için ekşihamur fermantasyonu gereklidir. Çünkü, kimyasal olarak asitlendirilmiş ekmek ile ekşihamur ekmeği kıyaslandığında, ikincisi duyusal açıdan çok daha üstün kaliteye sahiptir. "Fermantasyon bölümü" (fermentation quotient-FQ) olarak tanımlanan laktik ve asetik asit arasındaki oran, son ürünün yapısı için de yararlı olmakla birlikte, aroma profilini etkileyebilen önemli bir faktördür. Laktik asit, glutenin giderek daha elastik bir yapı kazanmasına neden olurken, heterofermentatif laktik asit bakterileri tarafından üretilen asetik asit daha kısa ve daha sert glutenden sorumludur. Tam tahıllı çavdar ekşihamurundan üretilen ekmekte, optimal FQ 1,5-4,0 arasındadır. Bu yüksek orandaki asetik asit küfler ve rop oluşumuna neden olan *Bacillus subtilis* üzerine antimikrobiyal etki sağlar (Corsetti ve Settanni, 2007).

Ekşihamur fermantasyonunda iki grup aroma bileşenleri üretilir. Homo- ve heterofermentatif bakteriler tarafından üretilen ve asitliği arttıran organik asitleri de içeren uçucu olmayan bileşenler birinci gruptur. İkinci grup ise alkoller, aldehytleri, ketonları, esterleri ve sülfürü kapsayan uçucu bileşenlerdir. Yeterli miktarlarda uçucu bileşenlerin üretilmesi için, oluşum işleminde 12 - 24 saatlik birçok basamak gereklidir; ekme mayası kullanıldığında fermantasyon birkaç saat içinde tamamlanır. Ekşihamur fermantasyonu sırasında bakteriyal proteolizin, kimyasal yolla asitlendirilmiş hamur ya da mayalı hamurdan üretilmiş ekmeklere kıyasla, ekmekte tipik ekşihamur aromalarının gelişimine çok daha fazla katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Corsetti ve Settanni, 2007). Gaz kromatografisi ve kütle spektroskopisi ile yapılan çalışmalar da ekşihamurlardan elde edilen ekmekte, direk işlem ile üretilen referans ekmeğe göre daha fazla uçucu bileşen olduğunu göstermiştir. Bu ekstra uçucu bileşenler ekşihamura çok çeşitli aroma molekülleri kazandırır (Decock ve Cappelle, 2005; S.-ur-Rehman, 2006).

Hem laktik asit bakterileri hem de mayalar kullanılarak üretilen ekşihamurlarda aroma bileşenleri, bunlardan sadece biriyle üretilenlerdekinden daha fazla bulunmuştur (Corsetti ve Settanni, 2007).

2. 2. 2. Laktobasillerin Hamur Yapısına Katkısı

Önemli laktik asit bakterilerinden *Lb. sanfranciscensis*, eksopolisakkarit (EPS) üretimine bağlı olarak ekşihamurun polisakkarit içeriğini artırır. Ekşihamur laktik asit bakterilerinin EPS üretimi, ekşihamurun viskozitesini etkilediği için istenen bir özelliktir. Ayrıca, *Lb. sanfranciscensis*'in iki suşu tarafından üretilen fruktan'ın bifidobakteriyal gelişimi teşvik ettiği ve böylece bifidojenik faktör ya da bir prebiyotik olarak rol aldığı gösterilmiştir (Corsetti ve Settanni, 2007).

Panettone, Noel döneminde tüketilen tipik bir İtalyan tatlı ekmeğidir. Mikroflorası üzerine pek çok inceleme yapılmış ve özel bir laktik asit bakterisinin varlığı

belirlenmiştir. Bu ekşihamur bakterisi, *Leuconostoc mesenteroides*; dekstran adında, sükroza dayalı bir eksopolisakkarit üretmektedir (Corsetti ve Settanni, 2007).

2. 2. 3. Ekşihamur Laktobasilleri Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddeler

Genelde, laktik asit bakterileri fermente ürünlerin korunması ve mikrobiyal açıdan güvenliğinde çok önemli bir rol oynarlar, buna bağlı olarak fermantasyonun son ürünlerinde mikrobiyal stabiliteyi sağlarlar. Laktik asit bakterileri çeşitli gıda ürünlerinde doğal olarak bulduklarından, geleneksel olarak doğal gıda biyokoruyucuları olarak kullanılmışlardır. Gıdaların korunumu, reutericyclin gibi antibiyotiklerin, bakteriyosinlerin, fenillaktik asit veya yağ asitleri gibi antifungal bileşiklerin ve organik asitler, karbon dioksit, etanol, hidrojen peroksit ve diasetil üretimlerine bağlı olarak gerçekleşir (Corsetti ve Settanni, 2007).

Yapılan çalışmalarda, *Lb. bavaricus*, *Lb. sanfranciscensis* ve *Lb. plantarum* gibi ekşihamur laktik asit bakterilerinin bakteriyosin sentezledikleri gösterilmiştir (Şimşek vd., 2006).

Difüzyon teslerinde, *L. brevis ssp. lindneri* 2103' ün ekmeğin içinde sünmeye yol açan *Bacillus subtilis* ATCC6633 ile *B. licheniformis* NRRL-B1264 ve *C. perfringens* 4TTK üzerine; ve *L. viridescens* 241, 242 ve *Pediococcus sp. E5'* in *C. perfringens* 4TTK üzerine antimikrobiyal etkileri tespit edilmiştir (Şimşek vd., 2006).

2.2.4. Ekşihamur Laktobasilleri Tarafından Antibesin Faktörlerinin İndirgenmesi

Ekşihamur fermantasyonu ekmeğin besin değerini artırır. Tahıl tanelerinde toplam fosforun çoğunluğu fitik asit halinde (mio-inositol hekzafosfat) tanenin başlıca en dış tabakasında yer alır. Buğday ve çavdar 2-58 mg/g fitik asit içerir. Fitik asit çoğunlukla, proteinlerle, amino asitlerle ve Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} gibi divalent katyonlarla şelatlar oluşturarak, bunların ince bağırsak mukozasından emilimlerine engel olduğu için anti-

besin maddesi olarak tanımlanır. Bu nedenle, ürün pişirilmeden önce fitatın fermantasyonla yıkımı istenir. Fermantasyon sırasında, ekşihamurlardan izole edilen laktik asit bakterileri ve mayalarda bulunan fitat-yıkıcı enzimler, fitik asitin mio- inositole kadar basamak basamak hidrolizini katalize eder. Buna ek olarak, laktik asit bakterilerinin asit üretimi sonucu pH'nın düşmesi, undaki endojen fitazların aktive olmasını sağlar ve böylece fitat parçalanması artar (Lopez, vd., 2000; Katina vd., 2005; Corsetti ve Settanni, 2007; Zotta vd., 2007).

2. 3. Ekşihamurdaki Proteolitik Aktiviteler

2. 3. 1. Buğday ve Çavdar Unlarının Proteazları

Proteolitik enzimler (proteazlar) genel olarak proteinazlar ve peptidazlar olarak ayrılırlar. Proteinazlar proteinlerin daha küçük peptid fraksiyonlara parçalanmasını katalizler; peptidazlar spesifik peptid bağlarını hidrolize ederler ya da peptidleri tamamen amino asitlere parçalarlar. Buğday ve çavdar unlarının proteolitik aktiviteleri başlıca aspartik proteinazlar ve karboksipeptidazlara bağlıdır ve her iki proteaz grupları da asidik koşullarda aktiftir. Buğdaydaki aspartik proteinazlar kısmen glutenle ilişkilidir (Gänzle vd., 2008).

2. 3. 2. Ekşihamur Laktik Asit Bakterilerinin Peptid Kullanımı ve Proteolitik Sistem

Bu sistemin başlıca bileşenleri;

- a. Hücre duvarı ile ilişkili serin proteinaz (CEP),
- b. Amino asit ve peptid taşıma sistemleri ve
- c. Hücre içi peptidazlardır.

Protein yıkımının başlangıç basamağı proteinazca gerçekleştirilir ve organik nitrojenin hücre içine girişi peptidlerin alımı yoluyla olur. *Lb. sanfranciscensis* ATCC 27651^T ve

çoğu diğer ekşihamur laktobasilleri ekstraselüler proteinaz aktivitesine sahip değildir. Buğday ve çavdarın proteinaz aktivitesi proteolitik olmayan laktobasillerin gelişimini teşvik eder. Diğer laktik asit bakterileriyle kıyasla, *Lb. sanfranciscensis* başlıca peptidleri taşır ve peptidlerin amino asitlere kadar yıkımı birkaç hücre içi peptidazlar tarafından katalizlenir (Zotta vd., 2007; Gänzle vd., 2008).

Ekşihamurlar ve kimyasal yolla asitlendirilmiş hamurlar kıyaslandığında buğday ve çavdar ekşihamurlarındaki birincil proteoliz (proteinlerden peptidlere) başlıca endojen tahıl proteazlarına dayandırılabilir. pH'ı aspartik proteinazların optimum seviyesine düşüren kimyasal asitlendirme, amino asit salınımını artırır. Bunun yanında, Vermeulen vd. (2005) kimyasal yolla asitlendirilmiş hamura kıyasla *Lb. sanfranciscensis* DSM 20451^T ile fermente edilen ekşihamurda daha yüksek amino asit miktarı gözlemlenmiştir. Hamurdaki laktobasiller tarafından amino asit üretimi, yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin yıkımına değil, peptid hidrolizine dayandırılmıştır. Buna karşın, Wieser vd. (2007) tarafından, *Enterococcus faecalis* gibi yüksek proteolitik bir starter kültür seçimiyle, endojen proteinaz aktivitesi olmadığında bile amino asit salınımının önemli derecede arttığı gösterilmiştir (Gänzle vd., 2008).

Düşük molekül ağırlıklı gluteninler fermantasyon sırasında kısmen hidrolize olur ve yüksek molekül ağırlıklı gluteninlerin yıkımı da gerçekleşir (Di Cagno vd., 2002; Thiele vd., 2004). Gliadinler, gluteninlere göre daha az miktarda parçalanırlar ve proteolize duyarlılıkları γ -, α/β - ve ω -gliadinler sırasıyla giderek azalır. Buna neden olarak da ω -gliadinlerin yüksek prolin içeriği gösterilebilir. Prolin içeren peptid bağlarının hidrolizi spesifik peptidazlar gerektirir ve bazı laktik asit bakterileri belirgin prolin-spesifik peptidazlara (PepX, PepQ, PepR, PepI) sahiptir. (Gänzle vd., 2008).

2. 3. 2. 1. Gluten Depolimerizasyonu ve Disülfid Bağlarının İndirgenmesi

Ekşihamur fermantasyonu sırasında gluteninlerin kısmi hidrolizi, glutenin makropolimerlerinin (GMP) depolimerizasyonu ve çözünebilirliğiyle sonuçlanır. Çünkü

yüksek molekül ağırlıklı gluteninler GMP'in belkemiğini oluşturur. Bunların daha küçük proteinlere parçalanması, gluten ağını bozar ve gluten proteinlerinin çözünürlüğünü artırır. Ayrıca, hamurdaki GMP miktarı indirgen ajanlardan önemli derecede etkilenir. Glutasyon (GSH) buğday hamurlarındaki en etkili indirgen ajandır. GSH, gluten proteinleri ile tiol (-SH) değişimi reaksiyonlarına girer ve moleküller arası disülfid çapraz bağları azaltır, bu da GMP'nin molekül ağırlığını düşürür. Heterofermentatif laktobasiller ekşihamurda gelişirken, glutasyon redüktaz enzimi açığa çıkarılır ve hücre-dışı okside glutasyonu (GSSG) GSH'ye indirger. Bakteriyel metabolizma tarafından GSSG'nin GSH'ye sürekli dönüşümü, buğday hamurlarında SH seviyelerini yüksek tutar ve gluten proteinlerindeki SH-gruplarının miktarını artırır. Moleküller arası ve molekül içi disülfid bağlarının indirgenmesi, gluten proteinlerini çözünür kılar ve bunları proteolitik enzimler için daha ulaşılır yapar (Vermeulen vd., 2006; Gänzle vd., 2008;).

2. 3. 2. 2. Ekşihamurun Fungal Enzimlerle Kombinasyonu

Yüksek proteolitik aktiviteler için seçilmiş ekşihamur laktik asit bakterileri ve dışardan iki fungal proteaz preparasyonlarının kombinasyonunun, uzun süreli sıvı fermantasyon sırasında buğday ve çavdar un proteinlerini hidrolize ettiği gösterilmiştir (De Angelis vd, 2006b). Ekşihamur fermantasyonu ve fungal enzimlerin ilavesi kombinasyonu gluten konsantrasyonunun 10 g/kg'ın altına düşürmek için gereklidir. *Lb. sanfranciscensis* suşlarının karışımıyla ve iki farklı fungal proteaz preparasyonları ile fermente edilen ekşihamurlarda, gluten konsantrasyonu 20 mg/kg'ın altına düşmüştür, bu da glutensiz ekşihamur yapımına olanak sağlar (Rizzello vd., 2007; Gänzle vd., 2008).

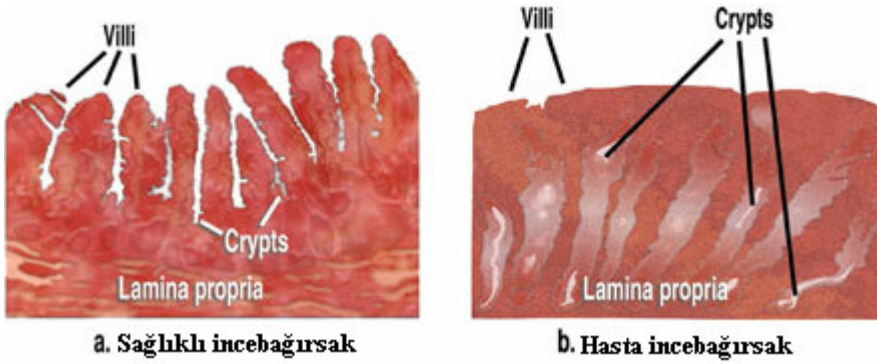
2. 4. Çölyak Hastalığı (Gluten Sensitiv Enteropati)

Çölyak hastalığı ya da **glutene duyarlı enteropati**, insanlarda oldukça sık görülen otoimmün karakterli ve besin kökenli bir ince barsak hastalığıdır. Çölyak hastalığının görülme sıklığı ülkeden ülkeye değişmektedir. Çölyak hastalığı görülme sıklığının

Avrupa ülkelerinde 1/200 - 1/1000, Amerika Birleşik Devletleri'nde ise 1/250 – 1/500 arasında değiştiği bildirilmektedir. Türkiye'de görülme sıklığı ise net bir şekilde bilinmemekle birlikte 200 ya da 1000 kişide bir olduğu tahmin edilmektedir. Fakat, birçok hastada belirtiler hafif olduğu ya da belirtisiz olduğu için tanı koyulamamakta, bu nedenle gerçek rakamlar bilinmemektedir. (Ulusoy vd., 2002; Ün ve Aydoğdu, 2003).

Çölyak hastalığı herkeste görülebilir. Genetik açıdan çölyak hastalığı, hem çevresel (gluten) hem de genetik faktörlerin (MHC genleri) etkili olduğu multifaktöryel bir hastalıktır. Genetik olarak, hastalık değil hastalığa yatkınlık geçer (Erdil ve Ateş, 2005).

Hastalığın nedenini oluşturan gluten'in gliadin isimli alt fraksiyonudur. Hasta kişilerde gluten içeren gıdaların diyetten eklenmesinden sonra ince barsaklardaki villus adı verilen parmaklı çıkıntılar vücudun bu maddeye karşı oluşturduğu iltihabi bir reaksiyon sonrasında hasar görür ve yok olur (Şekil 2.2). Böylece diğer besinlerin sindirimi ve emilimi de bozulur ve malabsorpsiyon (kötü emilim) sendromu denilen bir hastalık tablosu ortaya çıkar. Demir, folik asit, kalsiyum ve yağda çözünen vitaminler gibi önemli besin maddelerinin absorpsiyonu düşer (Ulusoy vd., 2002; Katina vd., 2005; Kutlu, 2005).



Şekil 2.2. Sağlıklı bir bireyin intestinal epitel dokusu ve villuslar (a), çölyak hastalarında intestinal epitelde görülen villusların harabiyeti (b) (Erdil ve Ateş, 2005)

2. 4. 1. Hastalık Tablosu (Patogenez)

Çölyak hastalarının kanlarında, gluten'e karşı oluşmuş belli antikorlar (*Anti-Gliadin, Anti-Endomisyum, Anti-Transglutaminaz*) normalden yüksek miktarlarda bulunur. Antikorlar vücudun kendisi için yabancı kabul ettiği yapılara karşı ve onları ortadan kaldırmak için ürettiği özel savaşçı proteinlerdir (*İmmünglobulinler*). Çölyak hastalarının bağırsaklarındaki iltihabı meydana getirenler de yukarıda adı verilen antikorlardır (web_1). Gluten alındığında, lenfositler aktive olur interferon gama (savunma sisteminde rol alan bir antikor) salgırlar. Bu da intestinal epitelde harabiyeti başlatır (Şekil 2.2) (Erdil ve Ateş, 2005).

2. 4. 2. Çölyak Hastalığının Belirtileri (Semptomlar)

Hastalığın en önemli özelliği bazı hastalarda yıllarca hiç belirti vermemesi veya çok hafif seyredemesidir. Hastalık hayatın herhangi bir döneminde tipik belirtilerle başlayabileceği gibi çok hafif belirtilerle de seyredebilir ve tanısı çok zor olabilir (Kutlu, 2005). Tüm semptomları ile tipik bir çölyak hastası yoktur. Hastalık; diyare, kabızlık, karın ağrısı, aşırı gaz (flatulans), kusma, kilo kaybı, iştahsızlık gibi gastrointestinal semptomları içerir. Bunun yanında, anemi, demir, folik asit, vitamin B₁₂ eksikliği, K vitamini eksikliğine bağlı hemoraji (kanama); kalsiyum ve D vitamini malabsorpsiyonuna bağlı olarak osteoporoz da gözlenebilir. Ayrıca hastalıkla birlikte kas sisteminin, sinir sisteminin ve endokrin sistemin de olumsuz etkilendiği gözlenmiştir (Ulusoy vd., 2002; Kutlu, 2005; web_2).

Bir çalışmaya göre çölyak hastalığında malignite (kötü huylu kanserlerin tümü) riskinin normal topluma göre arttığı, malignite gelişen hastaların çoğunluğu tanıdan önce olduğu için erken tanının önemli olduğu, erken tanının malignite riskini azalttığı vurgulanmıştır. Çölyak hastalığı olan şahıslarda normal topluma göre aynı yaş gruplarında ölüm oranları 1.9 - 3.8 kat daha fazladır. Bu genellikle daha sonra gelişen kötü huylu kanserler sonucu olur. Glutensiz diyetle ölüm oranlarının düşmesi, diyetin koruyucu olduğunun

göstergesidir. Eğer sıkı bir şekilde glutensiz diyet yapılırsa ölüm oranları normal toplumla aynı düzeylere gelmektedir (Erdil ve Ateş, 2005).

2. 4. 3. Çölyak Hastalığının Teşhisi

Çölyak hastalığından şüphe edildiğinde tanı amacıyla öncelikle IgG ve IgA tipinde antigliadin antikor, IgA tipinde antiendomisiyum antikor ve transglutaminaz antikor testleri tarama testi olarak kullanılmalıdır. Bu antikorlardan en az birisi pozitif olursa çölyak hastalığı şüphesi ile ince barsak biyopsisi yapılması gerekir. Kesin tanı için klinik, biyokimyasal, serolojik bulgular ile ince bağırsak biyopsi bulgularının birleştirilmesi gerekmektedir (Ulusoy vd., 2002; Ün ve Aydoğdu, 2003). Alınan ince barsak biyopsisinin patolojik incelemesi sonucunda villus atrofi (parmaksı çıkıntılarının yok olması) ve intraepitelyal lenfositlerin arttığı gösterilmesi çölyak hastalığını düşündürür. Bundan sonraki aşamada gluten içermeyen diyetle beslenen hastanın yakınmalarının kaybolması, anemi gibi biyokimyasal bozuklukların düzelmesi, başlangıçta saptanan antikorların yok olması ve en erken bir yıl sonra yapılan kontrol biyopsisinde ince barsaktaki bozukluğun düzeldiğinin gösterilmesi ile hastalığın tanısı doğrulanır (ESPGHAN kriterleri) (Kutlu, 2005).

2. 4. 4. Çölyak Hastalığının Tedavisi

Bugün için çölyak hastalığının medikal tedavi ile iyileştirilmesi söz konusu değildir. Medikal tedavi sadece destek tedavisi şeklinde olup anemi saptananlara demir verilmesi, gereğinde D vitamini desteği veya villus atrofisine bağlı olarak sekonder laktoz entoleransı gelişen hastalara bir süre süt ve süt ürünü verilmemesinden ibarettir (Kutlu, 2005).

Çölyak hastalığının bugüne kadar kabul edilen tek tedavi yolu, ömür boyu glutensiz diyettir. Bu da, hastaların saf nişastalar hariç buğday, çavdar, arpa ve yulaf ürünlerinden uzak durması anlamına gelir. (Erdil ve Ateş, 2005).

Tanı konduktan sonra “*glutensiz*” diyetle geçilmesiyle semptomatik iyileşme 48 saat içerisinde başlar. İnce barsaklardaki iltihapta birkaç hafta içerisinde düzelme görülür. Klinik iyileşme için haftalar gerekir. Barsakların eski haline gelmesi, yaşa bağlı olarak 2-3 ay ile 2-3 yıl arasında bir süre alır. Glutensiz diyet için mutlaka doktor ve diyetisyen kontrolüne gereksinim vardır (Erdil ve Ateş, 2005; web_1)

2. 5. Glutensiz Diyet

Günümüzde tüm çölyaklı hastaların glutensiz diyetle tam olarak uyması ve ömür boyu sürdürmesi gerektiği konusunda fikir birliği vardır. Hastaların glutensiz diyetle uymaları çok zor bir durumdur. Gluten birçok üründe kullanılan bir maddedir. Bir çok yiyecek, içecek ve ilaçlarda gluten bulunabilir. Çünkü gluten yiyecek endüstrisinde sıkılaştırıcı ve stabilize edici olarak kullanılmaktadır. Glutenin çok yaygın ve birçok ülkede etikette belirtilmeyen bir katkı olması, çölyak hastaları için büyük bir risk teşkil eder. Bu nedenle güvenli ve etkili alternatiflerin geliştirilmesi acil bir ihtiyaçtır (Erdil ve Ateş, 2005; Kutlu, 2005; Gobbetti vd., 2007).

Glutensiz bir diyetle izin verilmeyen gıdalar arasında;

- 1) Buğday, çavdar, tritikale, spelt (kılçıksız buğday), yulaf ve kamut unlarından ya da bileşenlerinden ve bunların yan ürünlerinden yapılan diğer gıdalar;
- 2) Hot dog, salata sosları, konserve çorbalar, kuru çorba karışımları, işlenmiş peynirler, krema sosları gibi kalınlaştırıcı ve dolgu maddeleri olarak gluten türevleri ve buğday, arpa ve yulaf içeren işlenmiş gıdalar;
- 3) Hap ya da tablet bağlayıcılar olarak gluten veya benzeri proteinleri kullanan ilaçlar bulunmaktadır (Gobbetti vd., 2007).

Glutensiz ürünler için Kodeks Standartları, 1976’da Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’nün Kodeks Gıda Komisyonu (Codex Alimentarius Commission) ve Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agricultural Organization-FAO) tarafından kabul edilmiştir. 1981 ve 2000’de düzenlenen standartlara göre glutensiz olarak adlandırılan gıdalar:

- 1) Buğday, çavdar, arpa, yulaf, spelt, kamut veya bunların melez türlerinin hiçbir prolaminini içermeyen ingrediyenlerden yapılan veya oluşan, gluten seviyesi 20 ppm'i geçmeyen gıdalar;
- 2) Buğday, çavdar, arpa, yulaf, spelt ve bunların glutensiz olarak nitelendirilen gluten seviyesi 200 ppm'i geçmeyen melez türlerinden elde edilen ingrediyenlerden oluşan gıdalar; ve
- 3) 1. ve 2. maddelerde belirtilen iki grup ingrediyenin 200 ppm'i geçmeyen seviyede karışımları olarak tanımlanmaktadır (Gallagher vd., 2004; Gobbetti vd., 2007).

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre hazırlanan, 2003/33 tebliğ nolu Glutensiz Gıdalar Tebliği 16/11/1997 tarihli ve 23172 mükerrer sayılı Resmi Gazete'de yayınlanmıştır. Bu tebliğde şunlara yer verilmektedir (Anonim, 2003):

Tanımlar (Madde 4):

- a) Gluten: Buğday, arpa, yulaf, çavdar, tritikale veya bunların melezlerinde veya türevlerinde bulunan ve suda ve 0.5 M NaCl'de çözünmeyen protein fraksiyonu.
- b) Glutensiz gıda maddesi: Gluten içeren buğday veya tüm *Triticum* türleri ile arpa, çavdar, yulaf ve bunların melezlerini ve/veya türevlerinin yerine kullanılan, gluten içermeyen bileşenlerden oluşan gıda maddeleri.
- c) Gluteni azaltılmış gıda maddesi: Gluteni azaltılmış buğday veya tüm *Triticum* türleri ile arpa, çavdar, yulaf ve bunların melezlerini ve/veya türevlerini içeren gıda maddeleri.

Ürün özellikleri (Madde 5):

Bu Tebliğ kapsamındaki ürünlere ait özellikler aşağıda verilmiştir:

- a) Glutensiz gıda maddelerinde gluten miktarı kuru madde üzerinden 20 mg/kg'ı geçemez.
- b) Gluteni azaltılmış gıda maddelerinde gluten miktarı kuru madde üzerinden 200 mg/kg'ı geçemez.

c) Doğası gereği gluten içermeyen bileşenler ile gluteni azaltılmış bileşenlerin karışımından oluşan gıda maddelerinde gluten miktarı kuru madde üzerinden toplam 200 mg/kg'ı geçemez.

Ambalajlama- etiketleme ve işaretleme (Madde 11):

Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerin ambalajlanması, etiketlenmesi ve işaretlenmesinde “Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği”nin Ambalajlama ve Etiketleme-İşaretleme Bölümünde yer alan genel kuralların yanı sıra aşağıdaki kurallara da uyulmalıdır.

- a) Glutensiz gıda maddelerinde, gıda maddesi adı ile birlikte ambalaj rengi ile kontrast teşkil edecek şekilde “Glutensiz” ifadesi bulunur.
- b) Glutensiz gıda maddelerinde, gıda maddesinin adı ile birlikte “Gluten miktarı 20 mg/kg'ı geçmez” ifadesi yer alır.
- c) Gluteni azaltılmış gıda maddelerinde, gıda maddesinin adı ile birlikte ambalaj rengi ile kontrast teşkil edecek şekilde “Gluteni azaltılmış” ifadesi yer alır.
- d) Gluteni azaltılmış gıda maddelerinde, gıda maddesinin adı ile birlikte içerdiği “gluten miktarı” mg/kg olarak açıkça görülebilir ve diğer etiket bilgilerinden kolayca ayrılabilir şekilde yazılır.
- e) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerde, ambalaj rengi ile kontrast teşkil edecek ve kolaylıkla görülebilecek şekilde “Doktor tavsiyesiyle kullanılmalıdır” ifadesi yer alır.
- f) Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerde, beslenme beyan tablosunda vitamin ve mineral değerleri belirtilmelidir.

2. 5. 1. Türkiye’de Glutensiz Ürün Piyasası

Günümüzde glutensiz un, bisküvi ve ekmek gibi ana besinler yanında çikolata gibi bir takım ürünler de glutensiz olarak üretilmektedir. İstanbul’da İstanbul Belediyesi Halk Ekmek ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları’nın ortak çalışması ile ve Ankara’da Ankara Halk Ekmek ve Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nün ortak çalışmalarıyla çölyaklı hastalar için diyet ekmek

üretilmiş ve satışa sunulmuştur. Diğer taraftan yine Eti Firması ile ilk kez glutensiz bisküvi üretilmiş ve Eti Pronot adıyla 2003 yılının Nisan ayında piyasaya verilmiştir (web_3). Bunların haricinde çok sayıda firma tarafından glutensiz un, makarna, gofret, çikolata ve benzeri ürünler hem üretilip hem de ithal edilmektedir. Bu konuda ayrıntılı bilgi Çölyakla Yaşam Derneği (www.colyak.org.tr) tarafından hastalara sunulmaktadır (Kutlu, 2005).

2. 5. 2. Glutensiz Ürün Formülasyonları

Gluten genellikle ekmek yapımı için yapısal protein olarak tanımlanır. Un ıslatılıp iyi gaz tutma özelliklerine sahip, uzayabilir bir hamur oluşturduğunda ve fırınlanmış ekmekte iyi bir iç yapı oluştuğunda glutenin özellikleri açıkça görülür. Gluten olmadığında, bir hamurdan ziyade sıvı bir karışım (kek hamuru kıvamında - batter) elde edilir ve pişirildiğinde kolay ufalanır yapıda, soluk renkli ve diğer kalite defektlerine sahip bir ekmek elde edilir. Bunun yanında, glutensiz makarna yapımı da zordur, çünkü pişme sırasında makarnanın dağılmasını engelleyen kuvvetli protein ağı gluten oluşturmaktadır (Gobbetti vd., 2007).

Son yıllarda glutensiz fırıncılık ürünlerinin yapısını, ağız hissini, reolojisini, aromasını, kabul edilebilirliğini ve raf ömrünü geliştirmek için bazı katkıların kullanımı üzerine çok fazla çalışma yapılmaktadır. Glutensiz ekmek formülasyonlarında hamurun hacim artışı, su absorpsiyonunu arttırmak ve işleme özelliklerini iyileştirmek için hidroksipropil-metilselüloz (HPMC), metilselüloz (MC), karboksimetilselüloz (CMC), keçiboynuzu gamı, guargam, karregen, ksantan gam ve agar gibi birçok gam çeşidi ve süt ürünleri kullanılabilir. Yapı kazandıran ajanların (örn. Gamlar ve modifiye nişasta) kullanımı, ön-hidrolize edilmiş buğday unundan geleneksel ürünlerle neredeyse aynı reolojik özelliklere sahip ve glutensiz ürünlerden çok daha iyi duyu özelliklere sahip ekmekler üretilmesine olanak sağlar. Buğdaydan yapılan bisküvilerle kıyaslanabilir kaliteye sahip glutensiz bisküvilerin formülasyonunda pirinç, mısır, soya, darı (millet),

karabuğday ve patates nişastaları farklı yağ kaynaklarıyla kullanılabilir (Gobbetti vd., 2007; Lazaridou vd., 2007).

Ülkemizde Ankara Halk Ekmek ve Un Fabrikası'nın Hacettepe Üniversitesi ile ortaklaşa formüle edip ürettiği ve Tıbbi Ekmek Unu adıyla Met-Vak vakfı tarafından satışa sunulan glutensiz un şunları içerir: mısır nişastası, şeker, pektin, ksantangam, CaCl₂, askorbik asit, tuz, emülgatör, kabartma tozu. Tıbbi Ekmek de bu karışıma bitkisel yağ ve maya ilavesiyle hazırlanıp yine Met-Vak vakfı tarafından ihtiyaç sahiplerine ulaştırılmaktadır.

İstanbul Halk Ekmek tarafından üretilen glutensiz karışımın içeriği ise şu şekildedir: içme suyu, buğday nişastası, mısır nişastası, şeker, maya, bitkisel sıvı yağ, pektin, kabartma tozu, guargum, tuz, kalsiyum klorür, antioksidan (askorbik asit) ve üzüm sirkesi (web_4).

2. 5. 3. Kalıntı Gluten Tehlikesi

Bazı ülkelerde (ABD ve Kanada gibi), glutensiz diyet hiç gluten içermez ve pirinç ve mısır gibi doğal olarak glutensiz olan ürünlerden yapılır. Diğer bazı ülkelerde ise (İskandinav Ülkeleri ve İngiltere gibi), glutensiz diyet; glutensiz diye sunulan ancak yine de düşük miktarlarda toksik prolaminler içerebilen buğday nişastası gibi katkıları içerir (Thompson, 2001).

Buğday nişastası bazlı glutensiz ürünler, onyıllardır pek çok ülkede kullanılmaktadır. Daha önceleri buğdayın protein bileşenlerinin nişastadan tamamen ayrıldığına inanılıyordu fakat şimdi bir miktar proteinin nişasta içerisinde kaldığı bilinmektedir. Glutensiz ürünlerde kullanılan buğday nişastalarının protein içeriği, genel amaçlı kullanılan nişastalarinkinden daha düşük olmaktadır ancak içerebileceği çok küçük miktarda gluten dahi bir çölyak hastasının sağlığını tehlikeye atabilir. Chartrand vd. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada, teorik olarak gliadin içermeyen karabuğday

unlarında da gliadine rastlanmıştır. Araştırmacılar, bu gliadinin muhtemelen öğütme işleminde ortamdan kontaminasyon yoluyla gelmiş olabileceğini bildirmişlerdir (Chartrand vd., 1997; Thompson, 2001; Katina vd., 2005).

Buğday ve çavdar unlarının seçilen LAB'leriyle uzun süreli fermantasyonu glutensiz ürünlerde gluten kontaminasyonu riskini azaltabilir (Gobbetti vd., 2007).

2. 6. Ekşi hamur LAB'nin Proteolitik Etkilerinin Gözlenmesi

Laktik asit bakterilerinin proteolitik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Di Cagno vd., 2004), buğday ve toksik olmayan unlardan bir ekşi hamur ekmeği üretmek için, prolin ve glutamine zengin gliadin oligopeptidlerini degrade etme potansiyeline sahip seçilmiş ekşi hamur laktobasillerinin karışımı kullanılmıştır (Di Cagno vd., 2004; Gobbetti vd., 2007). Buğday (%30), toksik olmayan yulaf, millet ve karabuğday unlarının karışımından (3:1:4:2) hazırlanan bir ekşi hamura, seçilen *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A ve *L. hilgardii* 51B (ca. 10^9 kob/g) inoküle edilmiş ve 37°C'de uzun süreli (24 sa) fermantasyona tabi tutulmuştur. Formülasyonda kullanılan %30 buğday ununun seçilen laktobasillerin hidrolize edici aktiviteleriyle uyumlu olduğu görülmüştür. 24 sa fermantasyon sonunda gliadinlerin neredeyse tamamı hidrolize uğramıştır. Kimyasal olarak asitlendirilen hamur veya sadece maya ile fermente edilen hamur ile kıyaslandığında hidrolizin ekşi hamur laktobasillerinin proteolitik aktivitelerinden ileri geldiği görülmektedir (Di Cagno vd., 2004; Gobbetti vd., 2007).

Diğer bir çalışmada ise (De Angelis vd., 2006a) hamur fermantasyonu ve gliadin polipeptidlerinin hidrolizi için *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis* içeren VSL#3'ün dondurularak kurutulmuş preparasyonu kullanılmıştır. Gliadin ve glutenin polipeptidlerinin, hamur fermantasyonu esnasında VSL#3 tarafından hidrolizini belirlemek için kullanılan iki boyutlu elektroforez (2DE) analizine göre

hamurun VSL#3 ile fermentasyonundan sonra gliadin polipeptid lekeleri kontrole göre degrade olmuştur. Kimyasal yolla asidifiye edilmiş hamura göre, VSL#3 ile fermente edilen hamurda, HMW gluteninlerin de kısmi hidrolizi gözlenmiştir.

Bir diğer çalışmada(Gobbetti vd., 2007) LAB'nin etkisi ile gliadinin toksisitesi üzerindeki değişim araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan ekmeğin yapımında, buğday unu seçilen laktobasillerle yarı sıvı koşullarda (%30 buğday unu ve %70 su) 37°C'de 24 sa fermente edilmiştir. 3:7 oranında toksik olmayan unlarla (yulaf, millet ve karabuğday) karıştırılmıştır. Maya ile 30°C'de 2 sa daha fermentasyondan sonra 220°C'de 20 dk pişirilmiştir. Hazırlanan ekmeğin sadece maya ile fermente edilen 2 g gluten ihtiva eden ekmeğin çölyak hastalarında denenmiştir. 17 hastadan 13'ünün mayalı ekmeği tüketmelerinin üzerine intestinal geçirgenliklerinde belirgin şekilde değişim gözlenmiştir. Aynı 13 hasta ekşi hamur ekmeği tükettiğinde intestinal geçirgenlik değerleri önemli düzeyde farklılık göstermemiştir (Gobbetti vd., 2007).

Probiyotik VSL#3 preparasyonu da buğday ununun uzun süreli fermentasyonu sırasında toksisitesini düşürebilmiştir (De Angelis vd., 2006a).

Ekşi hamur fermentasyonu sırasında gerçekleşen proteolizin bir diğer kanıtı da serbest amino asitlerde görülen artıştır. LAB tarafından gerçekleştirilen fermentasyon, serbest amino asit konsantrasyonunu kimyasal yolla asitlendirilmiş çavdar hamuruna kıyasla yaklaşık 40 kat arttırmıştır (204.87 – 5.36 mg/kg hamur). Alanin, lösin, valin, glutamik asit, izolösin, fenilalanin ve prolin en fazla artış gösteren amino asitlerdir (De Angelis vd., 2006b).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3. 1. 1. Ekşihamur Örnekleri

Laktik asit bakterilerinin izole edileceği ekşihamur örnekleri Isparta ilinden 10 farklı fırın işletmesinden toplanmıştır. Bir işletmeden 2, diğerlerinden 1'er olmak üzere toplam 11 ekşihamur örneği alınmıştır. Toplanan ekşihamurlar bir gün öncesinden hazırlanmış ~18 saatlik hamurlardır. Fırıncıların ekşihamur yapımı şu şekilde olmaktadır: önceki günden fermente olmuş ekşihamur ekmek yapımında hazırlanan una katılarak yeni hamur mayalanmış olmakta ve hazırlanan yeni hamur ile ekmek üretimi tamamlandıktan sonra, kalan hamur ertesi güne kadar bekletilerek tekrar fermente olması sağlanmaktadır.

3. 1. 2. İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri

Fırınlardan toplanan ekşihamur örneklerinden laktik asit bakterileri izole edilmiştir ve bunlar tanımlanarak gluten üzerine proteolitik aktiviteleri incelenmek üzere kullanılmışlardır.

3. 1. 3. Hazırlanan Ekşihamurlar

İzole edilen laktik asit bakterilerinden ayrı ayrı aşılansarak yarı sıvı formda ekşihamurlar ve bunları kıyaslayabilmek için nötral ve asit ilave edilerek asitlendirilmiş hamurlar hazırlanmıştır.

3. 2. Metotlar

3. 2. 1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Hamurlardan, otoklavda 105°C’de 10 dk ısı işlem görmüş blender kaplarına 25 g örnek alınarak, 225 ml serum fizyolojik (% 0,85 NaCl) ile blenderda (Waring Blender) 1 dk homojenize edilerek 10⁻¹ dilüsyonları elde edilmiştir. Hamurların 10⁻⁶ ‘ya kadar dilüsyonları hazırlanmıştır. 10⁻² ve 10⁻⁶ aralığındaki dilüsyonlardan çift katlı dökme plak yöntemi ile Rogosa agar besiyerine ekim yapılmıştır ve petriyerler 35 °C’de % 5 CO₂’li ortamda 48 sa inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonucunda, koloni morfolojileri 10⁻⁶ ‘lık dilüsyondaki petriyerlerden incelenmiştir. Koloniler şekil, büyüklük, renk, ve agar içerisindeki konumuna göre değerlendirildi. Aynı petride farklı özellik gösteren koloniler belirlenerek, toplam 59 koloni seçilip kodlanmıştır.

Seçilen kolonilerin saf kültürlerini elde edebilmek ve tanımlama amacıyla uygulanacak Gram boyama ve katalaz testleri için MRS (De Man Rogosa Sharpe) broth besiyerine kültürler hazırlanmıştır. Tüpler 30 °C’de 24 sa. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda saflık kontrolü için MRS agarlı petriyerlere yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapıldı. Petriyerler % 5 CO₂’li inkübatörde 35 °C’de 24 sa. inkübe edildi. Petriyerlerdeki koloni gelişimlerinden ve Gram boyama ile mikroskopik morfolojileri incelenerek saf olmayan kültürler tespit edildi ve tekrar MRS agarlı besiyerinde tek koloni düşürme tekniğiyle ekim yapılarak, elde edilen kolonilerden MRS broth besiyerinde saf kültürleri hazırlanmıştır.

MRS broth besiyerindeki saf kültürlerden Özçelik (1998)’e göre Gram boyama preparatları hazırlandı ve Gram boyama ile mikroorganizmaların mikroskopik morfolojileri incelendi. Gram özellikleri, şekilleri ve dizilişleri belirlendi. Gram boyama ve katalaz testleri sonucunda toplam 59 kültürün 24’ünün Gram pozitif , katalaz negatif bakteriler olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen saf kültürlerden, steril MRS brothlu (800 µl) eppendorf tüplerine ekim yapıp 30 °C’de 24 sa inkübasyon sonunda üzerlerine 200 µl steril gliserol ilave edilerek -20 °C’de stoklanmıştır. Çalışmada, bu izolatlarla tanımlama testleri uygulanmıştır.

3. 2. 2. Glutenli Plak Testi

3. 2. 2. 1. Glutenli Besiyerinin Hazırlanması

Plak testinde bakterilerin endo- ve ekzo-enzimlerinin gluten üzerine proteolitik etkilerinin incelenebilmesi için glutenli besiyeri hazırlanmıştır. Enzim aktivitelerinin farklı pH değerlerinde aktive olması göz önünde bulundurularak farklı iki pH değerlerinde (pH 4 ve pH 7) besiyerleri hazırlanmıştır (Wehrle vd. 1999).

Glutenli Besiyeri (pH 7 için)

- 15 g agar
- 10 g gluten
- 5,6 tripton
- 2,5 maya ekstraktı
- 1 g glukoz
- 2 g CaCl₂
- 4 g sitrik asit monohidrat
- 28,8 g Na₂HPO₄.2H₂O
- Destile su ile 1 L’ ye tamamlanır
- 105 °C’de 10 dk sterilize edilir

Glutenli Besiyeri (pH 4 için)

- 15 g agar
- 10 g gluten
- 5,6 tripton
- 2,5 maya ekstraktı
- 1 g glukoz
- 2 g CaCl₂
- 13 g sitrik asit monohidrat
- 13,5 g Na₂HPO₄.2H₂O
- Destile su ile 1 L’ ye tamamlanır
- 105 °C’de 10 dk sterilize edilir

Agarın pH 4'te otoklavlanması sırasında hidrolizini engellemek için tampon çözeltisi (sitrik asit monohidrat ve disodyum hidrojen fosfat dihidrat karışımı) ve agarlı besiyeri ayrı otoklavlanmıştır, soğutulurak (50 °C'de) aseptik olarak ilave edilmiştir. Besiyerinin hazırlanması ve petri kutularına dökülmesi sırasında glutenin topaklanmasını önlemek için sürekli karıştırma işlemi uygulanmıştır. Gluten besiyerinde çözünmediği için, protein çökeltileri plakalarda görünür halde kalmıştır (Wehrle vd. 1999).

3. 2. 2. 2. Kültürlerin Hazırlanması

Bakteri kültürleri MRS broth besiyerine aşılanarak 30 °C'de 18 sa inkübe edilmiştir. Kültürlerin yoğunluğunu tespit edebilmek için Rogosa agarlı petrilere yüzeysel ekim yapılmış ve petriyerler 35 °C'de 48 sa inkübe edilmiştir. Daha sonra sıvı kültürler enzim aktivitelerinin tespiti için kullanılmıştır.

3. 2. 2. 3. Kültürlerin Endo- ve Ekzo-enzimlerinin Eldesi

Bakteri enzimlerinin gluten üzerine proteolitik etkilerinin incelemesi için 18 saatlik kültürler kullanılmıştır. Kültür yoğunlukları ortalama 10^9 kob/g olarak belirlenmiştir. Kültürlerden 3 ml alınarak 6000 g devirde 5 dk santrifüjlendi (Sigma 1-14). Üstte kalan sıvılar (supernatantlar) ekzoenzimleri içerdiğinden ayrı tüplere alınarak saklandı. Kalan hücre pelletleri üzerine 50 mM'lık Tris-HCl (pH 8) tampon çözeltisinden 1 ml ilave edilerek vortekslendi (Velp Scientifica) ve tekrar santrifüjlenip ayrılarak yıkama yapıldı. Pellet üzerine 2 mg/ml oranında lizozim içeren aynı tampon çözeltisinden 200 µl ilave edildi. Üzerlerine 150-200 µm çapındaki cam partikülleri içeren cam tozundan 50 mg kadar eklendi. 3 dk vortekslenerek hücrelerin mekanik parçalanması sağlandı. Daha sonra 37 °C'de 1 sa inkübasyona bırakılarak lizozim enziminin hücre duvarlarına etki etmesi sağlandı. Süre sonunda 10 dk sonikatörde (Bandelin Sonorex) bekletilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Cam tozunun ve hücre kalıntılarının çöktürülmesi için 10000 g devirde 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant endoenzimleri içerdiğinden ayrılarak saklandı (Zotta vd. 2007).

50 mM Tris-HCl (pH 8.0):

- 6,055 g Tris tartılır
- 900 ml destile su içersinde çözdürülür
- HCl ile pH ayarlanır
- 1 L' ye tamamlanır
- 121 °C'de 15 dk sterilize edilir.

3. 2. 2. 4. Glutenli Besiyerine Aşılama

Elde edilen enzim preparatlarının gluten üzerine proteolitik etkilerinin görülebilmesi için petri kutularına dökülüp katılaştırılan glutenli besiyerlerinde 8 mm çaplı oyuklar açıldı. Sıvının aşılama sonrasında besiyeri tabanına yayılmasına engel olmak için oyukların diplerine glutenli besiyerinden sıvı halde birkaç damla damlatılarak katılışp oyuk tabanını kaplaması sağlandı. Her petriye biri endoenzimler, biri eksoenzimler, diğeri de ikisinin karışımı için olmak üzere 3 oyuk açıldı ve her kültür için 2 ayrı pH değerinde besiyeri hazırlanmış (pH 4 ve pH 7) ve 2 paralelli çalışılmıştır. Ayrıca eksoenzim preparatları MRS broth besiyeri ve endoenzim preparatları Tris-HCl (pH 8) tamponu içerdüğinden kontrol grubu olarak ayrı petrilerdeki oyuklara sadece steril Tris-HCl (pH 8) tamponundan ve steril MRS broth besiyerinden aşılantmıştır. Enzim preparatları ve kontroller 40'ar µl inoküle edildikten sonra petriler 30 °C'de 48 sa inkübasyona bırakılmıştır.

3. 2. 2. 5. Plakların Boyanması ve Boyanın Uzaklaştırılması

İnkübasyon sonunda, oyuk etrafında zon oluşumunun daha rahat görülebilmesi için boyama çözeltisi ile boyanmıştır. Boyama çözeltisinden petrilerin üzerlerine dökülüp 1 dk beklenerek boyama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra boyama çözeltisini uzaklaştırmak için boya yıkama çözeltisi hazırlandı ve petrilerdeki boya çözeltisi dökülerek, üzerine bu yıkama çözeltisi döküldü ve bir gece bekletildi (Wehrle vd. 1999).

Boyama çözeltilisi

- 5 g Coomassie brilliant blue R-250
- 500 ml metanol
- 92 ml asetik asit
- 1 L' ye destile su ile tamamlanır

Boya yıkama çözeltilisi

- 250 ml etanol
- 50 ml asetik asit
- 1 L' ye destile su ile tamamlanır

3. 2. 3. API 50 CHL Tanımlama Testi

3. 2. 3. 1. API 50 CH Testinin Prensibi

API 50 CHL Medium, Lactobacillus cinsi ve benzer organizmaların tanımlanması için geliştirilmiş, API 50 CH şeritlerindeki 49 karbonhidratın fermantasyonuna olanak sağlayan kullanıma hazır bir besiyeridir. Bu medium içersinde incelenecek mikroorganizmanın süspansiyonu hazırlanır ve şeritteki her tüpe inoküle edilir. İnkübasyon sırasında, Çizelge 3.1'de görülen karbonhidratlar asite fermente olur ve pH' daki düşüş, indikatörün renginin değişimiyle tespit edilir. Mordan sarıya ve 25 nolu tüp (eskulin) için mordan siyaha renk değişimleri pozitif olarak kaydedilir. Sonuçlar, suşun biyokimyasal profilini oluşturur ve tanımlanmasında kullanılır.

Çizelge 3.1. API 50 CH test kitinde yer alan substrat karbonhidratlar

ŞERİT 0-9	ŞERİT 10-19	ŞERİT 20-29	ŞERİT 30-39	ŞERİT 40-49
tüp / substrat	tüp / substrat	tüp / substrat	tüp / substrat	tüp / substrat
0 CONTROL	10 GALactose	20 α-Methyl-D-Mannoside	30 MELibiose	40 D-TURanose
1 GLYcerol	11 GLUcose	21 α-Methyl-D-Glucoside	31 Sucrose	41 D-LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	22 N-Acetyl-Glucosamine	32 TREhalose	42 D-TAGatose
3 D-ARAbinose	13 MaNnosE	23 AMYgdalin	33 INUlin	43 D-FUCose
4 L-ARAbinose	14 SorBosE	24 ARButin	34 MeLeZitose	44 L-FUCose
5 RIBose	15 RHAmnose	25 ESCulin	35 RAFFinose	45 D-ARabitoL
6 D-XYLose	16 DULcitol	26 SALicin	36 Starch	46 L-ARabitoL
7 L-XYLose	17 INOsitol	27 CELlobiose	37 GLYcoGen	47 GlucoNaTe
8 ADOnitol	18 MANnitol	28 MALtose	38 XyLiTol	48 2-Keto-Gluconate
9 β-Methyl-D-Xyloside	19 SORbitol	29 LACtose	39 GENtiobiose	49 5-Keto-Gluconate

3. 2. 3. 2. Kültürlerin Hazırlanması

Test için kullanılan kültürler, ekşihamurlardan izole edilmiş olan 24 bakteri kültüründen MRS broth besiyerinde 30 °C’de 24 sa inkübe edilerek hazırlanmıştır.

3. 2. 3. 3. Aşılama Materyalinin (İnokulumun) Hazırlanması

Aşılama materyalinin hazırlanmasında, API 50 CHL test kitlerinin klavuzundaki yöntem kullanılmıştır. Bakteri süspansiyonunun hazırlanabilmesi için MRS broth kültüründe tüpün tabana çökmüş yoğun kısımdan, 2 ml’lik süspansiyon mediuma yoğun bir süspansiyon oluşacak şekilde aktarılmıştır. 5 ml’lik süspansiyon medium ampülü açılarak, içersinde bulanıklığı McFarland (Biosan Den-1 McFarland Densitometer) 2 değerine eşit olacak bir süspansiyon elde etmek için, yoğun hazırlanan süspansiyondan belirli bir miktar (n) buna aktarıldı. Daha sonra API 50 CHL medium (10 ml)’a bunun 2 katı kadar (2n) ilave edildi, çalkalanarak homojenize edildi.

3. 2. 3. 4. Şeritlere Aşılama

Şeritlere aşılama işlemi ürün klavuzunda açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Şeritlerdeki 50 tüp aşılınmış API 50 CHL mediumları ile doldurulmuştur (105 µl). Anaerobik ortam sağlamak amacıyla üzerlerine bir-iki damla mineral yağı damlatılarak yüzeyi kaplandı. Şeritler 30 °C'de 48 sa inkübe edildi, 24 sa ve 48 sa sonunda renk değişimlerine bağlı olarak (+) veya (-) sonuçlar kaydedildi. Tanımlama işlemi, elde edilen pozitif ve negatif sonuçların tanımlama yazılımında (identificatin software, bioMérieux) gerçekleştirilmiştir.

3. 2. 4. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinden Ekşihamur Yapımı

Ekşihamurlardan izole edilen ve tanımlanan kültürlerden farklı türden olanlar seçilerek bunların gluten proteinleri üzerine proteolitik etkilerinin SDS-PAGE ile araştırılması amacıyla yarı-sıvı hamurlara aşılınmışlar ve fermente edilmişlerdir.

Ekşihamur yapımında ticari, katkısız un kullanılmıştır. Hamurlar Çizelge 3.2.'de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır (Zotta vd. 2006).

Çizelge 3.2. Kontrol hamurlarının ve ekşihamurların hazırlanmasında kullanılan formülasyon (Zotta vd. 2006)

Katkı	Nötral Kontrol Hamuru	Asidik Kontrol Hamuru	LAB Aşılınmış Hamur
Un (g)	20	20	20
Su (ml)	20	20	18
NaCl (g)	0,4	0,4	0,4
Asit Çözeltisi (µl)	0	120	0
Penisilin (µl)	20	20	0
Kloramfenikol (µl)	200	200	0
LAB kültürü (ml)	0	0	2

Biyolojik ve kimyasal asidifikasyon, asidik olmayan buğday ununa kıyasla polipeptidlerde direkt bir modifikasyona yol açabilir. Bu nedenle, sadece bakteriyel

proteolize bağlı değişimleri tespit edebilmek için, fermente hamur kimyasal yolla asidifiye edilen (pH 4.0) hamur ile kıyaslanmalıdır. Hamuru kimyasal olarak asitlendirebilmek için, 4 hacim laktik asit (%90) ve 1 hacim asetik asit (%98) karışımı kullanılmıştır ve pH 4' e düşürülmüştür (Zotta vd. 2006). Nötral hamurun pH'sı 6,1'de kalmıştır.

Kontrol hamurlarında bakteri gelişimini inhibe etmek için penisilin ve kloramfenikol antibiyotikleri ilave edilmiştir. Hamur katkıları biraraya getirilerek steril spatül ile 3 dk karıştırılarak homojen yarı-sıvı bir hamur elde edilmiştir. Hamurlar 30 °C'de fermantasyona bırakıldı. Hamurların protein fraksiyonlarının elektroforezde incelenebilmesi için 24 sa. ve 48 sa. sonlarında örnekler alınmıştır (Zotta vd. 2006).

3. 2. 5. Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

3. 2. 5. 1. SDS-PAGE'in Çalışama Prensihi

SDS- PAGE, proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılır. Elektrik akımı etkisiyle proteinlerin büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan ortam akrilamid ve N-N'-metilen bis-akrilamid monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan jel matriksidir. Poliakrilamid jel matriksi farklı büyüklükte kanallar (porlar) içerdiğinden denatüre protein karışımı jele yüklenip elektroforez uygulandığında, proteinlerin bu kanallardan geçiş hızı tamamen büyüklüklerine bağlıdır. Küçük proteinler jelde hızlı, büyük proteinler ise yavaş ilerler (Coşkun-Arı, 2003).

SDS-PAGE yöntemi ile ayrılmak istenilen proteinlerin sadece büyüklüklerine göre ayrımını sağlamak için önce denatüre edilmeleri ve sonra Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile muamele edilmeleri gereklidir. Anyonik bir deterjan olan SDS, proteinlere bağlanıp negatif yüklü hale getirerek lineer forma dönüşmelerini sağlar. SDS sayesinde negatif yük ile yüklenen proteinler elektroforez sırasında anoda göç ederler. Elektroforez işlemi tamamlandığında farklı büyüklükteki proteinler jel boyunca ilerlerken ayrışarak farklı

protein zonları halinde odaklanırlar. SDS-PAGE işleminden sonra jeldeki protein bantlarının görüntülenmesi için Coomassie Brilliant Mavisi (Coomassie Brilliant Blue, CBB) kullanılır (Coşkun-Arı, 2003).

Akrilamid ve bisakrilamid oranı jelin ayrıştırma kapasitesini belirler. Boyutları ayarlanabilen gözenekli yapıları nedeniyle proteinleri molekül ağırlıkları veya kütleleri ile orantılı olarak moleküllerin göçünü yavaşlatan bir 'moleküler elek' olarak davranır. Bu nedenle ayırım hem moleküler eleme hem de elektroforetik mobilite temeline dayanır. Düşük derişimde hazırlanan jellerin gözenekleri daha büyük olup, büyük molekül ağırlıklı biyomoleküllerin ayırımında kullanılırlar (Coşkun-Arı, 2003).

3. 2. 5. 2. Ekşihamurlardan Proteinlerin Ekstraksiyonları

Hamur örneklerinden 2,5 g tartılarak üzerine 7,5 ml 0,5 M NaCl-150 mM sodyum fosfat tamponu (ph 6,8) ilave edildi. Oda sıcaklığında 10 dk'da bir vorteksleyerek 30 dk boyunca hamurdaki albumin, globulin proteinlerinin ekstraksiyonu sağlanmıştır. Süre sonunda 4 °C'de 20000 g'de 15 dk santrifüjlenerek (Sigma 3K30) supernatantta kalan albumin ve globulinler ayrılmıştır. Kalan pelet aynı çözelti ile ve sonra da saf su ile yıkanarak santrifüjlendi supernatantlar atıldı (Zotta vd. 2006).

0,5 M NaCl-150 mM sodyum fosfat tamponu (ph 6,8)

- 29,22 g NaCl
- 10,3494 g NaH₂PO₄.H₂O
- 13,3492 g Na₂HPO₄.2H₂O
- 1 L'ye destile su ile tamamlanır

Kalan peletler üzerine 7,5 ml 1-propanol (% 50 v/v) eklendi (Thiele vd. 2006). Oda sıcaklığında 10 dk'da bir vorteksleyerek 30 dk boyunca hamurdaki gliadin proteinlerinin ekstraksiyonu sağlandı. Süre sonunda 4 °C'de 20000 g'de 15 dk santrifüjlenerek supernatantta kalan gliadin proteinleri ayrılmıştır. Yine alkol çözeltisiyle ve sonra saf su ile pelletler yıkanarak santrifüjlendi ve supernatantları atıldı (Zotta vd. 2006).

Kalan peletler üzerine 50 mM Tris-HCl- %1 SDS-% 0,5 DTT (ph 8,8) çözeltisi ilave edildi (Di Cagno vd. 2005). Oda sıcaklığında 10 dk'da bir vorteksleyerek 30 dk boyunca hamurdaki glutenin proteinleri ekstrakte edildi. Süre sonunda 4 °C'de 20000 g'de 15 dk santrifüjlenerek supernatantta kalan glutenin proteinleri ayrıldı. Gliadin ve glutenin ekstraktları elektroforez uygulamasında kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır (Zotta vd. 2006).

50 mM Tris-HCl- %1 SDS-% 0,5 DTT (ph 8,8)

200 ml için;

- 1,2114 g Tris
- 2 g SDS
- 1 g DTT
- HCl ile pH ayarlanır,
- 200 ml' ye tamamlanır

3. 2. 5. 3. SDS-PAGE Uygulaması

SDS-PAGE için 100 µl protein ekstraktları 300 µl örnek tamponu (Çizelge 3.3'te verilmiştir) ile seyreltilmiştir (Thiele vd. 2004). Üzerine 10 µl β-merkaptetanol ilave edilerek 100 °C'de 5 dk kaynatılarak proteinlerin denatürasyonu sağlandı. Bu şekilde elektroforez jeline yüklenecek örnekler hazırlanmış oldu. Jellerin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler Çizelge 3.3'te verilmiştir (Sambrook vd. 1989).

İki adet jel camı saf su ile yıkanıp kurulandıktan sonra, jel kasetine yerleştirilerek jel dökme tablasına tutturuldu. Bir miktar % 12'lik sıvı haldeki ayırma jeli, cam plakalar arasına hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilerek pipetlendi. Jelin polimerleşmesi beklendi. Ayırma jelinin polimerleşmesinin ardından üste biriken su döküldü.

Polimerleşen ayırma jelinin üzerine % 3,5'lik ön ayırma jeli (stacking gel) solüsyonunun pipet yardımıyla cam plakaların arasına camın üst seviyesine kadar dökülmesinin ardından, iki cam arasına örneklerin yükleneceği kuyuları oluşturacak tarak yerleştirilerek polimerleşmesi beklenmiştir.

Polimerleşmenin ardından jel kaseti elektroforez tankına yerleştirilip (Cleaver Scientific Mini Gel), hazırlanan 1× yürütme tamponu anot-katot boşluklarına döküldükten sonra tarak dikkatlice çıkartıldı. Oluşan kuyucuklara her örnek için yaklaşık 30 µg protein içeren 20 µl hacimde örnek yüklenmiştir. Elektroforez tankı güç kaynağına (Electrophoresis Power Supply Consort E844) bağlanarak proteinler 20 mA sabit akımda (Zotta vd. 2006) yaklaşık 2 saat boyunca yürütüldü.

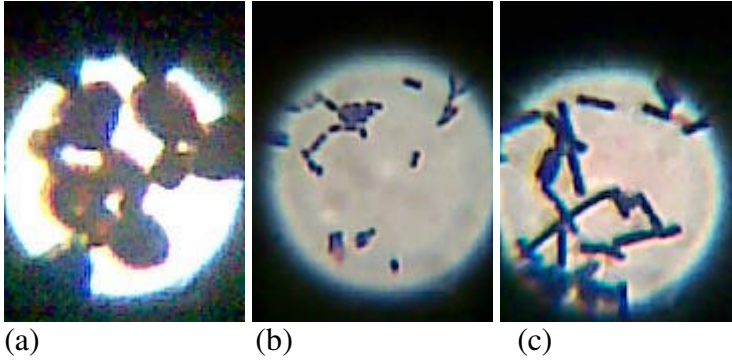
Çizelge 3.3. SDS-PAGE uygulamasında kullanılan çözeltiler

Örnek Tamponu (100 ml)	0,606 g Tris (50 mM) 2 g SDS 10 g gliserol 0,1 Bromofenol mavisi
%30 akrilamid karışımı	29 g Akrilamid 1 g N,N' Metilen bisakrilamid 100 ml destile su
%10 SDS	10 g SDS 100 ml destile su
%10 APS	0,1 g Amonyum persülfat 1 ml destile su
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) (50 ml)	9,0825 g Tris 40 ml destile su HCl ile pH ayarlanır 50 ml' ye destile su ile tamamlanır
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8) (20 ml)	2,422 g Tris 15 ml destile su HCl ile pH ayarlanır 20 ml' ye destile su ile tamamlanır
%12 Akrilamid Ayrırma Jeli (25 ml)	8,2 ml destile su 10 ml %30 akrilamid karışımı 6,3 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 0,25 ml % 10 SDS 0,25 ml % 10 APS 0,01 ml TEMED
% 3,5 Akrilamid Ön-ayırma Jeli (6 ml)	4,4 ml destile su 0,7 ml %30 akrilamid karışımı 0,75 ml 1 M Tris (pH 6,8) 0,06 ml % 10 SDS 0,06 ml % 10 APS 0,006 ml TEMED
Yürütme Tamponu (5x) (1 L)	15,1 g Tris (25 mM) 94 g Glisin (250 mM) (ph 8,3) 50 ml % 10'luk (w/v) SDS 1 L' ye destile su ile tamamlanır

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4. 1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon Sonuçları

Ekşihamurlardan izole edilen mikroorganizmalar, koloni morfolojilerine gre seçilmiŐlerdir. Yapılan Gram boyama ve katalaz testleri sonucunda mayalar elenerek, Gram (+), katalaz (-) bakteriler izole edilerek saf kültürleri elde edilmiş ve saklanmıştır. Gram boyama sonucu gözlenen farklı hücre morfolojileri Şekil 4.1.' de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. Ekşihamurlardan izole edilen mikroorganizmaların mikroskop görüntüleri (a) Maya, (b) Kok, (c) Basil

Elde edilen 24 bakteri kültürünün koloni morfolojileri ve mikroskobik morfolojileri izelge 4.1'de verilmiştir.

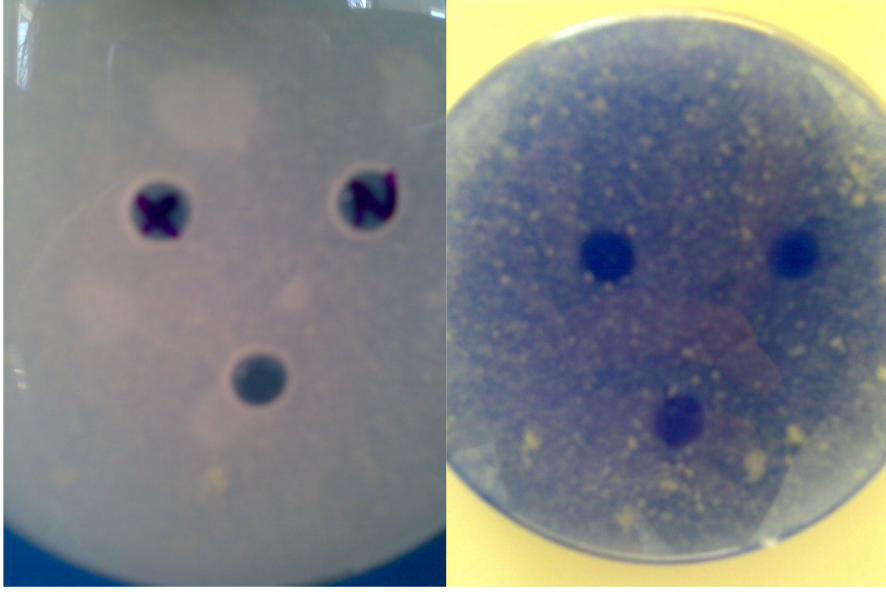
Çizelge 4.1.Ekşihamurlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin morfolojik özellikleri

BAKT NO:	KOLONİ MORFOLOJİSİ		MİKROSKOBİK MORFOLOJİ		
	RENK	GÖRÜNÜŞ	ŞEKİL	GRAM ÖZELLİĞİ	KATALAZ TESTİ
1	Şeffaf-mat	Düzgün yuvarlak, yassı	Kok, elips	+	-
2	Beyaz-şeffaf	Düzgün yuvarlak, parlak, küçük	Kok	+	-
3	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak, küçük	Kok	+	-
4	Şeffaf-mat	Düzensiz, Yüzeğe yaygın	Basil, uzun çubuk	+	-
5	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
6	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
7	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
8	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
9	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
10	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
11	Beyaz-şeffaf	Düzgün yuvarlak, parlak, küçük	Kokobasil	+	-
12	Beyaz-şeffaf	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
13	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
14	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
15	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
16	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
17	Şeffaf-mat	Düzensiz, Yüzeğe yaygın	Basil, uzun çubuk	+	-
18	Şeffaf-mat	Düzensiz, Yüzeğe yaygın	Basil, uzun çubuk	+	-
19	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
20	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kokobasil	+	-
21	Beyaz- az şeffaf	Düzgün yuvarlak, parlak, küçük	Kokobasil	+	-
22	Şeffaf-mat	Düzensiz, Yüzeğe yaygın	Basil, uzun çubuk	+	-
23	Şeffaf-mat	Düzensiz, Yüzeğe yaygın	Basil, uzun çubuk	+	-
24	Beyaz	Düzgün yuvarlak, parlak	Kok, elips	+	-

4. 2. Gluten Plak Testi Sonuçları

Glutenli besiyerleri boyama ve boya yıkama işlemleri yapıldıktan sonra besiyeri maviye boyanmış fakat büyük gluten partiküllerine boya iyi işlemediği için açık renkli kalmıştır (Şekil 4.2).

Kültürlerin hiçbirinin ne endoenzim, ne ekzoenzim ne de enzim karışımlarının inoküle edildiği oyuklarda zon oluşumu gözlenmemiştir.



(a)

(b)

Şekil 4.2. Glutenli besiyerinin inkübasyon sonrası görünümleri. (a) Boyanmadan önceki görünüm, (b) boyandıktan sonraki görünüm

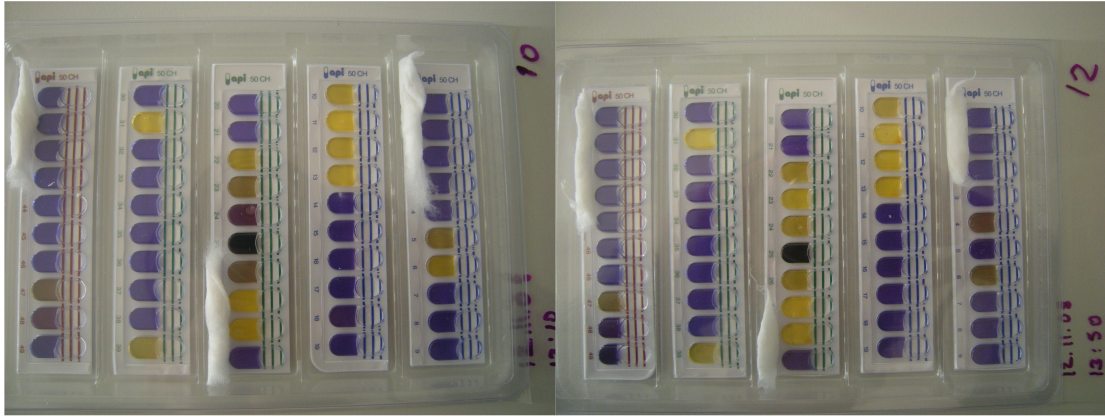
4. 3. API 50 CHL Tanımlama Testi Sonuçları

Ekşihamurlardan izole edilen 24 bakteri kültürünün tanımlanması için API 50 CHL test kiti kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda bakterilerin karbonhidratları kullanabilme durumlarına göre asitlik değişimine bağlı olarak indikatörün renk değişimine göre elde edilen pozitif ve negatif sonuçlar (Bkz. Şekil 4.3) Çizelge 4.2' de gösterilmiştir:

Elde edilen pozitif ve negatif sonuçlar tanımlama yazılımında (identificatin software, bioMérieux) değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3). *Lb. curvatus* olarak tespit edilen kültürlerin 15 °C’de ve 45 °C’deki gelişimleri araştırılmıştır. 15 °C’de gelişme gözlenmiş, 45 °C’de gelişme olmamıştır. Bu sonuçlar da tanımlamayı doğrulamaktadır.

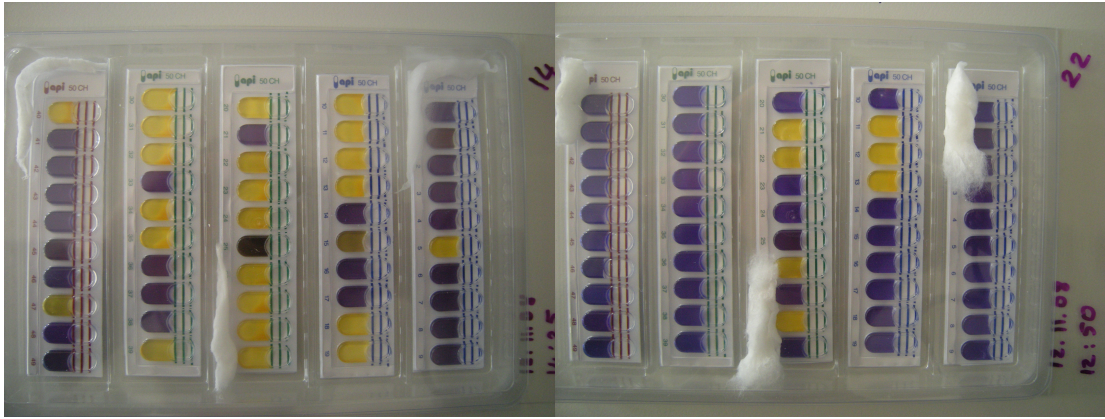
Çizelge 4.3. İzole edilen kültürlerin tespit edilen türleri

Kültür No:	Tanımlanan Tür	% ID
1	<i>Lactococcus lactis</i>	79,3
2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	86,2
3	<i>Lactococcus lactis</i>	82,4
4	Gelişme gözlenemedi	-
5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
7	<i>Weissella confusa (Lactobacillus coprophilus)</i>	97,6
8	<i>Weissella confusa (Lactobacillus coprophilus)</i>	97,6
9	<i>Weissella confusa (Lactobacillus coprophilus)</i>	94,2
10	<i>Weissella confusa (Lactobacillus coprophilus)</i>	97,6
11	<i>Weissella confusa (Lactobacillus coprophilus)</i>	98,9
12	<i>Weissella confusa (Lactobacillus coprophilus)</i>	99,6
13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
17	<i>Lactobacillus curvatus</i>	40,0
18	<i>Lactobacillus curvatus</i>	40,0
19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
21	Tanımlanamadı	-
22	<i>Lactobacillus curvatus</i>	40,0
23	<i>Lactobacillus curvatus</i>	40,0
24	<i>Lactococcus lactis</i>	79,3



(a)

(b)



(c)

(d)

Şekil 4.3. Farklı kültürlerin inoküle edildiği API kitlerinin inkübasyon sonucu görünümleri, (a) ve (b) *Weissella confusa*, (c) *Lactobacillus plantarum*, (d) *Lactobacillus curvatus*

Elde edilen sonuçlara göre toplanan ekşihamurlardan, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Weissella confusa* olmak üzere 5 farklı tür izole edilmiştir. İzole edilen *Lactococcus lactis* kültürlerinden 1 ve 24 nolu olanlar API testinde benzer sonuçlar vermiş olmalarına rağmen, 3 nolu kültür bunlardan daha farklı bir profil göstermiştir (Bkz. Çizelge 4.2). Bu sonuçlar, 3 nolu kültürün 1 ve 24 nolu kültürlerden farklı bir alt tür olduğunu düşündürmüştür. Bu nedenle izole edilen farklı tür bakterilerin proteolitik etkilerini incelemek üzere elektroforez çalışmasında 2 nolu *Pediococcus pentosaceus*, 3 nolu

Lactococcus lactis, 12 nolu *Weissella confusa*, 17 nolu *Lactobacillus curvatus*, 19 nolu *Lactobacillus plantarum* ve 24 nolu *Lactococcus lactis* kültürleri kullanılmıştır.

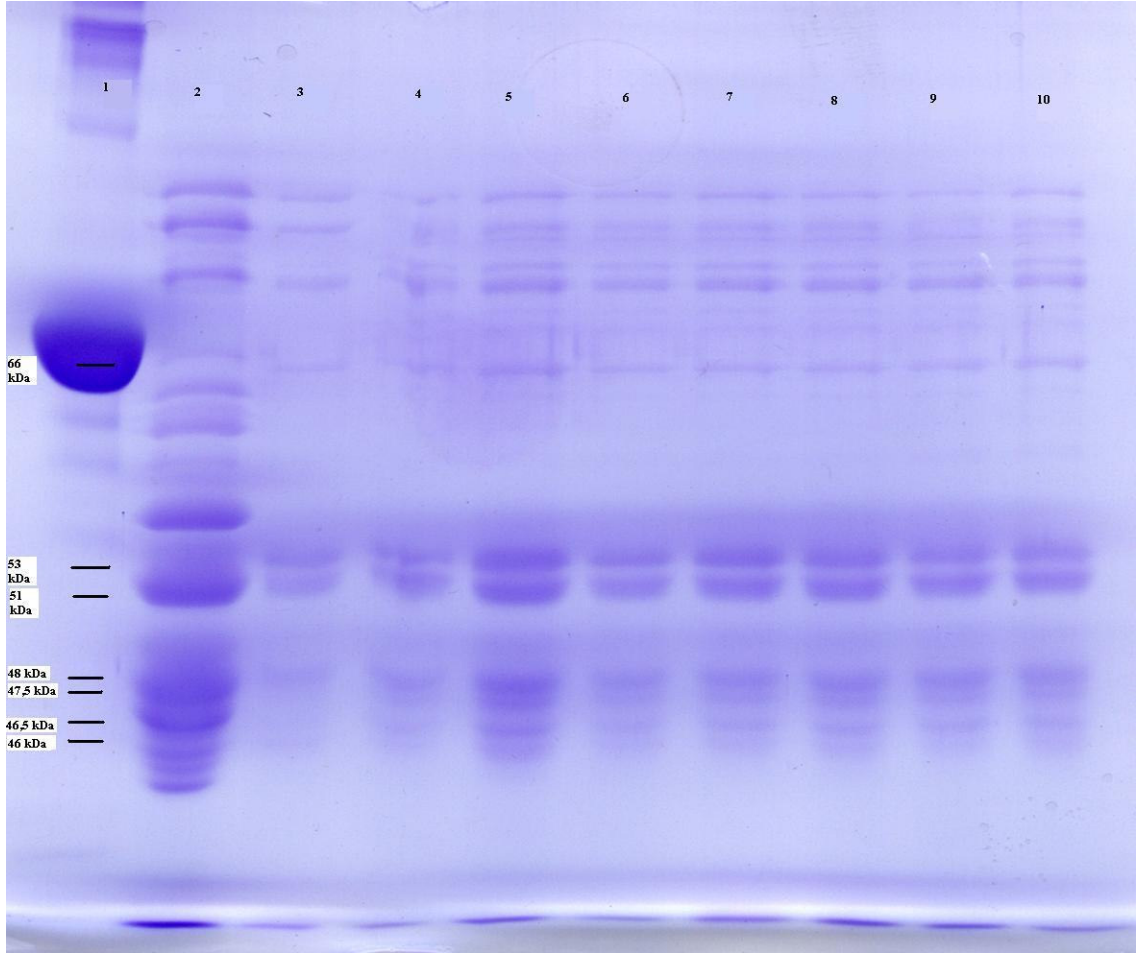
4. 4. SDS-PAGE Sonuçları

Ekşihamurlardan izole edilen ve tanımlanan kültürlerden farklı türden olanlar seçilerek bunların gluten proteinleri üzerine proteolitik etkilerinin SDS-PAGE ile araştırılması amacıyla yarı-sıvı hamurlara aşılanmışlar ve 30 °C'de 48 sa fermente edilmişlerdir. Fermantasyon sonunda ekşihamurların pH değerleri 3,5 ila 3,9 aralığında ölçülmüştür. Daha sonra bu hamurlardan, kontrol hamurlarından ve saf glutenden gliadin ve glutenin proteinleri Bölüm 3.2.5.2.'de anlatıldığı gibi izole edilerek SDS-PAGE' de yürütülmüşlerdir.

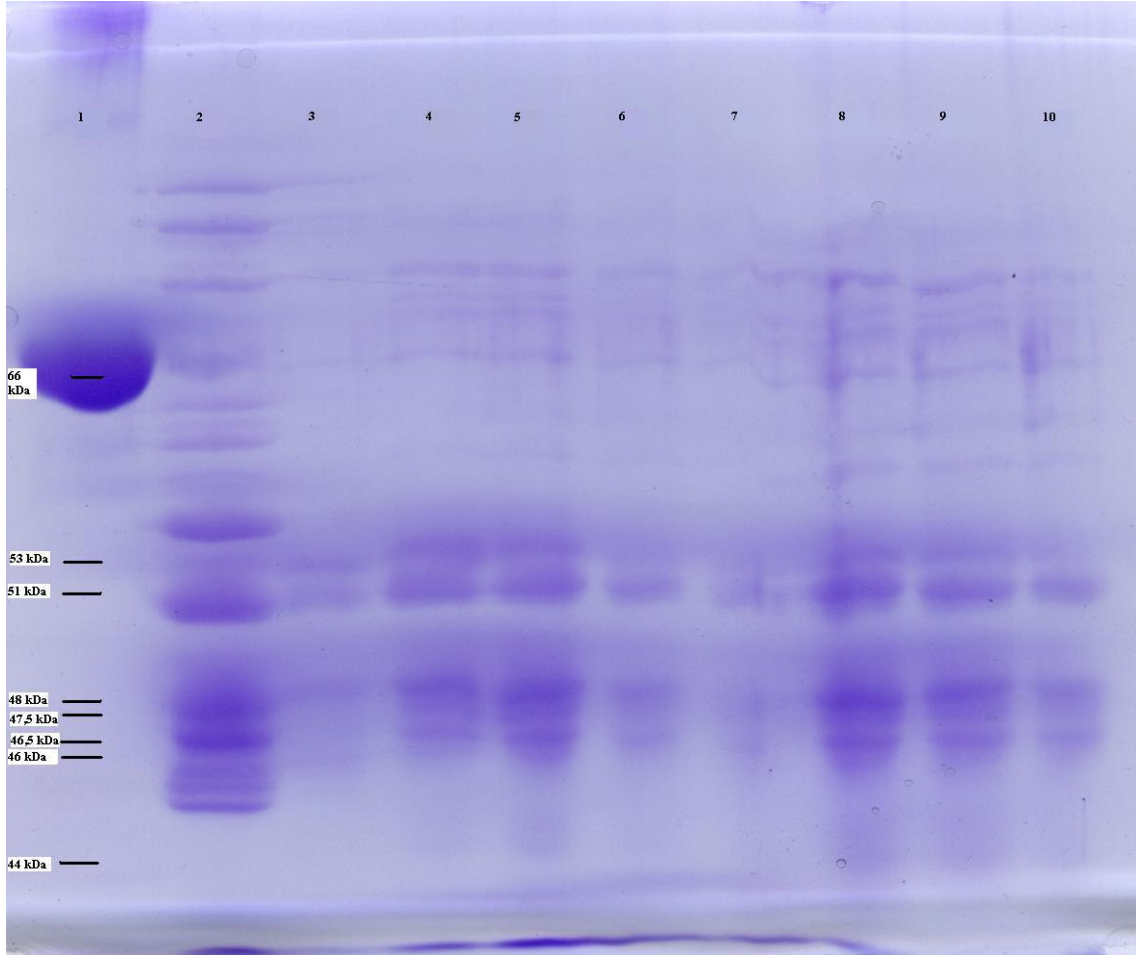
Jeller, gliadin proteinleri için 24 sa inkübasyon sonu ve 48 sa inkübasyon sonu, glutenin proteinleri için yine 24 sa ve 48 sa inkübasyon sonu olmak üzere 4 grup halinde yürütülmüşlerdir.

İzole edilen proteinlerin molekül ağırlıkları, Bovine Serum Albumin (BSA) standardının jel üzerinde oluşturduğu bandın yeri ve bilinen 66000 Da molekül ağırlığına göre jel üzerinde yürüdükleri mesafelerin logaritmaları oranlanarak hesaplanmıştır. Proteinlerin jel üzerinde aldıkları mesafe, molekül ağırlıklarına göre logaritmik olarak değişir. Daha yüksek moleküler ağırlığa sahip proteinler jel gözeneklerinden yavaş geçebildikleri için jelin üst kısımlarında bant oluştururken, küçük molekül ağırlıklı olanlar daha fazla ilerleyerek jelin alt kısımlarında bant oluştururlar.

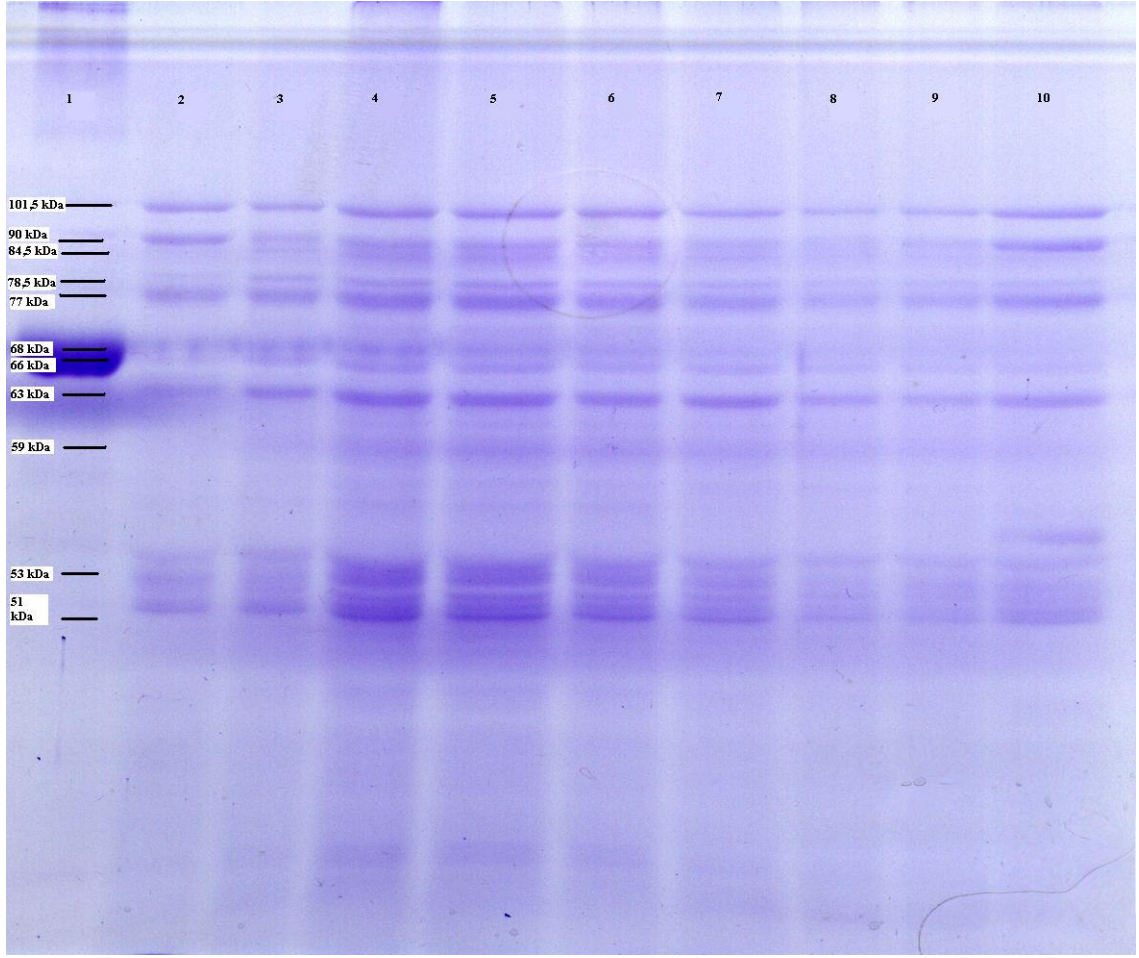
Buna göre 24 ve 48 saat sonlarındaki gluten proteinlerine ait SDS-poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7' de görüldüğü gibidir.



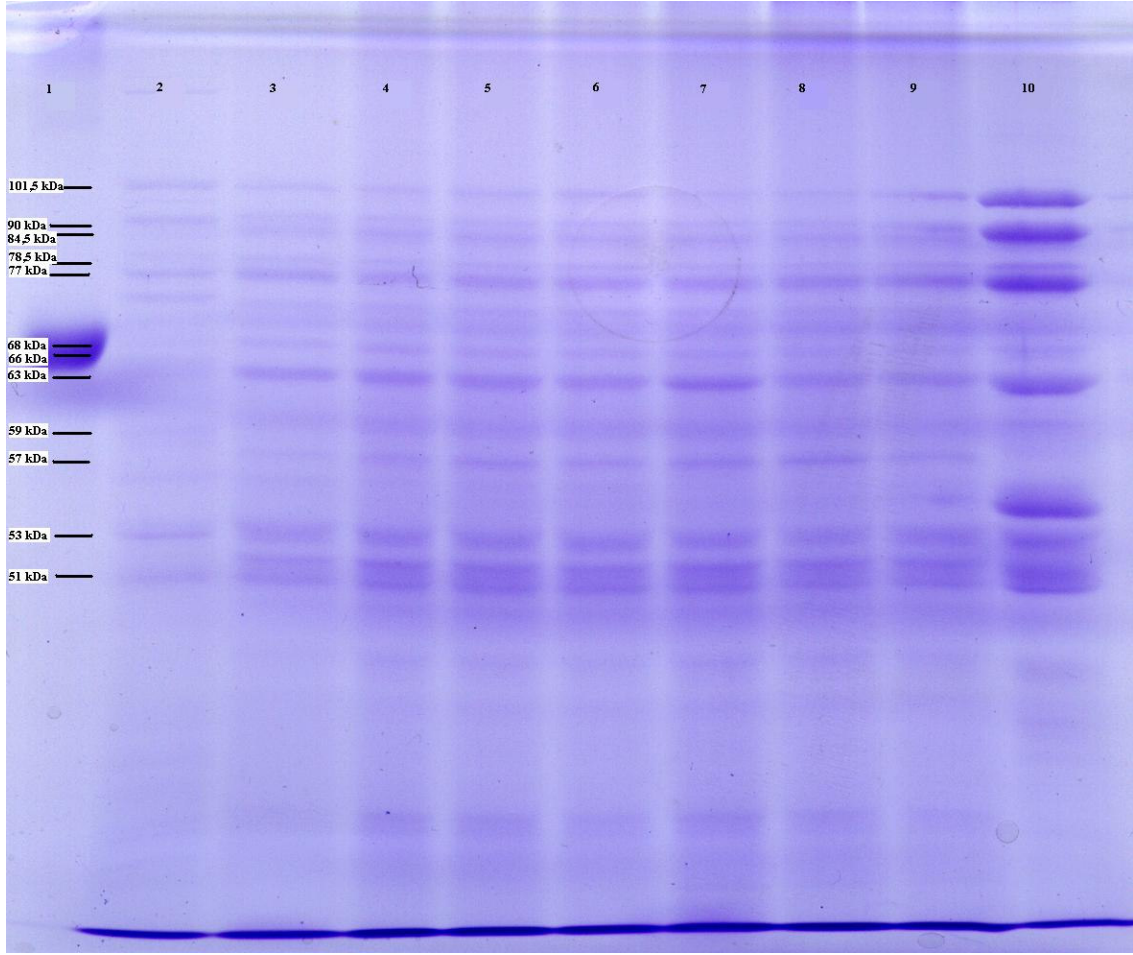
Şekil 4.4. Ekşihamurlardan 24 sa inkübasyon sonunda izole edilen gliadin proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüleri. (1) Marker olarak BSA, (2) Glutenden izole edilen gliadin, (3) Nötral kontrol hamurundan izole edilen gliadin, (4) Asit ilave edilmiş kontrol hamurundan izole edilen gliadin (5) *Pediococcus pentosaceus* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin, (6) *Lactococcus lactis* ssp.1 inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin, (7) *Weissella confusa* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin, (8) *Lactobacillus curvatus* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin, (9) *Lactobacillus plantarum* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin, (10) *Lactococcus lactis* ssp.2 inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin



Şekil 4.5. Ekşihamurlardan 48 sa inkübasyon sonunda izole edilen gliadin proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüleri. (1) Marker olarak BSA, (2) Glutenden izole edilen gliadin, (3) Nötral kontrol hamurundan izole edilen gliadin, (4) Asit ilave edilmiş kontrol hamurundan izole edilen gliadin (5) *Pediococcus pentosaceus* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin, (6) *Lactococcus lactis* ssp.1 inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin, (7) *Weissella confusa* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin, (8) *Lactobacillus curvatus* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin, (9) *Lactobacillus plantarum* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin, (10) *Lactococcus lactis* ssp.2 inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen gliadin



Şekil 4.6. Ekşihamurlardan 24 sa inkübasyon sonunda izole edilen glutenin proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüleri. (1) Marker olarak BSA, (2) Nötral kontrol hamurundan izole edilen glutenin, (3) Asit ilave edilmiş kontrol hamurundan izole edilen glutenin, (4) *Pediococcus pentosaceus* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (5) *Lactococcus lactis* ssp.1 inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (6) *Weissella confusa* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (7) *Lactobacillus curvatus* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (8) *Lactobacillus plantarum* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (9) *Lactococcus lactis* ssp.2 inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (10) Glutenden izole edilen glutenin,



Şekil 4.7. Ekşihamurlardan 48 sa inkübasyon sonunda izole edilen glutenin proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüleri. (1) Marker olarak BSA, (2) Nötral kontrol hamurundan izole edilen glutenin, (3) Asit ilave edilmiş kontrol hamurundan izole edilen glutenin, (4) *Pediococcus pentosaceus* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (5) *Lactococcus lactis* ssp.1 inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (6) *Weissella confusa* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (7) *Lactobacillus curvatus* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (8) *Lactobacillus plantarum* inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (9) *Lactococcus lactis* ssp.2 inoküle edilen ekşihamurdan izole edilen glutenin, (10) Glutenden izole edilen glutenin

Şekil 4.4' te kontrol hamurları ve ekşihamurlardan 24 saat inkübasyon sonunda izole edilen gliadin bantları görülmektedir. Gliadin bantları 46-53 kDa moleküler ağırlıkları arasında yoğunlaşmıştır. 3. kuyucuktaki nötral hamurdan izole edilen proteinlerle fermente hamurlardan izole edilen protein bantları kıyaslandığında nötral hamurda olmamasına rağmen, daha küçük molekül ağırlıklı (46-46,5 kDa) protein bantları fermente hamurlarda görülmektedir. Bunlar muhtemelen bazı proteinlerin hidrolizi sonucu oluşan parçalanma ürünleridir. Bu bantlar, asit ilave edilmiş kontrol hamurunda da gözlenmektedir ancak, bakteriyal proteolize bağlı olarak daha fazla parçalanma olduğundan fermente hamurlarda daha yoğun gözlenmektedir.

Şekil 4.5' e bakıldığında 44 kDa'a karşılık gelen bant nötral (3. kuyucuk) ve asit ilave edilmiş (4. kuyucuk) kontrol hamurlarında bulunmamasına rağmen 5, 8 ve 9 nolu kuyucuklardaki fermente hamurlarda gözlenmektedir. Bu proteinler, sadece pH'a bağlı olmayıp, bakteriyal proteolize bağlı olarak oluşmuş parçalanma ürünleri olabilir. Bu durumda *Pediococcus pentosaceus* (5. kuyucuk), *Lactobacillus curvatus* (8. kuyucuk) ve *Lactobacillus plantarum* (9. kuyucuk)'un proteolitik aktivitelerinden söz edilebilir.

Şekil 4.4 ve 4.5 kıyaslandığında da parçalanma ürünleri oldukları düşünülen düşük molekül ağırlıklı protein bantlarının 24 saatlik fermantasyona kıyasla 48 saat sonunda daha fazla yoğunlaştığı görülmektedir. Buna göre 48 saat inkübasyon sırasında hamurlarda proteolitik aktivite devam etmiş ve gliadin proteinlerinde daha ileri parçalanma gözlenmiştir.

Şekil 4.6 ve 4.7' de kontrol hamurları ve ekşihamurlardan 24 saat ve 48 saat inkübasyon sonunda izole edilen glutenin bantları görülmektedir. Şekil 4.6' ya göre 84,5 kDa ve 59 kDa molekül ağırlığa sahip proteinlere ait bant nötral kontrol hamurunda gözlenmezken, asitlendirilmiş kontrol hamuru ve fermente hamurlarda görülmektedir. Bu da bu proteinlerin, daha büyük molekül proteinlerin proteolizi sonucu oluştuklarını gösterebilir. Bu parçalanma pH düşüşünden ileri gelmiş olabilir.

Şekil 4.7' ye bakıldığında glutenin bantlarının yoğunlukları fermente hamurlarda oldukça düşmüştür. Fermantasyonun 48 sa devam ettirilmesi sonucu, ilk 24 saatlik inkübasyon sonucunda gözlenmeyen 57 kDa'luk proteinler oluşmuştur. Bunların da, kontrol hamurlarında bulunmaması nedeniyle, uzun süreli fermantasyonda bakteriyel proteoliz sonucu oluştukları söylenebilir.

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada öncelikle Isparta ilindeki 10 farklı fırından ekşihamur örnekleri toplanmış, toplanan ekşihamurların mikrobiyal florası incelenmiştir. Ekşihamurlardan mayaların yanında farklı türde laktik asit bakterileri de izole edilmiştir. Bunlar API 50 CHL medium ve API 50 CH test kitleri kullanılarak, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactococcus lactis*, *Weissella confusa* ve *Pediococcus pentosaceus* olarak tespit edilmişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalara göre de bu türler ekşihamurlardan sıklıkla izole edilmişlerdir (Gül vd., 2005; De Vuyst ve Neysens, 2005; Gerez vd., 2006; Corsetti ve Settanni, 2007).

İzole edilen türlerin gluten üzerine proteolitik etkilerini gözlemleyebilmek için bakterilerin hem ekzo- hem de endo-enzim preparatları hazırlanarak glutenli besiyerinde oyuk agar difüzyon yöntemine göre inoküle edilmiş ve oyukların etrafında besiyerindeki gluten partikülleri üzerine enzim aktivitelerine bağlı olarak zon oluşturmaları beklenmiştir. Ancak hiçbir kültürün enzim preparasyonu zon oluşturmamıştır. Buna göre, bakterilerdeki proteazların gluten üzerine gözle görülebilecek düzeyde yeterli aktivite gösteremediği düşünülebilir. Besiyerinde büyük gluten topaklarının oluşması, enzim ile substratın biraraya gelmesini zorlaştırmış olabilir. Bununla birlikte, daha önce yapılan çalışmalarda, bakteriyal proteolizin, yüksek molekül ağırlıklı proteinlerden ziyade, peptidlerin hidrolizine dayandığı belirtilmiştir (Gänzle vd., 2008). Buna göre bizim çalışmamızda zon oluşumunun gözlenmemesi de bu durumu destekler niteliktedir. Çalışmamızda hazırlanan besiyerinde gluten bulunsa da bakteriyal enzimler bunlara etki edememiştir. Halbuki bir ekşihamur ortamında buğdaydan gelen endojen proteazların gluteni kısmen parçalamasıyla oluşan peptidler, laktik asit bakterilerinin enzimatik aktiviteleriyle daha fazla hidrolize uğrayabilirler.

İzole edilen bakteri kültürleri ile 24 saat ve 48 saat fermente olan hamurlardan ve nötral ve asit ilave edilerek asitlendirilmiş kontrol hamurlarından gliadin ve glutenin proteinleri izole edilmiş ve SDS-PAGE jelinde oluşturdukları bant yoğunlukları incelenmiştir. Elde

edilen bulgulara göre farklı moleküler ağırlıklı gluten fraksiyonları üzerine bakteriyal proteolitik etki gözlenmiştir. Proteolitik aktivite 48 sa boyunca etkili olmuştur.

Yapılan iki çalışmada (Di Cagno vd., 2004; De Angelis vd., 2006a), LAB'nin ekşi hamur laktobasilleri ve ticari probiyotik bir preparasyon kullanılarak uzun süreli ve yarı sıvı fermantasyonla buğday gliadin fraksiyonlarını önemli derecede hidrolize etme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Zotta vd. (2006; 2007)'nin ve Rollán vd. (2005) yaptıkları çalışmalarda *Lb. plantarum* ve *Lb. curvatus*' a ait bazı suşların yüksek proteolitik ve peptidaz aktivitelerine sahip olduklarını bulmuşlardır. Gerez, Rollán ve Valdez tarafından yapılan bir çalışmada (2006) da bazı *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, ve *Pediococcus pentosaceus* suşlarının gluten üzerine proteolitik etkileri gösterilmiştir. Bahsedilen bu çalışmalar da elde ettiğimiz bulguları doğrular niteliktedir.

Çalışmamızda izole edilen türler dışında, *Lb. alimentarius*, *Lb. brevis*, *Lb. sanfranciscensis* ve *Lb. hilgardii*'ye ait suşların karışımından oluşan bir preparatın da gliadini parçaladığı bulunmuştur (Di Cagno vd., 2002; 2004; Gobbetti vd., 2005; Corsetti ve Settanni, 2007; De Angelis vd., 2006b; Gänzle vd., 2008).

Başka bir çalışmada (Di Cagno, 2004), laktik asit bakterilerinin gliadin proteinleri üzerine etkileri, çölyak hastaları üzerinde de araştırılmıştır. Buğday unuyla, laktobasillerle fermente edilerek hazırlanmış bir ekşihamur, yulaf, milet ve karabuğday gibi toksik olmayan unlar ile karıştırılarak ekme yapımında kullanılmıştır. Diğer bir hamur da yine aynı unların karışımlarıyla hazırlanmış ancak ekşihamur yerine sadece maya ilave edilerek ekme yapılmıştır. Her iki un da 2 g gluten içeriğine sahip olmuştur. Gözlem altında tutulan 17 hastanın 13'ü mayalı ekmeği tükettiğinde intestinal geçirgenliklerinde belirgin bir değişiklik gözlenirken, aynı kişiler ekşihamur ekmeğinden tükettiklerinde intestinal geçirgenliklerinde bir değişim oluşmamıştır (Di Cagno, 2004; Gobbetti vd., 2007).

Çimlenmiş tanelerin endojen proteazlarının, gluten proteinlerini parçalayabildiği tespit edilmiştir. Hartmann, Köhler ve Wieser (2006), çimlenmiş tanelerin proteazlarının gliadin peptidlerini de, çölyak hastaları için non-toksik olan fragmanlara kadar hızlıca hidroliz edebildiğini göstermişlerdir. Çimlenmiş tanelerin buğday ekşihamurlarında kullanımı, buğday prolaminlerinin çok geniş ölçüde hidrolizini mümkün kılmıştır. Ekşihamur fermantasyonu sırasında, prolaminlerin %95'inin hidrolize olduğu belirtilmiştir (Hartmann vd. 2006; Gänzle vd., 2008).

Buğday ve çavdar hamurlarındaki kontrollü proteolizin, gluten miktarını bu ürünlerin çölyak hastaları için tolere edilebileceği düzeylere düşürebileceği önerilmiştir. Bu tip, uzun fermantasyon süreli, ekşihamurlar ekmek üretimi için çok uygun olmasa da, glutensiz formülasyonlara dahil edilerek, pişirmede geliştirici olarak kullanılabilirler. Geleneksel (buğday) ürünleriyle kıyaslandığında glutensiz ekmeğin kalitesi genellikle daha düşük olurken, buğday ekşihamuru ve glutensiz katkılarla birlikte üretilen ekmeklerin somun hacmi ve aroması, buğday ekşihamur ekmekleriyle kıyaslanabilir düzeydedir (Di Cagno vd., 2004).

Daha önce yapılan çalışmalar da göz önüne alındığında, laktik asit bakterilerinin gluten'in çölyak hastaları için toksik özellik gösteren fraksiyonları üzerine proteolitik etkileri bulunmaktadır. Bununla birlikte gerek çimlendirilmiş tanelerin endojen proteazları, gerekse fungal proteazların katılımıyla toksik fraksiyonların parçalanımı ilerletilebilir. Böylece düşük oranda buğday unu kullanılarak ve ekşihamur ile diğer proteaz kaynaklarının (çimlendirilmiş tahıllar, fungal enzim preparatları) ilavesiyle hazırlanmış ürünlerde gluten'in toksik fraksiyonları parçalanırken, ürünün teknolojik, organoleptik ve duyuşsal özellikleri geliştirilebilir. Ancak bu tür ürün formülasyonlarının çölyak hastaları üzerinde sağlık açısından etkileri klinik denemelerle dikkatle araştırılmalıdır. Bunun yanında, "glutensiz" olarak piyasaya sürülen ancak tehlikeli sayılabilecek düzeyde kalıntı gluten içerebilen un formülasyonlarında da ekşihamur kullanımı, kalıntı gluteni elimine ederek ürün özelliklerini geliştirmede fayda sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Anonim, 2003. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Glutensiz Ürünler Tebliği (2003/33).
www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2003-33.html (Erişim Tarihi: 10. 12. 06)
- Arendt, E.K., Liam, A.M.R., Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24, 165-174.
- Chartrand, L. J., Russo, P. A., Duhaime, A. G., Seidman, E. G. (1997). Wheat starch intolerance in patients with celiac disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 6, 612-618.
- Corsetti, A., Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40, 539-558.
- Coşkun-Arı, F.F. (2003). Western Blotlama Yöntemi ile Protein Tespiti. In: *Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı-I. Karaöz, E., Ovalı, E. (-eds)* 189-198, Isparta-Türkiye.
- De Angelis, M., Rizzello, C.G., Fasano, A., Clemente, M.G., De Simone, C., Silano, M., De Vincenzi, M., Losito, I., Gobbetti, M. (2006a). VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762, 80–93.
- De Angelis, M., Coda, R., Silano, M., Minervini, F., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., Vicentini, O., De Vincenzi, M., Gobbetti, M. (2006b). Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to decrease the intolerance to rye flours. *J. Cereal Science*, 43, 301-314.
- Decock, P., Cappelle, S. (2005). Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 113-120.
- De Vuyst, L., Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 43-56.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M., Gobbetti, M. (2002). Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 623-633.

- Di Cagno, R., De Angelis, M., Auricchio, S., Greco, L., Clarke, C., De Vincenzi, M., Giovannini, C., D'Archivio, M., Landolfo, F., Parrilli, G., Minervini, F., Arendt, E., Gobbetti, M. (2004). Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1088–1096.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Alfonsi, G., De Vincenzi, M., Silano, M., Vincentini, O., Gobbetti, M. (2005). Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4393-4402.
- Erdil, A. ve Ateş, Y. (2005). Gluten enteropatisinde son gelişmeler. *Güncel Gastroenteroloji*, 9/1, 18-28.
- Gallagher, E., Gormley, T.R., Arendt, E.K. (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends Food Sci. Technol.*, 15, 143-152.
- Gänzle, M. G., Loponen, J., Gobbetti, M. (2008). Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 513-521.
- Gerez, C.L., Rollán, G.C., de Valdez, G.F. (2006). Gluten breakdown by lactobacilli and pediococci strains isolated from sourdough. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 459-464.
- Gobbetti, M., Simonetti, M. S., Corsetti, A., Santinelli, F., Rossi, J., Damiani, P. (1995). Volatile compound and organic acid production by mixed wheat sourdough starters: influence of fermentation parameters and dynamics during baking. *Food Microbiology*, 12, 497-507.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R. (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 57-69.
- Gobbetti, M., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., De Angelis, M. (2007). Sourdough lactobacilli and celiac disease. *Food Microbiology*, 24, 187-196.

- Gül, H., Özçelik, S., Sağdıç, O., Certel, M., (2005). Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochemistry*, 40, 691-697.
- Hartmann, G., Koehler, P., Wieser, H. (2006). Rapid degradation of gliadin peptides toxic for celiac disease patients by proteases from germinating cereals. *Journal of Cereal Science*, 44, 368-371.
- Hoseney, RC. (1994). Principles of Cereal Science and Technology. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, 378 p, Minnesota.
- Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K., Autio, K., Flander, L., ve Poutanen, K. (2005). Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 104-112.
- Kitahara, M., Sakata, S., Benno, Y. (2005). Biodiversity of *Lactobacillus sanfranciscensis* isolated from five sourdoughs. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 353-357.
- Kutlu, T., (2005). Çölyak hastalığı. www.internationalhospital.com.tr (E.T: 10.12.06)
- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., Biliaderis, C. G. (2007). Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*, 79, 1033-1047.
- Lopez, H. W., Ouvry, A., Bervas, E., Guy, C., Messenger, A., Demigne, C., Remesy, C. (2000). Strains of lactic acid bacteria isolated from sour doughs degrade phytic acid and improve calcium and magnesium solubility from whole wheat flour. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 2281-2285.
- Özçelik, S., (1998). Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu. SDÜ Ziraat Fakültesi Yayınları, No:2, 91 s. Isparta.
- Pyler, EJ. (1988). Baking Science and Technology. Sosland Publishing Company, 1345 p, U.S.A..

- Rizzello, C. G., De Angelis, M., Di Cagno, R., Camarca, A., Silano, M., Losito, I., De Vincenzi, M., De Bari, M. D., Palmisano, F., Maurano, F., Gianfrani, C., Gobbetti, M. (2007). Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4499- 4507.
- Rollán, G., De Angelis, M., Gobbetti, M., de Valdez, G.F. (2005). Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1495-1502.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 2nd edition (3. cilt). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 sf. Cold Spring Harbor, NY.
- S.-ur-Rehman, Paterson, A. ve Piggott, J. R. (2006). Flavour in sourdough breads: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 557-566.
- Şimşek, Ö., Çon, A. H., Tulumoğlu, Ş. (2006). Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control*, 17, 263-270.
- Ulusoy, M., Feyizoğlu, H., Turan, M., Yılmaz, M., Yiğit, N., Gürkan, Y. ve Kuyubaşı, Z. (2002). Gluten sensitif enteropati. *Güncel Gastroenteroloji*, 6/3, 151-158.
- Ün, C., ve Aydoğdu, S. (2003). Çölyak hastalığının moleküler genetik temelleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 46, 75-79.
- Thiele, C., Grassl, S., Ganzle, M. (2004). Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1307–1314.
- Thompson, T. (2001). Wheat starch, gliadin, and the gluten-free diet. *Journal of The American Dietetic Association*, 101, 1456-1459.
- Vermeulen, N., Pavlovic, M., Ehrman, M. A., Gänzle, M. G., Vogel, R. F. (2005). Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T during growth in sourdough. *Applied and Environmental Microbiology*, 71/10, 6260-6266.

- Vermeulen, N., Kretzer, J., Machalitz, H., Vogel, R. F., Gänzle, M. G. (2006). Influence of redox-reactions catalised by homo- and hetero-fermentative lactobacilli on gluten in wheat sourdoughs. *Journal of Cereal Science*, 43, 137-143.
- Wehrle, K., Crowe, N., van Boeijen, I., Arendt, E. K. (1999). Screening methods for the proteolytic breakdown of gluten by lactic acid bacteria and enzyme preparations. *Eur. Food Res. Technol.*, 209, 428-433.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24, 115-119.
- Zotta, T., Piraino, P., Ricciardi, A., McSweeney, P. L. H., Parente, E. (2006). Proteolysis in model sourdough fermentations. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 2567-2574.
- Zotta, T., Ricciardi, A., Eugenio, P. (2007). Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from Cornetto di Matera sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 165-172.
- web_1. www.biruni.com.tr (E.T: 18.12.06)
- web_2. www.food-info.net (E.T: 18.12.06)
- web_3. www.etietieti.com/pronot/pronot.asp (E.T: 18.12.06)
- web_4. www.ihe.com.tr/ekmek_nisasta.asp (E.T: 18.12.06)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Seda GÜRE
Doğum Yeri ve Yılı : Denizli, 25. 09. 1983
Medeni Hali : Bekar



Eğitim Durumu:

2006- (Yüksek Lisans) Süleyman Demirel Ün., Mühendislik Fak.,
Gıda Müh. Böl., ISPARTA

2001 – 2005 Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Müh. Böl.,
ANKARA
Mezuniyet Tarihi: 13.06.2005

1999 - 2001 Meram Anadolu Lisesi (KONYA)
Fen-Matematik Bölümü

1994 - 1999 Uşak Orhan Dengiz Anadolu Lisesi (UŞAK)

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

Ocak- 2008 Ünallar Yemek Fabrikası, ISPARTA

Eylül- 2005 Muratbey Peynirleri, UŞAK

Yapılan Çalışmalar

- Özçelik, S.; Özkan, G.; Kuleaşan, H.; Baydar, H.; Kaplan, A. (2006-2007). Türkiye’de “Ticari Öneme Sahip Çay ve Baharat Olarak Kullanılan Bazı Bitkilerin Mikrobiyal ve Kimyasal Özellikleri Üzerine Işınlamanın Etkisi” konulu TOVAG 105-O-147 No’lu Tübitak projesi (**Burslu Öğrenci**)
- Özkan, G.; Kuleaşan, H.; Baydar, H.; Kaplan, A.; Özçelik, S.; Güre, S.; Erbaş S. 2007. Effect of irradiation on the microbiological status and chemical composition of *Origanum onites* L.I. International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs in Antalya, Turkey (29 April-04 May 2007)
- Kök-Taş T., Güre S., Güzel-Seydim Z. 2007. Determination of Quality Parameters of Cacik with Improved Probiotic Properties. 2nd International Congress on Food and Nutrition. 24-26 October 2007. Istanbul-Turkey. 234.
- Yalçın, E; Güre, S. (2006). Ekmek Hamurunun Köpük Yapısı ve Stabilitesini Etkileyen Faktörler. *Hububat Kongresi-Gaziantep*. (Poster Sunum)