

Laktik Asit Bakterilerinin Gluten Degradasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

Determination of Gluten Degradation Abilities of Lactic Acid Bacteria

Buket Kunduhoğlu^{ID}

Department of Biology, Faculty of Science, University of Eskişehir Osmangazi, Eskişehir, Turkey

* Corresponding author:

Geliş Tarihi / Received: 2.12.2022
Kabul Tarihi / Accepted: 25.12.2022

Araştırma Makalesi/Research Article
DOI: 10.5281/zenodo.7474692

ÖZET

Buğday gluteni, Çölyak hastalığı (ÇH), buğday alerjisi (BA) ve çölyak olmayan gluten duyarlılığı (ÇOĞD) gibi reaksiyonları tetikleyebilmektedir. Hassas bireylerin ömür boyu glutensiz bir diyetle uyum göstermeleri gerekmektedir. Ürünlerdeki glutenin hassas bireyler için uygun düzeylere düşürülmesi amacıyla alternatif stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Ekşi maya mikrobiyotasından faydalanılarak buğday gluteninin immünoreaktif bileşenlerinin zararsız peptitlere hidrolizi konusu giderek artan bir ilgi çekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, geleneksel yöntemlerle üretilmiş ve herhangi bir işlem görmemiş unlar ve bunlardan türetilen ekşi mayalar ve yerel fırınlardan alınan ekşi hamur örneklerinden laktik asit bakterileri (LAB) izole edilmiştir. Kalitatif yöntemle LAB'nin gluten hidroliz yetenekleri test edilmiştir. Sonuç olarak, 39 LAB suşunun glutensiz ya da gluteni azaltılmış fırıncılık ürünlerinin mayalandırılmasında “ekşi maya” olarak kullanım potansiyeli olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterisi, Probiyotikler, Çölyak, Gluten hassasiyeti, Gluten hidrolizi

ABSTRACT

Wheat gluten can trigger reactions such as Celiac disease (CD), wheat allergy (BA) and non-celiac gluten sensitivity (DOGD). Sensitive individuals must adhere to a lifelong gluten-free diet. Alternative strategies are needed to reduce gluten in products to levels suitable for sensitive individuals. The hydrolysis of immunoreactive components of wheat gluten into harmless peptides using the sourdough microbiota has received increasing attention. Therefore, in this study, lactic acid bacteria (LAB) were isolated from traditionally produced and untreated flours and sourdoughs derived from them and sourdough samples from local bakeries. Gluten hydrolysis abilities of LAB were tested by qualitative method. As a result, it was determined that 39 LAB strains have the potential to be used as “sourdough” in the leavening of gluten-free or gluten-reduced bakery products.

Keywords: Lactic acid bacteria, Probiotics, Celiac, Gluten sensitivity, Gluten hydrolysis

1. GİRİŞ

İnsanların tükettikleri temel gıda maddelerinin başında tahıllar gelmektedir. Buğday, dünyada en çok üretilen 3 tahıldan (mısır, buğday, pirinç) biridir (Kızılaslan, 2004). Tahıllar önemli bir enerji, karbonhidrat ve lif kaynağı olmakla birlikte, protein, mineral ve mikro besinler de içerirler. Tahıl tanelerinin kuru ağırlığının yaklaşık %10-20'si proteindir ve modern buğdaydaki toplam proteinin %80-90'ı glutendir (Bromilow ve ark., 2017). Buğday gluteni; gliadin ve glutenin proteinlerinden oluşmaktadır (Obsborn 1924). Gliadinler ise α , β , γ and Ω gliadin gibi monomerik alt birimlerden oluşur. Gliadinler prolin ve glutamin amino asitlerince zengin proteinlerdir. Gliadindeki tekrarlanan prolin ve glutamin dizileri ekmek kalitesi açısından önemlidir ancak hassas bireylerde çölyak hastalığı (ÇH), buğday alerjisi (BA) ve çölyak olmayan gluten duyarlılığı (ÇOĞD) gibi inflamatuvar, immünolojik ve otoimmün reaksiyonları tetikleyebilmektedir (Lionetti ve ark., 2017; Scherf ve ark., 2016; Catassi ve ark., 2015). ÇH hastalığı üzerinde yapılan araştırmalar, glutendeki başlıca

immünoreaktif bileşenin α 2-gliadinin 33-mer peptidi olduğunu ortaya çıkarmıştır (Scherf ve ark., 2018).

Gluten intoleransı ile ilişkili rahatsızlıkların tedavisi yoktur. ÇH bireyler katı bir glutensiz diyet (<20 mg/day) ömür boyu bağlı kalmalıdır (Plugis ve Khosla, 2015). Aynı şekilde, BA ve ÇOGD olan bireylerin de glutenli yiyecekleri tüketmemeleri gerekmektedir. Gluten içeriğini azaltmak için özel olarak işlenmiş ürünlerin toplam gluten içeriği 20 mg/kg'ın altındaysa "glutensiz" olarak etiketlenebilmektedir (Codex Standard 118-1979, 2015). Ancak glutensiz bir diyet ömür boyu sadık kalmak kolay olmadığı gibi, glutensiz ürünlerin daha pahalı olması, ekonomik olarak erişilebilirliğini sınırlamaktadır (Newberry, 2019). Ek olarak, yetersiz işleme veya çapraz kontaminasyon nedeniyle gıdalarda az miktarda bile olsa gluten bileşenleri mevcut olabilir. Bu nedenle ürünlerdeki glutenin hassas bireyler için uygun düzeylere düşürülmesi amacıyla kolay uygulanabilir, tüketiciler açısından kabul görebilecek ve ekonomik açıdan avantajlı alternatif stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alternatif stratejilerden birisi, gluteni immünoreaktif olmayan zararsız peptidlere hidrolize edebilen fungus, bakteri, bitki veya hayvan kaynaklı peptidazların kullanımınıdır (Scherf ve ark., 2018). Peptit bağını parçalayan enzimlere peptidazlar veya proteazlar denir. Sindirim sistemindeki peptidazlar beslenme yolu ile alınan proteinlerin hidrolizinden sorumludur. Ancak, gluten memeli peptidazlarıyla sindirilememektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, buğday gliadinindeki immünoreaktif peptitlerin mikrobiyal protil endopeptidazlar (PEP) ile parçalandığının rapor edilmesi bu konu ile ilgili pek çok diğer çalışmanın yolunu açmıştır (Di Cagno ve ark., 2008).

Ekşi hamur ya da spontan olarak fermente edilmiş hamur 5000 yıldır bilinen, buğday ve/veya çavdar unu, su ve bazen tuzdan oluşan karışımın, laktik asit bakterileri (LAB) ve mayalar tarafından fermente edilmesiyle oluşan bir üründür (Vogel ve ark., 2011). Fermente gıda üretiminde çok eski devirlerden beri kullanıldığından, FDA, LAB ve onların fermentasyon ürünlerinin insan sağlığı açısından güvenli olduğunu bildirmiştir (U.S. FDA, 2018).

LAB'nin proteolitik sistemi üç ana bileşenden oluşur: (i) hücre dışı - kazeinin (süt proteini) oligopeptidlere parçalanmasını başlatan - hücre duvarına bağlı proteinazlar, (ii) peptidleri hücre içine alan peptid taşıyıcıları ve (iii) peptitleri daha kısa peptidlere ve amino asitlere indirgeyen-çeşitli hücre içi peptidazlar (Liu ve ark., 2010)

Ekşi maya mikrobiyotasında *Lactobacillus* sp. baskındır ve gluten degradasyonunda görev alan bazı proteolitik enzimleri üretirler. Bunlar; metaloendopeptidazlar (örn. PepO ve PepF), aminopeptidazlar (örn. PepN ve PepC), dipeptidazlar (ör., PepD) ve dipeptidil- ve tripeptidilpeptidazlar (proline özgü Xaa Pro dipeptidil-peptidazlardır (ör. PepX). Ancak gluten yıkımı için gerekli olan tüm peptidazların karışımını üreten tek bir suş bilinmemektedir. En az üç LAB peptidazının kombinasyonu (PepN, PepX ve PepO) ile 33-mer peptidin di- ve tripeptidlere etkili bir şekilde yıkımı olurken, bunların tek tek ya da ikili kombinasyonları etkili olmamıştır (Vermeulen ve ark., 2005). Bu nedenle, 33-mer peptidin yıkımda rol alan enzimleri üreten suşlar seçilerek, bunların uygun kombinasyonları tam gluten degradasyonu denemelerinde kullanılmalıdır. Ekşi mayalardan izole edilmiş *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. rossiae*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. pentosus*, *Lb. alimentarius*, *Lb. fermentum*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei subsp. casei* ve *P. pentosaceus* gibi türlerin gluteni hidrolize edebildiği ve gluten içeren ürünleri hassas bireylerin tüketimi için uygun hale getirdikleri belirlenmiştir (Di Cagno ve ark., 2008). Ayrıca ekmek ve benzeri fırın ürünlerinde ekşi maya kullanımının diğer avantajları ise raf ömrü, aroma, doku ve besin değeri üzerindeki olumlu etkilerdir (Behera ve Ray, 2015).

Bu bilgilerin ışığında, LAB'nin de dahil olduğu ekşi maya fermentasyonunun, undaki immünoreaktif epitoplara gideriminde oldukça etkili bir uygulama olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle, LAB'nin sahip oldukları PEP enzimleri açısından taranması ve toksik gluten bileşenlerinin giderilmesi amacıyla, en etkin suş veya farklı suşlardan oluşan kombinasyonların belirlenmesi önem taşımaktadır.

Yaptığımız literatür taramasına göre, Türkiye’de üretilen unlardan ve bunlardan hazırlanan ekşi mayalardan izole edilmiş LAB’nin, gluten hidrolize etme yetenekleri konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır/ az sayıda çalışma olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda, artizanal ekmek ve diğer fırın ürünlerinin üretiminde kullanılan siyez buğdayı (*Triticum monococcum*) ve kızılta buğdayı (*Triticum spelt*) unundan ve bunlardan hazırlanan ekşi mayalardan LAB izole edilmiştir. Ayrıca yerel fırınlardan ekşi maya ve hamur örnekleri alınarak LAB izolasyonu yapılmıştır. LAB izolatları gluten hidrolize etme yetenekleri açısından taranmıştır. Bu çalışma sonunda elde edilecek gluten hidrolize eden suşların, glutene hassas bireylerin tüketebileceği düşük glutenli ekmek ve diğer fırın ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanım potansiyeli olacaktır. Ayrıca, bu suşların farklı kombinasyonlarından oluşan kültürler hazırlanarak daha etkin gluten degradasyonu yapabilen starter kültürler elde edilecek ve ekmek üretimi denemelerinde kullanılacaktır.

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Materyal

Ekşi maya, hamur ve un örnekleri

LAB’ların izole edildiği örnekler ve temin edildikleri yerler Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. LAB izole etmek için kullanılan un, ekşi maya ve hamur örnekleri.

Örnek kodu	Özelliği
Un 1	Kızılta buğday unu
Un 2	Siyez buğday unu
Ekşi maya 1	Fethiye (fırından alınmış)
Ekşi maya 2	Kızılta unu ile hazırlanmış
Ekşi maya 3	Siyez unu ile hazırlanmış
Ekmek hamuru	Ekşi maya ile fermente edilmiş hamur (fırından alınmış)

Gluten

Gluten hidrolizi denemelerinde buğday gluteni kullanılmıştır (Naturalys W). Buğday gluteni görünümü krem renkte ve toz halindedir. Çözünürlüğü yaklaşık %65’tir.

2.2.Yöntem

Kızılta ve Siyez unundan ekşi maya yapımı: Laboratuvarımızda, Kızılta ve Siyez unları kullanarak iki farklı ekşi maya (Ekşi maya 2 ve 3) üretilmiştir. Bunun için, steril cam kavanozların içine 1’er kaşık Kızılta ve Siyez unu konmuş ve 1’er kaşık steril içme suyu eklendikten sonra homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra cam kavanozların ağzı steril tülbent bezi ile kapatılmış ve 24 saat oda sıcaklığında, doğrudan güneş almayan bir yerde bekletilerek fermente edilmiştir. 2. gün aynı saatte her kavanoz 1 kaşık un ve 1 kaşık su eklenerek karıştırılmış ve aynı şekilde fermentasyona bırakılmıştır (Çifci, 2017). Hamurda gaz kabarcıklarının gözlenmesi ve kabarak iki katına çıkması fermentasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Bu şekilde 5 kez daha besleme yapıldıktan sonra, elde ettiğimiz iki çeşit ekşi maya LAB izolasyonu amacıyla kullanılmıştır.

Un, ekşi maya ve hamur örneklerinden LAB izolasyonu, saflaştırma ve saf kültürlerin stoklanması: Daha sonraki çalışmalarda gluten hidrolize etme yetenekleri belirlenecek olan suşların izolasyonu ve saflaştırılması amacıyla un, hamur ve ekşi maya örneklerinin desimal dilüsyonları fizyolojik tuzlu su ile (%0.9 NaCl) hazırlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan 100’er µl

alınarak drigalski spatülü ile MRS agar ve M17 agar bulunan petrilere ekim yapılmıştır. Petriler 35°C’de, anaerobik koşullarda 48 saat (sa) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda MRS ve M17 agar yüzeyinde oluşan topluğne başı büyüklüğündeki beyaz/krem renkli, düzgün kenarlı, hafif kubbeli koloniler seçilmiş, her bir koloni izole edildiği besiyeri ile hazırlanmış yatık agar tüplerine transfer edilmiştir. Tüpler 35°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, her tüpten bir öze yardımı ile büyüme alınarak Gram boyamaları yapılmış (Güven ve Zorba, 2021), saflıkları ve hücre morfolojileri belirlenmiştir. İnceleme sonucu, Gram pozitif ve saf olduğu belirlenen kültürler diğer testler uygulanmak üzere etiketlenmiş ve %20 gliserollü besiyeri bulunan kriyo tüplere 3 paralel olacak şekilde aktarılarak stok kültürleri hazırlanmış ve -20°C ile -80°C derin dondurucularda saklanmıştır.

İzolatlardan LAB’nin seçimi

Aerobik ve anaerobik koşullarda büyüme: Öncelikle yukarıda belirtilen şekilde saflaştırılan Gram pozitif suşların aerobik ve anaerobik koşullarda büyümeleri karşılaştırılmıştır. Bu suşlar MRS ve M17 agar plaklarına çizgi ekimle ekilmiş, 35°C’de hem aerobik hem de anaerobik koşullarda (CO₂’li etüvde) 48 saat inkübe edilmiş ve koloni büyümeleri gözlenmiştir.

Katalaz Testi: Hem aerobik hem de anaerobik koşullarda büyüyen suşlara katalaz, testi uygulanmıştır. Test için, 24-48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu alınmıştır ve temiz bir lama aktarılmıştır. Üzerine 1 damla %3’lük H₂O₂ damlatılmıştır, gaz baloncuğu oluşumu pozitif test sonucu olarak değerlendirilmiştir (Reiner, 2010). LAB anaerobiktir, katalaz enzimi bulundurmazlar, bu nedenle sadece katalaz negatif olan suşlara diğer testler uygulanmıştır.

Spor oluşturma: Katalaz negatif suşların spor oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek için suşlar sporulasyon besiyerine (Nutrient agar 20 g/L, MnSO₄ 0,04 g/L, CaCl₂ 0,10 g/L) ekilmiş ve 5 gün 35°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, petrilere gelişen kolonilerden öze dolusu örnek alınarak üzerinde bir damla su olan lama yayılmış malaşit yeşili ile spor boyama yöntemi uygulanmıştır. Bu boyama yönteminde sporangiumlar kırmızı, endosporlar ise yeşil renkte gözlenmektedir (Elçioğlu, 2010). LAB’lar spor oluşturmazlar, bu nedenle sadece spor oluşturmayan suşlara sonraki testler uygulanmıştır.

Hareketlilik testi: Katalaz negatif ve sporsuz suşlar seçilmiş ve flagel varlığını belirlemek için, asılı damla yöntemi ile hareketlilik testi yapılmıştır. Bu yöntemde çukur lamlar kullanılmıştır. Suşlar MRS brotha aktiflenmiştir ve 18-24 saatlik kültürler hareketlilik testi için kullanılmıştır (Jain vd., 2020). LAB hareketsizdir, bu nedenle sadece hareketsiz olan suşlar LAB olarak değerlendirilmiştir.

Bu testler sonunda Gram pozitif, katalaz negatif, sporsuz ve hareketsiz olan suşlar muhtemel LAB olarak kabul edilmiş ve iki farklı besiyeri kullanılarak gluten hidrolize etme yetenekleri belirlenmiştir.

GA-1 ve GA-2 besiyerlerinde LAB suşlarının gluten hidroliz yetenekleri

LAB’ nin Gluten hidroliz etme yeteneklerini belirlemek için önce **Gluten Brot-1 (GB-1)**: Buğday gluteni 10 g/L, Tripton 5,6 10 g/L, Maya ekstraktı 2,5 g/L, D(+) glukoz 1 g/L, CaCl₂ 2 g/L, Sitrik asit monohidrat 4 g/L, Na₂HPO₄ 22,96 g/L, pH 7) ve **Gluten Brot-2 (GB-2)**: Buğday gluteni 90 g/L, D(+) glukoz 20 g/L, KH₂PO₄ 10 g/L, K₂HPO₄ 10 g/L, Na₂HPO₄ 22,96 g/L, Tween 80 1 g/L adını verdiğimiz iki farklı besiyeri kullanılmıştır (Gerez vd., 2006; Stefanska vd., 2016). GB-1 besiyerinde glutene ek olarak tripton ve maya ekstraktı gibi diğer azot kaynakları bulunurken, GB-2 besiyerinde tek “azot kaynağı” olarak gluten bulunmaktadır. **Gluten Agar-1 (GA-1)** ve **Gluten Agar-2 (GA-2)** besiyerleri ise, GB-1 ve GB-2 besiyerlerinin agar eklenmiş (15 g/L) katı halidir.

LAB suşları MRS broth besiyerine ekilmiş ve aerobik olarak 35°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Aktiflenen LAB kültürlerinin hücre yoğunlukları Mc Farland 0,5 standartına göre ayarlanmıştır. Yoğunlukları ayarlanmış LAB kültürleri GB-1 besiyerine ekilmiş ve 35°C’de 24 saat inkübasyona

bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası bu kültürlerden 10'ar µl alınarak, içinde GA-1 besiyeri bulunan petrilere damla yöntemi ile ekim yapılmış ve petrilere 35°C'de 24 saat, aerobik ve anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Çalışma her bir suş için 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır. İnkübasyon sonrası petrilere yüzeyleri Coomassie Brilliant Blue R-250 protein boyası ile kaplanmış ve 5 dakika bu boya ile bekletilmiştir. Daha sonra petrilereki fazla boya dökülmüş ve boya uzaklaştırma çözeltisi eklenerek 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda petrilereki hidroliz zonlarının varlığı kontrol edilmiştir (Wehrle vd., 1999). GA-1 plaklarında protein hidrolizinin işareti, koloni altında ve çevresinde mavi rengin kaybolmasıdır.

Gluten hidrolize etmeyen ve gd-1, 2, 3 ve 4 olarak adlandırdığımız bakteri suşları ise negatif kontrol olarak denemelere dahil edilmiştir.

LAB'ların tek azot kaynağı olarak gluteni kullanabilme yetenekleri GB-2 ve GA-2 besiyeri ile belirlenmiştir. LAB suşları önce MRS broth besiyerine ekilerek 35°C'de 24 saatlik inkübe edilerek aktiflenmiştir. Aktiflenen LAB kültürlerinin hücre yoğunlukları Mc Farland 0,5 standartına göre ayarlanmıştır. Yoğunlukları ayarlanmış kültürlerin önceden hazırlanmış GB-2 besiyerine ekimleri yapılmıştır ve tekrar 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, yukarıda anlatılan şekilde, GA-2 besiyerine ekilerek, aerobik ve anaerobik koşullarda inkübe edilmiş ve hidroliz zonlarının varlığı kayıt edilmiştir (Gerez vd., 2006; Stefańska vd., 2016).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Ekşi maya, LAB ve mayalardan oluşan karmaşık bir mikrobiyal ekosistemdir. Ekşi mayalar ürüne karakteristik tad ve aroma kazandırmasından dolayı ekmek üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekşi maya mikrobiyotasının en önemli grubu Lactobacillerdir (Corsetti and Settani, 2017). Her bir ekşi hamur; ortam, bileşen, fermentasyon süreci, ve içindeki mikrobiyal populasyonlar ve bunların etkileşimleri nedeniyle benzersizdir. Ayrıca, ekşi maya starterlerinin önemli bir parçası olan LAB, gastrointestinal sağlığı iyileştirmede önemli potansiyeli olan probiyotikler olarak kabul edilmektedir (Lau et al., 2021).

Siyez unundan üretilmiş ekmek çeşitleri kendine özgü tadı ve daha doğal (atalık buğday) olması nedeniyle tüketiciler tarafından tercih edilmektedir. Ayrıca Kızıltan unu da makarnalık buğday olarak üretilen bir buğdaydır. Yaptığımız literatür taramasında, Türkiyede üretilen Siyez ve Kızıltan buğdayından hazırlanmış un ya da bu unlardan elde edilmiş ekşi mayalardan LAB izolasyonu ve identifikasyonunu konu alan bir çalışma bulamadık. Bu nedenle bu unlardan ve onlardan hazırlanan ekşi mayalardan ve yerel fırınlardan alınan ekşi mayalardan LAB izolasyonu yapılmıştır. LAB suşlarının gluten degradasyon yeteneği, GA-1 ve GA-2 olmak üzere iki farklı besiyerine ekilerek kalitatif olarak belirlenmiştir.

LAB izolasyonu için un, ekşi maya ve ekşi hamur örneklerinden (Çizelge 1) dilüsyonlar hazırlanmış ve bu dilüsyonlardan MRS ve M17 agar petrilere ekim yapılarak, anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. MRS ve M17 agar yüzeyinde oluşan topluluğın başı büyüklüğündeki beyaz/krem renkli, düzgün kenarlı, hafif kubbeli koloniler seçilmiş ve bu izolatlar MRS yatık agarlarına transfer edilerek saklanmıştır. İzolatların Gram boyaması yapılarak saflıkları kontrol edilmiş ve Gram pozitif olan izolatlar (basiller, kokobasiller ve koklar) daha sonraki testlerde kullanılmak üzere ayrılmıştır. Gram pozitif izolatlara önce katalaz sonra sporulasyon ve hareketlilik testleri uygulanmıştır. LAB lar; Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen ve hareketsiz bakterilerdir. Bu özelliklere sahip olan izolatlar muhtemel LAB olarak kabul edilmiş ve sonraki testler de sadece bu izolatlar üzerine uygulanmıştır. Çizelge 2-7' de sadece Gram pozitif olan izolatların yukarıda belirtilen test sonuçları verilmiştir. Daha sonra bu suşlara aerobik büyüme ve glukozdan CO₂ üretimi testleri uygulanmıştır (Çizelge 2-7). Son olarak da bu suşların aerobik ve anaerobik koşullarda gluten hidroliz yetenekleri belirlenmiştir (Çizelge 8).

Fethiye deki bir ekmek fırınının ekşi mayalı ekmek yapımında kullandığı Ekşi maya 1 örneğinden (Çizelge 2), Gram boyama, katalaz, spor oluşturma ve hareketlilik testi sonucunda basil formunda

15 LAB suşu izole edilmiştir. Bu suşların tamamı hem aerobik hem de anaerobik koşullarda büyüme göstermiştir. Sadece 3 nolu suş glukozdan gaz üretmiştir, bu onun heterofermentatif bir suş olduğunu göstermektedir, diğer 14 suş homofermentatiftir. Ekşi hamur fermantasyonunda heterofermentatif LAB önemli rol oynamaktadır. Ekşi hamurda bulunan mayalar ve heterofermentatif LAB fermantasyon sürecinde hamurun kabarmasından sorumlu iken homofermentatif LAB ekmeğin elastikiyetini, asitliğini ve lezzetini olumlu yönde etkilemektedir (İnce et al., 2021).

Kızıltan unu kullanılarak laboratuvarımızda üretilmiş Ekşi maya 2 örneğinden (Çizelge 3), Gram boyama ve katalaz testi sonucunda basil formunda sadece bir Gram pozitif suş (57) izole edilmiştir. Bu suş katalaz pozitif olduğu için LAB olarak kabul edilmemiş ve diğer testler uygulanmamıştır.

Siyez unu kullanılarak laboratuvarımızda üretilmiş Ekşi maya 3 örneğinden (Çizelge 4), Gram boyama, katalaz, spor oluşturma ve hareketlilik testi sonucunda basil formunda 2 LAB suşu izole edilmiştir. Bu suşlar hem aerobik hem de anaerobik koşullarda büyüme göstermiştir. 102 nolu suş heterofermentatif, diğer suş homofermentatiftir.

Kızıltan unundan (Un 1) Gram boyama, katalaz, spor oluşturma ve hareketlilik testi sonucunda kok formunda 4 LAB suşu izole edilmiştir. Bu suşların tamamı hem aerobik hem de anaerobik koşullarda büyüme göstermiştir. Koko-basil formundaki 100 nolu suş katalaz pozitif olduğu için LAB olarak kabul edilmemiş ve diğer testler uygulanmamıştır (Çizelge 5).

Siyez unundan (Un 2) Gram boyama, katalaz, spor oluşturma ve hareketlilik testi sonucunda basil formunda 16 LAB suşu izole edilmiştir. 16 LAB suşunun 5'i koko-basil diğerleri basil formundadır. 16 LAB suşunun tamamı hem aerobik hem de anaerobik koşullarda büyüme göstermiştir. Sadece 66, 82 ve 107 suşları heterofermentatif, diğer suşlar homofermentatiftir (Çizelge 6).

Eskişehirdeki bir ekmek fırınından alınmış ve ekşi maya ile fermente edilmiş ekmek hamurundan kok (26) ve Koko-basil (32) formunda 2 LAB suşu izole edilmiştir. Bu suşlar hem aerobik hem de anaerobik koşullarda büyüme göstermiştir ve homofermentatiftir. Kok formundaki 5 suş katalaz pozitif olduğu için LAB olarak kabul edilmemiş ve diğer testler uygulanmamıştır (Çizelge 7).

Örneklerin tamamından 39 LAB suşu elde edilmiş ve bu suşların gluten hidroliz yetenekleri belirlenmiştir. Tüm LAB suşları GA-1 ve GA-2 besiyerlerine ekilmiş, aerobik ve anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, besiyerlerinin yüzeyi Coomassie Brilliant Blue protein boyama yöntemi ile boyanmış ve petriyer yıkandıktan sonra hidroliz zonlarının varlığı gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır (Şekil 1). Benzer çalışmalarda da tek azot kaynağı olarak gluten içeren besiyerleri kullanılarak bakterilerin gluten degradasyon yetenekleri kalitatif olarak gösterilmiştir (Sharma et al., 2022; Kunduhoglu and Hacıoglu, 2020; Rashmi and Gayatri (2017); Berger et al., 2015; Wehrle et al., 1999). Sonuç olarak tüm 39 LAB suşunun aerobik ve anaerobik koşullarda gluten hidrolizi yapabildikleri belirlenmiştir (Çizelge 8). Şekil 1'de bazı LAB suşlarının GA-2 besiyerinde oluşturdukları proteoliz zonları görülmektedir. Negatif kontrol olarak kullandığımız ve gd-1, 2, 3 ve 4 olarak adlandırdığımız bakteri suşları GA-2 besiyerine ekilmiş ancak zayıf büyüme göstermiştir.

Çizelge 2. Ekşi maya 1' den izole edilen Gram pozitif bakterilerin morfolojileri, aerobik /anaerobik üreme, hareketlilik, sporulasyon ve katalaz test sonuçları.

Suş No	Hücre morfolojisi	Katalaz	Anaerobik üreme	Aerobik üreme	Spor	Hareket	Glukozdan CO ₂ üretimi
1	Basil	-	+	+	-	-	-
2	Basil	-	+	+	-	-	-
3	Basil	-	+	+	-	-	+
4	Basil	-	+	+	-	-	-
16	Basil	-	+	+	-	-	-
17	Basil	-	+	+	-	-	-
18	Basil	-	+	+	-	-	-
19	Basil	-	+	+	-	-	-
20	Basil	-	+	+	-	-	-
21	Basil	-	+	+	-	-	-
28	Basil	-	+	+	-	-	-
33	Basil	-	+	+	-	-	-
34	Basil	-	+	+	-	-	-
39	Basil	-	+	+	-	-	-
41	Basil	-	+	+	-	-	-

Çizelge 3. Ekşi maya 2'den izole edilen Gram pozitif bakterilerin morfolojileri, aerobik /anaerobik üreme, hareketlilik, sporulasyon ve katalaz testi sonuçları

Suş No	Hücre morfolojisi	Katalaz	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Sporulasyon	Hareketlilik	Glukozdan CO ₂ üretimi
57	Basil	+	yapılmadı	+	yapılmadı	yapılmadı	yapılmadı

Çizelge 4. Ekşi maya 3' den (Siyez unu) izole edilen Gram pozitif bakterilerin morfolojileri, aerobik /anaerobik üreme, hareketlilik, sporulasyon ve katalaz testi sonuçları

Suş No	Hücre morfolojisi	Katalaz	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Sporulasyon	Hareketlilik	Glukozdan CO ₂ üretimi
52	Basil	-	+	+	-	-	-
102	Basil	-	+	+	-	-	+

Çizelge 5. Un 1'den (**Kızıltan unu**) izole edilen Gram pozitif bakterilerin morfolojileri, aerobik /anaerobik üreme, hareketlilik, sporulasyon ve katalaz testi sonuçları

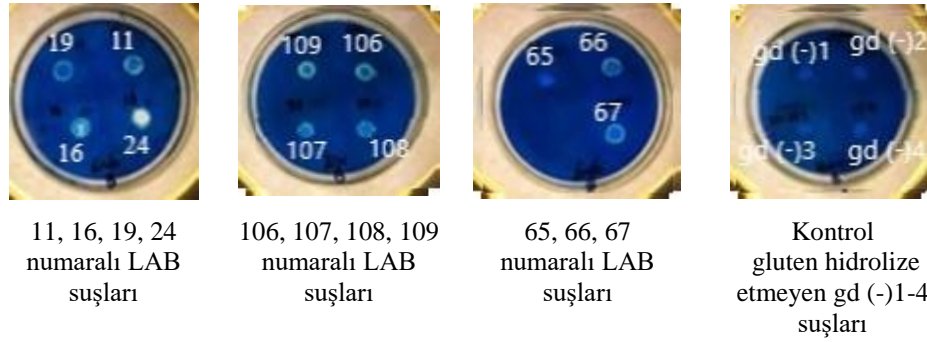
Suş No	Hücre morfolojisi	Katalaz	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Sporulasyon	Hareketlilik	Glukozdan CO ₂ üretimi
11	Kok	-	+	+	-	-	-
22	Kok	-	+	+	-	-	-
23	Kok	-	+	+	-	-	-
24	Kok	-	+	+	-	-	-
100	Koko-basil	+	yapılmadı	+	yapılmadı	yapılmadı	yapılmadı

Çizelge 6. Un 2'den (**Siyez unu**) izole edilen Gram pozitif bakterilerin morfolojileri, aerobik /anaerobik üreme, hareketlilik, sporulasyon ve katalaz testi sonuçları

Suş No	Hücre morfolojisi	Katalaz	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Sporulasyon	Hareketlilik	Glukozdan CO ₂ üretimi
29	Basil	-	+	+	-	-	-
43	Koko-basil	-	+	+	-	-	-
62	Basil	-	+	+	-	-	-
64	Basil	-	+	+	-	-	-
65	Basil	-	+	+	-	-	-
66	Basil	-	+	+	-	-	+
67	Basil	-	+	+	-	-	-
68	Basil	-	+	+	-	-	-
82	Basil	-	+	+	-	-	+
83	Basil	-	+	+	-	-	-
84	Basil	-	+	+	-	-	-
85	Basil	-	+	+	-	-	-
106	Koko-basil	-	+	+	-	-	-
107	Koko-basil	-	+	+	-	-	+
108	Koko-basil	-	+	+	-	-	-
109	Koko-basil	-	+	+	-	-	-

Çizelge 7. Ekmek hamurundan izole edilen Gram pozitif bakterilerin morfolojileri, aerobik /anaerobik üreme, hareketlilik, sporulasyon ve katalaz testi sonuçları

Suş No	Hücre morfolojisi	Katalaz	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Sporulasyon	Hareketlilik	Glukozdan CO ₂ üretimi
26	Kok	-	+	+	-	-	-
32	Koko-basil	-	+	+	-	-	-
63	Kok	+	yapılmadı	+	yapılmadı	yapılmadı	yapılmadı
77	Kok	+	yapılmadı	+	yapılmadı	yapılmadı	yapılmadı
78	Kok	+	yapılmadı	+	yapılmadı	yapılmadı	yapılmadı
87	Kok	+	yapılmadı	+	yapılmadı	yapılmadı	yapılmadı
99	Kok	+	yapılmadı	+	yapılmadı	yapılmadı	yapılmadı



Şekil 1. Bazı LAB suşlarının tek azot kaynağı olarak glutenin kullanıldığı GA-2 plaklarında meydana getirdiği proteoliz zonları. Gluten hidrolize etmeyen gd(-)1-4 suşları negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çizelge 8. 39 LAB suşunun GA-1 ve GA-2 besiyerlerinde gluten hidrolizi

Suş no	Gluten hidrolizi			
	GA-1 besiyeri		GA-2 besiyeri	
	Aerobik	Anaerobik	Aerobik	Anaerobik
1	+	+	++	++
2	+	+	++	++
3	+	+	++	++
4	+	+	++	++
11	+	+	++	++
16	+	+	++	++
17	+	+	++	++
18	+	+	++	++
19	+	+	++	++
20	+	+	++	++
21	+	+	++	++
22	+	+	++	++
23	+	+	++	++
24	+	+	++	++
26	+	+	++	++
28	+	+	++	++
29	+	+	++	++
32	+	+	++	++
33	+	+	++	++
34	+	+	++	++
39	+	+	++	++
41	+	+	++	++
43	+	+	++	++
52	+	+	++	++
62	+	+	++	++
64	+	+	++	++
65	+	+	++	++
66	+	+	++	++
67	+	+	++	++
68	+	+	++	++
82	+	+	++	++
83	+	+	++	++
84	+	+	++	++
85	+	+	++	++
102	+	+	++	++
106	+	+	++	++
107	+	+	++	++
108	+	+	++	++
109	+	+	++	++

+:İyi

++:Çok iyi

SONUÇ

ÇH, genetik olarak yatkın kişilerde ortaya çıkan kronik bir otoimmün hastalıktır. Günümüzde bu hastalığın tedavisi bulunmamaktadır. Hassas bireylerin ömür boyu glutensiz bir diyetle uyum göstermeleri gerekmektedir. Bu nedenle ürünlerdeki glutenin hassas bireyler için uygun düzeylere düşürülmesi amacıyla alternatif stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda, ekşi maya mikrobiyomundan faydalanılarak buğday gluteninin immünoreaktif bileşenlerinin zararsız peptitlere hidrolizi konusu giderek artan bir ilgi çekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, geleneksel yöntemlerle üretilmiş ve herhangi bir işlem görmemiş unlar ve bunlardan türetilen ekşi mayalar ve yerel fırınlardan alınan ekşi hamur örneklerinden LAB izolasyonu yapılmıştır. LAB suşları içinde buğday gluteni bulunan besiyerlerine ekilerek gluten hidroliz yetenekleri açısından taranmış ve gluteni hidrolize edebildikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada izole edilen 39 LAB suşunun glutensiz ya da gluteni azaltılmış fırıncılık ürünlerinin mayalandırılmasında “ekşi maya” olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Daha sonra yapılacak çalışmalar ile, bu suşların farklı kombinasyonlarından oluşan kültürler hazırlanarak daha etkin gluten degradasyonu yapabilen starter kültürler elde edilecek ve ekmek üretimi denemelerinde kullanılacaktır. Suşların bu potansiyellerinin kantitatif testler kullanılarak daha detaylı bir şekilde araştırılması da diğer bir çalışma konusu olacaktır.

KAYNAKLAR

- Behera, S.S., Ray, R.C., 2015. Sourdough bread. In: Rosell, C.M., Bajerska, J., El Sheikha, A.F (Eds), Bread Fortification for Nutrition and Health, (pp 53–67). Boca Raton: CRC Press.
- Berger, M., Sarantopoulos, C., Ongchangco, D., Sry, J., ve Cesario, T., 2015. Rapid isolation of gluten-digesting bacteria from human stool and saliva by using gliadin-containing plates. *Exp Biol Med.* 240(7), 917–924.
- Bromilow, S.N.L., Gethings L.A., Langridge, J.I., Shewry, P.R., Buckley, M., Bromley, M.J., Mills, E.N.C., 2017. Comprehensive proteomic profiling of wheat gluten using a combination of data-independent and data-dependent acquisition. *Front Plant Sci.* 7, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02020>
- Catassi, C., Elli, L., Bonaz, B., Bouma, G., Carroccio, A., Castillejo, G., Cellier, C., Cristofori, F., de Magistris, L., Dolinsek, J., Dieterich, W., Francavilla, R., Hadjivassiliou, M., Holtmeier, W., Körner, U., Leffler, D.A., Lundin, K.E.A., Mazzarella, G., Mulder, C.J., Fasano, A., 2015. Diagnosis of non-celiac gluten sensitivity (NCGS): the Salerno experts' criteria. *Nutrients*, 7(6), 4966–4977. <https://doi.org/10.3390/nu7064966>
- Codex Standard 118-1979, 2015. Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Codex Alimentarius Commission, revision 1, amendment 2.
- Corsetti, A., Settanni, L., 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res Int.* 40(5), 539–558.
- Çifci, M.M., 2017. Ekşi hamur mayasından izole edilen *Lactobacillus* türlerinin klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 34–69.
- Di Cagno, R., Rizzello, C.G., De Angelis, M., Cassone, A., Giuliani, G., Benedusi, A., Limitone, A., Surico, R.F., Gobbetti, M., 2008. Use of selected sourdough strains of *Lactobacillus* for removing gluten and enhancing the nutritional properties of gluten-free bread. *J Food Prot.* 71(7), 1491. [10.4315/0362-028x-71.7.1491](https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.7.1491)

- Elçioğlu, Ö., 2010. Kargı Tulum Peynir'inden izole edilen laktik asit bakterilerinin starter ve probiyotik kültür özelliklerinin belirlenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Gerez, C.L., Rollan, G.C., De Valdez, G.F., 2006. Gluten breakdown by lactobacilli and pediococci strains isolated from sourdough. *Lett Appl Microbiol.* 42(5), 459–464.
- İnce, C., Köse, E., Çağındı, Ö., 2021. *In vitro* bioaccessibility and health effects of bioactive compounds in bread produced by sourdough fermentation. *Türk Tarım – Gıda Bilim Teknol Derg.* 9(9), 1686–1694.
- Jain, A., Jain, R., Jain, S., 2020. *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology.* Springer, Humana New York, NY.
- Kızılaslan, H., 2004. Dünya’da ve Türkiye’de buğday üretimi ve uygulanan politikaların karşılaştırılması. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi.* 21(2), 23–38.
- Kunduhoglu, B., Hacıoglu S., 2020. Probiotic potential and gluten hydrolysis activity of *Lactobacillus brevis* KT16-2. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 12(1), 1–4. 10.1007/s12602-020-09633-y
- Lau, S.W., Chong, A.Q., Chin, N.L., Talib, R.A., Basha, R.K., 2021. Sourdough microbiome comparison and benefits. *Microorganisms.* 9, 1355. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071355>
- Lionetti, E., Pulvirenti, A., Vallorani, M., Catassi, G., Verma, A.K., Gatti, S., Catassi, C., 2017. Re-challenge studies in non-celiac gluten sensitivity: a systematic review and meta-analysis. *Front Physiol.*, 8, art no. 621. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00621>
- Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A., Siezen, R.J., 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genom.* 11, 36. 10.1186/1471-2164-11-36
- Newberry, C., 2019. The gluten-free diet: use in digestive disease management. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 17, 554–563. <https://doi.org/10.1007/s11938-019-00255-0>
- Obsborn, T., 1924. *The vegetable proteins*, 2nd edn. Longmans Green & Co, London.
- Plugis, N.M., Khosla, C., 2015. Therapeutic approaches for celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 29, 503–521.
- Rashmi B.S., Gayathri D., 2017. Molecular characterization of gluten hydrolysing *Bacillus* sp. and their efficacy and biotherapeutic potential as probiotics using Caco-2 cell line. *J Appl Microbiol.* 123, 759–772. 10.1111/jam.13517
- Reiner, K., 2010. Catalase test protocol. American Society for Microbiology Microbe Library. <https://asm.org/getattachment/72a871fc-ba92-4128-a194-6f1bab5c3ab7/Catalase-Test-Protocol.pdf>
- Scherf, K.A., Koehler, P., Wieser, H., 2016. Gluten and wheat sensitivities - an overview. *J Cereal Sci.* 67, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.008>
- Scherf, K.A., Wieser, H., Koehler, P., 2018. Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Res Int.* 110, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.021>
- Selma G., Zorba, N.N.D., 2021. Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu. 12. Baskı, sh: 204. Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara.
- Sharma, K., Bhawanani, S., Sharma, D., Goel, G., 2022. Selection of indigenous *Lacticaseibacillus paracasei* CD4 for production of gluten-free traditional fermented product Bhaturu. *Food Biotechnol.* 36(1), 76–91. 10.1080/08905436.2021.2007395

- Stefańska, I., Piasecka-Józwiak, K., Kotyrba, D., Kolenda, M., Stecka, K.M., 2016. Selection of lactic acid bacteria strains for the hydrolysis of allergenic proteins of wheat flour. *J Sci Food Agric.* 96(11), 3897–3905. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7588>
- U.S. FDA (Food and Drug Administration), 2018. Generally Recognized as Safe (GRAS) Notification Program 01.04.2018. <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list>
- Vermeulen, N., Pavlovic, M., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2005. Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451 during growth in sourdough. *Appl Environ Microbiol.* 71(10), 6260–6266. [10.1128/aem.71.10.6260-6266.2005](https://doi.org/10.1128/aem.71.10.6260-6266.2005)
- Vogel, R.F., Pavlovic, M., Ehrmann, M.A., Wiezer, A., Liesegang, H., Offschanka, S., Voget, S., Angelov, A., Böcker, G., Liebl, W., 2011. Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as a stable element in traditional sourdoughs. *Microb Cell Fact.* 10(Suppl. 1), S6. [10.1186/1475-2859-10-S1-S6](https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S6)
- Wehrle, K., Crowe, N., van Boeyjen 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 (6):428–433. [doi:10.1007/s002170050521](https://doi.org/10.1007/s002170050521)