

TOKSİK GLUTEN PEPTİTLERİN DETOKSİFİKASYONUNDA YENİ YÖNTEMLER VE GLUTEN TOKSİSİTESİNİN BELİRLENMESİ

Ezgi Karademir, Erkan Yalçın*

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü, Gölköy Kampüsü, Bolu

Geliş tarihi / *Received*: 01.08.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 21.10.2016

Kabul tarihi / *Accepted*: 27.10.2016

Özet

Buğday, arpa ve çavdarda ve yulafın bazı çeşitlerinde bulunan sırasıyla gliadin, hordein, secalin ve avenin prolamin proteinlerine karşı oto-immün sistemin intolerans göstermesinden kaynaklanan sindirim sistemi rahatsızlığına çölyak hastalığı denmektedir. Çölyak hastaları için toksik olan buğday, arpa ve çavdar prolaminleri, terminolojide genellikle "gluten" olarak adlandırılır. Prolamin proteinlerinin ince bağırsakta kısmen hidrolizi sonucu oluşan toksik gluten peptitler ince bağırsaklarda villilerin körelmesi ve iltihaplanma gibi karakteristik belirtilere sebep olurlar. Glutensiz diyet, çölyak hastaları için güvenli tek uygulamadır. Codex Alimentarius Commission (CAC), glutensiz gıdaların gluten içeriği eşik değerini <20 mg/kg, düşük gluten içerikli gıdaların ise <100 mg/kg olarak belirlemiştir. Glutensiz gıda üretimi için son yıllarda yeni gluten detoksifikasyon yöntemleri araştırılmaktadır. Bunlar, bakteri veya küf kaynaklı gluten-spesifik peptidazların kullanıldığı enzimatik yöntemler, ekşi hamur uygulaması, tahılların çimlendirilmesiyle aktifleşen gluten-spesifik peptidazlar ile glutenin oto-sindirimi, mikrobiyel transglutaminazın transamidasyonu yoluyla detoksifikasyon gibi bazı alternatif yöntemlerdir. Glutenin tespitinde immünolojik teknikler önemli rol oynamaktadır. CAC tarafından belirlenen resmi standart metot, R5 antikorunu kullanan kompetitif ELISA yöntemidir.

Anahtar kelimeler: Çölyak hastalığı, gluten toksisitesi, detoksifikasyon yöntemleri, gluten analizi

NEW METHODS FOR DETOXIFYING OF TOXIC GLUTEN PEPTIDES AND DETERMINATION OF GLUTEN TOXICITY

Abstract

Celiac disease (CD), which is a gastrointestinal disorder, is an auto-immune intolerance against prolamine proteins, like gliadin, hordein, secalin and avenin, of wheat, barley, rye and in some varieties of oats, respectively. Prolamins of wheat, barley and rye, which are toxic to celiac patients, are generally recognised as 'gluten' terminologically. Toxic gluten peptides, which are formed through partial hydrolysis of prolamin proteins, cause characteristic inflammation and villous atrophy in upper small intestine of celiac patients. Gluten-free diet is the only safety treatment for celiac patients. Codex Alimentarius Commission (CAC) determined that the threshold values of gluten content in gluten-free foods and foods containing low levels of gluten are <20 mg/kg and <100 mg/kg, respectively. For the production of gluten-free products, the novel gluten detoxifying methods have recently been investigated. These are alternative methods, such as enzymatic approaches like using gluten-specific peptidases obtained from fungi or bacteria, sourdough practices, autolysis of gluten with activated gluten-specific peptidases during germination of cereals, using microbial transglutaminase fulfilling transamidation reactions. Immunologic technics play an important role in the quantification of gluten. The official standart method issued by CAC is the competitive ELISA method using R5 antibody.

Keywords: Celiac disease, gluten toxicity, detoxifying methods, gluten quantification

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ yalcin_e@ibu.edu.tr,

☎ (+90) 374 254 1000 / 4832,

☎ (+90) 374 253 4558

ÇÖLYAK HASTALIĞI VE PROLAMİN PROTEİNLERİ

Çölyak hastalığı için kullanılan 'gluten' terimi genel olarak buğday, arpa, çavdar ve yulafıta veya bunların melezlerinde bulunan, bazı insanların intolerans gösterdiği, suda ve 0.5 mol/L NaCl'de çözünemeyen proteinler olarak tanımlanmıştır. Prolamin proteinleri olarak adlandırılan bu proteinler, aynı tahılların depo proteinlerinden olup, %40-70'lik etil alkol ile ekstrakte edilebilen ve buğday gluteninin %50'sini (gliadinler) oluşturan proteinlerdir (1). Çölyak hastalığı, beslenmeyle alınan gluten proteinlerinin prolin ve glutamin aminoasitleri ile zengin olması sebebiyle ince bağırsakta sindirime direnç göstermesi ile başlayan ve oto-immün sistemde meydana gelen bağırsak rahatsızlığıdır. Dünyadaki nüfusun %1'ini etkilemektedir ve tek çaresi glutensiz beslenmedir (1). Bu sebeple, glutensiz gıda üretimi ve ürünlerdeki gluteni doğru ve kesin olarak belirleyecek yöntemin seçimi en önemli hedefler olmuştur.

TOKSİK GLUTEN PEPTİTLERİ

Çölyak hastaları için toksik olan buğday, arpa ve çavdar prolaminleri, terminolojide genellikle "gluten" terimi altında toplanmıştır. Son çalışmalarda yulafın sadece bazı çeşitlerinin toksik olduğu ve yulaf prolaminlerini birçok çölyak hastasının tolere edebildiği bildirilmiştir. Buğday, çavdar, yulaf ve arpada bulunan sırasıyla gliadinler, sekalinler, aveninler ve hordeinler 'prolamin tip proteinler' olarak tanımlanmıştır (2-7). Çizelge

Çizelge 1. Triticeae alt sınıfından buğday, çavdar ve arpanın çölyak hastalığına sebep olan prolamin proteinleri ile buğdayın glutenin proteinleri (2, 8, 9).

	Buğday (<i>Triticum aestivum</i>)	Çavdar (<i>Secale cereale</i>)	Arpa (<i>Hordeum vulgare</i>)
HMW ^a polimerik grup	HMW-gluteninler ^b (67 000-88 000 MW ^c)	HMW-sekalinler (>75 000 MW)	D-hordeinler (105 000 MW)
Kükürt-fakir MMW ^a monomerik prolaminler	ω -gliadinler (ω 1-, ω 2- ω 5-) (46 000-74 000 MW)	ω -sekalinler (48 000-53 000 MW)	C-hordeinler (55 000-75 000 MW)
Kükürt-zengin LMW ^a polimerik (agregat) grup	LMW-gluteninler ^d (30 000-45 000 MW)	γ -75k-sekalinler (40 000-75 000 MW)	B-hordeinler (32 000-46 000 MW)
Kükürt-zengin LMW monomerik prolaminler	α -, β - ve γ -gliadinler (30 000-45 000 MW)	γ -40k-sekalinler (40 000-75 000 MW)	γ -hordeinler (32 000-46 000 MW)

^a HMW: Yüksek Molekül Ağırlıklı; MMW: Orta Molekül Ağırlıklı; LMW: Düşük Molekül Ağırlıklı

^b İndirgeyici ajan içeren çözümlerde çözünen, %60'lık 1-propanolde çözünemeyen indirgenmiş (reduced) alt-birimler

^c MW: Molekül Ağırlık

^d İndirgeyici ajan içeren çözümlerde ve %60'lık 1-propanolde çözünebilen indirgenmiş (reduced) alt-birimler

1'de buğday, çavdar ve arpanın çölyak hastalığına sebep olan prolamin proteinleri ile buğdayın glutenin proteinleri ayrıntılı olarak gösterilmiştir (2, 8, 9).

Gliadin ve diğer prolaminlerde bulunan prolin (~%15) ve glutamin (~%35) aminoasitlerince zengin peptit dizilerinin, çölyak hastalığına sebep olan epitoplara olduğu bilinmektedir (10). Farklı uzunluklardaki bu peptitlerin N- ya da C- terminallerindeki peptit bağları, gastrik-pankreatik ve ince bağırsak membranındaki proteolitik sindirim enzimlerine karşı dirençlidirler (11). Buğdayın, immün epitop veri tabanında (Immune Epitope Database- IEDB), çölyak hastalığıyla ilişkili 190 adet T-hücresi uyaran epitopu belirlenmiş, bunun 94 tanesi α -gliadin geninde, 74 tanesi γ -gliadin geninde, 12 tanesi ω -gliadin geninde, 8 tanesi düşük moleküler ağırlıklı (LMW) glutenin geninde ve 2 adet epitopu ise yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) glutenin genlerinde toplanmıştır (12). Çölyak hastalığı bir dizi reaksiyon sonucunda meydana gelir. İlk olarak, doğal veya doku transglutaminazının deamidasyonu ile oluşan ve negatif yüklü aminoasitleri (Glu, Asp) içeren gluten peptitleri, lökosit antijenleri olan HLA-DQ2 ve HLA-DQ8'e (HLA class II geni tarafından sentezlenen ve olgun ağaçsı hücrelerin yüzeyinde bulunan antijen molekülleri) bağlanırlar. Bu antijenik reaksiyon, T-hücrelerinin ve bunun sonucunda, inflammatör sitokinlerin (interferon- γ veya interleukin-4) ve matriks metaloproteinazların aktivasyonuna yol açar. Bu durum ise mukozal yıkım ve epitel hücrelerinin körelmesine sebep olur ve en sonunda ince bağırsakta yangı ve

iltihaplanma meydana gelir. Uyarılan T-hücreleri ise, B-hücrelerinin aktivasyonuna yol açar, bunlar ise gluten peptitleri (antijen) veya doku transglutaminazına (oto-antijen) karşı serum IgA ve IgG antikorlarının geliştirilmesini sağlar (2, 3, 13, 14).

GLUTEN DETOKSİFİKASYON YÖNTEMLERİ

Son yıllarda, tüm dünyada gluten kaynaklı hastalıkların artış göstermesi, bu hastalıklara karşı farkındalığın artmasına ve gluten tespiti için hassas metotların geliştirilmesine sebep olmuştur (1). Codex Alimentarius Commission (CAC) standartlarına uygun glutensiz (<20 mg/kg) gıdaların üretimi için çeşitli gluten detoksifikasyon yöntemleri literatürde belirtilmiştir.

Mikrobiyel, fungal ve bitki-böcek zararlıları kaynaklı peptidazların kullanımı

Farklı kaynaklardan elde edilen, prolince zengin gluten peptitlerine spesifik proteaz uygulaması, gluten peptitlerinin lenf dokusuna ulaşmadan T hücreleri tarafından tanınmayacak şekilde en fazla 9 aminoasit içeren kısa fragmentlere parçalanmasını amaçlar (15, 16). "Proteaz" veya "peptidaz" terimi, oligopeptitlerin ya da daha büyük proteinlerin, terminal uçlarındaki veya iç kısımlarındaki peptit bağlarını kıran enzimleri ifade eder (17).

Oral yoldan enzim takviyesiyle prolin spesifik ve glutamin spesifik proteazların birlikte kullanılarak, gastrointestinal sistemde gluten degradasyonunun teşvik edilmesi (18, 19), uygulama kolaylığı ve düşük riskli yan etkileri bakımından önem kazanmıştır (20). Uygulamadaki iki önemli nokta; proteazların immünolojik gluten epitoplarındaki prolin ve glutamince zengin dizileri parçalayabilme yeteneğine sahip olması ve ayrıca mide ve/veya ince bağırsak sisteminde etkin ve kararlı yapıda olmaları gerektirir (21). Prolil-endopeptidazlar (PEPs), karboksil ucunda bulunan prolin kalıntıları arasındaki peptit bağlarını hidroliz edebilen enzim grubudur. *In-vitro* ve *in-vivo* yapılan çalışmalarda *Aspergillus niger*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Myxococcus xanthus* ve *Sphingomonas capsulata* gibi birçok bakteri ve küf kaynaklı PEP'in (22) gastrointestinal sistemin pH aralığında, yapısını ve fonksiyonunu muhafaza ederek, prolince zengin immunojenik gliadin peptitlerini kolaylıkla hidrolize ettiği kanıtlanmıştır (23, 24).

Son yıllarda bitki zararlılarından elde edilen enzimlerin, gıda proteinlerinin hidrolizinde biyokatalizör olarak rol almasının kanıtlanmasıyla, gluten-spesifik peptidazların tahıl zararlılarından elde edilmesi üzerine yapılan çalışmalara yoğunlaşmıştır. Süne olarak bilinen *Eurygaster* spp. gibi çeşitli tahıl zararlılarından elde edilen 'serin endopeptidaz' ve 'sistein endopeptidaz' grubu enzimlerin (25), gluten proteinlerini etkin bir şekilde hidroliz ettiği belirlenmiştir (10). Bellir *et al.* (2014), çörek otu olarak bilinen *Nigella sativa* türü bitkiden elde ettikleri enzim ile glutenin gliadin fraksiyonunun tümünün yıkımını 24 saatlik inkübasyon sonucunda gerçekleştirmişlerdir (26).

Ekşi hamur uygulaması ile detoksifikasyon

Glutensiz gıdaların üretimi için gluten detoksifikasyonunda kullanılan, proteolitik aktiviteye sahip laktik asit bakterileri ve küf proteazlarının kombinasyonu ile yapılan ekşi hamur fermantasyonu, prolin içeren bazı potansiyel toksik peptitlerin hidrolize edildiği kompleks bir yöntemdir (15, 27). Ekşi hamur ile proteoliz yöntemiyle bakteriyel peptidazların yanı sıra, aspartikpeptidazlar ve karboksipeptidazlar gibi (28, 29) buğday ve çavdar unlarında bulunan asidik enzimlerin fermantasyon koşullarında aktivasyonu ile, prolaminlerin çözünürlüğü arttığından, proteolitik parçalanmaya uygun bir ortam oluşur (30) ve tahıl prolaminlerinin degradasyonu gerçekleştirilir (13). Di Cagno *et al.* (2010), *Lb. alimentarius* 15M, *Lb. brevis* 14G, *Lb. sanfranciscensis* 7A ve *Lb. hilgardii* 51B bakterilerini kullanarak *in-vitro* koşullarda yaptıkları çalışmada (10, 28) ekşi hamur fermantasyonu ile α -gliadindeki 31-43 aminoasitler arası fragmentlerin ve ayrıca albumin ve globulin fraksiyonlarının önemli oranda hidroliz edildiğini göstermişlerdir (10).

Rizzello *et al.* (2014), ekşi hamurdan izole edilen laktobasiller ile küf proteazlarının kombinasyonunu uygulayarak, gluten konsantrasyonunu 10 mg/kg'ın altına düşürmüşlerdir. Bu çalışmada ekşi hamur; her suş miktarı 10^9 kob/ml hamur olacak şekilde çeşitli *Lactobacillus* suşları ve *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* kaynaklı proteazlar kullanılarak, 48 saat 37°C sıcaklıkta fermantasyon uygulamasıyla elde edilmiştir. Ekşi hamurdan ekstrakte edilen protein fraksiyonları altı hastadan alınan ince bağırsak mukozasında (*in-vitro* organ kültürü)

inkübe edildiğinde, herhangi bir intestinal T hücresi aktivitesine rastlanmamıştır (30). Angelis *et al.* (2010)'nun yapmış oldukları benzer bir çalışmada da glutenin 72 saat 37°C sıcaklıkta mikrobiyel proteazlar ile hidrolizasyonu sonucunda gluten miktarı 20 mg/kg'ın altına düşürülebilmektedir (31).

Glutensiz ekmek üretiminde ekşi hamur uygulamasıyla yapılan mikrobiyel fermentasyonun, ürün tekstürünü (32, 34) ve hacmini geliştirdiği (4, 32), laktik asit ve alkol fermentasyonuyla gerçekleşen biyotransformasyon reaksiyonları ile bazı biyoaktif bileşenleri (esansiyel aminoasitler, esansiyel yağ asitleri) ortaya çıkararak gıdanın tadını ve besinsel değerini iyileştirdiği, bayatlamayı geciktirdiği (32, 34), protein sindirilebilirliğini artırdığı, normal koşullarda lisin ve sülfür içeren aminoasitler bakımından fakir olan buğday unlarının, lisin içeriğini ve sülfür içeren aminoasit miktarını artırdığı (30), antifungal aktivite gösteren laktik asit bakterilerinin gıdalarda doğal koruyucu olarak rol alabileceği belirlenmiştir (32, 34). Dolayısıyla bu yaklaşımın, maliyet, fonksiyonellik, katkısız ürün içeriği (*clean label*), uzun raf ömrü ve iyileştirilmiş besin içeriği bakımından avantajlı bir yöntem olduğu ifade edilmiştir (34).

Tahılların çimlendirilmesiyle aktifleşen enzimler ile detoksifikasyon (oto-sindirim)

Bakteri ve küf proteazlarının, prolince zengin toksik gluten peptitlerinin birçoğunun degradasyonunu sağlarken yavaş reaksiyon göstermeleri, başka enzimlerle birlikte yüksek konsantrasyonda kullanım ihtiyacı, maliyetlerinin fazla olması gibi sebeplerden (16), tahıl enzimlerinin çimlendirme işlemi ile aktifleştirilmesiyle depo proteinlerinin hidrolizinin sağlanması, gluten detoksifikasyonunda farklı bir bakış açısı sağlamıştır.

Prolin ve glutamince zengin depo proteinleri, çimlenmenin ilk gelişim evresinde embriyoya azot ve aminoasit kaynağı sağlar (12, 16). Bunun için çimlenme sırasında sentezlenen endojen tahıl proteazları, proteinleri etkin bir şekilde hidrolize ederler (33). Bu uygulama, bira üretimindeki malta işlemede olduğu gibi bazı üretim proseslerinin bir parçasıdır (12, 16), çimlendirme süresince mineral, vitamin ve besinsel lif içeriğini zenginleştiren hemiselülaz, lipaz gibi diğer enzimler de aktif hale geçer (35) ve uygulama oldukça düşük maliyetlidir (7).

Glutensiz bira üretimi için yapılan bir çalışmada, çimlenme aşamasında ortaya çıkan doğrudan gluten epitoplarına spesifik endoproteinazların (sistein proteinaz, serin proteinaz, metaloproteinaz gibi) (36, 37) ve tanede bulunan aspartik proteinaz ve serin karboksipeptidazların (13), gastrointestinal peptidazlara karşı dirençli P-Q, Q-P, P-F, L-P, ve P-Y gibi aminoasitler arasındaki bağları, etkin olarak hidrolize ettiği gösterilmiştir (7).

Hartmann *et al.* (2006), buğday, çavdar ve arpa tanelerini 7 gün boyunca iki farklı sıcaklıkta (15 ve 30°C) çimlendirdiklerinde, glutelinlerin degradasyonunun 30°C'de, prolaminlerin ise 15°C'de daha hızlı olduğunu belirlemişlerdir. Proteolitik aktivitenin, tahıl kepeklerinde, unlarından önemli derecede yüksek; buğday ve çavdar kepeği ekstraktlarının ise arpa ekstraktından daha aktif olduğunu saptamışlardır. İnkübasyon koşullarının çimlendirilmiş tahıl proteazlarının aktivitesi üzerine etkisini incelediklerinde, pH 4.5 ve 50°C'de ve pH 6.5 ve 50-60°C'de proteolitik aktivitenin maksimum olduğunu ve tüm peptitlerin aminoasit sayısının 9'dan düşük olduğunu bildirmişlerdir (16). Tahılların vejetasyon süresi ve nem içeriğindeki artışa bağlı olarak, son ürünlerdeki gluten içeriğinin doğrusal olarak azaldığını belirleyen Kerpes *et al.* (2016), en iyi sonucun (9300 mg gluten/ kg), %48 nem içerikli arpanın 8 gün, 18°C'de çimlendirilmesi ile sağlandığını rapor etmişlerdir (36).

Mikrobiyel Transglutaminaz ile Gluten Detoksifikasyonu

Transglutaminaz (TG), peptit veya proteinin yapısındaki glutaminin, γ -karboksiamid grubu (-açıl donörü) ile yine protein veya peptitlerin lisin aminoasidinin ϵ -amino grubu (-açıl grubu alıcısı) arasında açıl-transfer reaksiyonunu katalizleyen, proteinler arasında inter- veya intramoleküler ϵ -(γ -glutamil)-lisin izopeptit bağlarının oluşumunu sağlayan bir polimerazdır (4, 12, 25, 38). Dolayısıyla TG, deamidasyon ve transamidasyon/çapraz bağlama reaksiyonlarını kataliz etmektedir. Doku-TG 2 (tTG) enzimi deamidasyon reaksiyonu sonucunda, gluten peptitlerinin çölyak hastalığını ortaya çıkarışını hızlandırmaktadır (12). Bu sebeple TG'nin transamidasyon reaksiyonu ile gluten detoksifikasyonu üzerinde daha çok durulacaktır.

Gliadinler, sekalinler ve hordeinlerde, prolin ve glutamince zengin, tekrar eden birçok PQQQLPY peptit dizilimi bulunur (39). Bu dizilim, tTG enzimi ile deamidasyon reaksiyonunun meydana gelmesi için iyi bir substrattır (25, 40). tTG enzimi, bu dizilimde ikinci defa tekrar eden glutamin (Q) aminoasidini deamidasyona uğratarak, peptit dizilimini PQPELPY olarak değiştirir (39). Glutaminin amid gruplarının ayrılarak, glutamik aside (E) deamidasyonu sonucu yeni epitoplardan oluşmasıyla, peptitlerin antijenlere (HLA-DQ2) bağlanma eğilimleri artarken, lizin aminoasidinin metil esteriyile transamidasyonu sonucu toksik peptitlerin maskelenmesiyle bağlanma eğilimleri azalmaktadır (25, 40). Asidik koşullarda tTG enzimi, glutaminin glutamik aside deamidasyonunu katalize ederken (41), alkali ortamda transamidasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği ve polipeptit zincirleri arasında çapraz bağ oluşumunun görüldüğü ifade edilmiştir (41, 42). Brzozowski (2015)'nin farklı ortam koşullarında yaptığı çalışmada, TG ile asidik koşullarda yapılan protein modifikasyonunun immuno-reaktiviteyi artırdığı, alkali koşullarda ise gluten içeriğinin 61400 mg/kg'dan 7200 mg/kg'a düştüğü belirtilmiştir (41).

Heredia *et al.* (2014) lizin aminoasidinin mikrobiyel-TG (mTG) etkisiyle glutamin aminoasidine bağlanma derecesini belirlemek amacıyla oluşturdukları model sistemde, pH 8 ve %2 L-lisin bulunan ortam koşullarındaki örneklerde, L-lisin bağlanmasının daha yüksek olduğunu ve bunun sonucunda gluten proteinlerinin reaktivitesinin %42 oranında azalarak, gluten miktarının 1102 mg/kg'a düştüğünü gözlemlemişlerdir (43). TG uygulamasında inkübasyon süresinin etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada (44), 8 U/g mTG ve 20 mM lizin etil ester (Lys-C₂H₅) ile buğday unu veya durum semolina süspansiyonu hazırlanarak, iki aşamalı inkübasyon yapılmıştır. İlk aşamada, 30°C'de 2 saat, ikinci aşamada tekrar taze enzim ve Lys-C₂H₅ ile 30°C'de 3 saat inkübasyondan sonra santrifüj yapılmıştır. İki aşamalı transamidasyon işlemi sonucunda, R5 ELISA analizi sonuçlarına göre, ekmekteki son gluten miktarı 5.8 mg/kg, makamada ise 13.7 mg/kg olarak tespit edilmiştir (44).

Sonuç olarak mTG'nin, tTG enzimine göre daha spesifik olarak çalışması sebebiyle (37); de/trans-amidasyon, substrat dizilimi, pH (25,

38), enzim konsantrasyonu ve primer aminlerin miktarı gibi reaksiyon koşullarına bağlı olarak aktivitesi değişmektedir (38). Öte yandan bu uygulamayla, glutamin ve lizin kalıntıları arasında çapraz kovalent bağ oluşumu ile hamurdaki protein ağının kuvvetlendiği (4), gıdalarda su tutma kapasitesi, renk, aroma, tekstür ve viskozitenin geliştiği çeşitli çalışmalarda ifade edilmiştir (38).

Basınç-Ezme-Kesme Etkisi ile Glutenin Antijenik Özelliğinin Değiştirilmesi

Farklı gıda işleme teknolojileri ile gıda proteinlerinde yapısal değişiklikler meydana getirilerek antijenik özellikleri değişikliğe uğratılabilir. Örneğin ekstrüzyon teknolojisi ile buğday unu nemli ortamda yüksek basınç ve sıcaklığa tabi tutulduğunda buğday depo proteinlerinin sindirilebilirliği ve oluşan hidrolizatların immünolojik özelliklerinin değiştiği saptanmıştır. Ekstrüzyon işleminde sıcaklık, basınç, kesme kuvveti ve oksijen etkisiyle protein yapısında ve çözünürlüğünde değişimler meydana getirildikten sonra proteazlar ile hidroliz özellikleri değiştirilebilir; hammaddeye patojenler ve bozulma yapan mikroorganizmalar yok edilebilir veya azaltılabilir; hammaddeye besleyici değeri azaltan bileşiklerin inaktivasyonu ve nişasta jelatinizasyonu sağlanabilir (45).

Farklı pH (3, 5, 7), sıcaklık (80, 90, 100°C) ve kesme kuvveti (shear stress, 500, 1000, 1500 1/s) kombinasyonları ile glutenin antijenitesi tam olarak yok edilememiştir. Rahaman *et al.* (2016) farklı kombinasyonlar uyguladıkları bu çalışmalarında, pH 3'te ve 90°C'ye kadar uygulanan sıcaklıklarda, kontrol grubuna göre antijenitenin %30 azaldığını tespit etmişlerdir. 100°C'den yüksek sıcaklıklarda ise muhtemelen yeni epitoplardan ortaya çıkması sebebiyle antijenitenin arttığı belirtilmiştir. Fakat pH 5 ve pH 7'de ve 100°C'de -tiol gruplarının modifikasyonuna ve bazı epitoplardan parçalanmasına veya maskelenmesine sebep olan yapısal değişiklikler sonucunda antijen özelliklerin azaldığı rapor edilmiştir (46).

GLUTENSİZ GIDA GÜVENLİĞİ İÇİN GLUTEN ANALİZİ

Glutensiz gıdalar, tarladan başlayarak, hasat, taşıma, depolama ve üretim aşamaları sırasında gluten bulaşısı tehdi ile karşı karşıyadır. CAC,

glutensiz gıda olarak etiketlenmiş gıdaların gluten içeriği bakımından eşik değerini <20 mg/kg, düşük gluten içerikli gıdaların ise <100 mg/kg olarak belirtmişlerdir (47). Gliadin proteinlerinin karmaşık ve polimorfizm göstermesi sebebiyle, toksik özellikteki alt birimlerinin tespitini ve bu alt birimlerin modifikasyonları için yapılan çalışmaları zorlaştırmaktadır. Glutensiz gıdaların güvenliği ancak güvenilir bir şekilde gluten tespiti yapan ve miktarını belirleyen metotların geliştirilmesi ile sağlanabilir (1). Günümüze kadar çölyak hastaları için toksik prolamin tip proteinlerin tespitinde ELISA, Western Blot gibi immunolojik teknikler; izoelektrik odaklama (IEF-isoelectric focusing), A-PAGE, SDS-PAGE gibi elektroforetik teknikler; RP-HPLC, yüksek performanslı kapiler elektroforez (HPCE-high performance capillary electrophoresis) gibi kromatografik teknikler; PCR (polymerase chain reaction) gibi genomik teknikler; MALDI-TOF/MS gibi proteomik teknikler geliştirilmiştir (1, 39).

Glutenin tespitinde, prolamin proteini ve antikoru arasındaki spesifik etkileşimlere dayanan immünolojik teknikler önemli rol oynamaktadır. Codex Alimentarius Commission tarafından belirlenen resmi standart metot, R5 antikorunu kullanan kompetitiv ELISA yöntemidir. R5 antikoru, buğday gliadininde, arpa hordeininde ve çavdar sekalininde bulunan ve çölyak hastalığına sebep olan kısa zincirli peptitlerin tekrar eden epitoplarnın birçoğunu (QQPFP, LQPFP, QLPYP, QLPTP, QQSFP, QQTFP, PQPFP, QQPYP ve PQPFP) tanıma kabiliyetine sahiptir (47). G12 ve A1 gibi monoklonal antikorumların da kullanıldığı ELISA standart metodu ile diğer bir immün dominant peptit olan 'proteaz dirençli 33-mer α -gliadin' de tespit edilebilmiştir (48). Bu antikorumların gıdalardaki toksik peptitlerin ve gluten detoksifikasyonunun belirlenmesinde oldukça yararlı oldukları kanıtlanmıştır (1, 49).

Antikorumlara dayalı immüno-kimyasal ELISA yöntemi orijinal hedeflere oldukça spesifik ve yüksek affinite gösterirler, fakat maliyetli bir uygulamadır. Antikorumlar çeşitli manipülasyonlara karşı hassastır, ayrıca protein ekstraksiyonunda kullanılan indirgeyici kimyasallardan etkilenirler. ELISA yöntemine göre daha hassas sonuç veren PCR yöntemi, DNA biyo-işaretleyici miktarının

belirlenmesine dayanan diğer bir alternatif yöntemdir. Yüksek spesifiklik ve duyarlılık gösteren PCR yöntemi ile glutence zengin bitki hücrelerindeki DNA biyo-işaretleyici tespit edilir. PCR yönteminin, bitki hücresinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesine odaklanırken, toplam gluten içeriğini tespit etmede başarısız olduğu bildirilmiştir (50).

Kütle spektrometresi (MS-mass spectrometry), unlardaki ve diğer gıdalardaki prolaminleri belirlemede kullanılan en önemli fiziksel metottur (1, 51). Protein ve peptitleri yüksek hassasiyetle belirler, tanımlar ve miktarını tespit eder. Bu metot, moleküllerin iyonizasyonuna dayanır, iyonlar kütle/yük oranına göre ayrılır ve ayrılmış iyonlar tespit edilir. MALDI-TOF/MS, çölyak hastalığına sebep olan toksik prolaminlerin tespitinde kullanılan ilk kütle spektrometrik yöntemdir. Fakat yöntemin, parçalanmamış gluten proteinlerinin veya gluten hidrolizatlarının analizinde, dizimlerin benzerliği sebebiyle yeterli olmadığı bildirilmiştir (1). MALDI-TOF/MS, 20-25 mg/kg'ın altındaki prolaminleri tespit edemediği için düşük prolamin içeren gıdalarda yapılan ELISA analiz sonuçlarını doğrulayamamaktadır (51).

SONUÇ

Çölyak hastalığı, genetik olarak yatkın bireylerin, buğday gliadini veya diğer prolaminlerin sindiriminden sonra, oto-immün sistemlerinin gösterdiği tepki reaksiyonları sonucu meydana gelen rahatsızlıktır ve dünyadaki toplam nüfusun %1'inde görülmektedir. Bu durum son on yılda, glutensiz gıda üretimi için yapılan çalışmaların artmasına sebep olmuştur. Bu çalışmada, CAC ve Avrupa Birliği mevzuatında belirtilen sınırlar çerçevesinde glutensiz gıda üretimi için uygulanabilecek detoksifikasyon yöntemlerine ve gluten tespitinde kullanılan metotlara değinilmiştir. Bu potansiyel gluten detoksifikasyon faaliyetleri, gıda güvenliği, maliyet, verimlilik gibi faktörler açısından teoride pozitif sonuçlar vermiştir, ancak daha detaylı *in-vivo* çalışmaların da yapılması gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Rosell CM, Barro F, Sousa C, Mena MC. 2014. Cereals for Developing Gluten-Free Products and Analytical Tools for Gluten Detection, *J Cereal Sci*, 59(2014): 354-364.
2. Wieser H, Koehler P. 2008. The Biochemical Basis of Celiac Disease, *Cereal Chem*, 85(1): 1-13.
3. Camarca A, Del Mastro A, Gianfrani C. 2012. Repertoire of Gluten Peptides Active in Celiac Disease Patients: Perspectives for Translational Therapeutic Applications, *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 12(2): 207-219.
4. Gallagher E. (Ed.), 2009. *Gluten-Free Food Science and Technology*, Wiley-Blackwell, Dublin, Ireland, 30, 85, 122 p.
5. Diaz-Amigo C, Popping B. 2012. Gluten and Gluten-Free: Issues and Considerations of Labeling Regulations, Detection Methods and Assay Validation. *JAOAC Int*, 95 (2): 337-348.
6. Michalcová E, Potockál E, Chmelová D, Ondrejovic M. 2012. Study of Wheat Protein Degradation During Germination, *J Microbiol Biotech Food Sci*, 1(6): 1439-1447.
7. Knorr V, Kerples R, Wieser H, Zarnkow M, Becker T, Koehler P. 2016. Production and Application of Barley Malt Extract with High Peptidase Activity for the Degradation of Gluten in Wort, *Eur Food Res Technol*, 242: 585-597.
8. Johansson E, Malik AH, Hussain A, Rasheed F, Newson WR, Plivelic T, Hedenqvist MS, Gällstedt M, Kuktaite R. 2013. Wheat Gluten Polymer Structures: The Impact of Genotype, Environment and Processing on Their Functionality in Various Applications, *Cereal Chem*, 90(4): 367-376.
9. Shewry P R, Miles M J, Tatham A S. 1994. The Prolamin Storage Proteins of Wheat and Related Cereals. *Prog Biophys Mol Biol*, 61: 37-59.
10. Mika N, Gorshkov V, Spengler B, Zorn H, Rühl M. 2015. Characterization of Novel Insect Associated Peptidases for Hydrolysis of Food Proteins, *Eur Food Res Technol*, 240: 431-439.
11. Cavaletti L, Abbondi M, Brunati M, Taravella A. December 2014. New Proteases Able to Hydrolyze Gluten Peptides and Proteins at Acidic pH, from the Actinomycete *Actinoallomurus*, US Patent 0356345.
12. Comino I, de Lourdes Moreno M, Real A, Rodríguez-Herrera A, Barro F, Sousa C. 2013. The Gluten-Free Diet: Testing Alternative Cereals Tolerated by Celiac Patients, *Nutrients*, 5: 4250-4268.
13. Loponen J. 2006. Prolamin Degradation in Sourdoughs, *Doctoral Thesis*, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
14. Caputo I, Lepretti M, Martusciello S, Esposito C. 2010. Enzymatic Strategies to Detoxify Gluten: Implications for Celiac Disease, *Enzyme Res*, 2010(5): 1-9.
15. Koehler P, Wieser H. 2011. Peptidases for degradation of gluten and possible use in dietary therapy, *Proceedings of the 24th Meeting of Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*, 30 September-2 October, Ancona, Italy, 95-98 p.
16. Hartmann G, Koehler P, Wieser H. 2006. Rapid Degradation of Gliadin Peptides Toxic for Coeliac Disease Patients by Proteases from Germinating Cereals, *J Cereal Sci*, 44(2006): 368-371.
17. Gass JD, Khosla C, Bethune M, Siegel MJ. July 2014. Combination Enzyme Therapy for Digestion of Dietary Gluten, US Patent 8, 778, 338.
18. Siegel MJ, Park M. July 2014. Proteases for Degrading Gluten, US Patent 0205587.
19. Fernandez-Feo M, Wei G, Blumenkranz G, Dewhurst FE, Schuppan D, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ. 2013. The Cultivable Human Oral Gluten-degrading Microbiome and Its Potential Implications in Coeliac Disease and Gluten Sensitivity, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19: 386-394.
20. Montserrat V, Bruins MJ, Edens L, Koning F. 2015. Influence of Dietary Components on *Aspergillus niger* Prolyl Endoprotease Mediated Gluten Degradation, *Food Chem*, 174(2015): 440-445.
21. Bethune MT, Khosla C. 2012. Oral Enzyme Therapy for Celiac Sprue, *Methods Enzymol*, 502: 241-271.
22. Gass J, Ehren J, Strohmeier G, Isaacs I, Khosla C. 2005. Fermentation, Purification, Formulation and Pharmacological Evaluation of a Prolyl Endopeptidase From *Myxococcus xanthus*: Implications for Celiac Sprue Therapy, *Biotechnol Bioeng*, 92(6): 674-684.

23. Plugis NM, Khosla C. 2015. Therapeutic Approaches for Celiac Disease, *Best Pract Res Cl Ga*, 29(2015): 503-521.
24. Kanerva P. 2011. Immunochemical Analysis of Prolamins in Gluten-free Foods, *Academic Dissertation*, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 24 p.
25. Wieser H, Koehler P. 2012. Detoxification of Gluten by Means of Enzymatic Treatment, *J AOAC Int*, 95(2): 356-363.
26. Bellir N, Bellir MN, Rouabah L. 2014. Enzymatic Degradation of Gliadin by *Nigella sativa* Seeds Protease: Implications for New Treatment of Celiac Disease, *World J Pharm Sci*, 3(12): 1555-1571.
27. Stoven S, Murray JA, Marietta E. 2012. Celiac Disease: Advances in Treatment via Gluten Modification, *Clin Gastroenterol H*, 10(8): 859-862.
28. Cabrera-Chavez F, Calderon de la Barca AM. 2010. Trends in wheat technology and modification of gluten proteins for dietary treatment of coeliac disease patients, *J Cereal Sci*, 52(2010): 337-341.
29. Loponen J, Mikola M, Katina K, Sontag-Strohm T, Salovaara H. 2004. Degradation of HMW Glutenins During Wheat Sourdough Fermentations, *Cereal Chem*, 81(1): 87-93.
30. Rizzello CG, Curiel JA, Nionelli L, Vincentini O, Di Cagno R, Silano M, Gobbetti M, Coda R. 2014. Use of Fungal Proteases and Selected Sourdough Lactic Acid Bacteria for Making Wheat Bread with an Intermediate Content of Gluten, *Food Microbiol*, 37: 59-68.
31. Angelis MD, Cassone A, Rizzello CG, Gagliardi F, Minervini F, Calasso M, Di Cagno R, Francavilla R, Gobbetti M. 2010. Mechanism of Degradation of Immunogenic Gluten Epitopes from *Triticum turgidum* L. var. durum by Sourdough Lactobacilli and Fungal Proteases, *Appl Environ Microbiol*, 76(2): 508-518.
32. Deora, N. S., Deswal, A., Mishra, H. N., 2014. Alternative Approaches Towards Gluten-Free Dough Development: Recent Trends, *Food Eng Rev*, 6: 89-104.
33. M'hir S, Ziadi M, Chammem N, Hamdi M. 2012. Gluten Proteolysis as Alternative Therapy for Celiac Patients : A mini review. *Afr J Biotechnol*, 11(29): 7323-7330.
34. Zannini E, Pontonio E, Waters DM, Arendt EK. 2012. Applications of microbial fermentations for production of gluten-free products and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 473-485.
35. Luoto S, Jiang Z, Brinck O, Sontag-Strohma T, Kanerva P, Bruins M, Edens L, Salovaara H, Loponen J. 2012. Malt hydrolysates for gluten-free applications: Autolytic and proline endopeptidase assisted removal of prolamins from wheat, barley and rye. *J Cereal Sci*, 56(2012): 504-509.
36. Kerpes R, Knorr V, Procopio S, Koehler P, Becker T. 2016. Gluten-specific peptidase activity of barley as affected by germination and its impact on gluten degradation, *J Cereal Sci*, 68(2016): 93-99.
37. Stenman S. 2011. Coeliac Disease-inducing Gluten In vitro harmfulness and detoxification by germinating cereal enzymes, *Academic Dissertation*, University of Tampere, Tampere, Finland.
38. Lerner, A., Matthias, T., 2015. Food Industrial Microbial Transglutaminase in Celiac Disease: Treat or Trick, *Intern J Celiac Disease*, 3(1): 1-6.
39. Haraszi R, Chassaigne H, Maquet A, Ulberth F. 2011. Analytical Methods for Detection of Gluten in Food-Method Developments in Support of Food Labeling Legislation, *J AOAC Int*, 94(4): 1006-1025.
40. Cabrera-Chavez F, Rouzaud-Sandez O, Sotelo- Cruz N, Calderon De La Barca AM. 2008. Transglutaminase Treatment of Wheat and Maize Prolamins of Bread Increases the Serum IgA Reactivity of Celiac Disease Patients, *J Agric Food Chem*, 56: 1387-1391.
41. Brzozowski B. 2016. Immunoreactivity of wheat proteins modified by hydrolysis and polymerisation, *Eur Food Res Technol*, 242: 1025-1040.
42. Gianfrani, C, Siciliano RA, Facchiano AM, Camarca A, Mazzeo MF, Constantini S, Salvati VM, Maurano F, Mazzarella G, Iaquinto G, Bergamo P, Rossi M, 2007. Transamidation of Wheat Flour Inhibits the Response to Gliadin of Intestinal T Cells in Celiac Disease, *Gastroenterology*, 133(3): 780-789.
43. Heredia, N., Chavez, F. C., Islas-Rubio, A., Calderon, A. M., 2014. Transamidation of Gluten Proteins During the Bread-Making Process of Wheat Flour to Produce Breads with Less Immunoreactive Gluten, *Food Funct*, 5: 1813-1818.

44. Bergamo P, Gianfrani C, Capobianco F, Moscaritolo S, Rossi M. 2011. Transamidation of Wheat: An enzyme strategy to detoxify gluten, Proceedings of the 24th Meeting of *Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*, 30 Sep-2 Oct, Ancona, Italy, 91-94 p.
45. Cui C, Zhao H, Zhao M, Chai H. 2011. Effects of Extrusion Treatment on Enzymatic Hydrolysis Properties of Wheat Gluten, *J Food Process Eng*, 34(2011): 187-203.
46. Rahaman T, Vasiljevic T, Ramchandran L. 2016. Shear, heat and pH induced conformational changes of wheat gluten – Impact on antigenicity, *Food Chem*, 196 (2016): 180-188.
47. Colgravea ML, Goswamia H, Blundellb M, Howittb CA, Tannerb GJ. 2014. Using mass spectrometry to detect hydrolysed gluten in beer that is responsible for false negatives by ELISA, *J Chromatogr A*, 1370 (2014): 105-114.
48. Hager AS, Taylor JP, Waters DM, Arendt EK. 2014. Gluten free beer-A review, *Trends Food Sci Tech*, 36 (2014): 44-54.
49. Comino I, Real A, Moreno ML, Montes R, Cebolla A, Sousa C. 2013. Immunological determination of gliadin 33-mer equivalent peptides in beers as a specific and practical analytical method to assess safety for celiac patients. *J Sci Food Agric*, 93, 933-943.
50. Pinto A, Nadal P, Henry O, Svobodova M. 2013. Label-Free Detection of Gliadin Food Allergen Mediated by Real-Time Apta-PCR, *Anal Bioanal Chem*, 406:515-524.
51. Mujico JR, Lombard a M, Mena MC, Méndez E, Albar JP. 2011. A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients, *Food Chem*, 128(2011): 795-801.