

FERMENTE GIDALARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANNAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Merih Kıvanç*¹, Onur Temel²

¹Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye

²Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye

Geliş tarihi / Received: 18.03.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 02.04.2016

Kabul tarihi / Accepted: 14.04.2016

Özet

Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarda fermente ürünlerden izole edilen 10 izolatın DuPont Qualicon RiboPrinter® sistem ile tanımlamaları yapılmıştır. Spektrofotometrik ve görsel okuma metodu ile tannaz aktivitesi belirlenmiştir. En yüksek aktiviteyi *Lactobacillus curvatus* P3X izolatu göstermiştir. *L. curvatus* P3X'e ait enzimin yaklaşık molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir. Yüksek tannaz aktivitesi gösteren *L. curvatus* P3X'in tannaz aktivitesi üzerine farklı sıcaklık, pH, substrat yoğunluğu, tannik asit konsantrasyonu ve çeşitli minerallerin etkisi araştırılmıştır. Yapılan testler sonucunda optimum sıcaklık 37°C, pH 5.0 substrat olarak kullanılan metil gallat konsantrasyonu 7 mM, tannik asit konsantrasyonu ise 1.75 mM olarak bulunmuştur. Laktik asit bakterilerinin tannaz aktivitesi Hg⁺² ve Mg⁺² iyonlarının varlığında düşerken, Ca⁺² ve Zn⁺²'nin tannaz aktivitesi üzerine etki yapmadığı görülmüştür. Ayrıca yüzey aktif madde (Tween 80), şelat (EDTA), inhibitör (DMSO) ve yapıyı bozan maddenin de (Üre) tannaz aktivitesine tesir etmediği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Tannaz, laktik asit bakterisi, metil galat

DETERMINATION OF TANNASE ACTIVITY OF THE LACTIC ACID BACTERIA THAT ISOLATED FROM FERMENTED PRODUCTS

Abstract

In this study, 10 isolates obtained from fermented products in previous studies were identified by DuPont Qualicon RiboPrinter® system. Tannase activity was determined by spectrophotometric and visual reading methods. *Lactobacillus curvatus* P3X showed the highest tannase activity. Approximate molecular weight of the enzyme was determined by SDS-PAGE method. The effect of different temperatures, pH values, substrate concentrations, and the concentrations of tannic acid and various minerals, on activity of tannase of *L. curvatus* P3X, of which showed high tannase activity, were investigated. As a result of tests, the optimum temperature was found as 37°C, optimum pH was found as 5.0, methyl gallate concentration that was used as the substrate was found as 7 mM and tannic acid concentration was found as 1.75 mM. Tannase activity of lactic acid bacteria decreased in the presence of Hg⁺² and Mg⁺² ions, Ca⁺² and Zn⁺² ions did not show any effect on tannase activity. In addition, it was detected that surfactant (Tween 80), chelate (EDTA), inhibitor (DMSO), and denaturing agents (urea) had no effect on tannase activity.

Keywords: Tannase, lactic acid bacteria, methyl gallate

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ mkivanc@anadolu.edu.tr,

☎ (+90) 222 335 0580/4725,

☎ (+90) 222 320 4910

GİRİŞ

Laktik asit bakterileri ile fermente gıdalar, çok eski zamanlardan beri gıdaların korunmasında oynadığı temel rol ve insan gıdalarında besinsel, duyuşsal ve sağlık 6zelliklerine sağladığı katkılar nedeniyle geniş bir kullanım alanı bulmuştur. G6n6m6zde probiyotik 6zellik g6stermeleri nedeniyle laktik asit bakterileri 6zerinde 6nemle durulan bakteri grubu olup sağlık a6ısından yararlı olarak kabul edilmektedir. Bu bakterilerin direkt kendisi kullanılarak hem gıda da istenilen aroma kazanılmaya 6alışılırken diğer taraftan da sağlıklı bir 6r6n elde edilme hedeflenmektedir.

Tanenler bitkisel 6r6nlerin yapraklarında, tohumlarında ve k6klerinde yaygın olarak bulunmaktadır. 6ay, şarap ve meyve suları gibi bir6ok i6eekte de bu fenolik bileşikler bulunmaktadır. Tanenler beslenmede istenmeyen maddelerdir. 66nk6 sindirim enzimlerini inhibe edebilir. Vitamin ve minerallerin kullanımını etkileyebilirler. Ayrıca kanser oluşumu ile ilişkili olduğu ve hepatoksik olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle sağlık a6ısından riskli bileşiklerdir (1). Sindirim sisteminde bulunan bazı mikroorganizmalar tanenleri par6alayarak zararsız bileşenleri oluşturabilmektedir. Osawa ve ark.(2) insan dışkısından ve fermente gıdalardan izole edilen laktobasillus t6rlerinin tannaz aktivitesine sahip olduklarını g6stermişlerdir. Laktobasillus t6rleri, tanenleri hidrolize etmesi ve h6crede tutunmayı azaltmasından dolayı gıdada var olan tanenleri par6alamada kullanılabilir. Tanenleri gallik asit ve glukozu par6alayan enzim karboksil ester hidrolazlar ailesinde yer alan (E.C. 3.1.1.20. tanen a6ıl hidrolaz) tannazdır. Tannaz hidrolize olabilen tanenlerdeki ester ve depsiğ bağlarını hidrolize ederek gallik asit ve glukoz ortaya 6ıkarmaktadır. *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus foetidus*, *Penicillium chrysogenum*, *Paecilomyces variotii*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter* sp., *Bacillus cereus* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi bir6ok mikroorganizma tannazı 6retme yeteneğine sahiptir (3-6). Laktik asit bakterileri tannaz enzimi 6alışmalarında 6ok fazla kullanılmamıştır. Ancak sahip olduğu ekolojik avantajla bu alanda potansiyel teşkil etmektedir (2). Yapılan 6alışmada fermente sebzelerden izole edilen laktik asit bakterileri mikrobiyel tannaz aktivite yetenekleri a6ısından incelenerek enzim aktivitesi 6zerine etkili fakt6rler belirlenmeye 6alışılmıştır.

MATERYAL VE Y6NTEMLER

Test Mikroorganizmaları

6alışmada, Anadolu 6niversitesi Fen Fak6ltesi, Biyoloji B6l6m6 Mikrobiyoloji laboratuvarında daha 6nceki 6alışmalarda fermente 6r6nlerden izole edilen 10 laktik asit bakteri izolatu kullanılmıştır (6izelge 1).

Y6NTEMLER

Laktik asit bakteri izolatlarının otomatik riboprinter® sistem ile tanımlanması

Riboprinter sistemi 16S rRNA'yı temel alarak mikroorganizmaların t6r tayinlerini ger6ekleştiren molek6ler identifikasyon sistemidir. Riboprinter sistemi ile tanımlanacak bakteriye ait 16 S rRNA'nın EcoRI enzimi ile kesilmesi ve daha sonra jelde koşturulması ve oluşan bant b6y6klerinin kullanılan marker ile kıyaslanarak sistemde bulunan k6t6phaneki veriler ile benzerliğine g6re bakteri isimlendirilmektedir. Benzerlik oranı % 85 in 6zerinde olduğunda sonuca gidilmektedir. Identifikasyon işlemleri spesifik kitler aracılığıyla, kullanıcı talimatları doğrultusunda ger6ekleştirilmiştir.

Tannaz ve gallat dekarboksilaz aktivitesinin g6rsel olarak belirlenmesi

İzolatlar MRS agara ekilerek et6vde 37°C'de 24 saat ink6be edilmiştir. MRS agarda gelişen kolonilerden alınarak i6erisinde 1 mL substrat bulunan (pH 5; 33 mmol/L NaH₂PO₄ ve 20 mmol/L metil gallat i6eren) t6pte McFarland 3 (9x10⁸ h6cre/mL) olacak şekilde s6spanse edilmiştir. T6pler 37°C 24 saat ink6be edilmiştir. İnk6basyondan sonra t6plere eşit miktarda doymuş NaHCO₃ sol6syonu (pH 8.6) ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır. Bu s6re sonunda kahverengiden yeşile d6nen t6pler tannaz pozitif olarak kaydedilmiştir (7).

Gallat dekarboksilaz aktivitesini belirlemek i6in gecelik k6lt6rden 50 µL alınarak 10 mM gallik asit i6eren 10 ml MRS broth i6erisine aktarılmış ve t6pler 37°C 3 g6n ink6be edilmiştir. İnk6basyondan sonra doymuş NaHCO₃ sol6syonu (pH 8.6) ile eşit miktarda karıştırılarak 37°C'de 1 saat ink6be edilmiştir. Besiyeri renginin kahverengiden a6ık bir sarıya d6n6şmesi dekarboksilaz aktivitesi a6ısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (2).

Tannaz aktivitesi g6steren taze k6lt6rlerden 10 µL alınarak % 2 tannik asit ve % 0.5 Yeast extract

ilaveli Brain Heart Infusion agara ekilmiştir. Petriler 37 °C' de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra koloniler etrafında açık bir zon oluşumu tannaz aktivitesi açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (8).

Tannaz aktivitesinin spektrofotometre ile belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin tannaz enzimi aktivitesi Nishitani ve Osawa (9) metoduna göre belirlenmiştir. Elisa petrisine hazırlanan süpernatanttan her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde dağıtılarak mikropalak okuyucu yardımıyla 450 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Okunan değerler ile *Aspergillus ficuum*'dan elde edilen standart ticari tannaz enzimi kullanılarak hazırlanan standart eğriden yararlanılarak tannaz aktivitesi belirlenmiştir.

İnce tabaka kromatografisi ile oluşan ürünlerin belirlenmesi

Besiyerinde tannik asit, gallik asit ve piragallol oluşumu Kwon ve ark. (10)' a göre ince tabaka kromatografisi (TLC) metodu ile belirlenmiştir.

Kültür şartlarının tannaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

En yüksek tannaz aktivitesi gösteren *L. curvatus* P3X ile çalışmalara devam edilmiştir. P3X izolatu MRS broth içerisinde geliştirildikten sonra 8000 g de 20 dakika santrifüj edilmiş ve buradan elde edilen süpernatant çalışmalarda kullanılmıştır. *L. curvatus* P3X den elde edilen hücresiz süpernatanttan 50 µL, 5 mL 5 mM metil gallat içeren 33 mM NaH₂PO₄ (pH 5.0) tamponuna ilave edilerek farklı sıcaklıklarda (4, 20, 25, 30, 37, 45, 55 °C) 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edilen bu karışımdan 100 µL alınarak üzerine eşit hacimde doygun NaHCO₃ çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım daha sonra farklı sıcaklıklarda 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra santrifüj edilerek 96 kuyucuklu Eliza petrisine aktarılmış ve 450 nm' de okuma yapılarak değerlendirilmiştir.

Tannaz aktivitesinin optimum pH sını belirlemek için hücresiz filtrattan 50 µL, 5 mL 5 mM metil gallat içeren 33 mM NaH₂PO₄ farklı pH lardaki (3; 4; 5; 6; 7; 8; 9) tampona ilave edilerek 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir karışımdan ayrı ayrı 100 µL alınarak eşdeğer hacimde doymuş NaHCO₃ ile karıştırılarak 37°C'de 2 saat inkübe edilmiş ve daha sonra 450 nm de okutularak değerlendirilmiştir.

Hücresiz süpernatandan 50 µL, 5 ml farklı tannik asit konsantrasyonu (0.4375; 0.875; 1.75; 3.5 ve 7 mM)

içeren fosfat tamponu (33 mM pH 5.0) içerisine eklenmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bu karışımın 100 µL alınarak eşit hacimde doygun NaHCO₃ solüsyonu ilave edilerek 37°C'de 2 saat tekrar inkübe edilmesinin ardından santrifüj edilmiştir. Daha sonra bu karışımdan 100 µL alınarak Eliza petrisine aktarılmıştır ve 450 nm de spektrofotometre ile okunmuştur.

Çeşitli maddelerinin tannaz aktivitesi üzerine etkisi

Magnezyum klorür (MgCl₂), potasyum klorür (KCl), çinko klorür (ZnCl₂), civa-II-klorür (HgCl₂), kalsiyum klorür (CaCl₂) gibi metal iyonları, tween 80 (yüzey aktif madde), üre (yapıyı bozan madde), şelat edilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve inhibitör dimetil sülfoksit (DMSO) ayrı ayrı olarak 5 mL' lik fosfat tamponunda (33 mM, pH 5.0) 1mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra *L. curvatus* P3X ile hazırlanan süpernatantdan 50µL 5 mL' lik bu karışıma ilave edilerek 37° C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübe işleminden sonra karışım farklı tüpe alınarak üzerine eşit hacimde olacak şekilde NaHCO₃ solüsyonu ilave edilerek 37°C de 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra santrifüj yapılarak süpernatanttan 100 µL 96 kuyucuklu elisa petrisine aktarılmış ve 450 nm dalga boyunda okuması yapılarak değerlendirilmiştir.

Enzim molekül ağırlığının belirlenmesi

Tannaz enziminin moleküler büyüklüğü Rodriguez ve ark. (11) göre SDS-PAGE yöntemi ile incelenmiştir. % 12.5 akrilamid/bisakrilamid derişimine sahip ayırma jelinde 1000 ve 1200 mU derişimlerine sahip tannaz enzimi (Sigma, 42395) ile kıyaslanmıştır. Elde edilen protein profilinin boyut analizi geniş aralıklı protein marker (Sigma, M4038) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

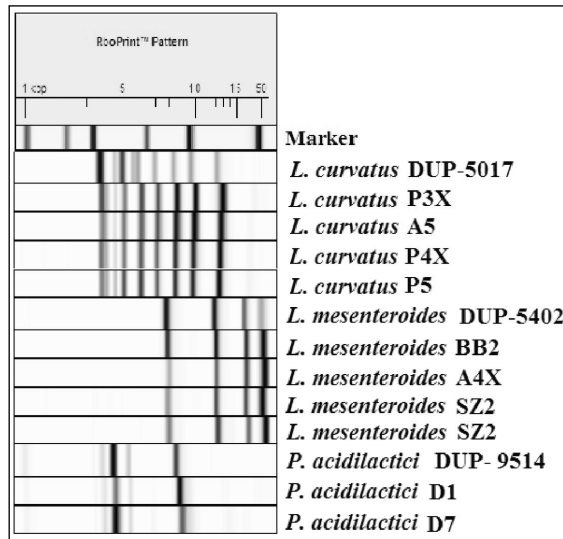
Protein miktarının belirlenmesi

Protein derişimi bilinmeyen çözelti Bradford reaktifi ile muamele edilerek, köre karşı hazırlanan çözeltinin absorbansı oda sıcaklığında spektrofotometrede okunmuştur. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart protein çözeltileri (BSA) de reaktif ile muamele edilerek absorbans değerleri ölçülmüş ve ölçüm sonuçları kullanılarak absorbansa karşı derişim grafiği çizilmiştir. Derişimi bilinmeyen çözeltinin protein miktarı bu grafikten hesaplanmıştır. 5 µL protein standart çözeltisi 250 µl Bradford solüsyonu

içeren tüp içine aktarılmıştır. Rengin stabil hale gelmesi için çok kuyucuklu petriye dağıtılarak 20 dak oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra plak spektrofotometrede 595 nm de okutularak protein miktarı hesaplanmıştır.

BULGULAR

Fermente sebzelerden izole edilen on laktik asit bakterisi otomatik riboprinter ile *Lactobacillus curvatus* (4 izolat), *Leuconostoc mesenteroides* (4 izolat) ve *Pediococcus acidilactici* (2 izolat) olarak tanımlanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Laktik asit bakterilerinin ribotip profilleri (Standartlar DUP numaraları ile gösterildi)

Figure 1. Ribotyping profiles of lactic acid bacteria (Standards were shown with DUP numbers)

Tannaz aktivitesi açısından görsel olarak taranan izolatların tannaz ve gallat dekarboksilaz aktivitesi Çizelge 1'de verilmiştir. İzolatların hepsinin az veya çok tannaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 1. Laktik asit bakterilerinin görsel metot ile belirlenen tannaz ve gallat dekarboksilaz aktivitesi

Table 1. Tannase and gallat decarboxylase activity of Lactic acid bacteria that is determined by visual method

Fermente gıda Fermented food	İzolat Isolate	Tanımlanan tür Identified species	Tannaz aktivitesi Tannase activity	Gallat dekarboksilaz aktivitesi Gallate decarboxylase activity
Pancar turşusu Pickled beetroots	P3X	<i>L. curvatus</i>	++	-
Pancar turşusu Pickled beetroots	P4X	<i>L. curvatus</i>	++	-
Pancar turşusu Pickled beetroots	P5	<i>L. curvatus</i>	+	-
Acur turşusu Pickled cucurbita	A5	<i>L. curvatus</i>	+	+
Biber turşusu Pickled pepper	BB2	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
Siyah zeytin Black olive	SZ2	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
Siyah zeytin Black olive	SZ6	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
Acur turşusu Pickled cucurbita	A4X	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
Domates turşusu Pickled tomato	D1	<i>P. acidilactici</i>	++	-
Domates turşusu Pickled tomato	D7	<i>P. acidilactici</i>	+	-

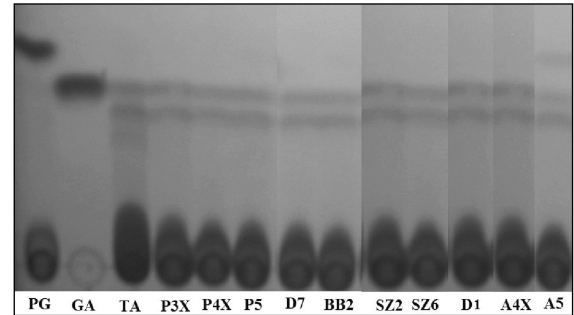
+, Düşük aktivite, ++, orta derecede aktivite, +++, Yüksek aktivite

+, Low activity, ++, medium activity, +++, high activity

İzolatların tannaz aktivitesi katı besiyerinde de doğrulanmıştır. Aktivite açısından görsel olarak taranan izolatlardan *L. curvatus* P3X yüksek aktivite göstermiştir. Gallat dekarboksilaz aktivitesi ise *L. curvatus* A5 hariç diğer izolatlarda negatif olarak bulunmuştur.

İzolatların spesifik tannaz aktivitesi optimum koşullarda birim olarak 1 unit, tannazın dakikada 1 µmol tannik asidi hidrolize etmesi olarak hesaplanarak Çizelge 2'de gösterilmiştir. Laktik asit bakterileri 0.56-1.07 U/mL değerleri arasında aktivite göstermiştir.

Tannaz hidrolize olabilen tanenlerdeki ester ve depsid bağlarını hidrolize ederek gallik asit ve glukoz ortaya çıkarmaktadır. Tannazın katalizlediği reaksiyonlarda tannik asit, metilgallat, n-propilgallat, etilgallat ve izoamilgallat gibi hidrolize olabilen tanenler gallik asit ve glukoz hidrolize olmaktadır. Oluşan ürünler TLC ile tanımlanmaya çalışılmıştır. İzolatların hepsinde gallik asit oluştuğu görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. TLC de reaksiyon ürünleri (PG: Pirogallol, GA: Gallik asit, TA: Tannik asit)

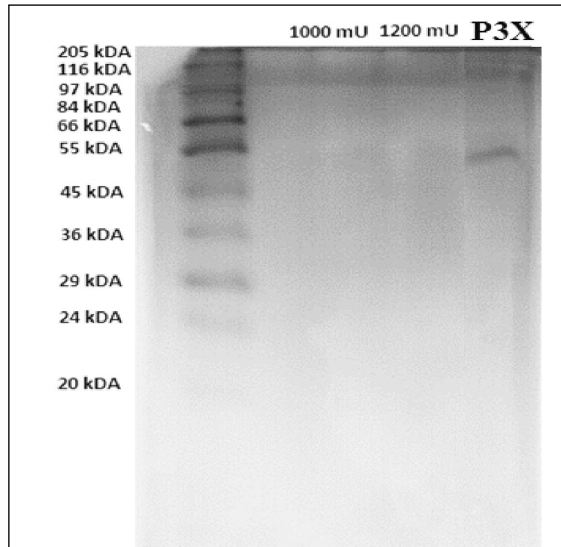
Figure 2. Demonstration of reaction products by TLC (PG: pyrogallol, GA: gallic acid, TA: tannic acid)

Çalışmamızda maksimum aktivite gösteren *L. curvatus* P3X suşuna ait SDS-PAGE jel görüntüsü

Çizelge 2. Laktik asit bakterilerinin tannaz aktivitesi
Tablo 2. Tannase activity of lactic acid bacteria

İzolatlar <i>Isolates</i>	Koloni sayımı (kob/mL) <i>Bacteria count (cfu/mL)</i>	Spesifik tannaz aktivitesi <i>Specific tannase activity</i>		
		U/10 ⁷ kob	U/mg Protein	
P3X	<i>L. curvatus</i>	3.1x10 ⁷	1.07	7.78
P4X	<i>L. curvatus</i>	2.5x10 ⁷	0.78	1.96
P5	<i>L. curvatus</i>	3.1x10 ⁷	0.56	2.04
A5	<i>L. curvatus</i>	1.7x10 ⁷	0.58	2.22
BB2	<i>L. mesenteroides</i>	2.3x10 ⁷	0.81	3.40
SZ2	<i>L. mesenteroides</i>	2.6x10 ⁷	0.72	5.16
SZ6	<i>L. mesenteroides</i>	2.2x10 ⁷	0.63	2.69
A4X	<i>L. mesenteroides</i>	2.6x10 ⁷	0.65	2.22
D1	<i>P. acidilactici</i>	1.5x10 ⁷	0.77	3.30
D7	<i>P. acidilactici</i>	2.1x10 ⁷	0.57	1.98

Şekil 3'te verilmiştir. Burada da görüleceği üzere izolatların hücresiz filtratlarında bulunan enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDA olarak bulunmuştur.



Şekil 3. *L. curvatus* P3X ait tannazın moleküler ağırlığı (1000mU ve 1200mU ticari tannaz enzimi)
Figure 3. The molecular weight of *L. curvatus* P3X tannase (1000 mU and 1200 mU of commercial tannase enzyme)

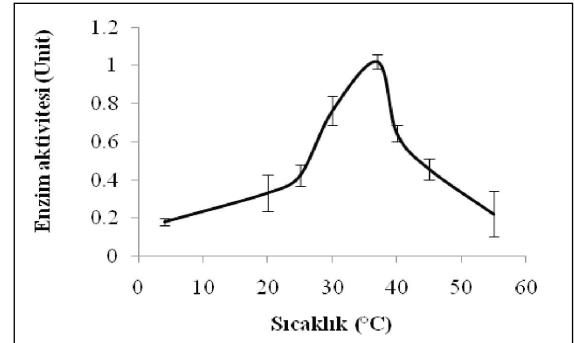
Tannaz Aktivitesi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

L. curvatus P3X, izolatını maksimum tannaz aktivitesi 37°C'de elde edilmiştir (Şekil 4). Optimum pH 5 olarak bulunmuştur (Şekil 5).

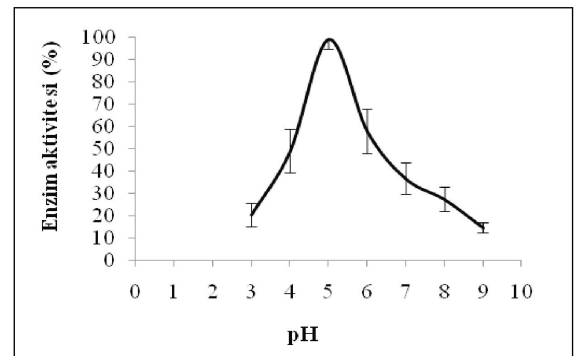
Çizelge 3. *L. curvatus* P3X tannaz aktivitesi üzerine çeşitli maddelerin etkisi
Tablo 3. Effect of different compounds on *L. curvatus* P3X tannase activity

İzolat <i>Isolate</i>	Tannaz aktivitesi (U/mL) <i>Tannase activity (U/mL)</i>									
	Kontrol <i>Control</i>	MgCl ₂	KCl	CaCl ₂	ZnCl ₂	HgCl ₂	Tween 80 Urea	Üre	EDTA	DMSO
P3X	1.07	0.94	1.10	1.08	1.07	0.33	1.07	1.07	1.07	1.07

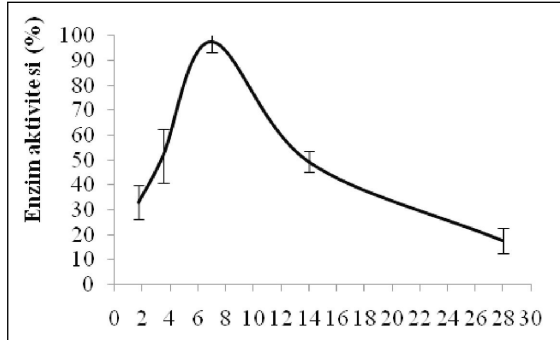
Substrat olarak metil gallat kullanıldığında en yüksek enzim aktivitesi 7 mM metil gallatta saptanmıştır (Şekil 6). Tannik asit kullanıldığında ise 1.75 mM tannik asitte en yüksek aktivite gözlenmiştir (Şekil 7).



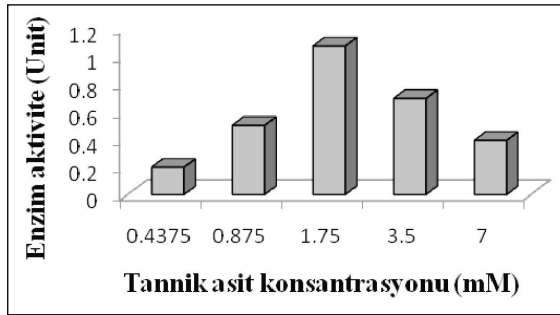
Şekil 4. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi
Figure 4. Effect of temperature on the enzyme activity



Şekil 5. pH'nin enzim aktivitesi üzerine etkisi
Figure 5. Effect of pH on the enzyme activity



Şekil 6. Metil gallat konsantrasyonunun tannaz aktivitesi üzerine etkisi
Figure 6. Effect of methylgallate concentration on the tannase activity



Şekil 7. Tannik asit konsantrasyonunun tannaz aktivitesine etkisi
Figure 7. Effect of tannic acid concentration on the tannase activity

Farklı Maddelerin Tannaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çizelge 3'te tannaz aktivitesi üzerine metal iyonların etkisi gösterilmiştir. Hg^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının varlığında enzim aktivitesi düşerken Ca^{+2} ve Zn^{+2} laktik asit bakterisinin tannaz aktivitesi üzerine etki yapmadığı görülmüştür. Ayrıca bazı sürfaktan (Tween 80), şelat (EDTA), inhibitör (DMSO) ve yapıyı bozan maddenin de (Üre) tannaz aktivitesine tesir etmediği saptanmıştır.

TARTIŞMA

Lactobacillus, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* cinsleri ile tanınan laktik asit bakterileri günümüzde çeşitli fermente gıdaların üretiminde kullanılmalarından dolayı yoğun ilgi görmektedir (12). Çeşitli fermente ürünlerden elde edilen laktik asit bakterileri *L. mesenteroides*, *L. curvatus*, *P. acidilactici* olarak saptanmıştır. Literatürde *L. plantarum* ve *L. mesenteroides* ile tannaz enzim çalışmaları bulunmaktadır. Ancak *L. curvatus* ile tannaz enzim çalışmasına rastlanılmamıştır.

Test edilen bakterilerin hepsinin az veya çok tannaz aktivitesine sahip olduğu görsel metotlarla ve spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda *L. plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* ve *Lactobacillus pentosus*'un tannaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (2, 10, 13). Vaquero ve ark. (7) ve Kostinek ve ark. (14) *L. mesenteroides*'in tannaz üreticisi olduğunu bildirmiştir. *L. curvatus* A5 hariç diğer izolatların hiç birinde gallat dekarboksilaz aktivitesi görülmemiştir. Osawa ve ark. (2) laktik asit bakterilerinin gallat dekarboksilaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *Lactobacillus gasserii*'nin tannaz aktivitesi göstermediği ancak gallat dekarboksilaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar farklı ortamlardan izole ettikleri laktik asit bakterilerinin tannaz ve gallat dekarboksilaz aktivitesi göstermediğini de saptamışlar. Hidrolize olabilen tanenler glukoz ve polioller gruplarının esterlenmiş halleri olup en basitleri gallotanenlerdir. Gallotanenler glukozun poligallol esterleridir. Tannaz hidrolize olabilen tanenlerdeki ester ve depsid bağlarını hidrolize ederek gallik asit ve glukoz ortaya çıkarmaktadır. Tannazın katalizlediği reaksiyonlarda tannik asit, metilgallat gibi hidrolize olabilen tanenler gallik asit ve glukozu hidrolize olurlar. Oluşan gallik asit dekarboksilaz enzimi ile dekarboksile olarak pirogallol oluşmaktadır. Bazı mikroorganizmaların gallotanenleri parçaladığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (15, 16). Test edilen laktik asit bakterilerinin hepsi ticari tannik asidi hidrolize ederek gallik asit oluşturmuştur. Benzer olarak son yıllarda Rodriguez ve ark.(11) *L. plantarum*'un hücre dışı ekstraktının tannik asidi biyodegrade ettiğini rapor etmişlerdir. Kwon ve ark.(10) *L. pentosus* LT7 suşunun çok yüksek (60.61 U/10⁹cfu) tannaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Bizim izolatlarımız arasında ise bu kadar yüksek aktivite gösteren olmamıştır. Ancak araştırmacıların *L. plantarum* için belirttikleri tannaz aktivite değerleri bizim bulgularımızla benzerlik göstermektedir. Aradaki farklılığın bir sebebi de hücre sayısındaki artışın farklı olması olabilir.

L. curvatus P3X hücre dışı filtratlarında bulunan enzimin SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDa olarak bulunmuştur. Skene ve Brooker (17) yaptıkları çalışmada *Selemonasrum inantium*'dan üretilen tannazın moleküler ağırlığını yaklaşık olarak 59 kDa olarak belirlemişlerdir.

Maksimum tannaz aktivitesi pH 5'te görülmüştür. Rodriguez ve ark. (11) *L. plantarum* için optimum pH'yı 5 olarak bildirirken Ayed ve Hamdi (13) *L. plantarum* ile tannaz üretiminde optimum pH'yı 6 olarak bildirmişlerdir. Test edilen örneklerimizin enzim aktivitesi için optimum sıcaklık 37°C olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın azalması ve yükselmesi enzim aktivitesini önemli ölçüde düşmeye neden olmuştur. Rodriguez ve ark. (11) *L. plantarum* için optimum sıcaklığı 30°C olarak bildirmişlerdir.

7mM gallat aktivitesinde en yüksek aktivite elde edilirken tannik asit için en yüksek aktivite 1.75mM da elde edilmiştir. Metil gallatın sübstrat olarak kullanıldığı birçok çalışmada *L. plantarum*'un tannaz aktivitesi incelenmiştir (7, 9, 18). Rodriguez ve ark. (11) tannaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada en yüksek aktivite 6,25 mM metil gallat konsantrasyonunda elde edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızdakine benzer olarak, araştırmacılar substrat konsantrasyonundaki artış ile tannaz aktivitesinde azalma meydana geldiğini saptamışlardır. Metil gallat gibi küçük moleküllerin hücre içine kolayca geçtiğini ve takiben parçalanma ürünlerinin hücre dışına çıktığı rapor edilmiştir (11). Ancak araştırmacılar tannik asit gibi kompleks bileşiklerin hücre içine geçemediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar 1mM tannik asidin *L. plantarum*'un hücre dışı ekstraktı ile hidrolize edilebildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda tannik asit substrat olarak kullanıldığında tannaz aktivitesi saptanmıştır. Düşük substrat konsantrasyonlarında yüksek enzim aktivitesi elde edilmesi endüstride uygulama açısından yarar sağlayabilir.

Enzimler aktivatör olarak metal iyonlara ihtiyaç duyarlar. Metal iyonlar düşük konsantrasyonlarda enzimler için kofaktörler gibi davranırlarken yüksek konsantrasyonlar ise katalik aktivitenin düşmesine neden olabilirler. Çalışmamızda Hg⁺² ve Mg⁺² iyonlarının varlığında enzim aktivitesi düşerken Ca⁺² ve Zn⁺² laktik asit bakterilerinin tannaz aktivitesi üzerine etki yapmadığı görülmüştür. K⁺ ise tannaz aktivitesinde az da olsa bir artışa neden olmuştur. Benzer olarak Rodriguez ve ark (11) K⁺, Ca⁺² ve Zn⁺² *L. plantarum*'un tannaz aktivitesi üzerine etki yapmadığını, Hg⁺² ve Mg⁺² iyonlarının varlığında ise enzim aktivitesinin kısmen inaktive olduğunu bildirmişlerdir. Kar ve ark. (19) ise 1 mM Ca⁺², Zn⁺² ve Hg⁺² metal iyonlarının tannaz aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ağır

metallerin inhibitör etkisi literatürde bildirilmiştir. Civa iyonları proteinlerin tiol grupları ile reaksiyona girerek proteinlerin yapısını bozarlar. Ayrıca civanın ilavesi ile disülfid bağlar hidrolitik olarak parçalanabilir. Bu ise enzim aktivitesinde düşmeye neden olabilir. İki değerlikli iyonlar ise enzimin agregasyonuna veya spesifik olmayan bağlanmaya neden olabilirler (11). Sabu ve ark (20) *Aspegillus niger* tannaz aktivitesinin K⁺ ilavesi ile arttığını, Ca⁺² ve Zn⁺² iyonlarının ise enzim aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda bazı yüzey aktif madde (Tween 80), şelat (EDTA), inhibitör (DMSO) ve yapıyı bozan madde (Üre)'nin tannaz aktivitesine tesir etmediği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre test edilen laktik asit bakterilerine ait tannaz enzim aktivitesi enzimleri etkileyen yüzey aktif madde, inhibitör ve yapıyı bozan maddelerden etkilenmemektedir. Benzer sonuçlar *L. plantarum* tannazı için Rodriguez ve ark (11) tarafından da bildirilmiştir. Kar ve ark. (19) Tween 80'in enzim aktivitesini artırırken 1 mM EDTA'nın tannaz aktivitesini inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

Bu çalışma ile *L. curvatus*'un tannaz aktivitesine sahip olduğu ilk kez ortaya konmuştur. Bazı meyve sularının üretiminde acı-buruk tat (nar suyu, gilaburu) problem oluşturmakta, acılığın giderilmesi önemli işleme aşamalarından birini oluşturmaktadır. Depolanmış bira veya meyve sularında tannaz enzimi yardımıyla bulanıklık oluşumu önemli ölçüde azalma göstermiştir (21). Bu meyve sularında acı buruk tada tanenli bileşenler neden olmaktadır. Laktik asit bakterileri tanenleri parçalayan tannaz aktivitesine sahip olduğundan bu meyve sularında acı ve buruk tadın giderilmesinde rahatlıkla kullanılabilceğinden doğal yolla acı ve buruk tat giderilmesinin yanında laktik asit bakterilerinin sahip olduğu antimikrobiyel aktivite ve benzeri özellikleri ile ürünlerin raf ömrü uzatılmış olacaktır. Yine ileride yapılacak çalışmalar doğrultusunda bu izolatların probiyotik özellikleri ortaya konduğu takdirde günümüzde yaygın bir kullanım alanı bulunan probiyotik ürün eldesi sağlanmış olacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu proje Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (BAP-1002F62).

KAYNAKLAR

1. Rodriguez H, De las Rivas B, Gomez-Cordoves C, Munoz R. 2008. Degradation of Tannic Acid by Cell-Free Extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food Chem*, 107: 664-670.
2. Osawa R, Kuroiso K, Goto S, Shimizu A. 2000. Isolation of Tannin- Degrading Lactobacilli From Humans and Fermented Foods. *Appl Environ Microbiol*, 66 (7): 3093-3097.
3. Yao J, Guo GS, Ren GH, Liu YH. 2014. Production, Characterization and Applications of Tannase. *J Mol Catal B: Enzym*. 101: 137-147.
4. Temel O, Kivanç M. 2015. Tannase Activity by *Enterococcus faecium* Isolated From Local Fermented Food. *J Ferment Technol*, 3:2.
5. Zhang S, Gao X, He L, Qiu Y, Zhu H, Cao Y. 2015. Novel Trends For Use of Microbial Tannases. *Prep Biochem Biotech*, 45: 221-232.
6. Kumar M, Beniwal V, Salar KR. 2015. Purification and Characterization of A Thermophilic Tannase From *Klebsiella pneumoniae* KP 715242. *Biocatal Agric Biotech*, 4: 745-751.
7. Vaquero I, Marcobal A, Munoz R. 2004. Tannase Activity by Lactic Acid Bacteria From Grape Must and Wine. *Int J Food Microbiol*, 96 (2): 199-204.
8. Nishitani Y, Osawa R. 2005. Deceptive Halo Formation by Tannase-Defective Bacteria on Tanin-Treated Plate Media. *Microbes Environ*, 20 (2): 117-119.
9. Nishitani Y, Osawa, R. 2003. A Novel Colorimetric Method to Quantify Tannase Activity of Viable Bacteria. *J Microbiol Meth*, 54: 281-284.
10. Kwon T, Shim S, Lee JH. 2008. Characterization of Lactobacilli With Tannase Activity Isolated From Kimchi. *Food Sci Biotechnol*, 17 (6): 1322-1326.
11. Rodriguez H, Rivas B, Cordoves CG, Munoz R. 2008. Characterization of Tannase Activity in Cell-Free Extracts of *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Int J Food Microbiol*, 121: 92-98.
12. Madigan MT, Martinko MM, Stahl DA, Clark DP. (Ed). 2013. *Brock Biology of Microorganisms*, 13th Ed, Pearson Education Inc. San Francisco, CA 94111.USA.
13. Ayed A, Hamdi M. 2002. Culture Conditions of Tannase Production by *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnol Lett*, 24: 1763-1765.
14. Kostinek M, Specht I, Edward VA, Pinto C, Egounlety M, Sossa C, Mbugua S, Dortu C, Thonart P, Taljaard L. 2007. Characterisation and Biochemical Properties of Predominant Lactic Acid Bacteria From Fermenting Cassava For Selection as Starter Cultures. *J Food Microbiol*, 114: 342-351.
15. Bhat TK, Singh B, Sharm OP. 1998. Microbial Degradation of Tannins; A Current Perspective. *Biodegradation*, 9: 343-357.
16. Mingshu L, Qiang H, Dongying J. 2006. Biodegradaton of Gallotannins and Ellagitannins. *J Basic Microbiol*, 46 (1): 68-84.
17. Skene IK. and Brooker JD. 1995. Characterization of Tannin Acylhydrolase Activity in The Ruminal Bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe*, 1 (6): 321-327.
18. Nishitani Y, Sasaki E, Fujisaw T. and Osawa R. 2004. Genotypic Analyses Of Lactobacilli With A Range of Tannase Activities Isolated From Human Feces and Fermented Foods. *Syst Appl Microbiol*, 27: 109-117.
19. Kar B, Banerjee R, Bhattacharyya BC. 2003. Effect of Additives on The Behaviorual Properties of Tannin Acyl Hydrolase. *Process Biochem*, 38: 1285-1293.
20. Sabu A, Kiran GS, Pandey A. 2005. Purification and Characterization of Tannin Acyl Hydrolase From *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Food Technol Biotech*. 43: 133-138.
21. Fitzpatrick DE, Bing B, Maggi DA, Fleming RC, O'Malley RM. 2002. Vasodilating Procyanidins Derived From Grape Seeds. *Ann New York Acad Sci*, 957: 78-89.