

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANNAZ
ÜRETİM YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Onur TEMEL

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Ocak-2012

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1002F62.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Onur Temel' in “Laktik Asit Bakterilerinin Tannaz Üretim Yeteneklerinin Araştırılması” başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 17.01.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. MERİH KIVANÇ
Üye : Prof. Dr. KIYMET GÜVEN
Üye : Prof.Dr. SEMRA İLHAN
Üye : Yard. Doç.Dr. M.BURÇİN MUTLU
Üye : Yard. Doç. Dr. MERAL YILMAZ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANNAZ ÜRETİM YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ONUR TEMEL

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Merih KIVANÇ

2012, 87 sayfa

Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarda fermente ürünlerden izole edilen 49 izolatin saflaştırması yapılmış ve seçilen bu izolatların riboprinter sistem ile tanımlamaları yapılmıştır. Spektrofotometrik ve görsel okuma metodu ile en yüksek aktiviteyi MT4 izolatu göstermiştir. İnce Tabaka Kromatografisi kullanılarak tannik asitten oluşan gallik asitin dekarboksilaz aktivitesi ile pirogallol ürünü gözlemlenmiştir. Seçilen birkaç izolatta SDS-PAGE yöntemi ile enzimin yaklaşık moleküler ağırlığı belirlenmiştir. Yüksek tannaz aktivitesi gösteren 9 izolat belirlenmiş ve gösterdikleri tannaz aktivitesi üzerine farklı sıcaklık, pH, substrat yoğunluğu, tannik asit konsantrasyonu ve çeşitli minerallerin etkisi araştırılmıştır. Yapılan testler sonucunda optimum sıcaklık 37⁰ C, pH 5.0 substrat olarak kullanılan metil gallat konsantrasyonu 7 mM, tannik asit konsantrasyonu ise 1,75 mM olarak bulunmuştur. Hg⁺² ve Mg⁺² iyonlarının varlığında tannaz aktivitesi düşerken, Ca⁺² ve Zn⁺² laktik asit bakterilerinin tannaz aktivitesi üzerine etki yapmadığı görülmüştür. K⁺ tannaz aktivitesinde azda olsa artışa neden olmuştur. Ayrıca sürfaktan (Tween 80), şelat (EDTA), inhibitör (DMSO) ve denatüre edici ajan (Üre) ların da tannaz aktivitesine tesir etmediği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tannaz, Laktik Asit Bakterileri, Metil gallat, Pirogallol.

ABSTRACT**Master of Science Thesis****INVESTIGATION OF TANNASE PRODUCTION CAPABILITIES OF
LACTIC ACID BACTERIA****Onur TEMEL****Anadolu University Graduate School of Sciences
Biotechnology Department****Supervisor: Prof.Dr. Merih KIVANÇ****2012, 87 pages**

In this study, 49 isolates obtained from fermented products in previous studies were purified and these selected isolates were identified by DuPont Qualicon RiboPrinter® system. Spectrophotometric and visual reading method indicated that isolate MT4 showed the highest activity. It was observed that pyrogallol product with the decarboxylase activity of gallic acid composed of tannic acid using the thin layer chromatography. The proximate molecular weights of the enzyme producing with some selected isolates were determined by SDS- PAGE method, and also the effect of different temperature, pH, substrate concentration, the concentration of tannic acid and various minerals on activity were investigated. As a result of the performed tests, the optimum temperature was found to be 37⁰ C, pH was found to be 5.0, methyl gallate concentration used as the substrate was found to be 7 mM and tannic acid concentration was found to be 1.75 mM. While tannase activity of lactic acid bacteria decreases in the presence of Hg⁺² and Mg⁺² ions, does not show any changes in the presence of Ca⁺² and Zn⁺² ions. The presence of K⁺ ion was caused a slight increase in tannase activity. In addition, it was detected that surfactant (Tween 80), chelate (EDTA), inhibitor (DMSO), and denaturing agents (urea) have don't effect on tannase activity.

Keywords: Tannase, Lactic acid bacteria, Metyl gallate, Pyrogallol.

TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun seçiminde bana önderlik eden ve araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar çalışmamı yakından takip edip, tecrübesi ve bilgileriyle her türlü yardım ve katkılarını benden esirgemeyen, olaylara her zaman farklı açılarla bakabilme yeteneği ve yapılabilecek olanın en iyisini başarma yönündeki tutumuyla güler yüzünü benden esirgemeyen değerli tez hocam Sayın Prof. Dr. Merih Kıvanç' a, ve laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan sayın Uzman Erdoğan Çakır' a, sorularımı yanıtlamaktan rahatsızlık duymayan Araştırma Gör. Rasime Demirel' e ve aynı çalışma ortamını paylaştığım tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca beni yetiştiren her zaman her koşulda yanımda olan maddi ve manevi yönden beni destekleyen, anlayışını ve desteğini benden hiç esirgemeyen ve bana güç veren aileme sonsuz teşekkür ederim.

Onur Temel

Ocak-2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması	2
1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Gıdalarda Kullanımı	4
1.3. Tanenler.....	5
1.3.1. Hidrolizlenebilir Tanenler.....	7
1.3.2. Kondanse Tanenler	10
1.3.3. Kompleks Tanenler	10
1.4. Gallik asit	10
1.5. Tannaz	11
1.5.1. Tannazın Kaynakları	13
1.5.1.1. Bitkiler	13
1.5.1.2. Hayvanlar	13
1.5.1.3. Mikroorganizmalar.....	14
1.5.2. Tannaz Enziminin Fizikokimyasal Özellikleri	15
1.5.2.1. Optimum pH ve Stabilitesi.....	15
1.5.2.2. Optimum Sıcaklık ve Stabilitesi.....	17
1.5.2.3. Moleküler kütlesi	17
1.5.3. Tannaz ile Katalizlenen Reaksiyon.....	19

1.5.4. Tannaz Enziminin Uygulama Alanları	20
1.5.4.1 Hazır Çay	21
1.5.4.2. Şarap ve Bira Üretimi	22
1.5.4.3. Gallik Asitin Üretimi.....	23
1.5.4.4. Hayvan Yem Katkısı.....	23
1.5.4.5. Diğer Kullanım Alanları	23
2. MATERYAL VE METOD	25
2.1. MATERYAL.....	25
2.1.1. Test Mikroorganizmaları.....	25
2.1.2. Besi Ortamları	25
2.1.2.1. MRS Broth	25
2.1.2.2. MRS Agar	26
2.1.2.3. Brain Heart Infusion Agar.....	26
2.1.2.4. Brain Heart Infusion Broth	27
2.1.2.5. % 2 Tannik Asit İlaveli Brain Heart Infusion Agar	27
2.1.2.6. Substrat Besiyeri	27
2.1.3. Kullanılan Boyalar	27
2.1.3.1. Kristal violet.....	27
2.1.3.2. Safranin	28
2.1.3.3. Lügol	28
2.1.4. Kullanılan Çözeltiler	28
2.1.4.1. Fizyolojik tuzlu su.....	28
2.1.4.2. % 15' lik gliserol çözeltisi.....	28
2.1.4.3. 33 mM' lık Sodyum fosfat tamponu	29
2.1.4.4. Doygun NaHCO ₃ solüsyonu	29
2.1.4.5. 5 mM' lık metil gallat çözeltisi	29
2.1.4.6. İyot solüsyonu sprayinin hazırlanması (TLC plaka sprayleme) ..	29
2.1.4.7. 33 mM' lık Amonyum asetat tamponu	29
2.1.4.8. Yükleme jelinin (Stacking gel) hazırlanması (%4'lük, 3ml)	29
2.1.4.9. Ayırma jelinin (Resolving gel) hazırlanması (% 12,5, 5 ml)	30
2.1.4.10. SDS-PAGE örnek yükleme tamponu.....	30
2.1.4.11. SDS-PAGE yürütme tamponu (5X).....	30

2.1.4.12. SDS PAGE Boyama solüsyonu	30
2.1.4.13. SDS-PAGE Yıkama solüsyonu.....	31
2.1.4.14. SDS PAGE Saklama solüsyonu.....	31
2.2. METOD.....	31
2.2.1. Laktik Asit Bakterileri Kültürlerinin Hazırlanması	31
2.2.1.1. Gram Boyama	31
2.2.2. Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Dupont Qualicon RiboPrinter® Sistem ile Tanımlanması.....	32
2.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Görsel Okuma Metod ile Tannaz Aktivitesinin Belirlenmesi	33
2.2.4. Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Spektrofotometre Yöntemi ile Tannaz Aktivitesinin Belirlenmesi	34
2.2.5. İnce Tabaka Kromatografisi ile Oluşan Ürünün (Pyragallol ve Gallik Asit) ve Substratın (Tannik Asit) Gözlemlenmesi.....	34
2.2.6. SDS-PAGE Uygulanması	35
2.2.7. Tannaz Aktivitesi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi.....	36
2.2.7.1. Optimum Sıcaklık	36
2.2.7.2. Optimum pH	37
2.2.7.3. Substrat Yoğunluğu.....	37
2.2.7.4. Tannik Asit Konsantrasyonu.....	37
2.2.7.5. Farklı Katkı Maddelerinin Tannaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	38
2.2.8. Bradford Yöntemi	38
3. BULGULAR	40
3.1. Fermente Olmuş Ürünlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri ve Tanımlanması	40
3.3. Laktik Asit Bakterileri İzolatlarının Tannaz Spesifik Aktivite Ölçümü	51
3.4. Laktik Asit Bakterilerinin İnce Tabaka Kromatografisi ile Reaksiyon Ürünlerinin Gözlemlenmesi	54
3.5. SDS-PAGE Uygulanması	56
3.6. Bakteri Yoğunluğunun Etkisi.....	57
3.7. Tannaz Aktivitesi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi.....	58
3.7.1. Sıcaklığın Tannaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	58

3.7.2. pH' in Tannaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	60
3.7.3. Substrat Konsantrasyonunun Aktiviteye Etkisi	62
3.7.4. Tannik Asit Konsantrasyonunun Tannaz Aktivitesine Etkisi	64
3.7.5. Farklı Katkı Maddelerin Tannaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	66
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	68
KAYNAKLAR	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Hidrolize olabilen tanenler ve bazı bileşenlerinin yapısal olarak karşılaştırılması.....	7
1.2. Tannik asitin kimyasal yapısı.....	8
1.3. Tanenlerin genel sınıflandırılması.....	9
1.4. Kondanse tanenler.....	10
1.5. Gallik asit.....	11
1.6. Tannik asidin yapısı ve tannazın hidrolitik ürünleri.....	12
1.7. Tannazın depsidaz ve esteraz aktivitesi.....	13
1.8. Tannaz tarafından tannik asitin hidroliz reaksiyon yolu.....	20
1.9. <i>L. plantarum</i> ve <i>L. pentosus</i> türlerinde görülen tannik asitin biyodegradasyon reaksiyon yolu.....	20
1.10. Tannaz ile çay fenollerinin estersizleşmesi.....	22
3. 1. İzolatlarının ışık mikroskopunda görüntüleri.....	43
3. 2. <i>Enterococcus faecium</i> türüne ait riboprinter profil bantları.....	45
3. 3. <i>Lactobacillus brevis</i> türüne ait riboprinter profil bantları.....	46
3. 4. <i>Lactobacillus curvatus</i> türüne ait riboprinter profil bantları.....	47
3. 5. <i>Lactobacillus plantarum</i> türüne ait riboprinter profil bantları.....	47
3. 6. <i>Pediococcus acidilactici</i> türüne ait riboprinter profil bantları.....	48
3. 7. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> türüne ait riboprinter profil bantları.....	48
3. 8. % 2 Tannik asit ilaveli Brain Heart Infusion agar üzerinde izolatın gelişimi ve açık zon görüntüsü.....	51
3. 9. Laktik asit bakterilerinin gallat dekarboksilaz aktivitesi.....	51
3. 10. Tannaz aktivite miktarını belirlemek için kullanılan standart eğri grafiği..	52
3. 11. Bradford standart eğri grafiği.....	52

3. 12. İnce tabaka kromatografi ile reaksiyon ürünlerinin gösterilmesi	55
3. 13. İnce tabaka kromatografi ile reaksiyon ürünlerinin gösterilmesi.	55
3. 14. İnce tabaka kromatografi ile reaksiyon ürünlerinin gösterilmesi	56
3. 15. İnce tabaka kromatografi ile reaksiyon ürünlerinin gösterilmesi.	56
3. 16. İnce tabaka kromatografi ile reaksiyon ürünlerinin gösterilmesi.	56
3. 17. SDS-Page analizi sonucu maksimum aktivite gösteren izolatların tannaz moleküler ağırlıkları.	57
3. 18. SDS-Page analizi sonucu maksimum aktivite gösteren izolatların tannaz moleküler ağırlıkları.	57
3. 19. Sırasıyla MT4, A4, DS1, DZ2, A6, P3X, KT2, ES6, A6X izolatlarının sıcaklığın enzim aktivitesi (Ünit) üzerine etkisi.	59
3. 19. (Devam) Sırasıyla MT4, A4, DS1, DZ2, A6, P3X, KT2, ES6, A6X izolatlarının sıcaklığın enzim aktivitesi (Unit) üzerine etkisi.	60
3. 20. Sırasıyla MT4, A4, KT2, ES6, A6X, P3X, A6, DS1, DZ2 izolatlarının pH enzim aktivitesi üzerine etkisi.	61
3. 20. (Devam) Sırasıyla MT4, A4, KT2, ES6, A6X, P3X, A6, DS1, DZ2 izolatlarının pH enzim aktivitesi üzerine etkisi.	62
3. 21. Sırasıyla MT4, A4, A6, DS1, DZ2, KT2, ES6, A6X, P3X izolatlarının substrat olarak kullanılan metil gallatın tannaz aktivitesi üzerine etkisi. ...	63
3. 21. (Devam) Sırasıyla MT4, A4, A6, DS1, DZ2, KT2, ES6, A6X, P3X izolatlarının substrat olarak kullanılan metil gallatın tannaz aktivitesi üzerine etkisi.	64
3. 22. Sırasıyla MT4, A4, A6, DZ2, DS1, KT2, ES6, A6X, P3X izolatlarının tannik asit konsantrasyonunun tannaz aktivitesine etkisi.	65
3. 22. (Devam) Sırasıyla MT4, A4, A6, DZ2, DS1, KT2, ES6, A6X, P3X izolatlarının tannik asit konsantrasyonunun tannaz aktivitesine etkisi	

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Tannaz enziminin mikrobiyal kaynakları	15
3.1. Daha önceki çalışmalarda elde edilen izolatların kaynakları.....	40
3.1. (Devam) Daha önceki çalışmalarda elde edilen izolatların kaynakları.	41
3.1. (Devam) Daha önceki çalışmalarda elde edilen izolatların kaynakları	42
3.2. Riboprinter Sistemi ile Tanımlanan Laktik Asit Bakterileri	43
3.2. (Devam) Riboprinter Sistemi ile Tanımlanan Laktik Asit Bakterileri	44
3.3. Laktik asit bakterilerinin tannaz ve gallat dekarboksilaz aktivitelerinin görsel okuma sonuçları.....	49
3.3. (Devam) Laktik asit bakterilerinin tannaz ve gallat dekarboksilaz aktivitelerinin görsel okuma sonuçları	50
3.4. Laktik Asit Bakterilerinin Spesifik Tannaz Aktivitesi.....	53
3.4. (Devam) Laktik asit bakterilerinin Spesifik Tannaz Aktivitesi.....	54
3.5. Bakteri yoğunluğunun tannaz aktivitesine etkisi	58
3.6. Farklı katkı maddelerin tannaz aktivitesi üzerine etkisi.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CaCl₂: Kalsiyum Klorür

Da: Dalton

DMSO: Dimetil sülfoksit

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

HgCl₂: Civa Klorür

KCl: Potasyum Klorür

kDa: Kilo Dalton

kob: Koloni oluşturan birim

MgCl₂: Magnezyum Klorür

mM: mili mol

mU: mili Ünit

M: Mol

nm: nanometre

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid jel Elektroferezi

Tannaz: Tanen Açıl Hidrolaz

TLC: İnce Tabaka Kromotografisi

Tween 80: Polysorbate 80

U: Enzim Ünitesi

ZnCl₂: Çinko Klorür

1. GİRİŞ

Günümüzde teknolojinin gelişmesi ile insanlar saf ürünler ve daha temiz bir dünya için mikroorganizmalardan faydalanma yolunu seçmişlerdir. Yüzyıllardan beri insanlar beslenme, eczacılık, endüstri ve tıp alanlarında mikroorganizmalardan yararlanmaktadır. Bu yararlanma mikroorganizmaların kendisinden ya da enzimlerinden olacak şekilde gelişmiştir.

Laktik asit bakterileri ile fermente gıdalar, çok eski zamanlardan beri gıda hammaddelerinin korunmasında oynadığı temel rol ve insan gıdalarında besinsel, duyuşal ve sağlık özelliklerine sağladığı katkılar nedeniyle geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Günümüzde probiyotik özellik gösterdiklerinden dolayı laktik asit bakterileri üzerinde önemle durulan bakteri grubu olup sağlık açısından yararlı olarak kabul edilmektedir. Bu bakterilerin direkt kendisi kullanılarak hem gıdada istenilen aroma kazanılmaya çalışılırken diğer taraftan da sağlıklı bir ürün elde edilme hedeflenmektedir.

Tanenler bitkisel ürünlerin yapraklarında, tohumlarında ve köklerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Çay, şarap ve meyve suları gibi birçok içecekte de bu fenolik bileşikler bulunmaktadır. Tanenler beslenmede istenmeyen maddelerdir. Çünkü sindirim enzimlerini inhibe edebilir. Vitamin ve minerallerin kullanımını etkileyebilirler. Ayrıca kanser oluşumu ile ilişkili olduğu ve hepatoksik olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle sağlık açısından riskli bileşiklerdir (Rodriguez ve ark, 2008b). Bazı gastrointestinal (mide-bağırsak) mikrobiyota, tanenleri degrade ederek zararsız bileşenleri oluşturabilmektedir. Osawa ve ark. (2000) insan dışkılarından ve fermente gıdalardan izole edilen laktobasillus türlerinin tannaz aktivitesine sahip olduklarını göstermişlerdir. Laktobasillus türleri, tanenleri hidrolize etmesi ve hücrede tutunmayı (adsorbsiyon) azaltmasından dolayı gıdada var olan tannenleri degrade etmede kullanılabilir.

Tanenleri gallik asit ve glukozu parçalayan enzim karboksil ester hidrolazlar ailesinde yer alan (E.C. 3.1.1.20. tanen açil hidrolaz) tannazdır. Tannaz hidrolize olabilen tanenlerdeki ester ve depsid bağlarını hidrolize ederek gallik asit ve glukoz ortaya çıkarmaktadır (Sarıkaya, 2005). Çoğu mikroorganizma tannazı üretme yeteneğine sahiptir.

Laktik asit bakterileri tannaz enzimi çalışmalarında çok fazla kullanılmamıştır. Ancak sahip olduğu ekolojik avantajla bu alanda potansiyel teşkil etmektedir (Osawa ve ark., 2000). Yapılan çalışmada fermente sebzelerden izole edilen laktik asit bakteri kültürlerinin mikrobiyal tannaz aktivite yetenekleri araştırılarak tannaz üretimi için kültür koşulları belirlenmesi hedeflenmektedir.

1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Laktik Asit Bakterileri (LAB) Firmicutes filumuna ait *Eubacteriales* takımının, *Streptococcaceae* ve *Lactobacillaceae* familyalarının içerisinde yer alan, spor oluşturmeyen G (+), basil veya kok şeklinde ve sitokromdan yoksun mikroorganizmalardır (Stiles ve Holzapfel, 1997). Bu grubun önemli cinsleri arasında *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* yer almaktadır. Bütün laktik asit bakterileri anaerobik koşullar altında gelişmesine rağmen çoğu anaerobik bakterinin tersine oksijene karşı duyarlı değildir. Ayrıca oksijen varlığı olan koşullarda da gelişim göstermektedirler. Bu sebeple de aerotolerant veya anaerob mikroorganizmalar olarak isimlendirirler (Salminen, 2004).

Bu bakteriler; kok, çomak, tetrad ve ovoid şeklinde bulunabilirler. Laktik asit bakterileri gelişme sıcaklıkları bakımından mezofil ve termofil özellik göstermektedir. Ayrıca bu bakteriler heterotrof beslenme şekli gösterirler (Şahin, 1995; Etöz, 2006). Farklı cinslerde olan laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması, morfoloji, glukoz fermentasyonunun biçimi, farklı sıcaklıklarda gelişme, asit veya alkalın toleransı, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme yeteneği ve üretilen laktik asitin yapısına bağlıdır.

Çoğu laktik asit bakterisi enerjisini sadece şeker metabolizmasından sağladığı için bunlar genellikle şeker içeren habitatlarda bulunmaktadır. Bu bakterilerin en tipik özelliği biyosentetik yeteneklerinin sınırlı olmasıdır. Besin maddeleri arasında gereksinim duydukları aminoasitler, pürinler, pirimidinler ve vitaminler yer almaktadır (Madigan ve Matrinko 2009).

Laktik asit bakterilerinin altgrupları arasında en önemli fark şekerlerin fermentasyonu sonucunda oluşan ürünlere bağlıdır. Laktik asit bakterilerinde

homolaktik fermentasyon ve heterolaktik fermentasyon olmak üzere iki şeker fermentasyon reaksiyon yolu vardır. Bunlardan homolaktik fermentasyon, standart koşullar altında glikoliz (Embden-Meyerhof-parnas reaksiyon yolu) ile sadece son ürün olarak laktik asit üretimi meydana getirir. Bunlar homofermentatif olarak isimlendirilirler. Heterolaktik fermentasyonda (heterofermentatif) ise 6-fosfoglukonat/fosfoketolaz reaksiyon yolu ile laktik asitin yanında önemli miktarlarda CO₂, etanol ve asetat gibi son ürünleri meydana getiren fermentasyon şeklidir (Salminen ve ark., 2004) ki bunlar da heterofermentatif olarak gruplandırılırlar.

Fermentasyonda olan farklılıklar glikoliz reaksiyon yolunda anahtar enzim olan aldolaz' ın bulunması veya bulunmamasından dolayı olmaktadır. Heterofermentatifler aldolazdan yoksun olduğundan früktoz bifosfatı trioz fosfata yıkamadıkları için glukoz 6-fosfatı 6-fosfoglukonat' a oksitlerler ve bununla birlikte daha sonra bunu pentoz fosfata dekarboksile ederler. Dekarboksile edilen bu ürün de fosfoketolaz enzimiyle trioz fosfat ve asetil fosfat oluşturulmak üzere yıkılmaktadır (Keskin, 2010).

Heterofermentatif fermentasyonda , trioz fosfat laktik aside çevrilir ve bu arada 1 mol ATP oluşturulur. Bununla beraber, redoks eşitliğinin sağlanması için üretilen asetilfosfat, pentoz fosfat üretimi sırasında oluşturulan NADH' tan gelen elektronları alıp ve etonole dönüştürür. Bu olayda ATP kazancı yoktur. Bu nedendir ki heterofermentörlerin, homofermentörler gibi 2 mol ATP üretmek yerine 1 mol ATP kazancı vardır. Heterofermentörler 6-fosfoglukonatı dekarboksile etmesi sonucu fermentasyon ürünü olarak CO₂ oluşturur. Fakat homofermentörler ise ya çok az CO₂ meydana getirirler ya da hiç CO₂ oluşturmazlar (Keskin, 2010).

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ile ilgili Orlo-jensen tarafından çok önemli incelemeler yapılmıştır. Bugün için geçerli olan ve fermentasyon tipine bağlı gerçekleştirilen sınıflandırma; homofermentatif, fakültatif heterofermentatif ve heterofermentatif laktobasillerin (thermobacterium, streptobacterium ve betabacterium) ayrımı Orlo-Jensen' e aittir (Sharpe, 1979).

1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Gıdalarda Kullanımı

İnsanların tükettikleri gıdaların güvenilir olması, sağlıklı büyüme ve gelişmelerinde önemlidir. Gıdalara eklenen katkı maddeleri, gıdaların fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve muhafaza sürelerinin uzatılması görevlerini üstlenmektedir. Ancak bu ilave edilen katkı maddelerinden bazılarının sağlıksız oluşu ve kullanım oranına bağlı olarak toksik veya kanserojenik etki gösterebilirler. Bu nedenle doğal ve güvenilir katkı maddelerinin elde edilmesi ve kullanımı önemli hale gelmiştir. Gıdaların güvenliği konusunda proses uygulamalarından kaçınılması ve mümkün olduğunca doğal katkı maddelerinin kullanılması tüketiciler tarafından tercih edilmektedir (Kurt ve Zorba, 2005).

Gıdalarda bulunan yararlı mikroorganizmalar aracılığı ile sentezlenen çoğu madde antimikrobiyal etkiye sahiptir. Özellikle organik asitlerin oldukça işlevsel olduğu bilinmektedir. Laktik asit ve asetik asit de koruyucu olarak kullanılan asitler arasında yer almaktadır. Bu asitlerin etkileri genelde ortamın pH değerini düşürmeye bağlı olsa da, asetik asidin ayrıca hücre duvarını aşarak hücreye girmesi ve plazmayı denatüre etmesi şeklinde de etki yaptığı saptanmıştır. Asetik asit daha çok sebze konserveleri, mayonez, sos, turşu, ketçap ve etin olgunlaştırılmasında kullanılırken, laktik asit; turşular, salamuralar, sebze ve zeytin ürünlerinde en fazla kullanılmaktadır (Coşkun, 2006).

Koruyucu olarak kullanılan organik asitler ve ürettikleri antimikrobiyal peptitler nedeni ile laktik asit bakterileri ve diğer bakteriler arasındaki etkileşimler çeşitli gıdaların üretiminde özellikle de fermente gıdalarda ve silaj oluşumunda oldukça geniş bir şekilde araştırılmıştır. Bunun dışında laktik asit bakterilerinin insanlar tarafından kullanılması güç olan ve toksik etkisi bulunabilen bileşenleri daha küçük moleküllü, sindirilebilen ya da toksik etkisinin ortadan kalktığı moleküllere parçalayabilme özelliği de gıdalarda kullanılmaları için avantaj sağlamaktadır (Visser ve ark., 1986; Arıcı, 2005).

Laktik asit bakterileri farklı türden gıdaların besin değerinin artırılmasında ve raf ömrünün uzatılmasında kullanımının yanında, medikal alanda da intestinal

enfeksiyonların ve bazı kanser tiplerinin kontrolünde de özellikle son yıllarda önem kazanan bir konu haline gelmiştir (Gilliland, 1990).

Laktik asit bakterileri sucuk, turşu, şarap, zeytin, boza, yoğurt gibi fermente gıdaların üretiminde çok eski zamanlardan beri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fermente ürünlerin kalitesinin belirlenmesinde de son derece önemlidir. Laktik asit bakterileri sebze, meyve ve süt ürünlerinde de bulunmaktadır. Bu bakteri grubunun bir kısmı insan vücudunun doğal florasını oluşturmaktadır (Deet ve Tamime, 1981).

Laktik asit bakterileri bakteriyosin olarak adlandırılan küçük, ribozomal olarak sentezlenen antimikrobiyal peptidler üretmektedirler (Cuozzo ve ark, 2000; Eijsink ve ark, 1998). Laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri, gıdalarda bozulmaya ve hastalığa neden olan bazı gram pozitif bakterilere karşı bakteriyosidal etkiye sahiptir (Kıvanç ve ark, 2002).

1.3. Tanenler

Tanenler moleküler ağırlıkları 300 Da ile 3000 Da aralığında değişen, suda çözünebilen polifenollerdir. Bu fenolik bileşenler genellikle bitkilerin meyve, yaprak, kök, gövde ve tohumlarında bulunmaktadır. Fakat özellikle bitkilerin doku ve organlarında bol miktarda birikirler. Tanenler ayrıca gıda maddelerinde de örneğin çilek, fındık, ceviz, çay, ahududu, mango ve üzümde bulunur (Mingshu, 2006).

Tanenler ligninden sonra doğada ikinci en çok bulunan bitkisel fenoliklerdir (Albertse, 2002). Tanenler metabolik reaksiyon yoluna dahil olmadığından bitkide sekonder maddeler olarak düşünülmektedir (Bhat, 1998).

Tanenler yara iyileştirici ve yapısal olarak pigmentler gibi görevi olmasına rağmen, metabolizmanın hücre içi düzeyinde direkt bir fonksiyonu yoktur. Bitkilerde biriken tanenler, doğrudan tabaklama yoluyla mikroorganizmaların istilacı ekstrasellüler enzimleri ve inaktivite olan virüsler nedeniyle mikrobiyolojik saldırılardan bitkilerin savunmasız kısımlarını korumaktadır. Saldıran mikroorganizmalar tarafından salınan enzimler, bitki ve tanen molekülünde non-enzim protein veya polisakkaritler gibi mikrobiyolojik substratlar arasında kompleks oluşumu nedeniyle kısmen veya bütünü inaktivite

olmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997). Tanenler, memeli otoburlar ve böcekler tarafından bitkilere zararı azaltmasının yanında ayrıca kimyasal savunmaya da katkıda bulunurlar (Hartzfeld, 2002).

Tanenler kimyasal açıdan, hidroliz olabilen tanenler ve kondanse tanenler olmak üzere iki ana grupta incelenir. Birinci gruptaki tanenler bir enzim ya da asit eşliğinde hidroliz olarak pirokateşik asit, gallik asit ve şeker gibi, suda çözünebilen bileşikler verir. Suda az çözünürken, alkol ve asetonda çok iyi çözünmektedir. Hidroliz olabilen tanenlerin en iyi bilinen örneklerinden biriside gallotanenlerdir. Çok geniş bir grup olan kondanse tanenler ise hidrolize olamazlar. Bunlar ısı karşısında kuvvetli asitler ya da bazı yükseltgeyici maddelerle *flobafen* denen koyu kırmızı renkli çözünmez bileşikler oluşturabilmektedir (Fröhlich, 2002).

Ticari ölçüde tannik asitin elde edildiği en mühim kaynak çaydır. Meşe palamudunda da bol miktarda bulunan tanenler aynı zamanda; antiseptik bileşiklerdir. Tannik asit, bitkinin sıcak suyla ekstrakte edilmesiyle (çayın demlenmesi gibi) suya çekilir. Bundan sonra çözelti buharlaştırmaya tabi tutulur ve katı halde tanen (veya tannik asit) elde edilir (Okuda ve Yoshida, 1993).

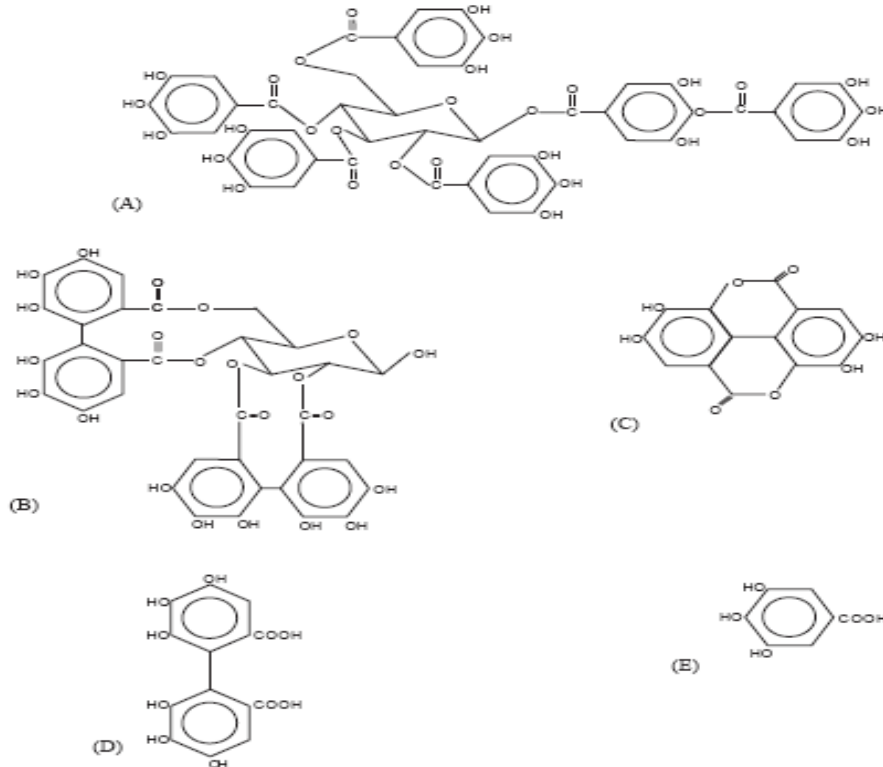
Tanenlerin mikroorganizma, hayvanlar ve çevreye birçok etkisi vardır. Fenolik hidroksil gruplar, genellikle proteinler ile tanenlerin çözünmez ve sindirilemeyen kompleks oluşumuna imkan vermektedir. Böylece bunlar gıdanın besinsel değerini ve geviş getiren hayvanlarda gıda alımını azaltmada rol oynamaktadır. Ayrıca çok sayıda mikroorganizmanın enzim aktivitesini engellemesi ve mikrobiyolojik saldırılara karşı direnç kazanması nedeniyle gelişmesini inhibe etmektedirler. Bu tanenlerin antimikrobiyal ve toksik özellikleri olmasına rağmen, bazı filamentli funguslar, bakteriler ve mayalar tanenlere karşı tamamen dirençli ve onları degrade etme yeteneğindedirler (Goel, 2005). Dahası tarımsal atıklarda tanenler çevrede ciddi kirliliğe sebep olmaktadır. Bu yüzden, organizmalar üzerinde olumsuz etkisi de bulunmaktadır (Kumar, 1999).

Tanenler temel olarak yapı ve özelliklerine göre, Hidrolizlenebilir tanenler, Kondanse tanenler ve Kompleks tanenler olmak üzere 3 temel gruba ayrılmaktadır.

1.3.1. Hidrolizlenebilir Tanenler

Çekirdek merkezi olarak polioliol (genellikle D-glukoz) içeren moleküllerdir (Şekil 1.1). Bu poliollerin hidroksi grupları kısmen veya tümüyle gallik asit (\rightarrow -gallotanenler) veya elajik asit (\rightarrow -elaji tanenler) gibi fenolik gruplarla esterleşmiştir. Gallik asit ile esterleşen hidrolize olabilen tanenler gallotanenler, elajik asitle esterleşenler ise elajitanenler olarak adlandırılmaktadır. Hidrolize olabilen tanenler ve ilişkili oldukları bileşikler Şekil 1.1’ te verilmiştir. Hidrolizlenebilir tanenler oldukça toksiktir. Eğer yüksek miktarda tenen içeren bitki tüketilirse zehirlenmelere neden olacağı düşünülmektedir(Bhat, 1998).

Hidrolizlenebilir tanenler gallotanenler ve ellajitanenler olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmaktadır.



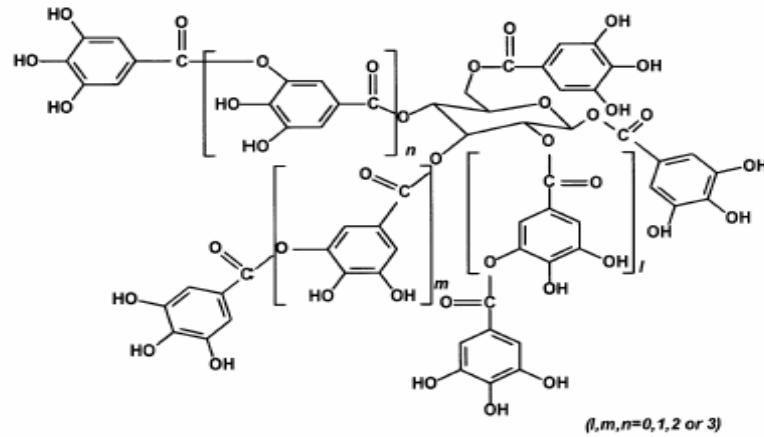
Şekil 1.1. Hidrolize olabilen tanenler ve bazı bileşenlerinin yapısal olarak karşılaştırılması. **A.** Gallotanen, **B.** Elajitanenler, **C.** Elajik asit, **D.** Hekzahidroksidifenolik asit ve **E.** Gallik asit (Belmares ve ark.,2004).

Gallotanenler gallik asit ve glukozun esterlerinden oluşmuştur. Gallotanenler, monomerik ürünler içinde belli enzimler, bazlar ve asitler tarafından kolayca hidrolize edilirler (Mingshu ve ark., 2006). Gallotanenlerin en bilineni Tannik asit (TA)'tir.

Tannik asit, gallotanenlerin ticari formu olup, gerçek bir asit değildir. Tannik asitin yapısı temel olarak gallik asitin glukoz esterlerine dayanmaktadır. Mazılarda, bitkilerin meyve veya kabuklarında bulunmaktadır. Bitkilerin sekonder metabolizmasından üretilmektedir (Andrade, 2005).

Tannik asit, organizma için çeşitli toksik özelliğine sahiptir. Tannik asit, tripsin ile α -amilazların sindirimdeki aktivitesini, substratlarla kompleks teşkil ederek önlerler veya onlara bağlanarak protein ve nişasta sindirimini aksamasına yol açarlar. Tanenler vitamin B ile de kompleks oluşturarak emilimini önlerler .

Tannik asitin büyük miktarı tüketilir veya kan dolaşımına injekte edilirse hayvanlara zararlı olduğu rapor edilmiştir (Khan ve ark., 2000; Makkar ve ark., 1988). Ancak tannik asitin insan sağlığına çeşitli yararlı etkileri de vardır. Antimutajenik, antikanser ve antioksidan özelliklerine sahiptir (Srivastava, 2000; Nakamura ve ark., 2003). Bununla birlikte sıçanlarda insülin ile indüklenen lipojenez (yağ oluşumu) baskılar (Ong, 1995), mevcut kolesterolü ve trigliseridleri düşürmektedir (Yugarani, 1992; Zhu ve Filippich, 1995). Ayrıca tannik asit zehirlenmede kimyasal panzehirlere, içilen suya ve besine ilave edildiğinde deride veya organlarda tümörüjenliği azaltmasının yanında lokal kan durdurucu ilaçlarda kullanılmaktadır (Khan ve ark., 2000; Bravo, 1994).

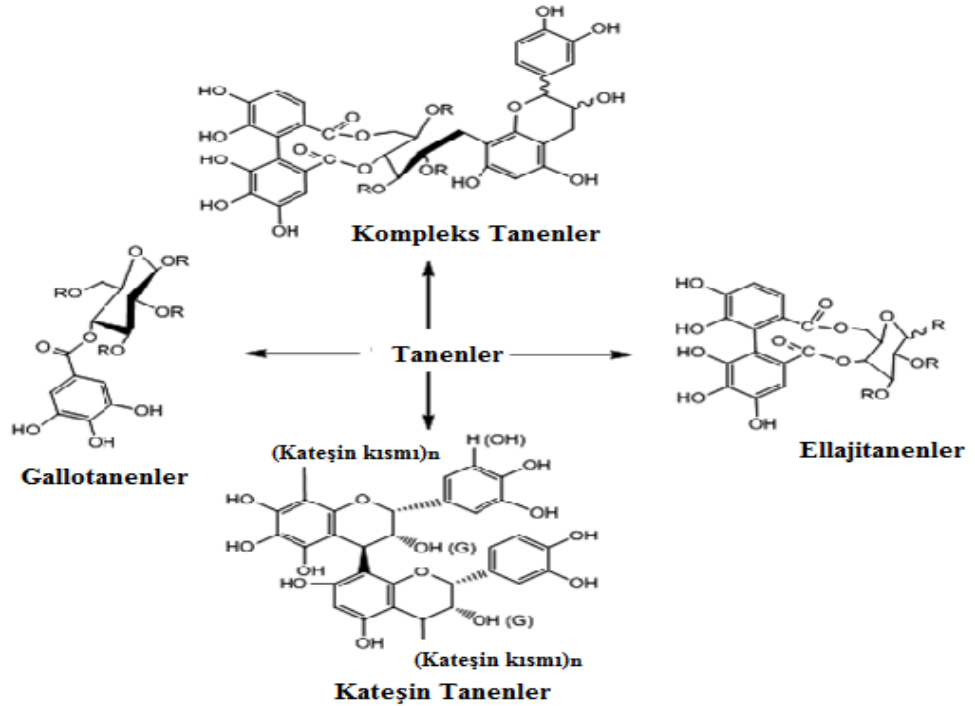


Şekil 1.2. Tannik asitin kimyasal yapısı (Nakamura, 2003).

Tannik asit çoğunlukla endüstriyel, gıda katkısı ve tıp ürünlerinde ham madde olarak farmasötik endüstride kullanılmaktadır. Şarap, bira endüstrisinde berraklaştırıcı; et, şeker ve fırında pişen gıdalarda ise tat veren ajan olarak yararlanılmaktadır (Khan, 2000). Ayrıca gallik asit üretimi, deri tabaklama, kereste boyacılığı, endüstriyel atıkları arıtma ve mürekkep endüstrisinde de kullanılmaktadır.

Ellajitanenler, ellajik asit ve glukozun esterlerinden oluşmuştur. Ellajitanenler kolayca hidrolizlenmezler. Çünkü C-C bağları içeren kompleks bir yapıya sahiptirler (Şekil 1.3).

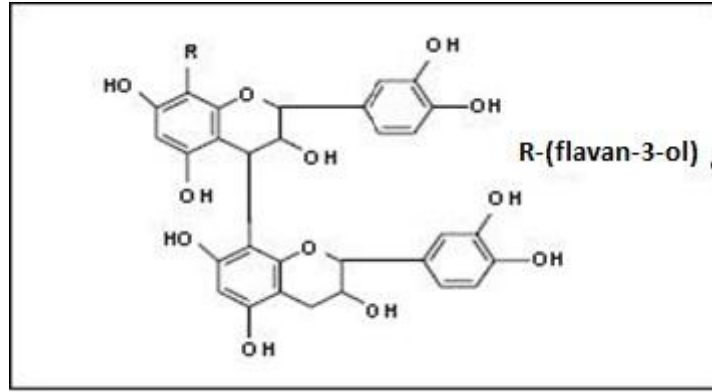
Ellajitanenler moleküler ağırlığı 300 ve 20.000 Da, amorf, zayıf asidik özelliğinin yanı sıra acı bir tada sahip hücre vakuolleri ve sitoplazmada bulunduğu düşünülen sekonder metabolitlerdir (Khadem ve Marles, 2010). Hekzahidroksidifenolik asitin bir birimden oluşan ve özellikle iki gallol kısmının oksidatif çifti ile gallotanenlerden oluşmaktadır. Ellajitanenlerin bitki fizyolojisinde önemli görevleri bulunmaktadır. Özellikle bitkiyi mikrobiyal çürümelere karşı koruyucu özelliğe sahiptirler. Bu yüzden mikrobiyal büyümeyi inhibe etmektedir (Haslam, 1996).



Şekil 1.3. Tanenlerin genel sınıflandırılması (Khanbabaee and van Ree, 2001).

1.3.2. Kondanse Tanenler

Kondanse tanenler “Proantosiyanidinler” olarak bilinirler. Bu sınıfa ait tanenlerle, hidrolize olabilen tanenlerden arasındaki en önemli fark, şeker içeren bir kısma sahip olmamalarıdır (Albertse, 2002). Kondanse tanenler, hidrolize karşı dirençli karbon-karbon bağlarıyla bağlanmış flavonoit birimlerinin (yani flavan-3-ol) oligomerleri veya polimerleridir (Şekil 1.4). Proantosiyanidin polimerleri karmaşık yapıya sahiptirler. Proantosiyanidinler, sıkıştırılmış kimyasal yapılarından dolayı sıklıkla **kondanse tanenler** olarak adlandırılır. Hidrolize olabilen tanenlerin ve kondanse tanenlerin özelliklerini birleştiren bir ara tanen grubu daha vardır. Bu tanen sınıfı “**kateşin tanenler**” olarak adlandırılmaktadır (Graham,1992).



Şekil 1.4. Kondanse tanenler (Proantosiyanidin) (Albertse, 2002).

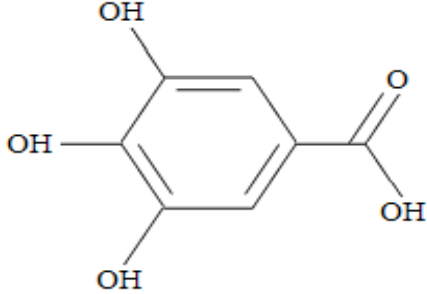
1.3.3. Kompleks Tanenler

Hidrolize tanenler ve kondanse tanenlerin özelliklerini ortak paylaşan kompleks tanenler ara bir gruptur. Bir gallotanen veya ellajitanen birimine glikozit bağıyla bağlanmış epikateşin veya kateşin birimlerinden oluşmaktadır (Mingshu, 2006; Haslam ve Tanner, 1970).

1.4. Gallik asit

Gallik asit (3,4,5- trihidroksi benzoik asit, $C_6H_2(OH)_3COOH$), doğal olarak polihidroksifenolik bileşenlerden meydana gelen renksiz kristal halinde bir organik asittir. Aynı molekül içinde hidroksil ve bir karboksil grup olmak üzere iki fonksiyonel gruba sahiptir.

Tannaz enzimi ile birlikte tannik asitin hidrolizi veya sülfirik asit ile birlikte tannik asitin hidroliz sonucu elde edilebilir. Enzimatik sentez, az enerji kullanımı ve saf üretimden dolayı tercih edilmektedir (Banerjee, 2004).

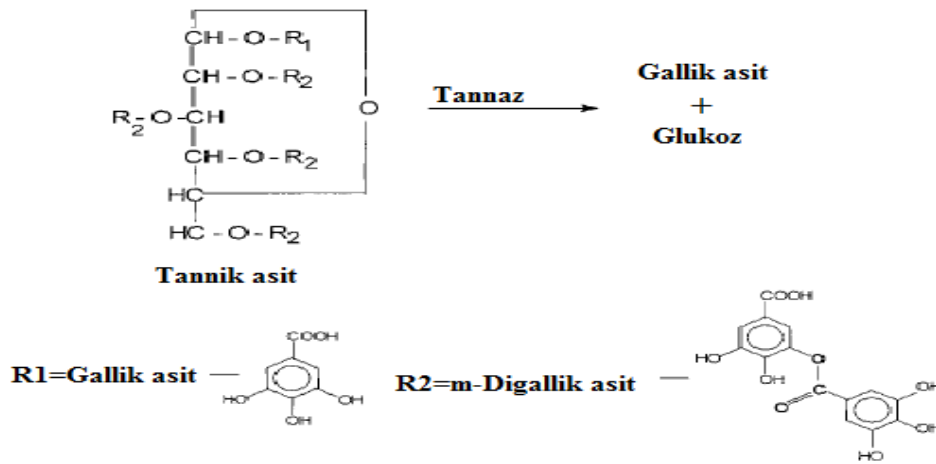


Şekil 1.5. Gallik asit (Bhat, 1998).

Gallik asit farmasötik, kozmetik, gıda ve kimyasal endüstrisinde kullanılmaktadır. Gallik asit, özellikle sülfonamid ile birlikte bir anti bakteriyel ajan olan trimethoprim (TMP) üretiminde farmasötik endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca anti kanser, anti mikrobiyal, anti mutajenik ve anti enflamatuar (iltihap sökücü) gibi terapötik (tedavi edici) özelliklere sahiptir (Soong ve Barlow, 2006). Yağlar, sıvı yağ ve içeceklerde antioksidan olarak kullanılan propil gallat gibi gallik asit esterlerin enzimatik sentezinde gallik asit kullanılır. Fotoğraf geliştirici (film banyosu ilacı), saç, deri ve kürk boyamada kullanılan pirogallolun imalatında kullanılır. Ayrıca mürekkep, boya, rengi geliştiriciler ve yarı iletken fotosensitik (ışığa duyarlı) reçine üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır (Mondal ve Pati, 2000; Kar ve Banerjee, 2000).

1.5. Tannaz

Genellikle Tannaz olarak bilinen Tanen Açıl Hidrolaz (E.C. 3.1.1.20), Teighem (1867) tarafından keşfedilmiştir. Hidroliz olabilen tanenlerin özellikle de gallotanenlerin glukoz ve gallik asite ayrıştırılmasından sorumlu önemli bir endüstriyel enzimdir. Bu enzim tannik asit gibi hidrolizlenebilir taninlerde ester (bir alkol kısmının gallol esteri) ve depsit bağlarının (gallik asitin gallol esteri) hidrolizini katalizlemektedir (Yu ve ark., 2004). Böylece glukoz ve gallik asiti serbest hale geçirir. Gallik asit, pyragallol ve gallik asit esterlerinin üretimi için sentetik bir ara üründür (Şekil 1.6) (Lekha ve Lonsane, 1997; Sharma, 2000).



Şekil 1.6. Tannik asidin yapısı ve tannazın hidrolitik ürünleri (Gallik asit ve Glukoz).

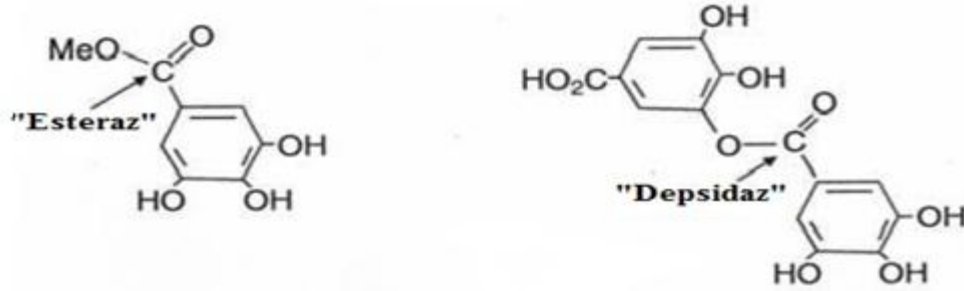
Tannaz, asit bileşeninde bulunan en az iki OH fenolik grubunu içeren substratları hidrolize etmektedir. Esterleşmiş COOH grubu, okside olmuş benzen halkası üzerinde olmalı ve OH grubunun biri benzen halkası üzerinde olmamalıdır (Lekha ve Lonsane, 1997).

Tannaz enzimi gıda, içecek, bira, kozmetik, ilaç ve kimya endüstrilerinde propil gallat, pirogallolun, trimetoprim ve fotosentetik resin gibi maddelerin üretimi için kullanılmaktadır. Ayrıca hazır çay, kahve, bira ve meyve sularının berraklaştırılması, üzüm şarabının stabilizasyonu ve besinlerin detannafikasyonu gibi amaçlarla gıda endüstrisinde ve tanen bakımından çok kirli atıklardan tanenin temizlenmesi amacıyla deri endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Pinto ve ark. 2006; Aguilar ve Gutierrez-Sanchez, 2001a; Aguilar ve ark., 2007; Lekha ve Lonsane, 1997).

Tannaz bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmada bol bulunan bir enzimdir. İndüklenebilir bir enzim olduğundan tannik asit veya metil gallat, etil gallat, n-propilgallat, m- digallik asit gibi substratların varlığında sadece üretilmektedir (Belmares, 2004; Lekha ve Lonsane, 1997). Hem membrana (hücre zarı) bağlı hem de fermantasyon tipine dayalı hücre dışı enzim (ekstrasellüler) üretimi bilinmektedir (Lekha ve Lonsane et al., 1997). Enzimi elde etmek için en önemli kaynak mikroorganizmalardır (Saxena, 2004; Vaquero, 2004). Çünkü üretilen enzim, diğer kaynaklardan üretilenlere göre daha stabil ve katalitik aktivitesi daha

yüksektir (Bhat, 1998). Bu güne kadar yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak küfler kullanılmıştır (Yılmaz ve ark., 2001, Aguilar ve ark., 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu enzimin bazı bakterilerde de bulunduğu ortaya konmuştur (Osawa ve ark., 2000). Laktik asit bakterilerindeki enzimatik özellik bitki materyallerinin fermentasyonla ilişkili olduğundan ekolojik bir avantaja sahiptir.

Tannaz (tanen açıl hidrolaz, EC. 3.1.1.20), tannik asit gibi hidrolizlenebilir tanenlerde depsit (fenolik benzoik asitten oluşan moleküler içi esterlerin herhangi bir sınıfıdır) ve ester bağlarının hidrolizini katalizler (Şekil 1.7). Hidroliz ürünleri gallik asit ve glukozdur. Gallik asit, içeceklerin yanı sıra yağlarda da çoğunlukla antioksidan olarak faydalanan propilgallatın sentezinde kullanılmaktadır.



I. Metilgallat

II. m- digallik asit

Şekil 1.7. Tannazın depsidaz ve esteraz aktivitesi (Banerjee,2004).

1.5.1. Tannazın Kaynakları

1.5.1.1 Bitkiler

Kara halile (*Terminalia chebula*) meyvesi, *Caesalpinia coriariave* *Anogeissus latifolia* gibi bitkilerin yapraklarının çoğu hidrolizlenebilir tanence veya kondanse tanence zengin *Cassia auriculat*, akasya (*Acacia arabica*), sinameki (*Cassia fistula*) gibi ağaç kabukları da tannaz kaynağına birer örnektir. Hidrolizlenebilir ve kondanse tanenler benzer bitkide üretilebilir, fakat genellikle dokularda yayılma göstermektedirler (Lekha ve Lonsane, 1997).

1.5.1.2 Hayvanlar

Sığırların rumen (işkembe) mukozasında tannaz düşük seviyede bulunmuştur. Tannazın ayrıca sığır rumeninin (işkembe) mukoza zarından ve ince bağırsaktan elde edildiği bildirilmiştir (Lekha ve Lonsane, 1997).

1.5.1.3 Mikroorganizmalar

Çoğu enzim hayvan ve bitkilerden elde edilmesine rağmen, mikroorganizmaların biyokimyasal çeşitliliği, ekonomik ve teknik avantajlarından dolayı endüstriyel enzimlerin üretimi açısından en önemli kaynaktır. Mikrobiyal enzimler, ayrıca bitki ve hayvanlardan elde edilen analog proteinlerden daha stabil olduğu bilinmektedir. Buna ilave olarak mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilere göre daha kolay genetik manipülasyona uğrarlar. Mikroorganizmaların bir başka avantajı ise fermentasyon ile kısa zamanda yüksek miktarda enzim üretebilmeleridir (Belur ve Mugeraya., 2011).

Mikroorganizmaların gelişmesini inhibe eden tanenlerin, biyodegradasyona ve mikrobiyal saldırılara karşı dirençli olduğu bilinmektedir. Bunların antimikrobiyal özelliklerine rağmen çoğu filamentli fungi, bakteri ve mayalar tanenlere karşı dirençli ve onların üzerinde gelişebilirler (Öztürk, 2006). Tannaz üreten mikroorganizmalar Çizelge 1.1' de gösterilmiştir.

Genel olarak tannaz üretimi küfler kullanılarak yapılmaktadır. Tannaz enziminin mikrobiyal yol ile üretimi mikroorganizmaların, yüksek spesifik üreme hızına sahip olmaları, genetik uygulamalarının daha basit ve daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi gibi nedenlerden dolayı bitkisel ve hayvansal kaynaklara göre daha fazla tercih edilmektedir. Ayrıca mikrobiyal tannazın, diğer kaynaklardan olan (bitkiler veya hayvanlar) tannazdan daha kararlı olduğu saptanmıştır (Purohit ve ark., 2006). Tannaz enzimi farklı tanen substratlarına karşı eşit ölçüde aktivite göstermez. Fungal tannazlar hidrolizlenebilir tanenlerin farklı tiplerini etkili bir şekilde degrade edebilirler. Bakteriyel tannazlar tannik asit veya kestane ve meşe tanenleri gibi doğal tanenleri, Maya tannazlar ise tannik asiti degrade etmesine rağmen, doğal tanenleri zayıf bir şekilde parçalayabilirler (Bhat, 1998).

Çizelge 1.1. Tannaz enziminin mikrobiyal kaynakları (Aguilar, 2007; Belur ve Mugeraya, 2011).

Bakteriler	Kaynaklar
<i>Lactobacillus murinus</i>	Nishitani, (2004)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Goel, (2005)
<i>Weissalla paramesenteroides</i>	Kostinek, (2007)
<i>Leuconostoc fallax</i>	Kostinek, (2007)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Kostinek, (2007)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Nishitani, (2004)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Nishitani, (2004)
<i>Streptococcus bovis</i>	Belmares, (2004)
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Sasaki, (2005)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ayed&Hamdi (2002);Kostinek, (2007), Nishitani & Osawa (2004)
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	Nishitani, (2004)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Nishitani, (2004); Kwon, (2008)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sabu, (2006)
Mayalar	
<i>Candida sp.</i>	Aoki, (1976)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zhong, (2004)
<i>Pichia sp.</i>	Deschamps & Lebeault, (1984)
Küfler	
<i>Aspergillus niger</i>	Bradoo, (1996); Rana ve Bhat (2005); Cruz-Hernandez, (2006)
<i>Aspergillus fischeri</i>	Bajpai ve Patil (1997)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Yamada, (1968); Batra ve Saxena (2005) Bradoo, (1996)
<i>Penicillium citrinium</i>	Bradoo, (1996)
<i>Penicillium notatum</i>	Ganga, (1977)
<i>Penicillium islandicum</i>	Ganga, (1977)

1.5.2. Tannaz Enziminin Fizikokimyasal Özellikleri

1.5.2.1. Optimum pH ve Stabilitesi

Tannaz genellikle optimum pH 5-6 değerleri arasında bir asidik protein olarak bilinir. Fakat Libuchi et al. (1968)' e göre; *Aspergillus oryzae* türünden elde edilen tannazın 12 saatte pH 3-7.5 ve 25 saatlik sürede ise pH 4.5-6 değerleri

arasında stabil kaldığını göstermiştir. Ayrıca reaksiyonun optimum pH 5.5 olduğu kabul edilmiştir (Öztürk, 2006).

Esteraz ve depsidaz aktivitelerini içeren *Aspergillus niger* LCF 8 izolatından elde edilen tannazın (esteraz+depsidaz) pH 5.0-6.0 değerleri arasında olduğu Barthomeuf (1994) tarafından belirtilmiştir. Benzer şekilde, Lekha ve Lonsane. (1994) tarafından *A. niger* PKL 104 izolatın batık, yüzey ve katı hal kültür fermentasyon çalışılmıştır. Optimum pH değeri, ekstrasellüler tannaz için 5.5, intrasellüler için ise 5.0 olarak belirlenmiştir.

Aspergillus aculeatus DBF 9 izolatından elde edilen tannaz enziminin optimum aktivitesi pH 5.0 ve stabilitesi pH 4-6 değerleri arasında bulunmuştur (Banerjee, 2001).

Aspergillus fumigatus, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium crustosum* ve *Penicillium restrictum* türlerinde de optimum tannaz aktivitesi pH 5.0 olarak belirlenmiştir. Fakat *Aspergillus caespitosum*, *Penicillium variable*, *Penicillium crustosum* türlerinde ise optimum pH 6.0 değerinde bulunmuştur (Batra ve Saxena, 2005).

Depolanmış zeytin salamurasından izole edilmiş *Lactobacillus plantarum* ile tannaz üretimi pH 6.0'da gerçekleştirilmiş ve en yüksek tannaz aktivitesi 6.0 U/ml olarak tespit edilmiştir (Ayed ve Hamdi, 2002).

Bacillus pumilus, *Bacillus polymyxa*, *Corynebacterium* sp. and *Klebsiella pneumonia* türlerinde Deschamps (1983) tarafından yapılan çalışmaya göre ise hücre dışı (ekstra sellüler) tannaz pH 5.5 değerinde optimum aktivite göstermiştir.

Bacillus licheniformis KBR 6 izolatının batık kültür fermentasyonu ile yapılan çalışmada pH 3.5-6 değerleri arasında aktivite göstermiştir. Fakat optimum enzim aktivitesi pH 5.75 olarak belirlenmiştir (Mondal ve Pati., 2000).

Aoki, (1976) tarafından yapılan çalışmada, *Candida* sp. K-1 izolatının optimum tannaz aktivitesi pH 6.0 değeri arasında bulunduğunu göstermiştir (Öztürk, 2006).

Rodriguez (2008a) tarafından yapılan çalışmada ise, *Lactobacillus plantarum* izolatının tannaz aktivitesi yaklaşık olarak pH 5.0-5.5 değeri arasında bulunduğunu göstermiştir.

1.5.2.2. Optimum Sıcaklık ve Stabilitesi

Libuchi ve ark. (1968) çalışmalarında *Aspergillus oryzae* izolatının optimum tannaz aktivite sıcaklığının 30-40⁰ C değerleri arasında olduğunu ve 30⁰C altında da enzimin stabil kaldığını belirtmiştir.

Aspergillus niger LCF 8 izolatından elde edilen tannaz aktivitesi optimum sıcaklığı 35⁰ C ve 50⁰ C altında stabil olduğu Barthomeuf(1994) tarafından yapılan çalışmayla belirlenmiştir.

Lekha ve Lonsane (1994) tarafından yapılan çalışmaya göre, *Aspergillus niger* PKL 104 türünden hücre içi tannaz 70⁰ C ve hücre dışı tannaz optimum 60⁰ C' de aktivite göstermiştir.

Aspergillus aculeatus DBF 9 izolatının optimum tannaz aktivitesinin 50-60⁰ C arası değerinde olduğu saptanmıştır (Banerjee ve ark., 2001).

Batra ve Saxena (2005) tarafından yapılan çalışmaya göre *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus* ve *Penicillium variable* türlerinde optimum sıcaklık 60⁰ C' de tannaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Ayrıca *Aspergillus caespitosum*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium charlesii* izolatlarında optimum sıcaklık 40⁰ C olarak saptanmıştır.

Bacillus licheniformis KBR 6 izolatı tarafından üretilen hücre dışı tannaz 20⁰ C ile 70⁰ C arasında aktive göstermiş. Ancak optimum aktivite 60⁰ C' de bulunmuştur (Mondal ve Pati., 2000).

L. plantarum CECT 748^T izolatı tarafından hücre dışı tannaz yaklaşık 30⁰C sıcaklığında optimum aktivite vermiştir (Rodriguez ve ark., 2008a).

1.5.2.3. Moleküler kütlesi

Proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılan SDS-PAGE yöntemi elektrik akımı etkisiyle proteinlerin büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan ortam akrilamid ve N-N'-metilen bis-

akrilamid monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan jel matriksidir. Poliakrilamid jel matriksi farklı büyüklükte kanallar (porlar) içermesinden dolayı denatüre protein karışımı jele yüklenip elektroforez uygulandığında, proteinlerin bu kanallardan geçiş hızı tamamen büyüklüklerine bağlıdır. Küçükproteinler jelde hızlı, büyük proteinler ise yavaş ilerler.

SDS-PAGE yöntemi ile ayrılmak istenilen proteinlerin sadece büyüklüklerine göre ayrımını sağlamak için önce denatüre edilmeleri ve sonra Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile muamele edilmeleri gereklidir. SDS anyonik bir deterjan olup, proteinlere bağlanıp negatif yüklü hale getirerek lineer forma dönüşmelerini sağlar. SDS sayesinde negatif yük ile yüklenen proteinler elektroforez sırasında anoda geçederler. Elektroforez işlemi tamamlandığında farklı büyüklükteki proteinler jel boyunca ilerlerken ayrılarak farklı protein zonları halinde odaklanırlar. SDS-PAGE işleminden sonra jeldeki protein bantlarının görüntülenmesi için Coomassie Brilliant Mavisi (Coomassie Brilliant Blue, CBB) kullanılmaktadır. Akrilamid ve bisakrilamid oranı jelin ayrıştırma kapasitesini belirlemektedir. Boyutları ayarlanabilen gözenekli yapıları nedeniyle proteinleri molekül ağırlıkları veya kütleleri ile orantılı olarak moleküllerin göçünü yavaşlatan bir “moleküler elek” olarak davranır. Bu nedenle ayırım hem moleküler eleme hem de elektroforetik mobilite temeline dayanmaktadır. Düşük derişimde hazırlanan jellerin gözenekleri daha büyük olup, büyük molekül ağırlıklı biyomoleküllerin ayırımında kullanılmaktadır (Coşkun-Arı, 2003a).

Tannaz mikroorganizmanın türüne göre 186 kDa ve 300 kDa arasında değişkenlik gösteren yüksek moleküler ağırlığa sahip bir proteindir. Barthomeuf (1994) göre *Aspergillus niger* LCF 8 izolatından elde edilen tannaz, %43' ünü şeker içeren 186 kDa büyüklüğünde bir glikoproteindir.

A. niger MTCC 2425 izolatu 102 veya 83 kDa moleküler ağırlığında iki polipeptitten oluşan saflaştırılmış tannaz proteinin toplamda moleküler ağırlığı yaklaşık 185 KDa civarında olduğu bildirilmiştir (Bhardwaj, 2003).

Hatamoto, (1996) göre *A. oryzae* türünden izole ettiği tannazın yaklaşık moleküler kütlesi 300 KDa olduğunu bildirmişlerdir.

Candida sp. K-1 den elde edilen tannazın toplam moleküler ağırlığı 250 kDa olarak bulunmuştur (Aoki *et al.*, 1976).

Lactobacillus plantarum CECT 748^T izolatından elde edilen saflaştırılmış tannazın karakterizasyonu yapılan SDS-PAGE sonucu moleküler ağırlıkları 186-300 kDa değerleri aralığında olduğu gözlemlenmiştir (Rodriguez ve ark., 2008a).

Lactobacillus plantarum ATCC 14917^T izolatından elde edilen tannaz karakterizasyonunda, SDS-PAGE sonucu yaklaşık olarak 50 kDa büyüklüğünde bulunmuştur (Iwamoto ve ark., 2008)

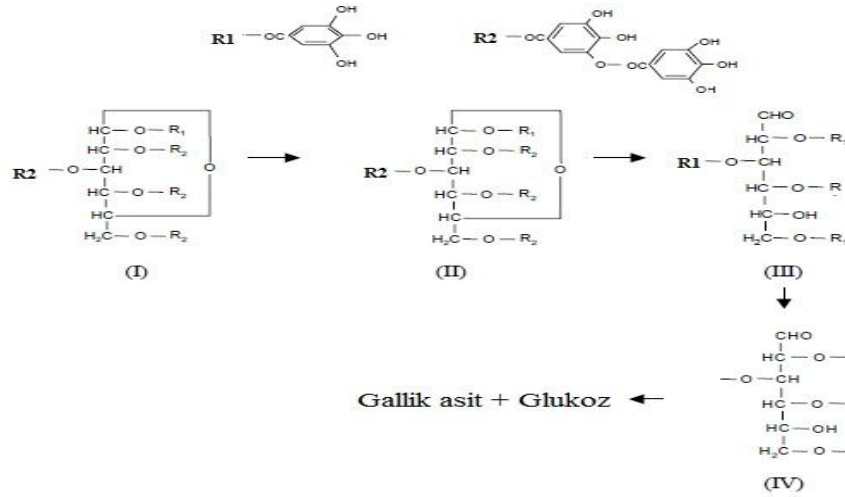
Gonçalves ve ark. (2011) *Emericella nidulans* türünden elde edilen tannazın moleküler ağırlığını % 12'lik jel SDS-PAGE ile iki bant 45.8 ve 52 kDa arasında gözlemlenmişler ve jel filtrasyonla saflaştırılan tannazın moleküler ağırlığı ise 302 kDa aralığında elde etmişlerdir.

1.5.3. Tannaz ile Katalizlenen Reaksiyon

Tannaz ile tannik asit gallik asit ve glukoz enzimatik dönüşümü çalışılmıştır. Birinci aşamada, tannik asiti glukoz ve gallik asite hidrolizleyen tannazın esas miktarını veya temel düzeyini üretmektedir. Glukoz glikoliz yoluyla sitrik asit döngüsüne katıldığından gallik asitten daha hızlı metabolize olmaktadır (Lagemaat ve Pyle, 2005). Glikoz bir katabolik indükleyici (başlatıcı) olarak görev yaptığı için ilk üreme ortamında glukozun küçük miktarlarda ilavesi üretim hızını arttırabileceğinden bahsetmişlerdir. Mikroorganizmalar gallik asiti parçalayabilir ve enerji üretimi için sitrik asit döngüsünde onu kullanabilmektedirler. İkinci aşamada ise üretilen gallik asit ve glukoz biyokütlenin oluşumu için kullanılmaktadır. Üçüncü aşamada ise reaksiyonu katalizleyen tannaz sentezlenmektedir (Şekil 1.8).

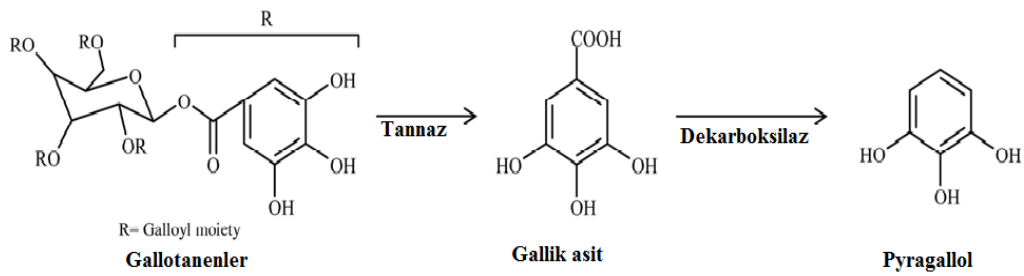
Lekha ve Lonsane (1997) *Aspergillus oryzae* türünden izole edilen tannazın hidrolize reaksiyon yolunu çalışmışlardır. Bu araştırmaya göre, tannik asiti (I), 2,3,4,6- tetra gallol glukoz (III) ve iki çeşit monogallol glukoz (IV) aracılığıyla tannaz enziminin tamamen gallik asit ve glukoz hidrolizlenmesini göstermektedir.

1,2,3,4,6-, pentagalloyl glukoz ve metil m- digallatin ilk üretilen depsidik gallik asitin hidrolizatında benzer ürünler tespit edilmiştir. R1 ve R2 sırasıyla gallat ve di gallattır.



Şekil 1.8. Tannik asitin tannaz tarafından hidroliz reaksiyon yolu (Albertse, 2002).

Pirogallolün yanında gallik asit ve tannaz tarafından yüksek moleküler ağırlıkta gallotanenlerin polimerizasyonu HPLC veya TLC metodu ile tespit edilmiştir. Böylece oluşan gallik asitin dekarboksilasyonu sonucu pyragallol ile birlikte gallik asit ve glukozu hidrolize olabilen tannik asitin *L. plantarum* türü tarafından biyokimyasal parçalanma reaksiyonu Şekil 1.9’ da gösterilmiştir (Kwon ve ark. 2008).



Şekil 1.9. *L. plantarum* ve *L. pentosus* türlerinde görülen tannik asitin biyodegradasyon reaksiyon yolu (Kwon ve ark.,2008)

1.5.4. Tannaz Enziminin Uygulama Alanları

Tannaz, günümüzde endüstriyel kullanımı yaygınlaşmamış birenzim olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum yüksek enzim maliyetinden ve tannaz enziminin fazla miktarda üretilmemesinden kaynaklanmaktadır (Lagemaat ve

Pyle, 2005). Tannaz son zamanlarda ürün sunuluşuna bağlı olarak farklı katalitik birimler ile **Biocon** (Hindistan), **Kikkoman** (Japonya), **ASA Specilaenznyne GmbH** (Almanya) ve **JFC GmbH**(Almanya) tarafından ticarileştirilmiştir (Belmares ve ark.,2004).

Endüstriyel uygulamalar için daha yüksek aktivitelere tannaz üretme yeteneğine sahip olan mikrobiyal suşlara dair süregelen araştırmalar devam etmektedir (Sharma , 2000).

Laktobasillus türleri, tanenleri hidrolize etmesi ve hücrede tutunmayı (adsorbsiyon) azaltmasından dolayı gıdada var olan tanenlerde çok önemli rol oynayabilir. Dahası, çevremizde tüketilen çoğu içecekler ve çaylarda farmokolojik aktivitelerle birlikte hidrolizlenebilir çeşitli tanenler içermektedir. Gıda alanında tannaz aktivitesi ile birlikte Laktobasillusun bulunması ile tanenlerin medikal özellikleri üzerine çok önemli etkisi vardır. (Osawa ve ark., 2000).

Tannazın en büyük ticari uygulaması çay ve kahvenin aromasında kullanımındır. Şarabın içinde ise kateşin ya da epikateşin olarak bulunmaktadır. Bu kompleks bileşik ise şarabın renginden sorumludur. Ancak sorun bu bileşiğin hızlı oksitlenmesidir. Şarap açılınca hızlı bir şekilde oksitlenen bu bileşik istenmeyen bir bulanıklığa neden olmaktadır. Tannaz kullanımı ile bu sorun giderilmektedir.

Deri sanayiinde kullanılan ve kullanıldığı basamaktan adını alan tanenin atıklardan temizlenmesi oldukça ucuz ve hızlı bir şekilde tannaz varlığı ile sağlanmaktadır.

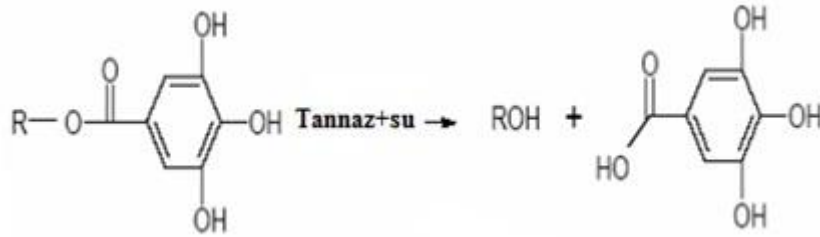
Tannaz çok yönlü bir enzim olduğu düşünülmektedir. Gıda, içecek, mayalanma, kozmetik, kimyasal ve eczacılık endüstrisi gibi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu alanlar detaylı bir şekilde başlıklar halinde açıklanmaktadır.

1.5.4.1 Hazır Çay

Tüketiciler temiz ürünleri tercih etmektedir. Buzlu çay gibi soğuk çay içeceklerin imalatında temel problem soğuk su çözünebilirliğidir. Polimerik siyah çay fenollerini, çay kreması diye adlandırılan kahverengi bir çökeltiye yol açar. Çay

40 ° C sıcaklığının altında birkaç saat kaldığı zaman çay kreması oluşmaktadır (Powell ve ark., 1993).

Kimyasal ve enzimatik metodlar, çay kremasının çözünürlüğü için kullanılmaktadır. Enzimatik metod ile bu çözünürlük problemi, siyah çay veya yeşil çayda yüksek kalite ve iyi renge dönüştürülerek çözülmektedir. Tannaz gallol gruplar arasında ester bağları ve çay yapraklarında bulunan çeşitli bileşenlerin hidrolizini katalizlemektedir (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Tannaz ile çay fenollerinin estersizleşmesi (Lekha ve Lonsane, 1997).

Bu esterden arındırma reaksiyonu, yeşil çayda gallik asit ve epikateşinin doğal düzeyini artırabilir. Ayrıca soğuk su çözünürlüğüne sahip ve çayın parlak kırmızımsı renginden sorumlu epitheaflavic asitin büyük miktarını oluşturmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997).

1.5.4.2. Şarap ve Bira Üretimi

Biranın depolanması sırasında fenolik ve diğer kimyasallar arasında kompleks oluşumdan dolayı normal rengini kaybetme ve bulanıklık oluşmaktadır. Tannaz enzimi birada bulanıklık oluşumunu azaltmak için lakkaz ile birlikte kullanılmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997).

Şarap yapımında, tanenler bulanıklığa ve gıdanın yapısında ciddi problemlere yol açar. Tannaz bu problemleri çözmede kullanılmaktadır (Belmares ve ark., 2004). Dahası, meyve sularını stabilize etmek ve berraklaştırmak için tannaz enziminden yararlanılmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997).

Şarap eskiden istenmeyen fenolikleri uzaklaştırmak için kimyasal olarak artırılırdı. Ama şimdi tannaz enzimi, şarap tadını olumlu etkileyen kafeik asit ve quinic asiti hidrolize etmek için kullanılabilir (Mondal ve ark., 2001).

Meyve suyularında da tannaz laktaz enzimi ile birlikte ürünü stabilize etmede ve berraklaştırmada kullanılmaktadır (Kwon ve ark., 2008).

1.5.4.3. Gallik Asitin Üretimi

Gallik asit ya enzimatik ya da kimyasal olarak sentezlenmesine karşın, enzimatik sentez seçici ve saflığından dolayı tercih edilmektedir. Tannaz enzimi tanen içeren maddeleri hidrolize etmek için kullanılmaktadır. Ayrıca farmasötik endüstrisinde trimethoprim ve gıda endüstrisinde propil gallatın sentezinde önemli bir substrat olarak kullanılan gallik asit üretimi için kullanılmaktadır. Çalışmalar göstermiştir ki gallik asit üretimi ve tannaz sentezi doğru orantılıdır. Tannaz fazla sentezlenirse, gallik asit üretimi de bir o kadar artar (Banerjee, 2004).

1.5.4.4. Hayvan Yem Katkısı

Hayvan yeminde birçok enzimin kullanımı son zamanlarda dikkat çekmektedir. Çünkü tanenlerin besinsel değeri olmamasına rağmen tanen içeren bitkiler gıda ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Tanenlerin proteinler ile birlikte çözünmez kompleks oluşturduğu çok iyi bilinmektedir. Tanenlerin sindirici enzimlerin yanında endojen proteinler ve beslenme ile ilgili bu oluşumu geniş getirmeyen hayvanlarda önemli bir rol oynamaktadır. Tanenler normal sindirime engel olmakla birlikte yüksek nitelikte proteinlerin vücuttan atılmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte vücuda demirin alınmasını da engellediği bilinmektedir. Tanenlerin diğer bir olumsuz etkisi ise midenin mukoza çeperine zarar vermesi, belli katyonların, proteinlerin ve temel aminoasitlerin salgıyla atılmasını içermektedir. Hayvan yeminde ve gıdada sindirilebilirliği artırmak amacıyla tanenlerin arzu edilmeyen olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için tannaz enzimi kullanılmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997).

1.5.4.5. Diğer Kullanım Alanları

Tannaz fenolik bileşikler ile kontamine olan atık suların arıtımında yararlanılabilir (Aguilar ve ark., 2001.b). Bunun yanında bitki ekstraktlarının yoğunluğunu giderme amacıyla kozmetik endüstrisinde ve yüksek derecede deri tanenlerini homojenize etmek için deri endüstrisinde kullanılmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997). Ayrıca doğal olarak meydana gelen gallik asit esterlerinin

yapılarını belirlemek için duyarlı analitik prob olarak da kullanılabilir (Seth ve Chand, 2000).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Test Mikroorganizmaları

Çalışmada, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında daha önceki çalışmalarda fermente ürünlerden izole edilen 50 laktik asit bakteri kültürü kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan test mikroorganizmaları (Çizelge 2.1) uzun süreli olarak -85°C ' de % 15' lik gliserolde, kısa süreli olarak ise $+4^{\circ}\text{C}$ ' de MRS Broth veya MRS Agar içerisinde muhafaza edilmiştir. Kullanılan bütün test mikroorganizmaları, analizlerden önce stoktan çıkarılarak canlandırılmış, saflık kontrolü yapıldıktan sonra analizlerde kullanılmıştır.

2.1.2. Besi Ortamları

2.1.2.1. MRS Broth (69962, Fluka)

Dipotasyum hidrojen fosfat	2 g
Glikoz	20 g
Magnezyum sülfat hepta hidrat	0,2 g
Mangan sülfat tetrahidrat	0,05 g
Pepton	10 g
Triammonyum sitrat	2 g
Sodyum asetat tri hidrat	5 g
Yeast ekstrakt	5 g
Beef ekstrakt	8 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak satılan besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,2\pm 0,2$ ' ye ayarlanmış, 1 ml Tween[®]80 eklenmiş ve 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.2. MRS Agar (Lactobacillus Agar acc. to DEMAN, ROGOSA and SHARPE) (1.10660, Merck)

Di amonyum hidrojen sitrat	2 g
Di potasyum hidrojen fosfat	2 g
Glikoz	20 g
Magnezyum sülfat heptahidrat	0,2 g
Mangan sülfat tetra hidrat	0,05 g
Pepton	10 g
Beef ekstrakt	8 g
Sodyum asetat tri hidrat	5 g
Yeast ekstrakt	4 g
Tween ® 80	1 ml
Agar	14 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak satılan besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 5,4 ± 0,2' ye ayarlanmış ve 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.3. Brain Heart Infusion Agar (53286, Sigma)

Sığır kalbi	5 g
Dana beyini	12,5 g
Di sodyum hidrojen fosfat	2,5 g
Glikoz (D+)	2 g
Pepton	10 g
Sodyum klorür	5 g
Agar	7 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak satılan besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $7,4 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmış ve 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.4. Brain Heart Infusion Broth (Merck, 1104930500)

Sığır kalbi	5 g
Dana beyini	12,5 g
Di sodyum hidrojen fosfat	2,5 g
Glikoz (D+)	2 g
Pepton	10 g
Sodyum klorür	5 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak satılan besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $7,4 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmış ve 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.2.5. % 2 Tannik Asit İlaveli Brain Heart Infusion Agar

Daha önce içeriği verilmiş olan brain heart infusion agar steril edildikten sonra % 2 tannik asit olacak şekilde filtre edilerek besiyerine ilave edilmiştir.

2.1.2.6. Substrat Besiyeri

20 mM Metil Gallat	0,368 g
33 mM Sodyum fosfat (NaH_2PO_4)	0,396 g
Distile su	100 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 5.0'e ayarlanmış ve 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Boyalar

2.1.3.1. Kristal violet

Kristal violet	2,0 g
Etil alkol (%95)	20 ml
Amonyum Oksalat	0,2 g

Distile su	20 ml
------------	-------

Kristal violet 10 ml etil alkol içerisinde çözüldükten sonra üzerine ayrı bir erlende 20 ml distile su içerisinde çözülmüş olan amonyum oksalat eklenmiştir. Karışım filtereden geçirilerek kullanılmıştır (Speck ve ark., 1976).

2.1.3.2. Safranin

Safranin	0,25 g
Etil alkol (%95)	10 ml
Distile su	100 ml

Safranin alkol içerisinde çözüldükten sonra distile su ilave edilmiş ve 24 saat sonrasında çözelti filtre kağıdından geçirilerek süzülmüştür (Çotuk ve Anđ-Küçüker, 1992).

2.1.3.3. Lügol

İyot	5 g
Potasyum iyodür (KI)	10 g
Distile su	100 ml

Potasyum iyodür 20-30 ml distile suda çözülmüş ve üzerine iyot eklenmiştir. Ardından çözelti distile su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır (Çotuk ve Anđ-Küçüker, 1992).

2.1.4. Kullanılan Çözeltiler

2.1.4.1. Fizyolojik tuzlu su

Sodyum klorür	85 g
Distile su	1000 ml

Fizyolojik tuzlu su çözeltisi sodyum klorür distile su içerisinde çözümlenerek kullanılmıştır.

2.1.4.2. % 15' lik gliserol çözeltisi

Gliserol	15 ml
Distile su	85 ml

Gliserol ve distile su karıştırılıp 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.4.3. 33 mM' lık Sodyum Fosfat Tamponu

Sodyum fosfat (NaH_2PO_4)	0,396 g
Distile su	100 ml

Sodyum fosfat (NaH_2PO_4) distile suda çözüldükten sonra pH 5.0' e ayarlanmıştır.

2.1.4.4. Doymun NaHCO_3 solüsyonu

1000 ml su içine çözünme gerçekleşmeyinceye kadar NaHCO_3 eklenir. Daha sonra pH 8.6' ya ayarlanarak hazırlanır.

2.1.4.5. 5 mM' lık metil gallat çözeltisi

Metil gallat	0,092 g
Fosfat tamponu	100 ml

5 mM' lık Metil gallat, 33 mM' lık Fosfat tamponu (pH 5.0) içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözümlenerek kullanılmıştır.

2.1.4.6. İyot Solüsyonu Sprayinin Hazırlanması (TLC plaka sprayleme)

İyot	0,5 gr
%95 Ethanol	100 ml

2.1.4.7. 33 mM' lık Amonyum asetat tamponu

Amonyum asetat buffer	0,2543 g
Distile su	100 ml

Amonyum asetat distile suda çözüldükten sonra pH 5,6' ya ayarlanmıştır.

2.1.4.8. Yükleme jelinin (Stacking gel) hazırlanması (%4'lük, 3ml)

Deiyonize su	2,2 ml
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	0,4 ml
1 M Tris (pH 6,8)	0,38 ml

% 10 SDS	0,03 ml
% 10 Amonyum persülfat (APS)	0,03 ml
TEMED	0,003 ml

2.1.4.9. Ayırma jelinin (Resolving gel) hazırlanması (% 12,5, 5 ml)

Deiyonize su	1,515 ml
%30Akrilamid/Bisakrilamid	2,083 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	1,3 ml
% 10 SDS	0,05 ml
% 10 Amonyum persülfat	0,05 ml
TEMED	0,002 ml

2.1.4.10. SDS-PAGE Örnek Yükleme Tamponu

0,125 M Tris	2,5 ml
%4 SDS	4 ml
%20 Gliserol	2 ml
2- Merkптоetanol	1 ml
Bromofenol Mavisi	0,02 g
Distile su	10 ml

2.1.4.11. SDS-PAGE Yürütme Tamponu (5X)

0,025 M Tris	15 g
0,192 M Glisin	72 g
%0,1 SDS	5 g
Distile su	1000 ml

2.1.4.12. SDS PAGE Boyama Solüsyonu

Metanol	500 ml
Comassic Brilliant Blue R-250	1 g

2.1.4.13. SDS-PAGE Yıkama Solüsyonu

Metanol	56,81 ml
G. asetik asit	79,56 ml
Distile su	1000 ml

2.1.4.14. SDS PAGE Saklama Solüsyonu

G. Asetik Asit	100 ml
Deiyonize su	400 ml

2.2. METOD

2.2.1. Laktik Asit Bakterileri Kültürlerinin Hazırlanması

-85°C'deki %15'lik gliserol ortamında saklanan mikroorganizmalar; hazırlanan 5 ml MRS Broth besiyerine yaklaşık 70 µl pipet yardımıyla aktarıldıktan sonra 37°C' de 24 saat inkübe edilerek canlandırılmaları sağlanmıştır.

Gelişen organizmalardan, bir öze dolusu örnek hazırlanan MRS agar katı besiyerine çizgi ekim yapılmıştır. Daha sonra ekim yapılan katı besiyeri 37 °C 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra saf olmayan izolatlardan tek düşmüş koloniler seçilip MRS agar katı besiyerine çizgi ekim yapılmıştır. İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra bu petrilere kültürlerin saflığı kontrol edilerek çalışmalarda kullanılmıştır. Saf olan kültürler çalışmada kullanılmıştır. Saf çıkmayan kültürler ise saflaştırılarak kullanılmıştır.

2.2.1.1. Gram Boyama

Christian Gram tarafından 1884 yılında geliştirilmiş differansiyel bir boyama tekniği olan genelde bakterilerin hücre çeperi geçirgenliğinin farkı kullanılarak bakterilerin gram pozitif ve gram negatif olmak üzere iki gruba ayrılmasını sağlayan Gram boyamada dört farklı kimyasal reagent kullanılmıştır.

Daha önce saflaştırma işlemleri tamamlanmış olan kültürler MRS agar petrilere çizgi ekim yapılarak tekrar aktiveştirildikten sonra boyama için 24 saatlik taze kültürler kullanılmıştır.

Gram boyamada öncelikle katı besiyerinde geliştirilmiş olan kültürden öze yardımıyla alınan kültür, bir damla distile su damlatılmış temiz bir lam yüzeyine yayılmıştır. Lam yüzeyine yayılan kültür havada kurutulduktan sonra, lam üç kez bek alevinden geçirilerek fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyondan sonra preparat ilk olarak kristal vioyet ile boyanmış ve yaklaşık 1 dakika bekletilmiştir. Preparat yüzeyinde boyanın fazlası distile su yardımıyla yıkandıktan sonra lügol çözeltisi tüm lam yüzeyine yayılmış ve 1 dakika bekletilmiştir. Fazla boya su ile giderildikten sonra preparat 10-15 saniye %96'lık etil alkole muamele edilmiştir. sonra yıkanan preparat son olarak 30 saniye süreyle safranin ile boyanmıştır ve ardından preparat yeniden yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Hazır olan preparat ışık mikroskobunda (Olympus, CHK, 3E 0357) 100' lük objektifte immersiyon yağı kullanılarak incelenmiştir. Boyama ve mikroskop incelenmesi sonucunda mor renkli görülen bakteriler gram pozitif, pembe veya kırmızı renkte olanlar ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.2.2. Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Dupont Qualicon RiboPrinter® Sistem ile Tanımlanması

Riboprinter sistemi 16S rRNA' yı temel alarak mikroorganizmaların tür tayinlerini gerçekleştiren moleküler identifikasyon sistemidir. Sistemin prensibinde 16 S rRNA' nın EcoRI enzimi ile kesilmesi ve daha sonra jelde koşturulması sonucunda oluşan bant büyüklerinin kullanılan marker ile kıyaslanarak sonuca varılmaktadır. İdentifikasyon işlemleri spesifik kitler aracılığıyla, kullanıcı talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

MRS agar ortamında geliştirilen aktif kültürlerden steril çubuk yardımıyla 2-3 koloni olacak şekilde steril şartlar altında alınmış ve içerisinde 40 µl tampon çözelti bulunan kriyo tüpüne aktarım yapılmıştır. Aktarım yapılan tüpler 5 saniye kadar vorteks ile karıştırıldıktan sonra koloni alımı ve karıştırma işlemi bir kez daha tekrar edilmiştir. Vorteksleme işlemi tamamlandıktan sonra kriyo tüpler içerisinde bulunan örnekler sistemin bir aparatı olan sekizli ependorf setine, her tüpe bir örnek konması şartı ile 30 µl miktarında aktarılmıştır. Aktarım işlemi tamamlandıktan sonra set 25 dakika süresince ısı ile muamele edilmiştir. Bu işlemin sonunda ependorf seti cihazdan çıkarılarak her tüpün içerisine 5 µl lysing A ve 5 µl lysing B ajanı eklenmiştir. Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra

ependorf seti cihaz içerisinde uygun yerine yerleştirilmiştir. Daha sonra çalışmada kullanılan enzim olan EcoRI içeren tüp çıkarılmış ve üzerine 18 µl ‘Lactic agent’ ilave edilmiştir. Enzim içeren tüp de cihaz içerisine uygun şekilde yerleştirildikten sonra sistemin çalışması için gerekli olan diğer parçalar (MP konjugat, MP prob ve MP substratdan oluşan MP ortamı; jel kaseti, jel mebranı ve ultra saf su) yerleştirilmiş ve cihaz çalışır konuma getirilmiştir. Cihazın çalıştırılmasından yaklaşık 12 saat sonra oluşan bantlar ve belirlenen türler sistem içerisinde bulunan veri tabanı ile karşılaştırılarak bakteriler identifiye edilmiştir (Dinçer, 2007).

2.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Görsel Okuma Metod ile Tannaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Ribotiplendirme tekniği ile identifiye edilen laktik asit bakterilerinin tannaz aktivitesini belirlemek için kültürler ilk önce MRS brotha veya M17 brotha ekilerek etüvde 37⁰C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra buradan alınan örnekler MRS agar ve/ veya M17 agara ekilerek inkübe edilmiştir. MRS agar üzerindeki taze kültür steril kürdan yardımı ile alınmış ve 1 ml substrat medium bulunan (pH 5, 33 mmol/l NaH₂PO₄ ve 20 mmol/l metil gallat içeren) tüp içerisine süspanse edilmiştir. Bu tüpteki bakteri yoğunluğu en az McFarland 3 (9x10⁸ hücre/ml) bulanıklık standartında olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüpler aerobik olarak 37⁰C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüplere eşit miktarda doymuş NaHCO₃ (sodyum bi karbonat) solüsyonu (pH 8.6) ilave edilerek alkalınlaşmış ve oda sıcaklığında 1 saat oda sıcaklığına maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda kahverengiden yeşil renk alan tüpler tannaz pozitif olarak kaydedilmiştir (Vaquero ve ark., 2004)

Gallik asit bir karbon kaynağı olduğu için mikroorganizmaların bir kısmı tannaz hidrolizinden sonraki basamağı katalizleyen gallik asit dekarboksilaz enzimine de sahiptir. Bu enzim, hidroliz ürünü gallik asidi pirogallale dönüştürmekte ve CO₂ açığa çıkarmaktadır (Kanberoğlu B. 2006). Gallat dekarboksilaz aktivitesini belirlemek için gecelik kültürden 50 µl alınarak 10 mM gallik asit içeren 10 ml MRS broth içerisine aktarılarak tüpler aerobik şartlarda 37⁰ C 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra doymuş NaHCO₃ solüsyonu (pH 8.6) ile eşit miktarda karıştırılarak 37⁰ C’ de 1 saat etüvde bekletilmiştir.

Besiyeri renginin kahverengiden açık bir sarıya dönüşmesi dekarboksilaz aktivitesi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (Osawa ve ark. 2000).

Maksimum tannaz aktivitesi gösteren kültürler, 5 ml MRS Broth besiyeri içeren tüplere aktararak 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her kültürden 10 µl alınarak % 2 tannik asit ve % 0.5 yeast extract ilaveli Brain Heart İnfusion Agara aşılantmıştır. İnoküle edilen petriyer etüvde 37 °C 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra koloniler etrafında açık bir zon oluşumu tannaz aktivitesi açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (Nishitani ve Osawa, 2005).

2.2.4. Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Spektrofotometre Yöntemi ile Tannaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin tannaz enzimi aktivitesi Osawa ve Nishitani, (2003) metoduna göre analiz edilmiştir.

Aspergillus ficuum türünden elde edilen standart toz ticari tannaz enzimi kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bunun için bir dizi enzim solüsyonu (0,2-1,2 Unit aralığında) standart olarak hazırlanmıştır. Bu enzim solüsyonları, 5 mM metil gallat içeren 5 ml 33 mM fosfat (NaH₂PO₄) (pH 5.0) tamponunun içerisine, her dilüsyondan ayrı ayrı 50 µl ilave edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her karışımdan 100 µl eşit hacimde doymuş NaHCO₃ (pH 8.6) solüsyonu ile karıştırılıp 37°C' de 2 saat tekrar inkübe edilmiştir. Bu karışım daha sonra vorteks cihazı ile karıştırılıp 8000 g x 20 dakika santrifüjlenerek pelet kısmı süpernatanttan ayrılmıştır. Doksan altı kuyucuklu elisa petrisine süpernatanttan her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtılarak mikroplet okuyucu cihazı yardımıyla 450 nm absorbansda okuma yapılmıştır. Okunan değerler ile standart eğriden yararlanılarak tannaz aktivitesi belirlenmiştir.

2.2.5. İnce Tabaka Kromatografisi ile Oluşan Ürünün (Pyragallol ve Gallik Asit) ve Substratın (Tannik Asit) Gözlemlenmesi

Kültür besiyerinde tannik asit, gallik asit ve piragallol, Kwon ve ark. (2008)' a göre TLC metodu ile analiz edilmiştir.

Hazırlanan 5 ml MRS Broth besiyerine ekilen izolatlar canlandırıldıktan sonra santrifüjlenmiştir (8000 g x 20 dak.). Daha sonra hücreler, % 1 tannik asit içeren 2 ml' lik 33 mM Amonyum Asetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$) tamponunda (pH 5.6) süspanse edilmiştir. Bu reaksiyon karışımı aerobik koşullarda 37°C' de 24 saat inkübe edildikten sonra santrifüj (8000 g x 20 dak.) edilerek İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) metoduyla analiz için süpernatant elde edilmiştir. Bir silika jel cam plakası (parçacık boyutu, 25 μm ; tabaka kalınlığı, 250 μm ; por çapı, 60 Å ; boy ve genişlik, 20X20 cm) üzerine reaksiyon ürünlerinden 20 μl spotlanmıştır. Cam plakalar, örneğin kuruması için 30-45 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur. Böylece beyaz renk oluşumu ile kuruma gerçekleştirilmiştir. TLC tankına Formik asit- Asetonitril -Tolüen (1:40:20) olacak şekilde organik çözücüler konarak yürütülmüş ve kuruyan plakalar tek tek ya da topluca dikey pozisyonda organik çözücülerin bulunduğu tanka yerleştirilmiştir. Sonrasında bir iyot solüsyonu (%95 ethanol içeren 100 ml' sinde 0.5 g iyot) ile plakaya spreyleme işlemi yapılmıştır. Bu işlemle birlikte plaka TLC fırınında 110°C' de 10 dakika ısıtılıp reaksiyon ürünleri gözlemlenmiştir.

2.2.6. SDS-PAGE Uygulanması

Maksimum tannaz enzimi üretme yeteneğine sahip olan mikroorganizmaların bu enzimi üretme yetenekleri SDS-PAGE yöntemi ile incelenmiştir. % 12.5 akrilamid/bisakrilamid derişimine sahip ayırma jelinde 1000 ve 1,2 U derişimlerine sahip tannaz enzimi (Sigma, 42395) ile kıyaslanmıştır. Elde edilen protein profilinin boyut analizi geniş aralıklı protein marker (Sigma, M4038) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İşlem süresince aşağıdaki işlem basamakları uygulanmıştır (Rodriguez ve ark. 2008a);

1. İki adet jel camı distile su yardımıyla yıkanıp kurutulduktan sonra, jel kasetine yerleştirilerek jel dökme tablasına tutturulmuştur. Daha sonra 5 ml %12,5' luk ayırma jeli (separating gel) hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek cam plakalar arasına pipetlenmiştir. Jelin üst sınırı düzgün olacak şekilde cam plakaların arasına son hizasına kadar izopropanol pipetlenerek, jelin polimerleşmesi beklenmiştir. Ayırma jelinin polimerleşmesinin sonrasında üstteki

izopropanol distile su ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve Whatman kurutma kağıdı ile kurulanmıştır.

2. 3 ml %4' lük yığıma jel (stacking gel) pipetleme işlemi ile cam plakaların arasına en üst seviyeye kadar dökülmesinin ardından, iki cam arasına örneklerin yüklenmesi için kuyucukları oluşturacak biçimde tarak yerleştirilmiştir.

3. Polimerleşmenin ardından jel kaseti elektroforez tankına yerleştirilip, hazırlanan 1×Yürütme tamponu anot-katot boşluklarına döküldükten sonra tarak dikkatlice çıkartılmıştır.

4. Her örnek 100⁰C'de 5 dakika kaynatıldıktan sonra jeldeki kuyulara 30 µl örnek (toplam protein derişimi 2-10 mg/ml) ve 10 µl hacimde olacak şekilde sample buffer yüklenmiştir. Elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak yükleme (stacking gel) jeli boyunca 90 V ile ayırma jelinde ise 120 volt'ta 2 saat boyunca yürütülmüştür.

5. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra bir gece boyunca hafif çalkalamalı olarak boyama solüsyonu ile muamele edilmiştir. Fazla boya yıkama solüsyonu ile uzaklaştırılmıştır ve elde edilen SDS-PAGE jeli UVtech illustration jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

2.2.7. Tannaz Aktivitesi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

Yüksek tannaz aktivitesine sahip izolatlar (A4, DS1, A6, DZ2, MT4) bu çalışmalara alınmıştır. Öncelikle kültürler santrifüjlenip (8000 g x 20 dakika) süpernatant kısmı kullanılmıştır. Planlanan çalışmada farklı pH değerlerinde (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), farklı inkübasyon sıcaklığında (4, 25, 30, 37, 40, 45 ve 55 °C) ve farklı substrat konsantrasyonları (1.75, 3.5, 7, 14 ve 28 mM), 33 mM NaH₂PO₄ tamponunda hazırlanarak en yüksek tannaz aktivitesinin elde edildiği kültürel koşullar belirlenmiştir.

2.2.7.1. Optimum Sıcaklık

Laktik asit bakteri izolatlarından elde edilen hücresiz ekstraktlardan (süpernatant) alınan 50 µl, 5 ml hazırlanan 5 mM metil gallat içeren 33 mM NaH₂PO₄ (pH 5.0) tamponuna ilave edilerek farklı sıcaklıklarda 24 saat inkübe edilmiştir (4, 20, 25, 30, 37, 45, 55). İnkübe edilen bu karışımdan 100 µl alınarak

üzerine eşit hacimde doymuş NaHCO_3 (pH 8.6) çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım daha sonra farklı sıcaklıklarda (4, 20, 25, 30, 37, 45, 55) 2 saat daha inkübe edilmiştir. Sonradan bu karışım vortekslenmiş ve santrifüj (8000 g x 20 dakika) edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra 96 kuyucuklu elisa petrisine pipetlenerek absorbansı 450 nm' de dört seri okuma yapılarak değerlendirilmiştir.

2.2.7.2. Optimum pH

Tannaz enziminin optimum pH değerini belirlemek için öncelikle kültür santrifüj (8000 g x 20 dakika) edildikten sonra elde edilen süpernatantlardan 50 µl, farklı pH değerlerinde (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) hazırlanan 5 ml 5 mM metil gallat içeren 33 mM NaH_2PO_4 fosfat tamponuna ilave edilerek 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edilen bu karışımdan 100 µl alınarak üzerine eşit hacimde doymuş NaHCO_3 (pH 8.6) çözeltisi eklenmiştir. Bu karışımda 2 saat inkübe edildikten sonra vortekslenip santrifüj (8000 g x 20 dak.) edilmesi ile birlikte 96 kuyucuklu elisa petrisine 100 µl pipetlenerek absorbansı 450 nm' de dört seri okuma yapılmıştır.

2.2.7.3. Substrat Yoğunluğu

Yüksek tannaz aktivitesine sahip kültürler öncelikle santrifüjlenerek (8000 g x 20 dakika) pelet süpernatanttan ayrılarak süpernatant kısmı kullanılmıştır. Elde edilen 50 µl hücresiz ekstrakt (süpernatant), 5 ml farklı substrat konsantrasyonları (1.75, 3.5, 7, 14 ve 28 mM) içeren 33 mM fosfat (NaH_2PO_4) tamponuna ilave edilerek 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra bu karışımdan 100 µl alınarak üzerine eşit hacimde olacak şekilde doymuş sodyum bi karbonat (NaHCO_3) çözeltisi (pH 8.6) eklenmiştir. Bu karışım 37°C' de 2 saat inkübe edildikten sonra vorteks ve santrifüj (8000 g x 20 dak.) edilerek 96 kuyucuklu elisa petrisindeki her bir kuyucuğa 100 µl ilave edilmiştir. Daha sonra mikroplet okuyucu cihazı ile dalga boyu 450 nm' ye ayarlanarak dört seri okuma yapılmıştır.

2.2.7.4. Tannik Asit Konsantrasyonu

İzolatlardan elde edilen 50 µl hücresiz ekstrakt (süpernatant), 5 ml farklı tannik asit konsantrasyonu (0.4375, 0.875, 1.75, 3.5, 7 mM) fosfat tamponu (33 mM pH 5.0) içerisine eklenmiş ve 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

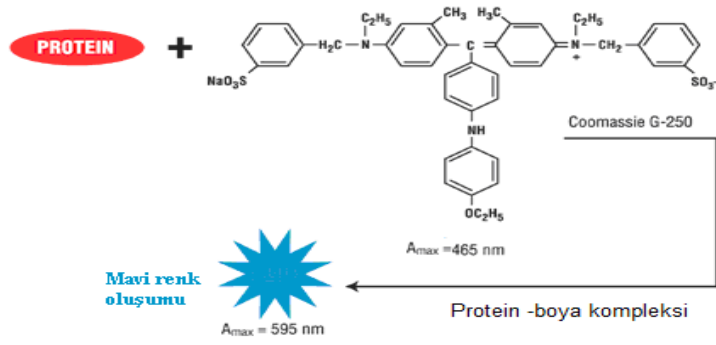
İnkübasyondan sonra bu karışımın 100 µl alınarak eşit hacimde doygun NaHCO₃ solüsyonu (pH 8.6) ilave edilerek 37⁰C’ de 2 saat tekrar inkübe edilmesinin ardından vortekslenmiş ve santrifüj (8000 g x 20 dakika) edilmiştir Daha sonra bu karışımdan 100 µl alınarak dört paralel şekilde 96 kuyucuklu elisa petrilere aktarılmıştır ve 450 nm de spektrofotometre ile okunmuştur.

2.2.7.5. Farklı Katkı Maddelerinin Tannaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Farklı metal iyonlar Magnezyum Klorür (MgCl₂), Potasyum Klorür (KCl), Çinko Klorür (ZnCl₂), Civa-II-Klorür (HgCl₂) Kalsiyum Klorür (CaCl₂), Tween 80 (sürfaktan), Üre (denatüre edici), şelat Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA) ve inhibitör Dimetil Sülfoksit (DMSO) ayrı ayrı olarak 1 mM hazırlanarak 5 ml’ lik fosfat tamponunda (33 mM, pH 5.0) çözdürülmüştür. Çözme işleminden sonra maksimum aktivite gösteren izolatların süpernatantlarından 50 µl olacak şekilde 5 ml’ lik bu karışıma ilave edilerek 37⁰ C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübe işleminden sonra karışım farklı tüpe alınarak üzerine eşit hacimde olacak şekilde NaHCO₃ (pH 8.6) solüsyonu ilave edilerek 37⁰ C 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra vortekslenmiş ve santrifüj edilmiştir (8000 g x 20 dak.). Yapılan santrifüj işleminden sonra karışımdan 100 µl pipetlenerek 96 kuyucuklu elisa petrilere dört seri olacak şekilde aktarılmış ve 450 nm dalga boyunda okuması yapılmıştır.

2.2.8. Bradford Yöntemi

Protein derişimi bilinmeyen çözelti Bradford reaktifi ile muamele edilerek, köre karşı hazırlanan çözeltinin absorbansı oda sıcaklığında spektrofotometrede okunmuştur. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standard 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 (Metin 2007).



Şekil 2. 1. Bradford reaksiyonu (Metin 2007).

Çalışmamızda, protein konsantrasyonunu belirlemek için Mikroplak okuyucu cihazı kullanılmıştır. Protein Standartlarının hazırlanması için Bovin Serum Albümin (BSA) kullanılmıştır. Çözücü olarak ise bakterileri geliştirdiğimiz MRS Broth besiyeri kullanılmıştır. Çözücü ile belli oranlarda karıştırılarak hazırlanan standartlar +4 °C’ de saklanmıştır.

Protein standart eğrisini hazırlamak için gerekli standart protein aralıklarına uygun olacak şekilde BSA ependorfa 0,1-1,4 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır

BSA standart örneklerinin ve bakteriyel özütlerin absorbans değerleri spektrofotometre kullanılarak aşağıda belirtildiği şekilde ölçülmüştür:

1. Spektrofotometre 595 nm dalga boyuna ayarlanarak sıfırlanmış, kör olarak MRS broth besiyeri kullanılmıştır

2. 250 µl Bradford çözeltisi içeren test tüplerine, standartlardan ve protein miktarı bilinmeyen örneklerden 5 µl ilave edilmiş ve pipetlenerek karıştırıldıktan sonra 96 kuyucuklu elisa petri kuyucuklarına aktarılarak rengin stabilize olması için yaklaşık 20 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiş daha sonra 595 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür.

3. Kör için okunan absorbans değeri sıfırlanarak tüm örneklerin absorbansı okunmuştur.

4. Microsoft Excell adlı bilgisayar programına veriler girilerek standart eğri grafiği oluşturulmuştur. $Y=0,5139x+0,0464$ denkleminde yararlanılarak örneklerin protein miktarları tayin edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Fermente Olmuş Ürünlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri ve Tanımlanması

Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan fermente olmuş ürün örneklerinden daha önceki çalışmalarda izole edilen 50 izolatin temin edildiği ürün ve yer çizelge 3.1’ de verilmiştir. Seçilen izolatlardan 8 tanesi Sucuk (ES5, DS1, DS2, ES2, DS4, ES4, DS3, ES6), 8 tanesi Pancar Turşusu (P3X, P2, P5, P4X, P1X, P4, P9), 7 tanesi Acur Turşusu (A6, A5X, A10, A4X, A5, A6X, A4), 5 tanesi Fasulye Turşusu (F6, F1X, F9X, F-7X, F4X), 4 tanesi Domates Turşusu (D2X, D7, D8X, D1), 3 tanesi Yeşil Zeytin (EZ7, EZ4, DZ2), 2 tanesi Mısır Turşusu (MT4, MT3), 2 tanesi Patlıcan Turşusu (PT11, PT2), 2 tanesi Havuç Turşusu (HV3, H8), 2 tanesi Siyah Zeytin (SZ2, SZ6), 2 tanesi Ekmek Mayası (SM3, SM5), 1 tanesi Biber Turşusu (BB2), 1 tanesi Kefir (MK3), 1 tanesi Boza (KB13), 1 tanesi Kabak Turşusu (KT2) ve 1 tanesi Mantar turşusu (MN9) örneğine aittir.

Çizelge 3.1. Daha önceki çalışmalarda elde edilen izolatların kaynakları.

İzolatlar	İzolatin Temin Edildiği Ürün	İzolatin Temin Edildiği Yer
ES5	Sucuk	Ev-Eskişehir
DS1	Sucuk	Ev-Edremit
DS2	Sucuk	Ev-Edremit
DS4	Sucuk	Ev-Edremit
ES2	Sucuk	Ev-Eskişehir
ES4	Sucuk	Ev-Eskişehir
DS3	Sucuk	Ev-Edremit
ES6	Sucuk	Ev-Eskişehir

Çizelge 3.1. (Devam) Daha önceki çalışmalarda elde edilen izolatlardan kaynakları.

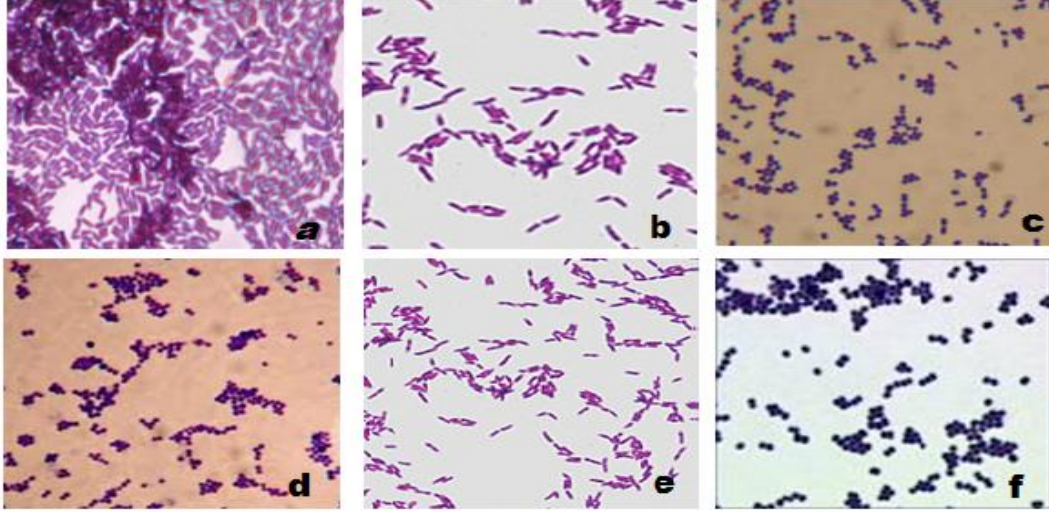
İzolatlardan	İzolatlardan Temin Edildiği Ürün	İzolatlardan Temin Edildiği Yer
P9	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir
P3	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir
P4	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir
P1X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir
P4X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir
P2	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir
P3X	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir
P5	Pancar Turşusu	Ev-Eskişehir
A6	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir
A10	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir
A4X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir
A5X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir
A5	Acur turşusu	Ev-Eskişehir
A6X	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir
A4	Acur Turşusu	Ev-Eskişehir
F4X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt
F-7X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt
F9X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt
F1X	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt
F6	Fasulye Turşusu	Ev-Söğüt
D2X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt
D7	Domates Turşusu	Ev-Söğüt

Çizelge 3.1. (Devam) Daha önceki çalışmalarda elde edilen izolatların kaynakları.

İzolatlar	İzolatın Temin Edildiği Ürün	İzolatın Temin Edildiği Yer
D8X	Domates Turşusu	Ev-Söğüt
D1	Domates Turşusu	Ev-Söğüt
EZ4	Yeşil Zeytin	Piyasa-Söğüt
EZ7	Yeşil Zeytin	Piyasa-Söğüt
DZ2	Yeşil Zeytin	Ev-Edremit
MT4	Mısır Turşusu	Ev-Söğüt
MT3	Mısır Turşusu	Ev-Söğüt
PT2	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt
PT11	Patlıcan Turşusu	Ev-Söğüt
HV3	Havuç Turşusu	Piyasa-Ankara
H8	Havuç Turşusu	Ev-Eskişehir
SZ6	Siyah Zeytin	Piyasa-Eskişehir
SZ2	Siyah Zeytin	Piyasa-Eskişehir
SM3	Ekmek Mayası	Ev-İnönü
SM5	Ekmek Mayası	Ev-İnönü
BB2	Biber Turşusu	Ev-Mersin
MK3	Kefir	Ev-Eskişehir
MN9	Mantar Turşusu	Ev-Söğüt
KT2	Kabak Turşusu	Ev-Söğüt
KB13	Boza	Piyasa-Eskişehir

Seçilen izolatların gram pozitif, katalaz negatif olanları testlerde kullanılmak üzere ayrılmıştır. Test edilen 50 izolattan birisinin (MT3) bu incelemeler sonucu laktik asit bakterisi olmayacağı düşünülerek 49 izolat ile çalışmalara devam edilmiştir. 49 izolatın otomatize edilmiş ribotiplendirme

sistemi ile tanımlanması sonucunda elde edilen türler Ribogrupları ve DUP grupları Çizelge 3.2' de verilmiştir.



Şekil 3. 1. a. A4 (*Lactobacillus plantarum*), b. KT2 (*Lactobacillus brevis*), c. DZ2 (*Enterococcus faecium*), d. BB2 (*Leuconostoc mesenteroides*), e. P3X (*Lactobacillus curvatus*), f. D1 (*Pediococcus acidilactici*) izolatlarının ışık mikroskobunda görüntüleri. Büyütme; 100X, Boyama yöntemi; Gram boyama.

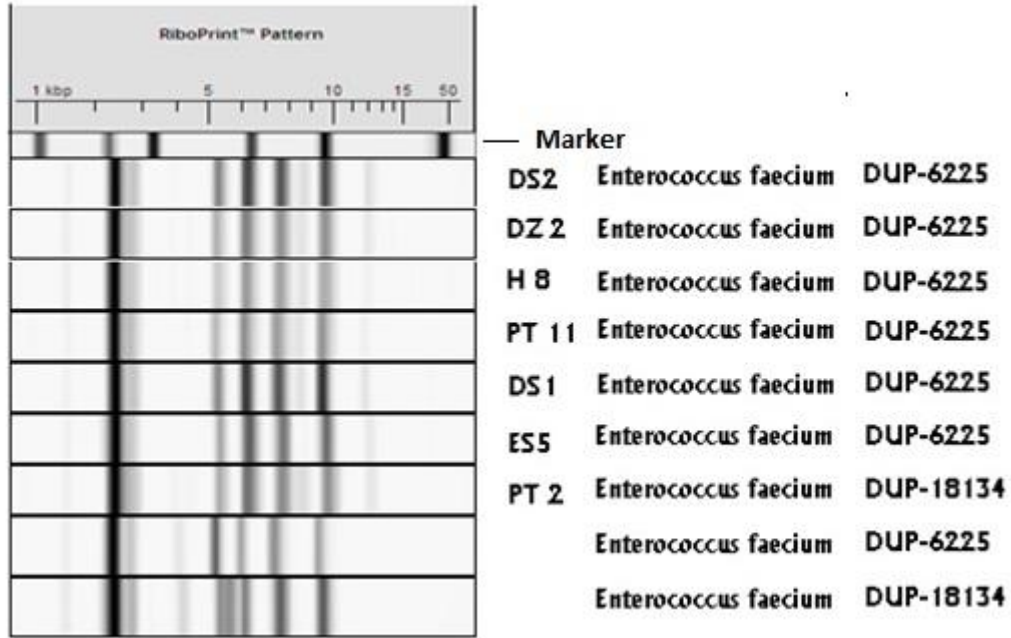
Çizelge 3.2. Riboprinter Sistemi ile Tanımlanan Laktik Asit Bakterileri.

İzolatlar	Tanımlanan Tür	DUP No.	Ribo No.	Benzerlik
ES5	<i>Enterococcus faecium</i>	DUP 6225	ECORI 425-111-S-8	0,85
DS1	<i>Enterococcus faecium</i>	DUP 6225	ECORI 425-11-S-5	0,90
DS2	<i>Enterococcus faecium</i>	DUP 6225	ECORI 425-111-S-8	0,86
H8	<i>Enterococcus faecium</i>	DUP 6225	ECORI 425-111-S-8	0,87
PT11	<i>Enterococcus faecium</i>	DUP 6225	ECORI 425-111-S-8	0,89
DZ2	<i>Enterococcus faecium</i>	DUP 6225	ECORI 425-111-S-8	0,86
MT4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 13075	ECORI 425-119-S-2	0,88
A4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 13075	ECORI 425-12-S-5	0,96
A6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 16541	ECORI 425-109-S-1	0,83
F4X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 16541	ECORI 425-109-S-1	0,87
A5X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 16541	ECORI 425-109-S-1	0,90

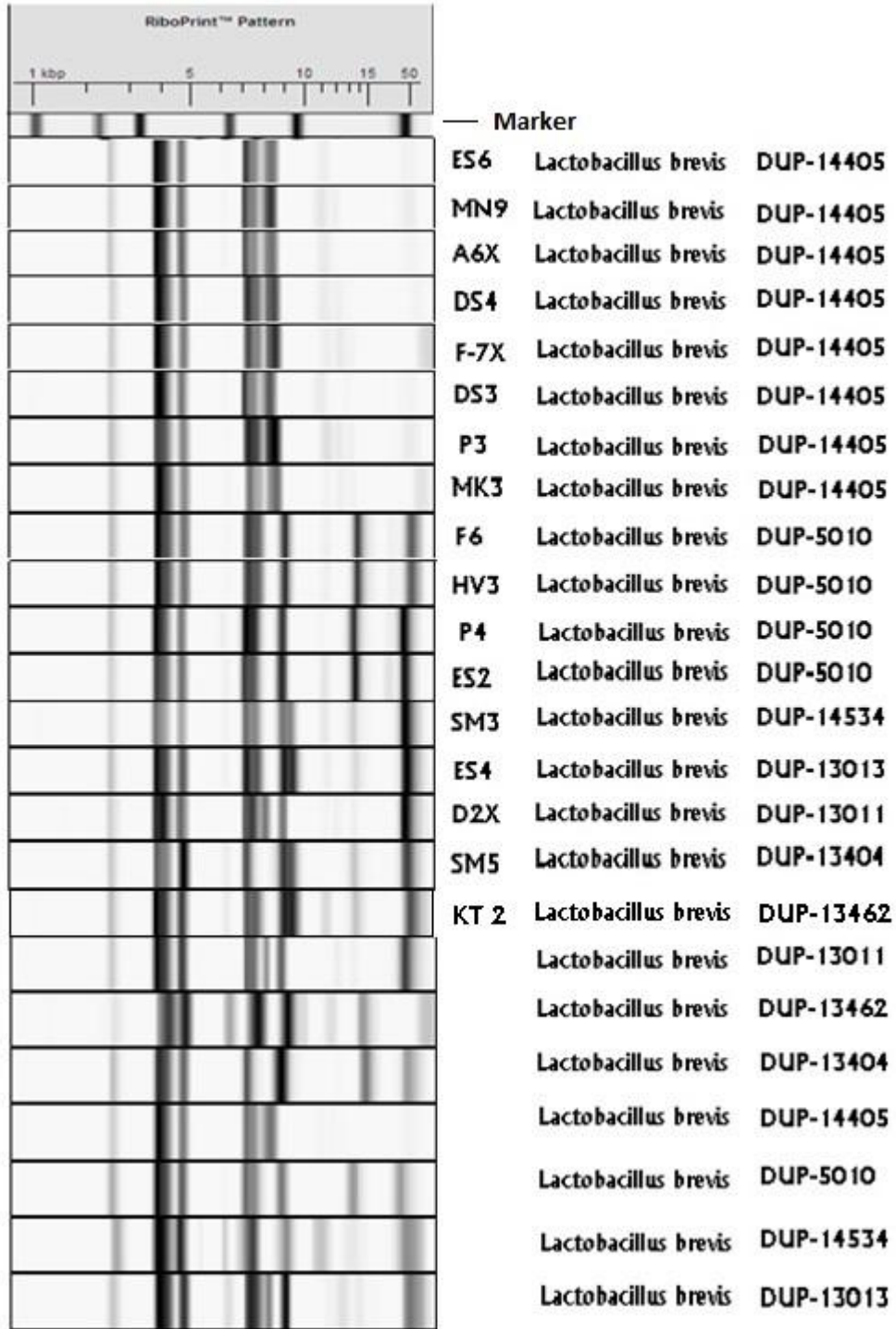
Çizelge 3.2. (Devam) Riboprinter Sistemi ile Tanımlanan Laktik Asit Bakterileri

İzolatlar	Tanımlanan Tür	DUP No.	Ribo No.	Benzerlik
F9X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 16541	ECORI 425-109-S-1	0,89
P1X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 16541	ECORI 425-109-S-1	0,88
A10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 16541	ECORI 425-109-S-1	0,84
F1X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 16541	ECORI 425-109-S-1	0,87
D8X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 16541	ECORI 425-109-S-1	0,88
P2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 13471	ECORI 425-110-S-2	0,88
P9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 13471	ECORI 425-110-S-2	0,86
KB13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 5031	ECORI 425-59-S-4	0,91
EZ7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 16541	ECORI 425-109-S-1	0,83
EZ4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DUP 16541	ECORI 425-109-S-1	0,90
MK3	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 14405	ECORI 425-12-S-1	0,91
MN9	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 14405	ECORI 425-12-S-1	0,97
ES6	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 14405	ECORI 425-12-S-1	0,97
A6X	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 14405	ECORI 425-12-S-1	0,97
DS3	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 14405	ECORI 425-12-S-1	0,98
DS4	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 14405	ECORI 425-12-S-1	0,96
P3	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 14405	ECORI 425-12-S-1	0,93
F-7X	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 14405	ECORI 425-12-S-1	0,88
P4	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 5010	ECORI 425-29-S-7	0,95
ES2	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 5010	ECORI 425-29-S-7	0,92
HV3	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 5010	ECORI 425-29-S-7	0,89
F6	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 5010	ECORI 425-29-S-7	0,89
D2X	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 13011	ECORI 425-63-S-1	0,97
ES4	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 13013	ECORI 425-110-S-1	0,82
KT2	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 13462	ECORI 425-119-S-6	0,82
SM3	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 14534	ECORI 425-110-S-1	0,82
SM5	<i>Lactobacillus brevis</i>	DUP 13404	ECORI 425-109-S-8	0,79
BB2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DUP 5402	ECORI 425-88-S-5	0,96
SZ6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DUP 5402	ECORI 425-88-S-5	0,92
A4X	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DUP 5402	ECORI 425-88-S-5	0,91
SZ2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DUP 5402	ECORI 425-88-S-5	0,95
A5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	DUP 5017	ECORI 425-59-S-5	0,83
P3X	<i>Lactobacillus curvatus</i>	DUP 5017	ECORI 425-59-S-5	0,81
P4X	<i>Lactobacillus curvatus</i>	DUP 5017	ECORI 425-59-S-5	0,86
P5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	DUP 5017	ECORI 425-59-S-5	0,86
D1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	DUP 9514	ECORI 425-119-S-5	0,81
D7	<i>Pediococcus acidilactici</i>	DUP 9514	ECORI 425-110-S-6	0,92

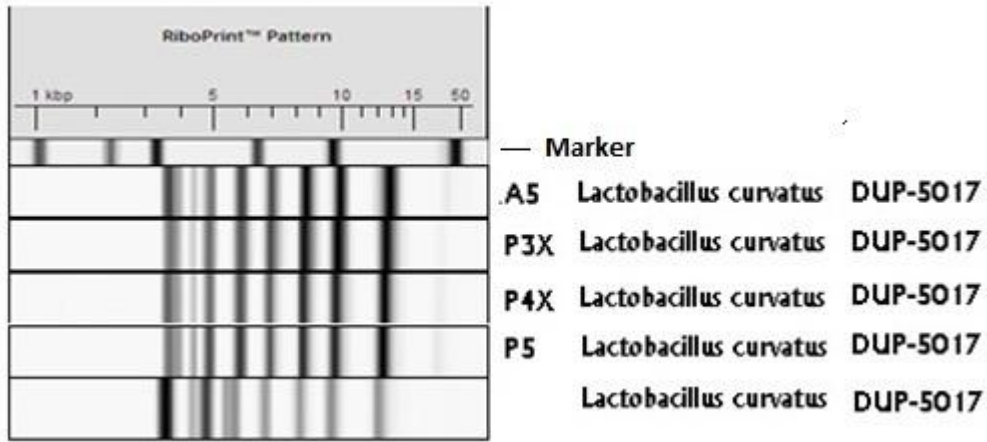
Riboprinter sistem ile yapılan tanımlamalar sonucunda seçilen izolatlardan 15 tanesi *Lactobacillus plantarum* (EZ7, A6, F1X, A10, F4X, EZ4, P1X, A5X, F9X, MT4, D8X, P9, KB13, P2, A4) (Şekil 3.1a), 17 tanesi *Lactobacillus brevis* (HV3, ES2, D2X, P3, MN9, DS4, F-7X, MK3, P4, SM3, ES4, SM5, KT2, ES6, A6X, F6, DS3) (Şekil 3.1b), 7 tanesi *Enterococcus faecium* (DZ2, PT11, H8, PT2, DS2, DS1, ES5) (Şekil 3.1c), 4 tanesi *Leuconostoc mesenteroides* (BB2, A4X, SZ6, SZ2) (Şekil 3.1d), 4 tanesi *Lactobacillus curvatus* (P4X, A5, P3X, P5) (Şekil 3.1e), ve 2 tanesi *Pediococcus acidilactici* (D1, D7) (Şekil 3.1f) olarak bulunmuştur. Ayrıca riboprinter sistemi ile yapılan çalışma sonucunda elde edilen bant profilleri Şekil (3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7) te verilmiştir.



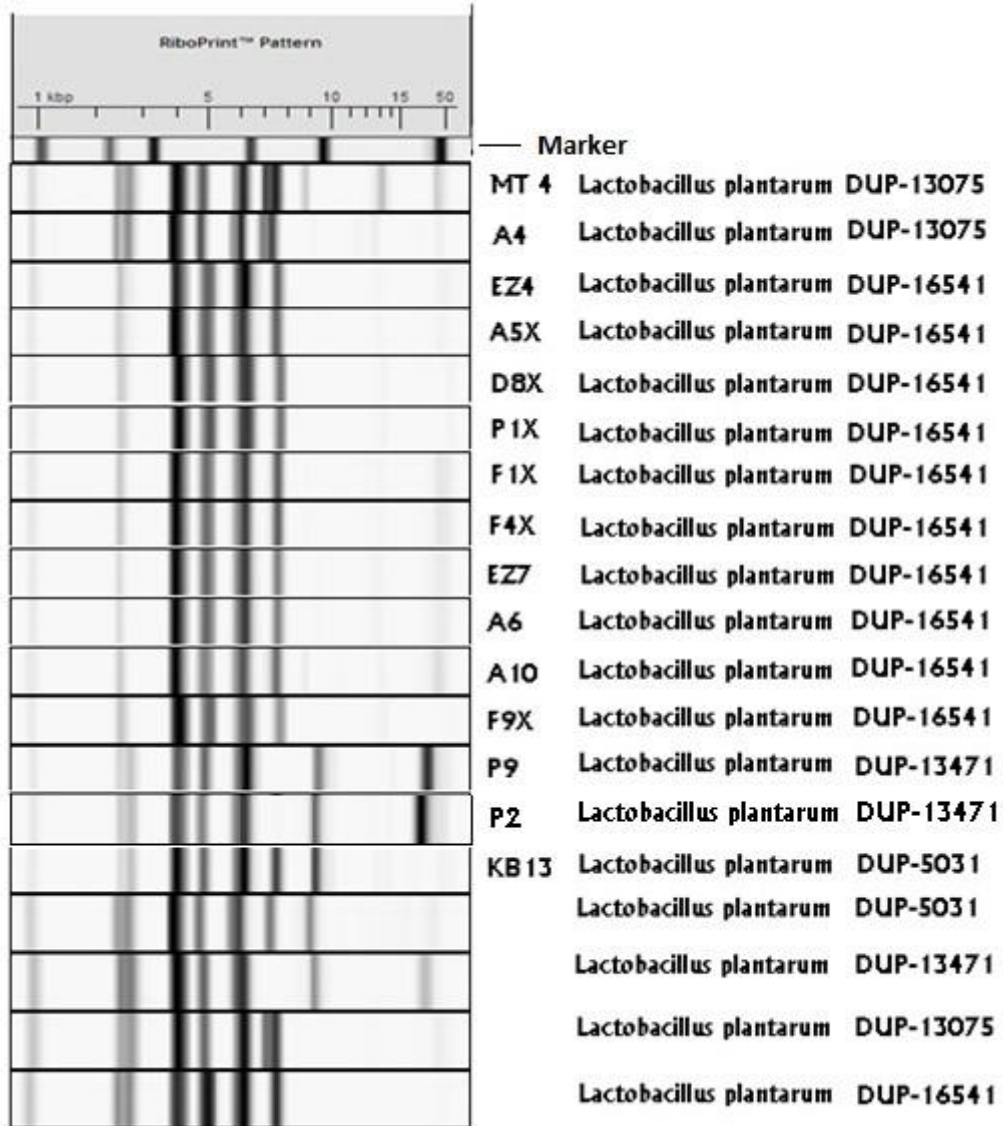
Şekil 3. 2 *Enterococcus faecium* türüne ait riboprinter profil bantları.



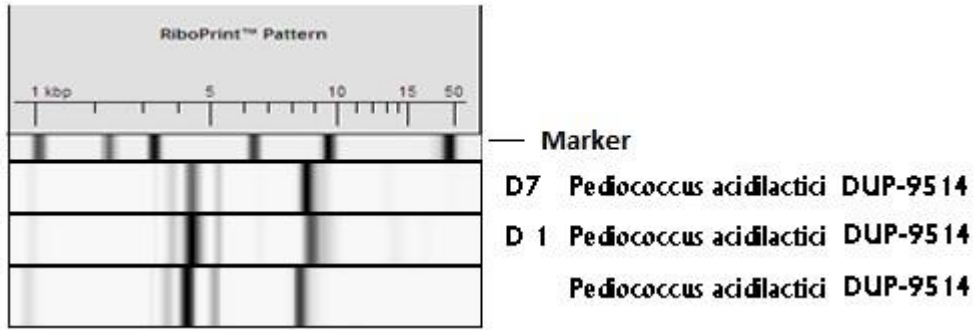
Şekil 3. 3. *Lactobacillus brevis* türüne ait riboprinter profil bantları.



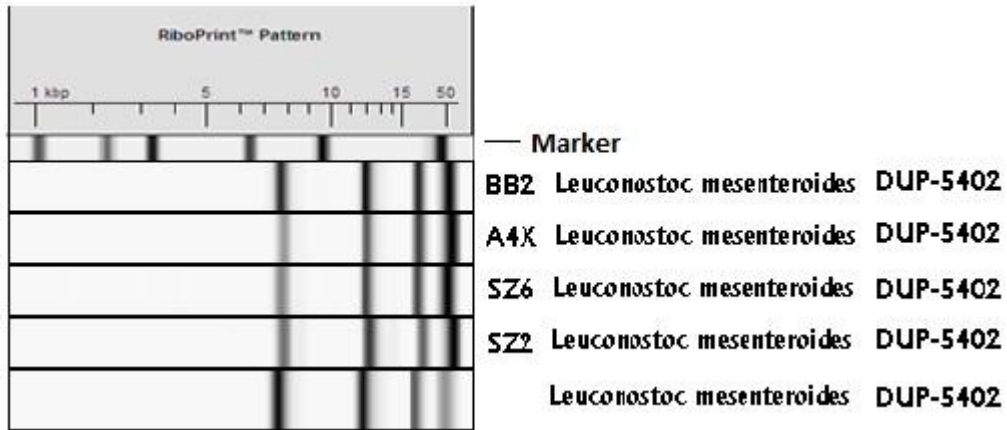
Şekil 3. 4. *Lactobacillus curvatus* türüne ait riboprinter profil bantları.



Şekil 3. 5. *Lactobacillus plantarum* türüne ait riboprinter profil bantları



Şekil 3. 6. *Pediococcus acidilactici* türüne ait riboprinter profil bantları.



Şekil 3. 7. *Leuconostoc mesenteroides* türüne ait riboprinter profil bantları.

3.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tannaz Aktiviteleri

Tannaz aktivitesi açısından taranan izolatların tannaz ve gallat dekarboksilaz aktivitesine sahip olma durumları Çizelge 3.3' de verilmiştir. İzolatların hepsinin az veya çok tannaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. *Lactobacillus plantarum* MT4, *Lactobacillus plantarum* A4, *Enterococcus faecium* DS1, *Enterococcus faecium* DZ2, *L. plantarum* A6, *Lactobacillus brevis* KT2, *L. brevis* ES6 en yüksek tannaz aktivitesi olarak göstermişlerdir. Yüksek aktiviteye sahip olan izolatların tannaz aktivitesi tannik asit içeren katı besiyerinde tekrarlanarak tannaz aktivitesi doğrulanmıştır (Şekil 3.8).

Gallat dekarboksilaz aktivitesi 20 izolat (F-7X, SZ6, P4X, A4X, P5, SZ2, SM3, PT11, DS3, P3X, ES5, DS1, BB2, SM5, MK3, D1, DS2, F6, D7, H8) negatif olarak bulunmuştur. Bu izolatlardan 6' sısı *L. brevis* (F-7X, SM3, DS3, SM5, F6, MK3), 5' i *E. faecium* (PT11, ES5, DS1, H8, DS2), 4' ü *L. mesenteroides* (BB2, SZ2, SZ6, A4X), 3' ü *L. curvatus* (P3X, P4X, P5) ve 2' si *Pediococcus acidilactici* (D1, D7) ait izolatlardır. Diğer 29 izolattan en yüksek

gallat dekarboksilaz aktivitesi *L.brevis* A6X, *L. plantarum* D8X ve *L.brevis* ES2 izolatlarında gözlemlenmiştir. Laktik asit bakteri izolatlarının gallat dekarboksilaz aktivitesi Şekil 3.9 de gösterilmiştir.

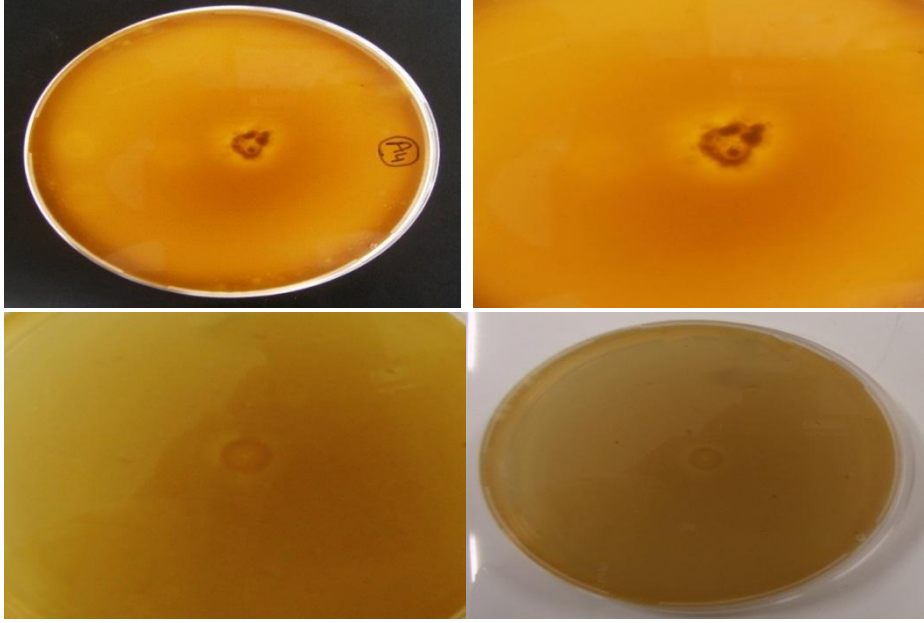
Çizelge 3.3. Laktik asit bakterilerinin tannaz ve gallat dekarboksilasyon aktivitelerinin görsel okuma sonuçları.

İzolot no.	Tanımlanan tür	Tannaz aktivitesi	Gallat dekarboksilaz aktivitesi
F-7X	<i>L. brevis</i>	++	-
D2X	<i>L. brevis</i>	+	+
P3	<i>L. brevis</i>	+	+
P4	<i>L. brevis</i>	+	+
ES2	<i>L. brevis</i>	+	+++
DS4	<i>L. brevis</i>	+	+
HV3	<i>L. brevis</i>	++	+
ES4	<i>L. brevis</i>	+	+
ES6	<i>L. brevis</i>	+++	++
A6X	<i>L. brevis</i>	++	+++
SM3	<i>L. brevis</i>	+	-
DS3	<i>L. brevis</i>	+	-
SM5	<i>L. brevis</i>	+	-
F6	<i>L. brevis</i>	++	-
KT2	<i>L. brevis</i>	+++	+
MK3	<i>L. brevis</i>	++	-
MN9	<i>L. brevis</i>	++	+
F9X	<i>L. plantarum</i>	++	++
P1X	<i>L. plantarum</i>	++	++
KB13	<i>L. plantarum</i>	+	++
A10	<i>L. plantarum</i>	+	++
D8X	<i>L. plantarum</i>	+	+++
F1X	<i>L. plantarum</i>	+	++
P2	<i>L. plantarum</i>	+	+
MT4	<i>L. plantarum</i>	+++	+
A6	<i>L. plantarum</i>	+++	+
F4X	<i>L. plantarum</i>	+	+
EZ7	<i>L. plantarum</i>	+	+
EZ4	<i>L. plantarum</i>	+	+

Çizelge 3.3. (Devam) Laktik asit bakterilerinin tannaz ve galat dekarboksilasyon aktivitelerinin görsel okuma sonuçları.

İzolat no.	Tanımlanan tür	Tannaz aktivitesi	Gallat dekarboksilasyon aktivitesi
A5X	<i>L. plantarum</i>	++	+
A4	<i>L. plantarum</i>	+++	++
P9	<i>L. plantarum</i>	++	+
PT11	<i>E. faecium</i>	+	-
DZ2	<i>E. faecium</i>	+++	+
ES5	<i>E. faecium</i>	++	-
DS1	<i>E. faecium</i>	+++	-
H8	<i>E. faecium</i>	+	-
PT2	<i>E. faecium</i>	+	+
DS2	<i>E. faecium</i>	++	-
P3X	<i>L. curvatus</i>	++	-
P4X	<i>L. curvatus</i>	++	-
P5	<i>L. curvatus</i>	+	-
A5	<i>L. curvatus</i>	+	+
BB2	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
SZ2	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
SZ6	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
A4X	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
D1	<i>P. acidilactici</i>	++	-
D7	<i>P. acidilactici</i>	+	-

+, Düşük aktivite, ++, orta derecede aktivite, +++, Yüksek aktivite olarak belirtilmiş ve çizelge 3.3' de gösterilmiştir.



Şekil 3.8. % 2 Tannik asit ilaveli Brain Heart Infusion agar üzerinde A4 (*Lactobacillus plantarum*) ve MT4 (*Lactobacillus plantarum*) izolatının gelişimi ve açık zon görüntüsü.



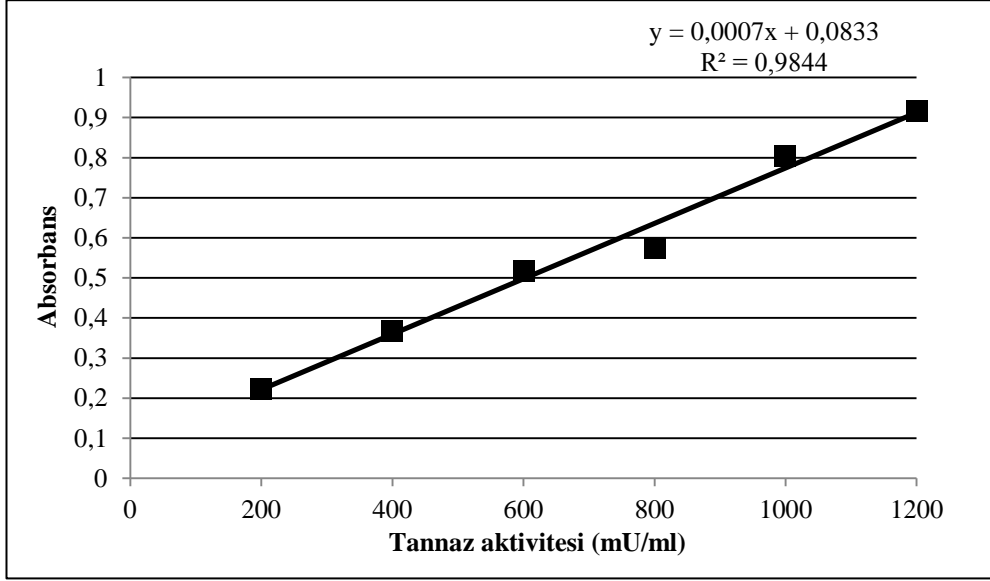
Şekil 3.9. Laktik asit bakterilerinin gallet dekarboksilaz aktivitesi. Sırasıyla soldan sağa MT4 (*Lactobacillus plantarum*), A4 (*Lactobacillus plantarum*), ES2 (*Lactobacillus brevis*), A6X (*Lactobacillus brevis*), DZ2 (*Enterococcus faecium*).

3.3. Laktik Asit Bakterileri İzolatlarının Tannaz Spesifik Aktivite Ölçümü

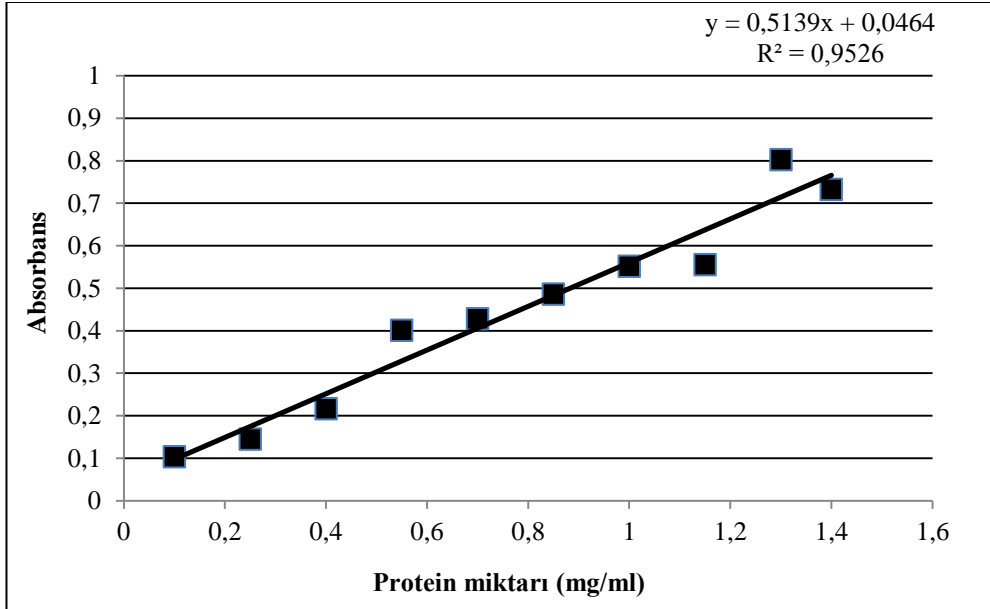
İzolatların spesifik tannaz aktivitesi optimum koşullarda birim olarak 1 unit tannazın dakikada 1 μ mol tannik asidi hidrolize etmesi olarak hesaplanarak Çizelge 3.4' de gösterilmiştir. Şekil 3.10' de tannaz aktivite miktarı belirlenmesi için kullanılan standart eğri grafiği çizilmiş ve izolatların tannaz aktivitesi bu grafik denklemi yardımıyla bulunmuştur.

Aktivite açısından görsel olarak taranan izolatlardan *L. plantarum* MT4, *L. plantarum* A4, *L. plantarum* A6, *E. faecium* DS1, *E. faecium* DZ2, *L. brevis* KT2,

L. brevis ES6, *L. brevis* A6X ve *L. curvatus* P3X yüksek aktivite göstermiştir. 49 izolat arasından seçilen bu dokuz izolat 1-1,2 U/ml değerleri arasında aktivite göstermiştir. Bu izolatlar spektrofotometrik yöntemle bakıldığında MT4 izolatı için aktivite 1,20 U/ml ve A4 izolatı içinse 1,18 U/ml olarak bulunmuştur. Geri kalan izolatlar 0,52- 1,17 U/ml değerleri arasındadır. En düşük aktivite değeri *L. brevis* (SM3) ile 0,52 U/ml olarak bulunmuştur.



Şekil 3.10. Tannaz aktivite miktarını belirlemek için kullanılan standart eğri grafiği.



Şekil 3.11. Bradford standart eğri grafiği.

Çizelge 3.4. Laktik Asit Bakterilerinin Spesifik Tannaz Aktivitesi.

İzolot numarası	Tanımlanan tür	Koloni sayımı (kob/ml)	Spesifik tannazaktivitesi	
			U/10 ⁷ kob	U/mg Protein
MN9	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,8x10 ⁷	0,83	2,93
F-7X	<i>Lactobacillus brevis</i>	3,2x10 ⁷	0,80	6,20
D2X	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,9x10 ⁷	0,71	2,35
P3	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,6x10 ⁷	0,69	1,97
DS2	<i>Enterococcus faecium</i>	1,2x10 ⁷	0,77	2,42
P4	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,5x10 ⁷	0,56	1,92
SZ6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,2x10 ⁷	0,63	2,69
ES2	<i>Lactobacillus brevis</i>	3,2x10 ⁷	0,62	1,90
F9X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,9x10 ⁷	1,02	6,37
P1X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,5x10 ⁷	0,76	2,40
KB13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,7x10 ⁷	0,65	1,98
P4X	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,5x10 ⁷	0,78	1,96
A10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,3x10 ⁷	0,66	2,63
A4X	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,6x10 ⁷	0,65	2,22
DS4	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,4x10 ⁷	0,66	1,47
P5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	3,1x10 ⁷	0,56	2,04
D7	<i>Pediococcus acidilactici</i>	2,1x10 ⁷	0,57	1,98
SZ2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,6x10 ⁷	0,72	5,16
HV3	<i>Lactobacillus brevis</i>	1,8x10 ⁷	0,71	1,86
ES4	<i>Lactobacillus brevis</i>	3,3x10 ⁷	0,67	2,93
F1X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,2x10 ⁷	0,57	1,49
D8X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,6x10 ⁷	0,67	2,53
A5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	1,7x10 ⁷	0,58	2,22
SM3	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,4x10 ⁷	0,52	1,76
P2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,1x10 ⁷	0,63	2,63
PT11	<i>Enterococcus faecium</i>	4,2x10 ⁷	0,53	2,28
DS3	<i>Lactobacillus brevis</i>	4,6x10 ⁷	0,66	1,98
DZ2	<i>Enterococcus faecium</i>	2,3x10 ⁷	1,12	4,33
ES6	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,9x10 ⁷	1,14	5,57
A6X	<i>Lactobacillus brevis</i>	1,2x10 ⁷	1,17	2,98
P3X	<i>Lactobacillus curvatus</i>	3,1x10 ⁷	1,07	7,78

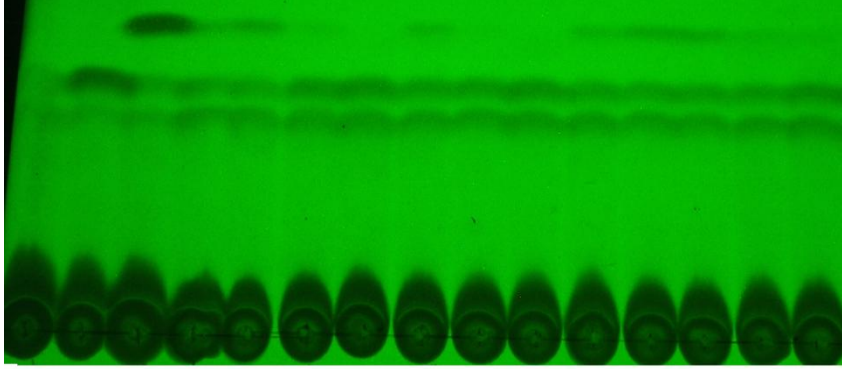
Çizelge 3.4. (Devam) Laktik asit bakterilerinin Spesifik tannaz aktivitesi.

İzolat numarası	Tanımlanan tür	Koloni sayımı (kob/ml)	Spesifik tannaz aktivitesi	
			U/10 ⁷ kob	U/mg Protein
ES5	<i>Enterococcus faecium</i>	1,6x 10 ⁷	0,78	2,45
DS1	<i>Enterococcus faecium</i>	1,4x10 ⁷	1,10	7,37
A6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,1x10 ⁷	1,12	4,36
BB2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,3x10 ⁷	0,81	3,40
SM5	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,5x10 ⁷	0,77	3,49
P9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,1x10 ⁷	0,70	5,10
F4X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,4x10 ⁷	0,55	4,46
MK3	<i>Lactobacillus brevis</i>	5,0x10 ⁷	0,80	4,35
EZ7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,5x10 ⁷	0,70	1,82
EZ4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,7x10 ⁷	0,62	2,70
A5X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,8x10 ⁷	0,83	3,07
MT4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,8x10 ⁷	1,20	8,95
A4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,2x10 ⁷	1,18	5,31
F6	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,4x10 ⁷	0,84	5,95
KT2	<i>Lactobacillus brevis</i>	1,7 x10 ⁷	1,09	7,06
D1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,5x10 ⁷	0,77	3,30
H8	<i>Enterococcus faecium</i>	3,6x10 ⁷	0,58	3,04
PT2	<i>Enterococcus faecium</i>	3,8x10 ⁷	0,67	2,94

3.4. Laktik Asit Bakterilerinin İnce Tabaka Kromatografisi ile Reaksiyon Ürünlerinin Gözlemlenmesi

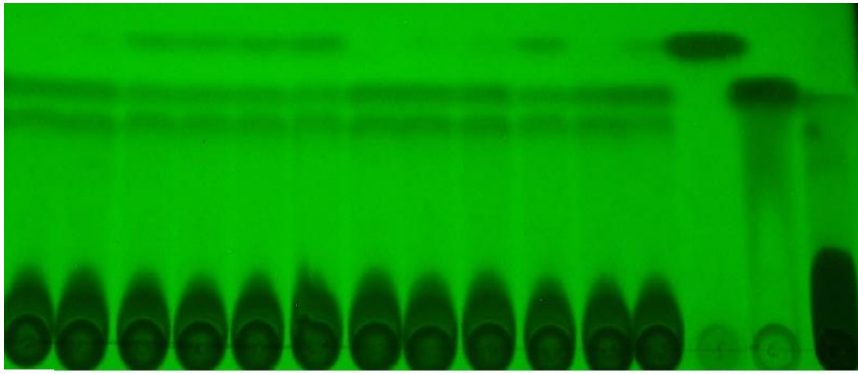
Hidrolize olabilen tanenler glukoz ve polioll gruplarının esterlenmiş halleri olup en basitleri gallotanenlerdir. Gallotanenler glukozun poligallol esterleridir. Hidrolize olabilen tanenleri gallik asit ve glukozu parçalayan enzim ise karboksil ester hidrolazlar ailesinde yer alan (E.C. 3.1.1.20. tanen açıl hidrolaz) tannazdır. 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 glukozu hidrolize olmaktadır. Oluşan gallik asit dekarboksilaz enzimi ile dekarboksile olarak pirogallol meydana gelmektedir. Bu durum TLC ile tanımlanmaya çalışılmıştır. Test edilen izolatlardan ES4, P3, EZ7, ES2, A6X, A4, F1X, D8X, DZ2, PT2, A5X, A10, DS4, D2X, P4, HV3, ES6, KT2, MN9, F9X, P1X, KB13, P2, MT4, EZ4, P9, A5 gallotanenlerden

gallik asit ve pirogallol oluşturdıkları fakat diğer izolatların ise sadece gallik asit oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15 ve Şekil 3.16). Bu durum görsel okuma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.



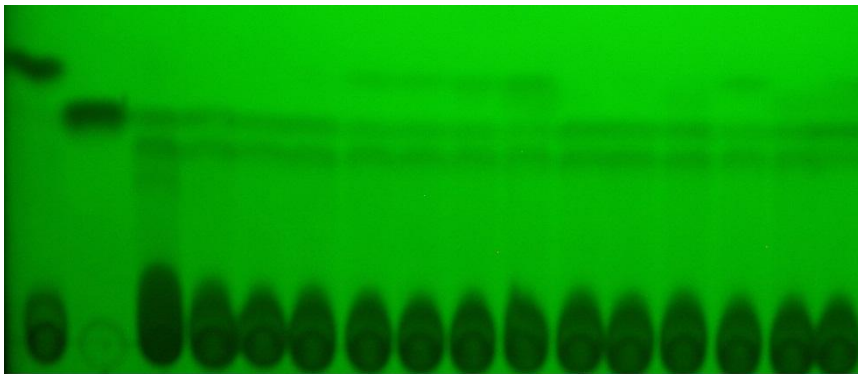
T.A G.A P.G FIX D8X F6 BB2 DZ2 H8 A4X PT2 A5X A10 DS4 SM3

Şekil 3. 12. İnce tabaka kromatografi ile reaksiyon ürünlerinin gösterilmesi. PG: Pirogallol, GA: Gallik asit, T.A: Tannik asit.



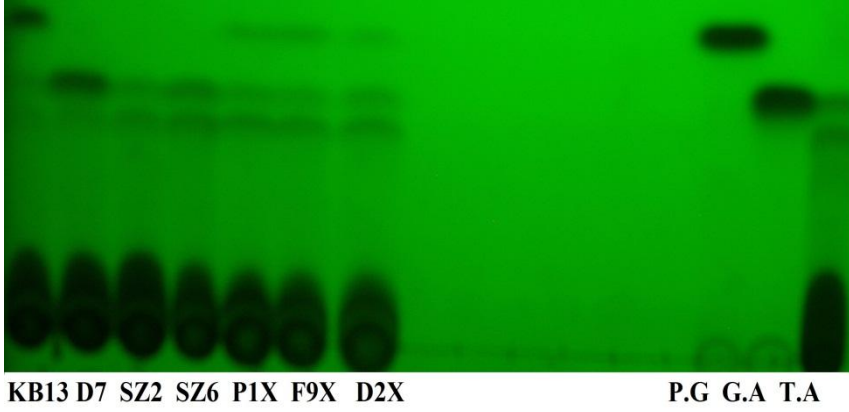
D1 SM5 ES4 P3 EZ7 ES2 DS2 MK3 F7X A6X DS1 A4 P.G G.A T.A

Şekil 3. 13. İnce tabaka kromatografi ile reaksiyon ürünlerinin gösterilmesi. PG: Pirogallol, GA: Gallik asit, T.A: Tannik asit.

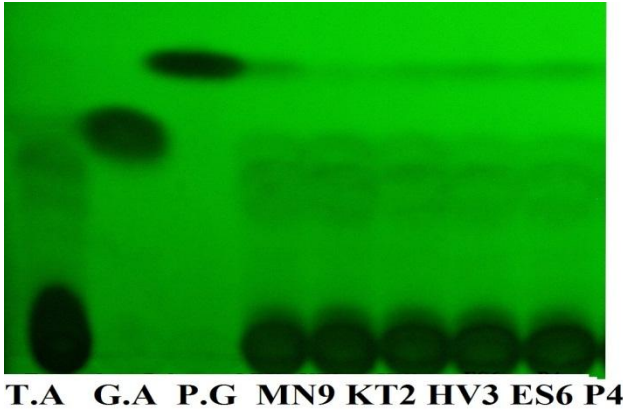


P.G G.A T.A P4X P3X ES5 A5 P9 EZ4 F4X PT11 DS3 P5 A6 P2 MT4

Şekil 3. 14. İnce tabaka kromatografi ile reaksiyon ürünlerinin gösterilmesi. PG: Pirogallol, GA: Gallik asit, T.A: Tannik asit.



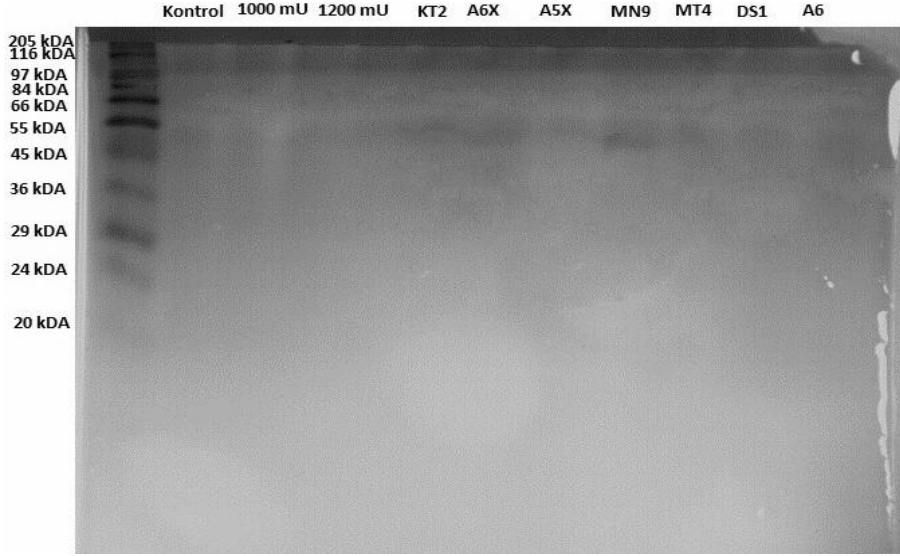
Şekil 3. 15. İnce tabaka kromatografi ile reaksiyon ürünlerinin gösterilmesi. PG: Pirogallol, GA: Gallik asit, T.A: Tannik asit.



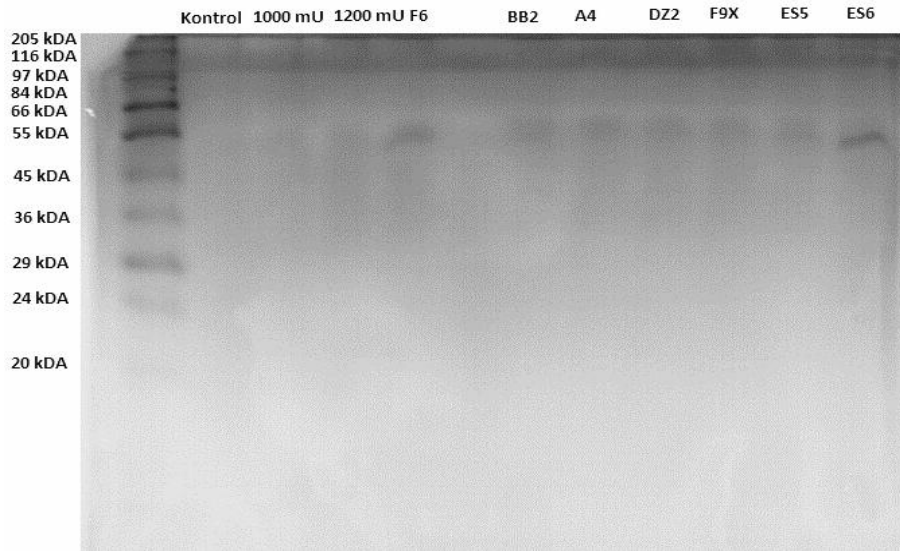
Şekil 3. 16. İnce tabaka kromatografi ile reaksiyon ürünlerinin gösterilmesi. PG: Pirogallol, GA: Gallik asit, T.A: Tannik asit.

3.5. SDS-PAGE Uygulanması

Çalışmamızda maksimum aktivite gösteren KT2, A6X, A5X, MN9, MT4, DS1, A6 F6, BB2, A4, DZ2, F9X, ES6 ve ES5 izolatları değerlendirilmiştir. İzolatlara ait SDS-PAGE jel görüntüleri Şekil 3.17 ve Şekil 3.18 de verilmiştir. Burada da görüleceği üzere izolatların hücresiz filtratlarında bulunan enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDA olarak bulunmuştur.



Şekil 3. 17. SDS-Page analizi sonucu maksimum aktivite gösteren izolatların tannaz moleküler ağırlıkları.



Şekil 3. 18. SDS-Page analizi sonucu maksimum aktivite gösteren izolatların tannaz moleküler ağırlıkları.

3.6. Bakteri Yoğunluğunun Etkisi

Bakteri yoğunluğu arttıkça enzim aktivitesinde bir artış görülmüştür. Ancak bu artış çok fazla değildir. Hücre yoğunluğunun azalması enzim aktivitesinde düşmeye neden olmuştur. Hücre sayısı 10^8 kob /ml olduğu zaman enzim aktivitesi 1,75U/ml ile 1,45 U/ml arasında değişmiştir. En yüksek aktivite 1,75 U/ml ile *L. plantarum* MT4 de elde edilmiştir. *L. plantarum* A4 de ise en düşük aktivite elde edilmiştir (1,44 U/ml). Hücre sayısı 10^3 kob /ml olduğu zaman ise enzim aktivitesi 0,42 U/ml ile 0,61 U/ml arasında değişmiştir.

Çizelge 3.5. Bakteri yoğunluğunun tannaz aktivitesine etkisi.

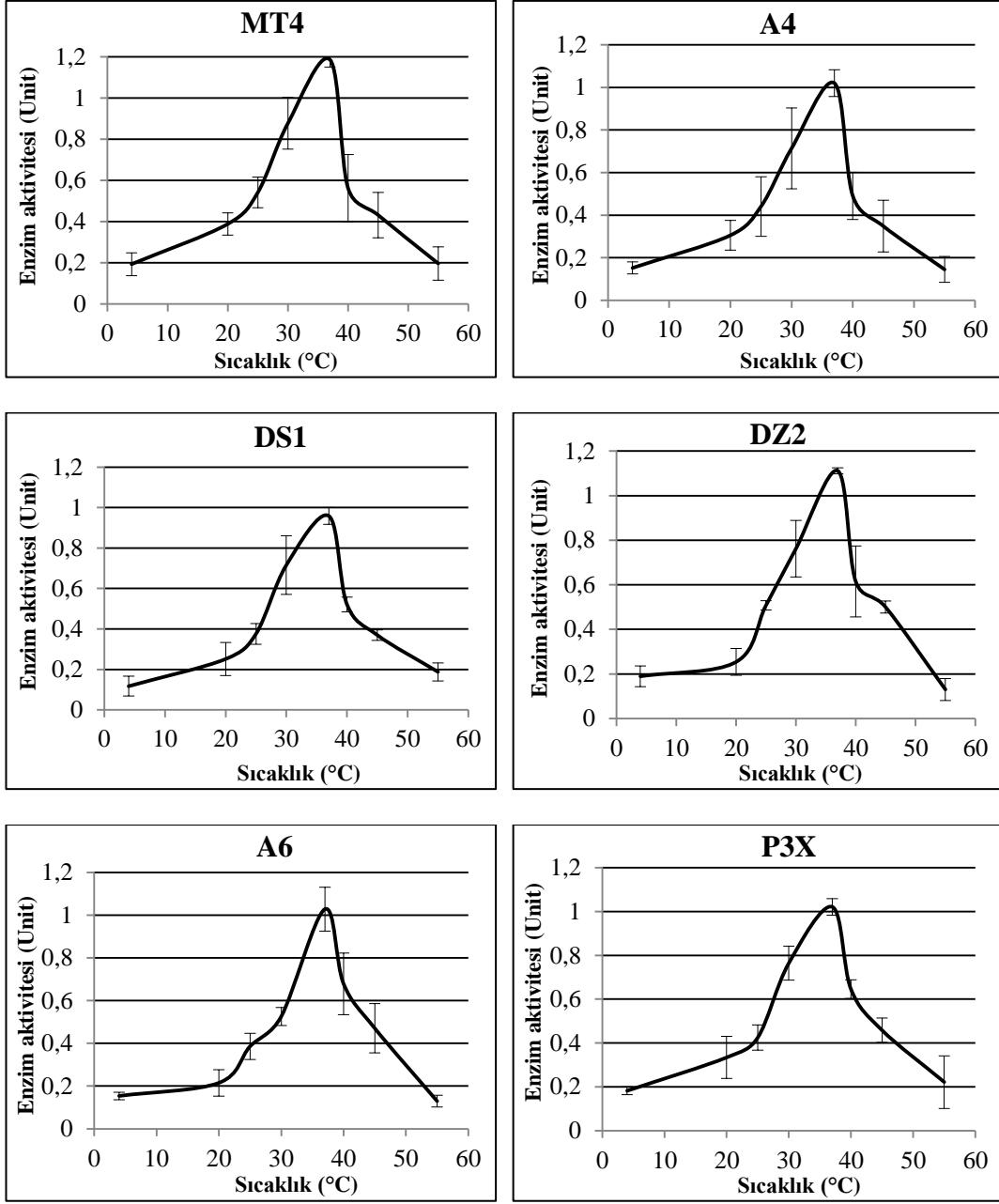
Bakteri sayısı kob/ml	Enzim aktivitesi (U/ml)								
	MT4	KT2	ES6	DS1	P3X	A6X	DZ2	A4	A6
10 ⁸	1,75	1,58	1,57	1,58	1,69	1,56	1,73	1,45	1,62
10 ⁷	1,14	1,10	1,13	1,08	1,08	1,10	1,03	1,06	0,96
10 ⁵	0,99	0,85	0,83	0,81	0,93	0,93	0,88	0,76	0,61
10 ³	0,55	0,58	0,56	0,61	0,56	0,57	0,49	0,42	0,43

3.7. Tannaz Aktivitesi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

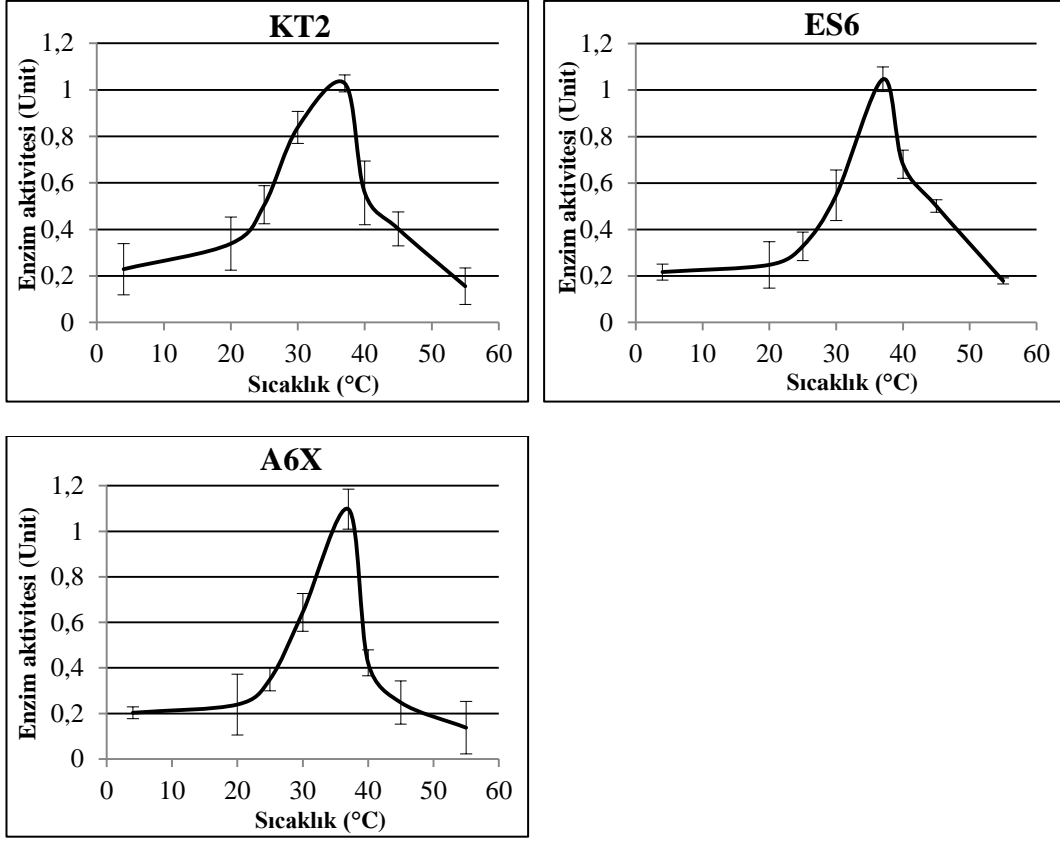
Sırasıyla KT2, ES6, A6X, P3X, DS1, A4, A6, DZ2, MT4 izolatlarının tannaz aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu (metil galat), tannik asit konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir.

3.7.1. Sıcaklığın Tannaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

En yüksek tannaz aktivite gösteren 9 izolatta sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini Şekil 3.19 da gösterilmiştir. İzolatların maksimum tannaz aktivitesi 37 °C' de elde edilmiştir. 37 °C' de *L. plantarum* MT4 için 1,19 U/ml, *L. plantarum* A4 için 1,02 U/ml, *L. plantarum* A6 1,03 U/ml, *E. faecium* DS1 0,95 U/ml, *E. faecium* DZ2 1,11 U/ml, *L. curvatus* P3X 1,02 U/ml, *L. brevis* A6X 1,10 U/ml *L. brevis* ES6 1,04 U/ml ve *L. brevis* KT2 için 1,03 U/ml değerinde bulunmuştur.



Şekil 3.19. Sırasıyla MT4, A4, DS1, DZ2, A6, P3X, KT2, ES6, A6X izolatlarının sıcaklığın enzim aktivitesi (Ünit) üzerine etkisi.

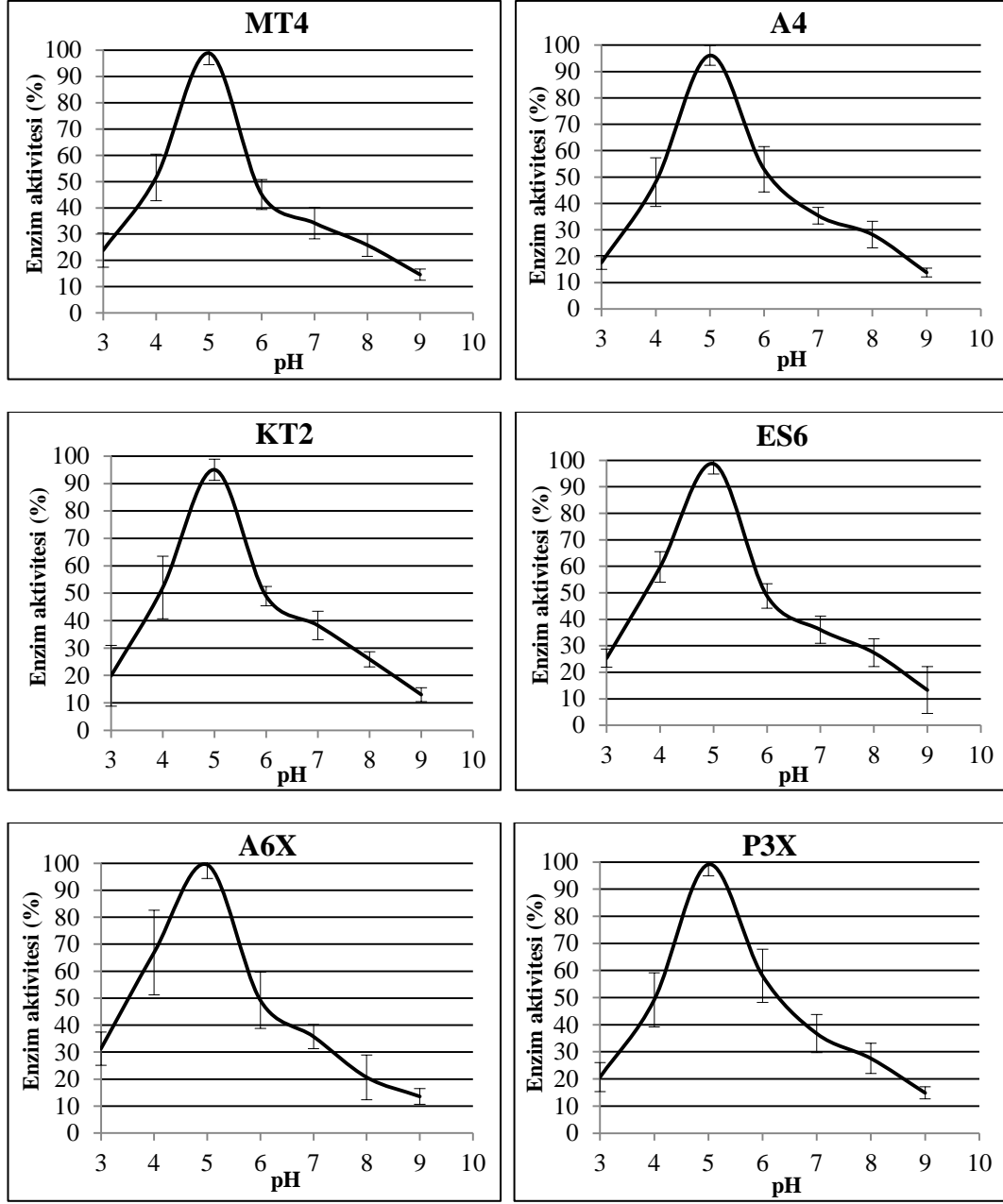


Şekil 3.19. (Devam) Sırasıyla MT4, A4, DS1, DZ2, A6, P3X, KT2, ES6, A6X izolatlarının sıcaklığın enzim aktivitesi (Unit) üzerine etkisi.

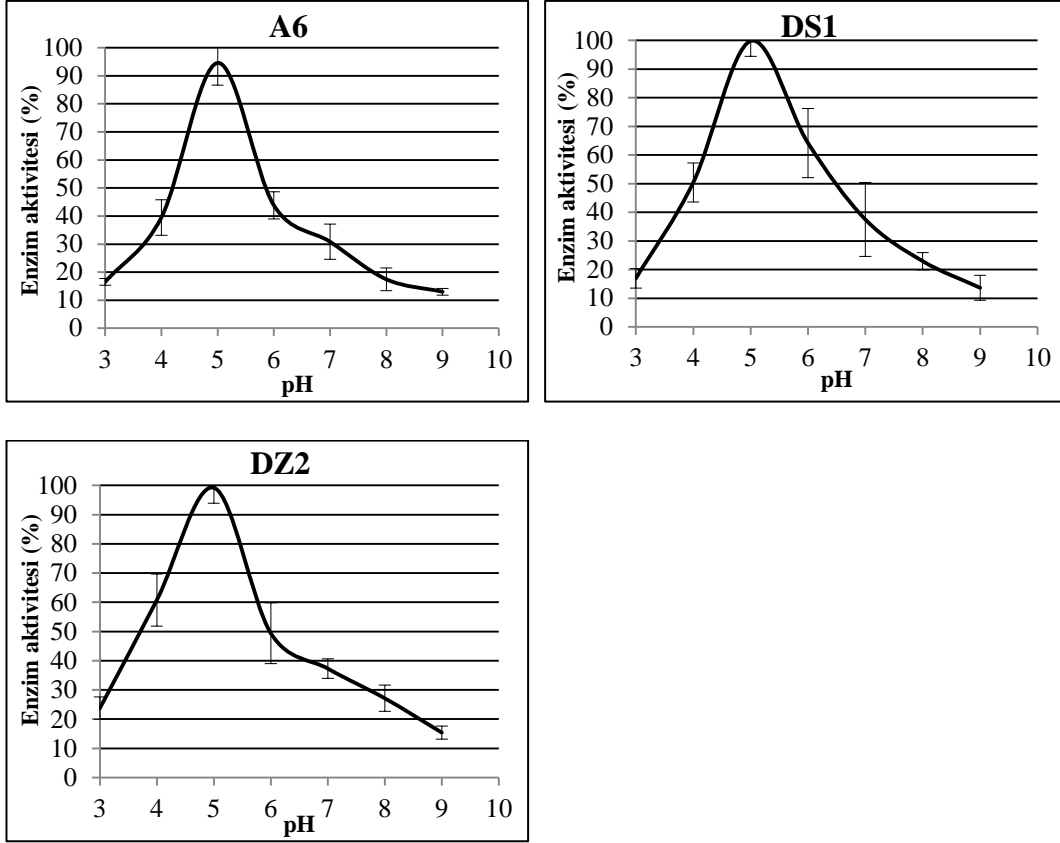
3.7.2. pH' ın Tannaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

MT4, A4, DZ2, DS1, KT2, ES6, A6, A6X, P3X izolatlarının tannaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi izolatlara göre büyük farklılık göstermemiştir. Test edilen bütün izolatlarda en yüksek aktivite pH 5' te elde edilmiştir.

L. plantarum MT4 izolatı pH 5.0' da %98.9, *L. plantarum* A4 %96,08, *E. faecium* DS1 %92,76, *L. curvatus* P3X %99,1, *L. brevis* A6X %99,4, *L. brevis* ES6 %98,6, *L. brevis* KT2 %95,04, *L. plantarum* A6 %94,5, *E. faecium* DZ2 %99,2 yüzde aktivite göstermiştir (Şekil 3.20).



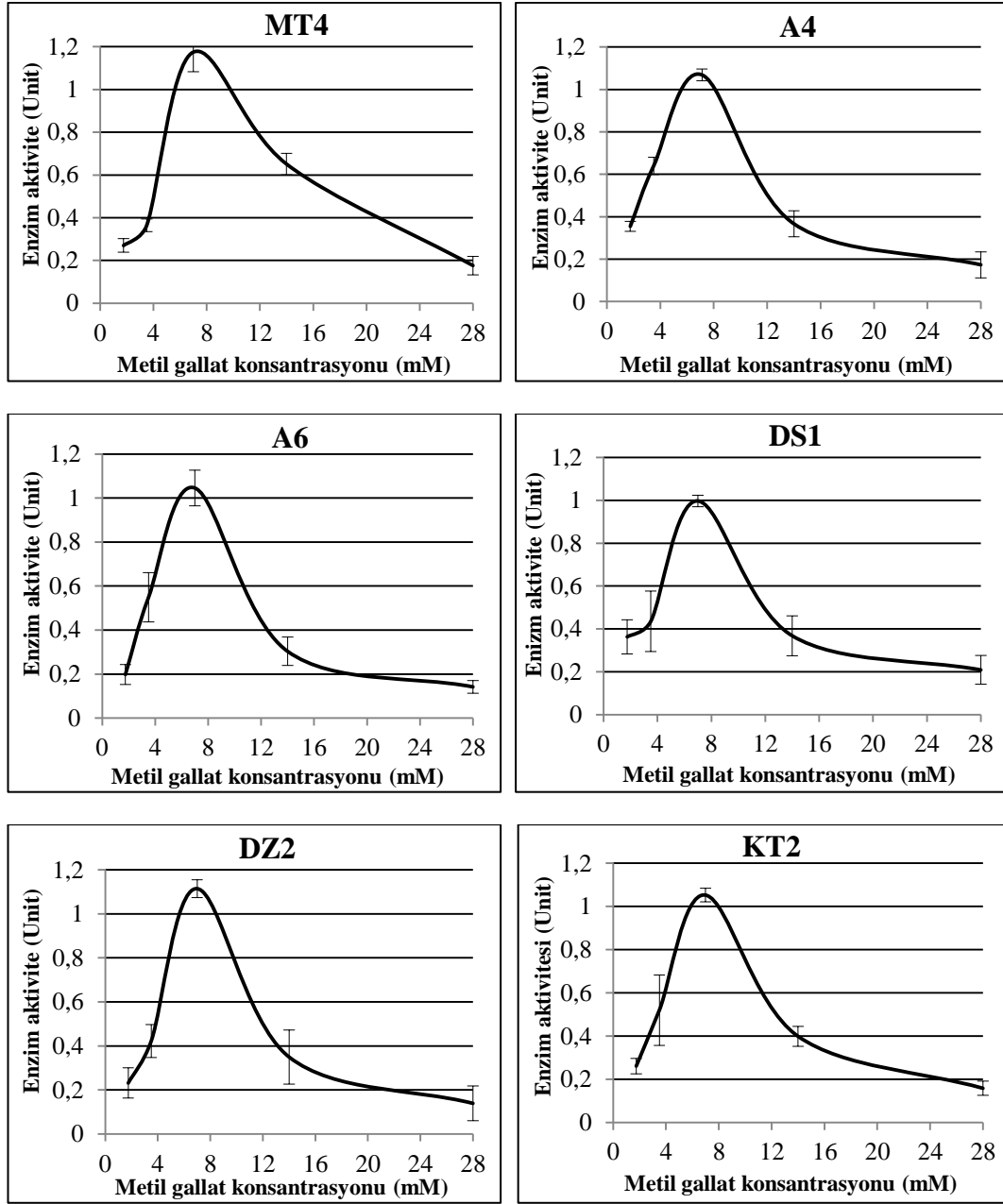
Şekil 3.20. Sırasıyla MT4, A4, KT2, ES6, A6X, P3X, A6, DS1, DZ2 izolatlarının pH enzim aktivitesi üzerine etkisi.



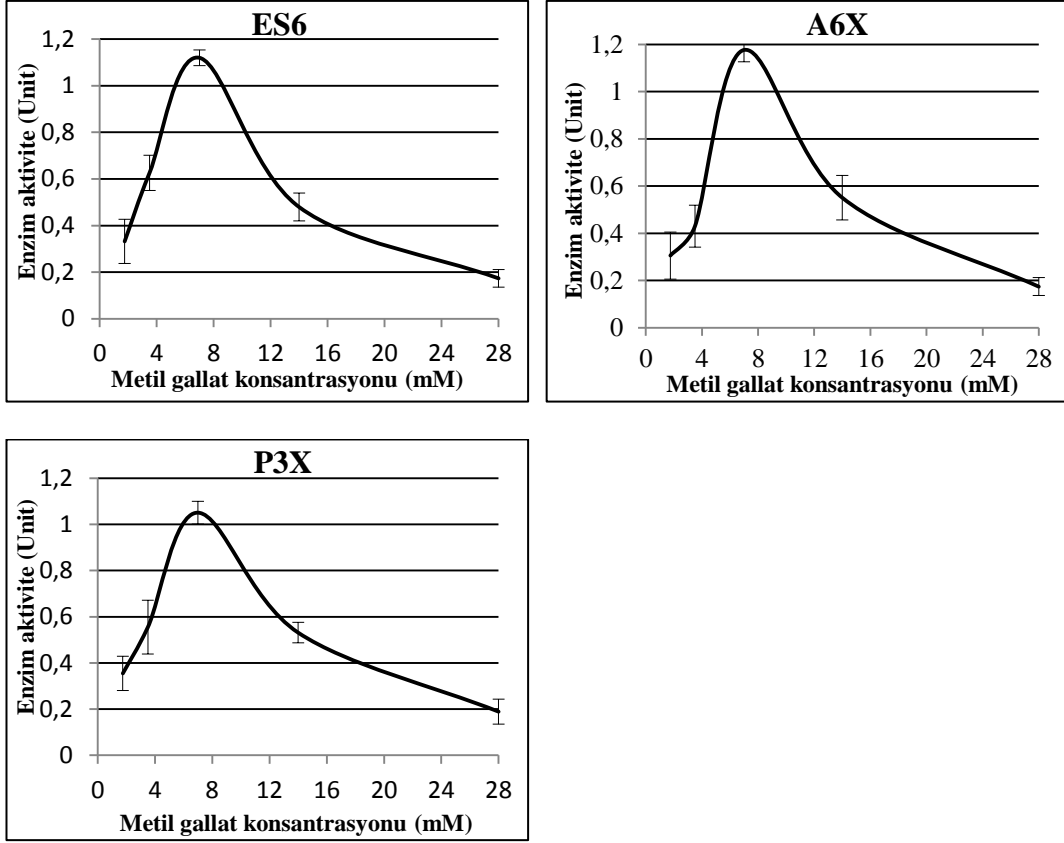
Şekil 3.20. (Devam) Sırasıyla MT4, A4, KT2, ES6, A6X, P3X, A6, DS1, DZ2 izolatlarının pH enzim aktivitesi üzerine etkisi.

3.7.3. Substrat Konsantrasyonunun Aktiviteye Etkisi

Tannaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisinin araştırılmasında substrat olarak metil gallatın farklı konsantrasyonları analiz edilmiş ve test edilen bütün izolatlar için enzim aktivitesi maksimum 7 mM metil gallat olarak bulunmuştur. Substrat konsantrasyonunda daha fazla artış tannaz aktivitesinin azalmasına sebep olmuştur (Şekil 3.21). *L. plantarum* MT4 1,17 U/ml, *L. plantarum* A6 1,05 U/ml, *L. plantarum* A4 1,06 U/ml, *E. faecium* DS1 1,00 U/ml, *E. faecium* DZ2 1,11 U/ml, *L. brevis* KT2 1,05 U/ml, *L. brevis* ES6 1,11 U/ml, *L. brevis* A6X 1,14 U/ml ve *L. curvatus* P3X 1,05 U/ml Unit birimi değerlerinde bulunmuştur.



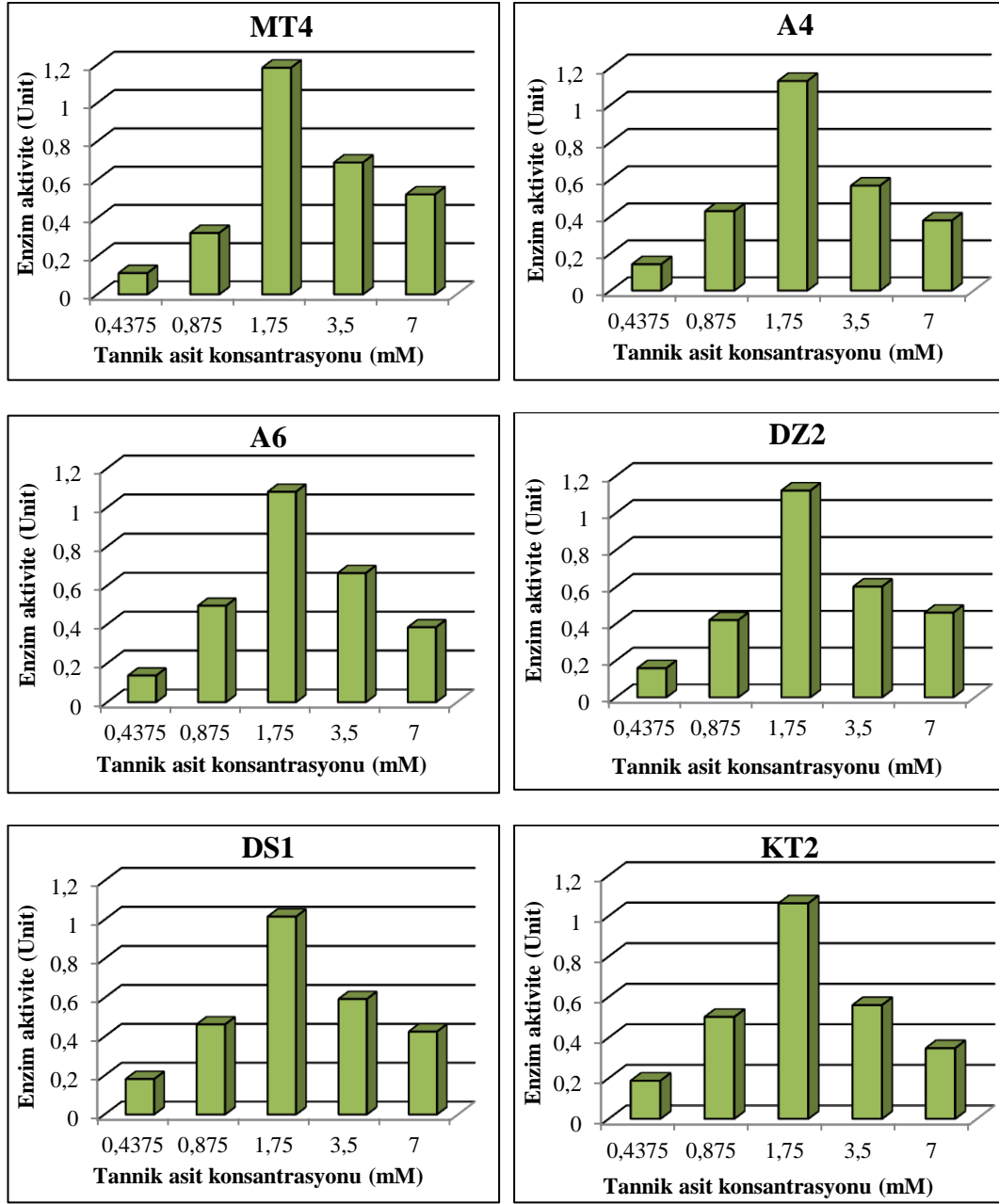
Şekil 3.21. Sırasıyla MT4, A4, A6, DS1, DZ2, KT2, ES6, A6X, P3X izolatlarının substrat olarak kullanılan metil gallatın tannaz aktivitesi üzerine etkisi.



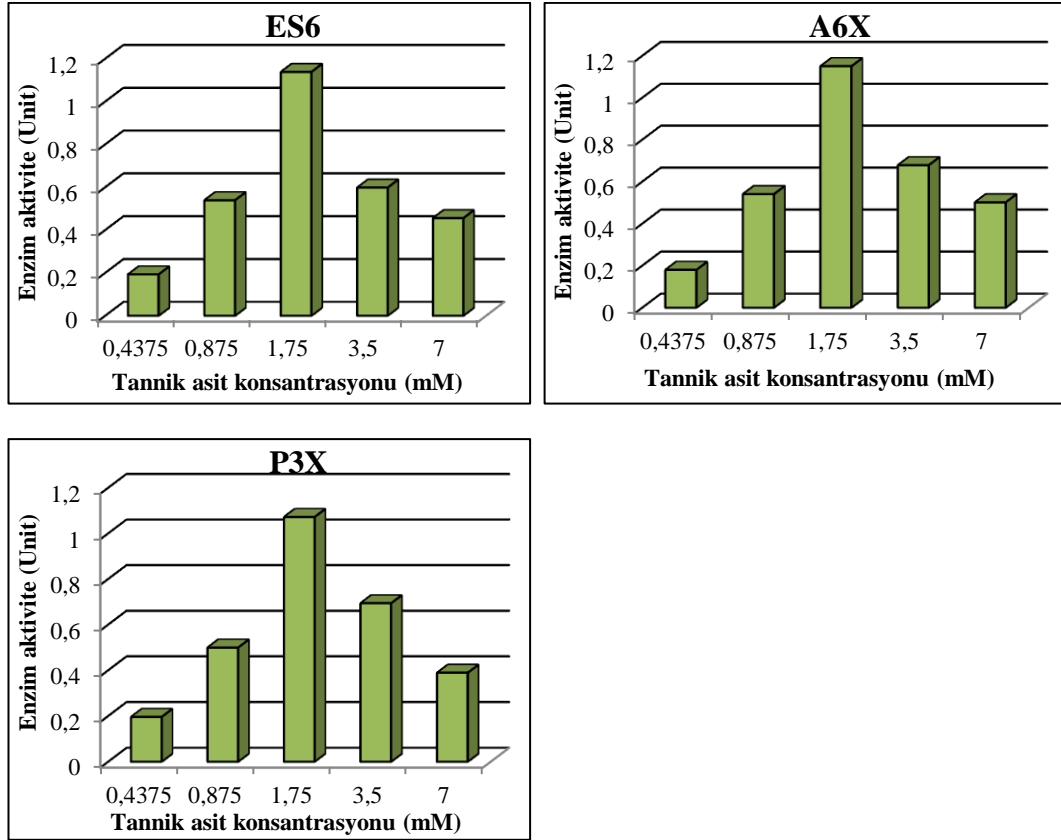
Şekil 3.21. (Devam) Sırasıyla MT4, A4, A6, DS1, DZ2, KT2, ES6, A6X, P3X izolatlarının substrat olarak kullanılan metil gallatın tannaz aktivitesi üzerine etkisi.

3.7.4. Tannik Asit Konsantrasyonunun Tannaz Aktivitesine Etkisi

Substrat olarak tannik asit kullanıldığında bunun enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Tannik asitin metil gallata göre moleküler ağırlığı büyük olduğundan daha küçük derişimlerde kullanılması gerekmektedir. Test edilen bütün izolatlarla 1.75 mM tannik asitte en yüksek aktivite gözlenmiştir. 1,75 mM tannik asit konsantrasyonlarda *L. plantarum* MT4 1,18 U/ml, *L. plantarum* A6 1,04 U/ml, *L. plantarum* A4 1,12 U/ml, *E. faecium* DS1 (1,00 U/ml), *E. faecium* DZ2 1,12 U/ml, *L. brevis* KT2 1,06 U/ml, *L. brevis* A6X 1,17 U/ml ve *L. curvatus* P3X 1,05 U/ml değerlerinde aktivite elde edilmiştir (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. Sırasıyla MT4, A4, A6, DZ2, DS1, KT2, ES6, A6X, P3X izolatlarının tannik asit konsantrasyonunun tannaz aktivitesine etkisi.



Şekil 3.22. (Devam) Sırasıyla MT4, A4, A6, DZ2, DS1, KT2, ES6, A6X, P3X izolatlarının tannik asit konsantrasyonunun tannaz aktivitesine etkisi.

3.7.5. Farklı Katkı Maddelerin Tannaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çizelge 3.6 de tannaz aktivitesi üzerine metal iyonların etkisi gösterilmiştir. Metal iyonlar düşük konsantrasyonlarda çoğunlukla enzimler için kofaktörler gibi davranmaktadır. Böylece enzimlerin katalitik aktivitesi artmaktadır. Oysa yüksek konsantrasyonlar da katalik aktivite düşebilir. Hg ve Mg iyonlarının varlığında enzim aktivitesi düşerken Ca^{+} ve Zn^{+} laktik asit bakterilerinin tannaz aktivitesi üzerine etki yapmadığı görülmüşken, K^{+} tannaz aktivitesinde biraz olsun artış gözlemlenmiştir. Ayrıca bazı sürfaktan (Tween 80), şelat (EDTA), inhibitör (DMSO) ve denatüre edici ajan (Üre) ların da tannaz aktivitesine tesir etmediği saptanmıştır.

Çizelge 3.6. Farklı katkı maddelerin tannaz aktivitesi üzerine etkisi.

İzolat numarası	Tannaz aktivitesi (U/ml)									
	Kontrol	MgCl ₂	KCl	CaCl ₂	ZnCl ₂	HgCl ₂	Tween 80	Üre	EDTA	DMSO
A4	1,18	0,97	1,20	1,20	1,20	0,39	1,18	1,18	1,17	1,17
A6	1,12	0,95	1,15	1,13	1,11	0,30	1,12	1,10	1,10	1,11
A6X	1,17	1,04	1,22	1,20	1,19	0,40	1,17	1,17	1,15	1,17
DS1	1,10	0,90	1,12	1,10	1,10	0,35	1,10	1,08	1,07	1,08
DZ2	1,12	0,96	1,16	1,14	1,13	0,38	1,13	1,13	1,09	1,11
ES6	1,14	0,96	1,19	1,15	1,14	0,39	1,15	1,15	1,13	1,15
KT2	1,09	0,91	1,13	1,10	1,10	0,34	1,11	1,08	1,08	1,06
MT4	1,20	1,00	1,23	1,20	1,20	0,35	1,20	1,20	1,20	1,20
P3X	1,07	0,94	1,10	1,08	1,07	0,33	1,07	1,07	1,07	1,07

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Firmicutes filumuna ait çeşitli bakteri cinslerini içeren daha çok *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* cinsleri ile tanınan laktik asit bakterileri günümüzde çeşitli fermente gıdaların üretiminde kullanılmalarından dolayı yoğun ilgi görmektedir (Madikan ve Matrinko, 2006).

Çalışmamızda çeşitli fermente gıdalardan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin tanımlanması yapılarak bu izolatların tannaz enzimi üretme yetenekleri araştırılmıştır.

Çeşitli fermente ürünlerden elde edilen laktik asit bakterileri *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici* olarak saptanmıştır. Bu bakteriler sıklıkla fermente ürünlerden izole edildiği çeşitli araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir.

Bu bakterilerin tannaz aktivitesi ilk önce görsel olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Test bakterilerinin hepsinin az veya çok tannaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Özellikle *L. plantarum* A4, *L. plantarum* A6, *E. faecium* DZ2, *E. faecium* DS1, *L. brevis* ES6 ve *L. brevis* KT2 en yüksek tannaz aktivitesi göstermişlerdir. Benzer olarak yapılan bir çalışmada ilk kez *L. plantarum*, *L. paraplantarum* ve *L. pentosus* 'un tannaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Osawa ve ark., 2000). Daha sonra Lamia ve Hamdi (2002) *L. plantarum* 'un tannaz aktivitesini çalışmışlardır. Kwon ve ark., (2008) Kimchi den izole ettikleri laktik asit bakterilerinin tannaz aktivitesini incelemiş ve *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* ' un yüksek tannaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Test izolatlarının gallat dekarboksilaz aktivitesi ise 20 izolatta (F-7X, SZ6, P4X, A4X, P5, SZ2, SM3, PT11, DS3, P3X, ES5, DS1, BB2, SM5, MK3, D1, DS2, F6, D7, H8) negatif olarak bulunurken diğer izolatlarda farklı seviyelerde galat dekarboksilaz aktivitesi saptanmıştır: *L. brevis* A6X, *L. plantarum* D8X ve *L. brevis* ES2 izolatlarında en yüksek gallat dekarboksilaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Benzer olarak Osawa ve ark. (2000) laktik asit bakterilerinin gallat dekarboksilaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *Lactobacillus gasseri* '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 ve fermente sebzelerden izole edilen laktik asit bakterilerinin daha yüksek aktivite gösterdiğini vurgulamışlardır. Bizim izolatlarımızda ise hepsi az veya çok tannaz aktivitesine sahiptir. İzole edilen kaynaklara bakıldığı zaman ekmek mayasından izole edilen *L. brevis* SM3 ve *L. brevis* SM5, kefirde izole edilen *L. brevis* MK3 izolatlarının gallat dekarboksilaz aktivitesi negatif iken turşulardan ve sucuktan izole edilen laktik asit bakterilerinin gallatdekarboksilaz aktivitesi farklı sonuçlar göstermiştir.

Test edilen laktik asit bakterilerine ait hücresiz süpernatantların da değişen oranlarda tannaz aktivitesi saptanmıştır. Yüksek tannaz aktivitesine sahip olan izolatlar görsel okuma ile de benzer sonuçlar göstermiştir. Osawa ve Walsh (1993) tarafından tanımlanan görsel okuma metodunun bakteriyel tannaz enziminin aranmasında basit ama kullanışlı bir metod olduğu görülmüştür. Bu yöntemin uygulanmasında herhangi bir alete gerek duyulmadan tarama yapılabilmektedir.

Hidrolize olabilen tanenler glukoz ve poliol 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 degrade ettiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Bhat ve ark., 1998, Mingshu ve ark., 2006). Çalışmamızda test edilen laktik asit bakterilerinin hepsi ticari tannik asidi hidrolize ederek gallik asit oluşturmuştur. Benzer olarak son yıllarda Rodriguez ve ark., (2008a) *L. plantarum*'un hücresiz ekstraktının tannik asidi biyodegrade ettiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda *L. brevis* ES4, *L. brevis* P3, *L. brevis* ES2, *L. brevis* A6X, *L. brevis* DS4, *L. plantarum* A4, *L. plantarum* EZ7, *L. plantarum* F1X, *L. plantarum* D8X, *L. plantarum* A10, *E. faecium* DZ2, *E. faecium* PT2 izolatlarına ait hücresiz filtratlarda ince tabaka kromatografisinde gallik asit ile birlikte pirogallol oluştuğu gözlenmiştir. Bu izolatlara ait gallat

dekarboksilaz aktivitesi de yüksek bulunmuştur. *L. plantarum*, *L. brevis* ve *E. faecium* tannik asidi gallik asit ve glukozu hidrolize etmekte, oluşan gallik asitte pirogallol dekarboksile olmaktadır. *L. plantarum* MT4 en yüksek tannaz aktivitesine sahip izolat olarak saptanmıştır. Kwon ve ark. (2008) *L. pentosus* LT7 suşunun çok yüksek ($60.61 \text{ U}/10^9 \text{ cfu}$) 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 sayısının büyüme oranının farklı olması olabilir. Çalışmamızda da hücre yoğunluğunun artışına paralel olarak tannaz enzim aktivitesinde de artış gözlenmiştir. Ancak bu değer araştırmacıların bulgularının çok altındadır. Nishitani ve Sasaki (2004) fermente ürünler ve insan dışkılarından izole ettikleri toplam 77 adet tannaz enzimi üreticisi laktobasil izolatlarının tannaz aktivitesinin $\leq 0,1 \text{ mU/ml}$ ile $5,99 \text{ mU/ml}$ arasında değiştiğini tespit ederek insan dışkılarından izole ettikleri *L. paraplantarum* ve fermente zeytinden izole ettikleri *L. pentosus* 'a ait tannaz enziminin $0,1 \text{ mU/ml}$ 'den daha az aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. En yüksek aktivitenin ise biradan elde edilen *L. paraplantarum* da $5,99 \text{ mU/ml}$ olarak elde edildiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda test edilen laktik asit bakterilerinin ekstrasellüler tannaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Lamia ve Hamdi (2002) bizim bulgularımıza benzer ekstrasellüler tannaz varlığını rapor ederken Rodriguez ve ark (2008a)'nın bulguları bizim bulgularımızı desteklememektedir. Ancak çalışma koşullarını dikkate aldığımızda bu farklılığın farklı kültür ortamlarının kullanılmasından ve farklı inkübasyon koşullarından kaynaklanabileceği söylenebilir. Diğer bir neden bizim çalışmalarımızda kolayca hidrolize olabilecek metil gallat kullanmamız olabilir. Benzer sonuçlar Nishitani ve Osawa (2003), Vaquero ve ark.(2004) tarafından da metil gallat kullanarak elde edilmiştir.

Test edilen izolatlardan ES4, P3, EZ7, ES2, A6X, A4, F1X, D8X, DZ2, PT2, A5X, A10, DS4, D2X, P4, HV3, ES6, KT2, MN9, F9X, P1X, KB13, P2, MT4, EZ4, P9, A5 gallotanenlerden gallik asit ve pirogallol oluşturdukları diğer izolatların ise sadece gallik asit oluşturduğu İnce tabaka kromatografisinde gözlemlenmiştir. Benzer olarak Goel ve ark. (2011) tarafından *Enterococcus*

faecalis izolatından elde edilen ve saflaştırılan tannazın tanenlerin degradasyon profilini incelemek için ince tabaka kromatografisi (TLC) ile pirogallol, gallik asit ve rezorsinol (antiseptik madde) gibi reaksiyon ürünlerini gözlemişlerdir. Test edilen izolatların hücresiz filtratlarında bulunan enzimin SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDA olarak bulunmuştur. Benzer olarak, amonyum sülfat çöktürmeden sonra DEAE selüloz ve Sephadex G-150 kolonlardan ayrılarak saflaştırılan tannazın moleküler ağırlığının yaklaşık 45 kDa olduğu bildirilmiştir (Goel ve ark. 2011). Bu farklılık normal olarak ortaya çıkacaktır. Çünkü çalışmamızda bulduğumuz sonuç saflaştırılmamış enzim için elde edilen değerdir. Skene ve Brooker (1995) yaptığı çalışmada *Selemonasrum inantium*dan üretilen tannazın moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 59 kDa olarak belirlemişlerdir. Mahendran ve ark. (2006) tarafından elde edilen *Paecilomyces variotii* izolatında ise yaklaşık 45 kDa olarak gözlemlenmiştir.

Maksimum tannaz aktivitesi pH 5 te görülmüştür. pH yükseldikçe ve düştükçe tannaz aktivitesinde düşme görülmüştür. Rodriguez ve ark. (2008a) *L. plantarum* için optimum pH' yı 5 olarak bildirirken Lamia ve Hamdi (2002) *L. plantarum* ile tannaz üretiminde optimum pH' yı 6 olarak bildirmişlerdir.

Test edilen örneklerimizin enzim aktivitesi için optimum sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiştir. En yüksek aktivite 37 °C' de *L. plantarum* MT4 için 1,20 U/ml, *L. plantarum* A4 için 1,02 U/ml, *L. plantarum* A6 için 1,03 U/ml, *E. faecium* DS1 için 0,95 U/ml, *E. faecium* DZ2 için 1,11 U/ml, *L. curvatus* P3X için 1,02 U/ml, *L. brevis* A6X için 1,10 U/ml, *L. brevis* ES6 için 1,04U/ml, *L. brevis* KT2 için 1,03 U/ml olarak saptanmıştır. Sıcaklığın azalması ve yükselmesi enzim aktivitesini önemli ölçüde düşmesine neden olmuştur. Sıcaklık 40°C' ye çıktığında *L. plantarum* A6, *L. curvatus* P3X, *L. brevis* ES6 da enzim aktivitesinin hemen hemen % 60 nın kalması bu izolatların gıda endüstrisinde kullanılmasında bazı avantajlar sağlayabileceği ortaya koymuştur. Rodriguez ve ark. (2008a) *L. plantarum* için optimum sıcaklığı 30°C olarak bildirmişlerdir. Buna benzer olarak fungal tannaz için de optimum sıcaklık 30°C bildirilirken (Aguilar ve Gutierrez-Sanchez, 2001a) *Bacillus cereus* ile elde edilen tannaz için optimum sıcaklık 40°C olarak rapor edilmiştir (Mondal ve ark., 2001). Goel ve ark. (2011) *Enterococcus faecalis* için optimum sıcaklığı 40°C olarak rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda maksimum aktivite gösteren izolatlarda substrat olarak kullanılan metil gallat konsantrasyonu 7mM elde edilmiş ve tannik asit konsantrasyonu ise 1,75 mM' da elde edilmiştir. Substrat konsantrasyonundaki artış enzim aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Metil gallatın substrat olarak kullanıldığı bir çok çalışmada *L. plantarum*'un tannaz aktivitesi incelenmiştir (Nishitani ve Osawa,2003, Nishitani ve ark., 2004, Vaquero ve ark., 2004). Rodriguez ve ark. (2008a) tannaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada en yüksek aktivitenin 6,25 mM metil gallat konsantrasyonunda elde edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızdakine benzer olarak, substrat konsantrasyonundaki artış ile Rodriguez ve ark. (2008a) da tannaz aktivitesinde azalma meydana geldiğini saptamışlardır. Metil gallat gibi küçük moleküllerin hücre içine kolayca geçtiğini ve takiben degrade ürünlerin hücre dışına çıktığını rapor etmişlerdir (Rodriguez ve ark. 2008a). 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 (2008a) 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. (2003) ise 1 mM Ca^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} metal iyonlarının tannaz aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ağır metallerin inhibitör etkisi literatürde detaylı olarak bildirilmiştir (Valeer ve Ulmer, 1972). Civa iyonları proteinlerin tiol grupları ile reaksiyona girerek proteinlerin yapısını bozarlar. Ayrıca civanın ilavesi ile disülfid

bağlar hidrolitik olarak degrade olabilir. Bu ise enzim aktivitesinde düşmeye neden olabilir Ayrıca Hg^{+2} iyonlarının kompetatif inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir (Kar ve ark., 2003). İki değerlikli iyonlar ise enzimin agregasyonuna veya spesifik olmayan bağlanmaya neden olabilirler (Rodriguez ve ark 2008a). Sabu ve ark (2005) *Aspegillus niger* tannaz aktivitesinin K^+ ilavesi ile arttığını, Ca^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarının ise enzim aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda bazı sürfaktan (Tween 80), şelat (EDTA), inhibitör (DMSO) ve denatüre edici ajanların (üre) da tannaz aktivitesine etkili olmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlara göre test edilen laktik asit bakterilerin ait tannaz enzim aktivitesi enzim etkileyen maddelerden etkilenmemştir. Bunun nedeni bu maddelerin düşük konsantrasyonda kullanılması olabilir. Benzer sonuçlar *L. plantarum* tannazı için Rodriguez ve ark (2008a) tarafından da bildirilmiştir. Kar ve ark. (2003) ise Tween 80 nin enzim aktivitesini artırırken 1 mM EDTA nın tannaz aktivitesini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Ürenin enzimlerin denatürasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Ancak çalışmamızda her hangi bir etkisi olmamasının nedeni düşük konsantrasyonda olması olabilir. Bu konsantrasyon enzim yapısının konformasyonel değişimine neden olamamış olabilir (Laidler ve Bunting, 1973).

Çalışmamızda maksimum aktivite gösteren 9 izolatin en yüksek tannaz aktivitesinde optimum sıcaklık $37^{\circ}C$, pH 5.0, substrat konsantrasyonu (metil gallat) 7 mM, tannik asit konsantrasyonu 1,75 mM tannaz aktivitesi elde edilmiştir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda ise araştırmacılar farklı sonuçlar bildirmişlerdir. Goel ve ark. (2011) *Enterococcus faecalis* için optimum sıcaklık $40^{\circ} C$, pH 6, substrat konsantrasyonu 0,25 mM metil gallat olarak bulunmuştur. Rodriguez ve ark. (2008a) *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T tannaz aktivitesi için optimum $37^{\circ}C$, pH 5.0 olarak bildirmişlerdir. Ayed ve Hamdi (2002) ise *Lactobacillus plantarum* tannaz enzim aktivitesi için optimum koşulları koşullarda $37^{\circ} C$ sıcaklık, pH 6, 2 g/L glukoz ve 7 g/L substrat olarak bildirmişlerdir. Natarajan ve ark. (2009) tarafından *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 maksimum tannaz aktivitesi 9,29 U/ml, optimum pH 6, reaksiyon sıcaklığını $30^{\circ}C$ ve tannaz aktivitesi için çalkalama hızını 125 rpm olarak bulduklarını rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışmada kendi izolatlarımız olan ve otomotize edilmiş riboprinter karakterizasyon sistemi ile tanımlanan *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *E. faecium*, *L. mesenteroides* ve *P. acidilactici* izolatlarının tannaz enzimi üretme potansiyelleri araştırılarak, en verimli izolatların tespiti ve en verimli izolatlarla tannaz enziminin kültür koşullarının belirlenmesi çalışılmıştır. *E. faecium* ve *L. curvatus*, *L. brevis* izolatları çalışmamızda ilk kez araştırılmıştır.

Sebze tanenleri, gıda ve yem olarak kullanılan bitkilerin birçok çeşidinde bulunmaktadır. Bitkinin kabuk, meyve, yaprak, kök gibi hemen hemen her kısmında yüksek konsantrasyonda tanen bulunmaktadır. Ayrıca fenolik bileşenleri içeren çay ve şarap gibi içeceklerde de bulunmaktadır. Vitaminlerin veya minerallerin faydalarına olumsuz tesir etmeleri, sindirimsel enzimlerini inhibe etmeleri ve kanser oluşumuna sebep olmalarından dolayı tanenler besinsel olarak gıdalarda arzu edilmez. Sağlığı olumsuz etkiledikleri için tanenlerin büyük miktarda yenilmesi tavsiye edilmemektedir. (Rodriguez ve ark., 2008a). Ayrıca bazı meyve sularının üretiminde acı-buruk tat (nar suyu, gilaburu) problem oluşturmakta, acılığın giderilmesi önemli işleme aşamalarından birini oluşturmaktadır. Bu amaçla çeşitli durultma teknikleri uygulanmaktadır. Depolanmış bira veya meyve sularında tannaz enzimi yardımıyla bulanıklık oluşumu önemli ölçüde azalma göstermiştir (Fitzpatrick ve ark., 2002). Test ettiğimiz laktik asit bakterileri tanenleri parçalayan tannaz aktivitesine sahip olduğundan bu meyve sularında acı ve buruk tadın giderilmesinde kullanılabilir. Enzim yerine bu laktik asit bakterileri direkt olarak ilave edilebilir. Bu doğal yolla acı ve buruk tat giderilmesinin yanında laktik asit bakterilerinin sahip olduğu antimikrobiyal aktivite özellikleri ile gıdalarda saf ürün eldesi ve böylece gıdanın raf ömrü uzatılmasında kullanılabilme potansiyeli olacaktır. Çalışmamız kapsamında bu izolatların daha ileriki çalışmalarla birlikte gıdalarda koruyucu olarak faydalanılacağını düşünmekteyiz.

Laktik asit bakterileri sahip oldukları özellikleri ve tannaz enzimi üretim yetenekleri ile gıda endüstrisinde özellikle şarap ve meyve suyu sektöründe kullanılabilme potansiyeline sahip olabilir. Şarap fermantasyonunda starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri arzu edilen tat ve aromanın eldesini sağlayacağı

gibi zararlı mikroorganizmaları da etkisiz hale getirilmesi açısından önem taşıyabilir.

KAYNAKLAR

- Aguilar, C.N. ve Gutierrez S.G., (2001a), "Review: Sources, Properties, Applications and Potential Uses of Tannin Acyl Hydrolase." *Food Science Tech. International*, **7**(5): 373-382.
- Aguilar, C. N., Augur, C., Favela-Torres, E., Viniegra-Gonzalez, G. (2001b), "Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **26**: 296-302.
- Aguilar, C.N., Rodriguez, R., Gutierrez S.G., Augur, C., Favela, T.E., Prado B.L.A., Ramirez C.A., Contreras E.J.C. (2007), "Microbial tannases:Advances and Perspectives." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 47-59.
- Albertse, E. H. (2002), "Cloning, Expression and Characterization of Tannase from *Aspergillus* Species", PhD Thesis, University of the Free State, **122**, South Africa.
- Andrade, Jr., R. G., Dalvi, L. T., Silva, Jr., J. M. C., Lopes, G. K. B., Alonso, A., Hermes-Lima, M. (2005), "The antioxidant effect of tannic acid on the vitro copper-mediated formation of free radicals", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **437**: 1-9.
- Aoki, K., Shinke, R., Nishira, H. (1976), "Chemical composition and molecular weight of yeast tannase", *Agricultural and Biological Chemistry*, **2**: 297-302.
- Arıcı, M. (2005), " Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Çoğalması Üzerine Patulinin Etkisi," *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **2** (1): 36-43.
- Ayed, L., Hamdi, M. (2002), "Culture conditions of tannase production by *Lactobacillus plantarum*", *Biotechnology Letters*, **24**: 1763-1765.
- Bajpai, B. and Patil, S., (1996), Tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity of *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium* and *Trichoderma*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**: 217-220.

- Bajpai, B. and Patil, S., (1997), Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of *fungi imperti*, *Enzyme and Microbial Technology*, **20**: 612-614.
- Banerjee, R. (2004), "Gallic acid", Concise Encyclopedia of Bioresource Technology, 629-634.
- Banerjee, D., Mondal, K. C., Pati, B. R. (2001), "Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9", *Journal of Basic Microbiology*, **41** (6): 313-318.
- Barthomeuf, C., Regerat, F., Pourrat, H. (1994), "Production, Purification and Characterization of a Tannase from *Aspergillus niger* LCF 8", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **77** (3): 320-323.
- Batra, A., Saxena, R.K. (2005), "Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*", *Process Biochemistry*, **40**: 1553-1557.
- Belmares, R., Contreras-Esquivel, J. C., Rodriguez-Herrera, R., Coronel, A. R., Aguilar, C. N. (2004), "Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry," *Lebensm.-Wiss. U.-Technology*, **37**: 857-864.
- Belur, P.D. ve Mugeraya G. (2011), "Microbial Production of Tannase: State of the Art." *Research Journal of Microbiology*, **6**: 25-40.
- Bhardwaj, R., Singh, B., Bhat, T. K. (2003), "Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* MTCC 2425", *Journal of Basic Microbiology*, **43** (6): 449-461.
- Bhat, T. K., Singh, B., Sharma, O. P. (1998), "Microbial Degradation of Tannins; A Current Perspective", *Biodegradation*, **9**: 343-357.
- Bhat, T. K., Makkar, H. P.S., Singh, B. (1997), "Preliminary Studies on Tannin Degradation by *Aspergillus niger* Van Tieghem MTCC 2425," *Letters in Applied Microbiology*, **25**: 22-23.

- Bravo, L., Abia, R., Eastwood, M. A., Saura-Calixto F. (1994), "Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output," *British Journal of Nutrition*, **71**: 933-946.
- Cruz-Hernandez, M., C. Augur, R. Rodriguez Contreras-Esquivel, J. and Aguilar, C.N., (2006). Evaluation of culture conditions for tannase production by *Aspergillus niger* GH1. *Food Technol. Biotechnol.*, **44**: 541-544.
- Cuozzo, S.A., Sesma, F., Palcios, J.M., Holgado, A.R. ve Raya, R.R. (2000), "Identification and Nucleotide Sequence of Genes Involved in The Synthesis of Lactocin 705", A Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705, *FEMS Microbiology Letters*, **185**: 157-161.
- Çoşkun, F. (2006), "Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular," *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **2**: 27-33.
- Coşkun-Arı, F.F., (2003a), Western Blotlama Yöntemi ile Protein Tespiti. İçinde: Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı-I. Karaöz, E., Ovalı, E. (-eds) Isparta Türkiye, 189-198.
- Çotuk, A., Anđ-Küçüker, M. (1992), *Biyologlar için Mikrobiyoloji Laboratuar Kılavuzu*, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 127-128.
- Deet, H.C. ve Tamime, A.Y. (1981), "Yoghurt: Nutritive and Therapeutic Aspects," *Journal of Food Protection*, **44** (1): 78-86.
- Deschamps, A. M., Otuk, G., Lebeault, J. (1983), "Production of Tannase and degradation of Chestnut Tannin by Bacteria", *Journal of Fermentation Technology*, **61** (1): 55-59.
- Dinçer, E. (2007), "Et ve Et Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Bunların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

- Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., Nes, I.F. (1998), "Comparative Studies of Class I α Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria," *Applied And Environmental Microbiology*, **64** (9): 3275-3281.
- Etöz, D. (2006), "Kefirden izole edilen maya ve bakterilerin bazı patojen mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkisi", Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 91 s, Ankara.
- Fitzpatrick, D.E., Bing, B., Maggi, D.A., Fleming, R.C, O'Malley, R.M. (2002), Vasodilating procyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci*. **957**: 78-89.
- Fröhlich, B., Niemetz, R., Gross, G.G., (2002), Gallotannin Biosynthesis: Two New Galloyltransferases from *Rhus tryphina* Leaves Preferentially Acylating Hexa and Heptagalloylglucoses, *Journal Planta.*, **216**: 168-172.
- Ganga PS, Nandy SC, Santappa M (1977). Effect of Environmental Factors on The Production of Fungal Tannase. *Leather Sci*. **24**: 8-16.
- Gilliand, S.E. (1990), "Health and Nutritional Benefits from Lactic acid bacteria," *FEMS Microbiology Reviews*, **87**: 175-188.
- Goel, G., Puniya, A. K., Singh, K. (2005), "Tannic acid Resistance in Ruminant Streptococcal Isolates," *Journal of Basic Microbiology*, **45** (3): 243-245.
- Gonçalves, H. B., Riul, J. A., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. (2011), "Extracellular Tannase from *Emericella nidulans* Showing Hypertolerance to Temperature and Organic solvents," *Journal of Molecular Catalysis*, **71**: 29-35.
- Graham, H.N., (1992), "Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry," *Prev. Med.*, **21**: 334–350.
- Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., Hagermann, A. E. (2002), "Determination of Hydrolyzable Tannins (Gallotannins and Ellagitannins) after Reaction with Potassium Iodate", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 1785-1790.

- Haslam, E. and Tanner, R.J.N., (1970), "Spectrophotometric assay of tannase," *Phytochemistry*, **9**: 2305–2309.
- Haslam E (1996). "Natural Polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action". *J. Nat. Prod.*, **59**: 205-215.
- Hatamoto, O, Watarai, T., Kikuchi, M., Mizusawa, K., Sekine, H. (1996), "Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*", *Gene*, **175**: 215 – 221.
- Iwamoto, K., Tsuruta, H., Nishitani Y., Osawa R. (2008), "Identification and Cloning of A Gene Encoding Tannase (Tannin Acylhydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T," *Systematic and Applied Microbiology*, **31**: 269-277.
- Kanberoğlu, B. (2006), "Zeytin Karasuyunun Biyolojik Yolla İyileştirilmesinde Tannaz Enziminin Etkisi," Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İzmir.
- Kar, B., Banerjee, R., Bhattacharyya B.C., (2003), "Effect of Additives on The Behaviorual Properties of Tannin Acyl Hydrolase." *Process Biochemistry*, **38**: 1285-1293.
- Keskin, N., Çökmüş, C. (Ed) (2010), Prokaryotik Çeşitlilik, İçinde: "*Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*," 11.Baskıdan Çeviri; Palme Yayıncılık, Ankara, 375-378.
- Khadem S, Marles RJ (2010). "Monocyclic Phenolic acids; Hydroxy-and Polyhydroxybenzoic acids: Ocurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules*, **15**: 7985-8005.
- Khanbabaee, K. ve Ree, T. (2001), "Tannins: Classification and Definition," *Natural Product Reports*. **18**: 641-649.
- Khan, N. S., Ahmad, A., Hadi, S. M. (2000), "Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA," *Chemico-Biological Interactions*, **125**: 177-189.

- Kıvanç, M. (2002), Bakteriyoloji Ders Notları, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Pinto, C. and Egounlety, M. (2007). "Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures." *Int. J. Food Microbiol.* **114**: 342-351.
- Kumar, R. A., Gunasekaran, P., Lakshmanan, M. (1999), "Biodegradation of Tannic Acid by *Citrobacter freundii* Isolated from A Tannery Effluent," *Journal of Basic Microbiology.* **39**: 161-168.
- Kurt, Ş. Ve Zorba, Ö. (2005), "Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları," *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, **16** (1): 77-83.
- Kwon, T., Shim, S. ve Lee J. H., (2008), Characterization of Lactobacilli with Tannase Activity Isolated from Kimchi, *Food Science and Biotechnology* ; **17** (6): 1322-1326.
- Lagemaat, J., Pyle, D. L. (2005), "Modelling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid-containing solid-state fermentation for tannase production", *Process Biochemistry*, **40**: 1773-1782.
- Lekha, P. K., Lonsane, B. K. (1994), "Comparative Titres, Location and Properties of Tannin Acyl Hydrolase Produced by *Aspergillus Niger* PKL 104 in Solid-State, Liquid Surface and Submerged Fermentations", *Process Biochemistry*, **29**: 497-503.
- Lekha, P. K., Lonsane, B. K. (1997), "Production and Application of Tannin Acyl Hydrolase : State of Art," *Advances in Applied Microbiology*, **44**: 215 – 260.
- Libuchi, S., Minoda, Y., Yamada, K. (1968), "Studies on Tannin Acyl Hydrolase of Microorganisms. Part III. Purification of the Enzyme and Some Properties of It ", *Agricultural and Biological Chemistry*, **32** (7): 803-809.
- Madigan, M.T., Martinko, M.M. (2009), "*Brock Biology of Microorganisms*," Twelfth Edition, Pearson Education 378-379.

- Mahedran, B., Raman, N., Kim, D.,J. (2006) "Purification and Characterization of Tannase from *Paecilomyces variotii*: Hydrolysis of Tannic Acid Using Immobilized Tannase," *Applied Microbiology and Biotechnology*, **70** (4): 444-450.
- Makkar, H. P. S., Singh, B., Dawea, R. K. (1988), "Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine Rumen," *British Journal of Nutrition*, **60**: 287-296.
- Metin, K., (2007), Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. İçinde: Moleküler Biyoloji Protein Sentezi ve Yıkımı.(Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M.,Tanyolaç, B.-eds) Nobel, Ankara, Türkiye 596-597.
- Mingshu, L., Qiang, H., Dongying, J. (2006), "Biodegradaton of Gallotannins and Ellagitannins," *Journal of Basic Microbiology*, **46** (1): 68-84.
- Mondal, K.C., Banerjee, D., Jana, M. ve Pati, B.R., (2001), Colorimetric Assay Method for Determination of the Tannin Acyl Hydrolase Activity, *Analytical Biochemistry*, **295**: 168-171.
- Mondal, K. C., Pati, B. R. (2000), "Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6," *Journal of Basic Microbiology*, **40** (4): 223-232.
- Mukherjee, G. ve Banerjee, R., "Biosynthesis of tannase and gallic acid from tannin rich substrates by *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*," *Journal of Basic Microbiology*, **44** (1): 42-48.
- Nakamura, Y., Tsuji, S., Tonogai, Y. (2003), "Method for analysis of Tannic Acid and Its Metabolites in Biological Saples: application to Tannic Acid Metabolism in the Rat," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 331-339.
- Natarajan, K., Rajendran, A. (2009), "Effect of Fermentation Parameters on Extra Cellular Tannase Production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407," *E-Journal of Chemistry*, **6**(4): 979-984.

- Nishitani, Y. ve Osawa, R., (2003), A Novel Colorimetric Method to Quantify Tannase Activity of Viable Bacteria, *Journal of Microbiological Methods*, **54**: 281-284.
- Nishitani, Y., Sasaki, E., Fujisawa, T. ve Osawa, R. (2004), Genotypic Analyses of Lactobacilli with A Range of Tannase Activities Isolated from Human Feces and Fermented Foods. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**: 109-117.
- Nishitani, Y. ve Osawa, R. (2005), Deceptive Halo Formation by Tannase-Defective Bacteria on Tanin-Treated Plate Media. *Microbes Environmental*, **20** (2): 117-119.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. (1993), Classification of Oligomeric Hydrolysable Tannins and Specificity of Their Occurrence in Plants. *Phytochemistry*, **32**: 507-521.
- Ong, K. C., Khoo, H. E., Das, N. P. (1995), “Tannic acid inhibits insulin-stimulated lipogenesis in rat adipose tissue and insulin receptor function in vitro,” *Experientia*, **51** (6): 577-584.
- Osawa, R., Kuroiso, K., Goto, S., ve Shimizu, A. (2000), Isolation of Tannin-Degrading Lactobacilli from Humans and Fermented Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (7): 3093-3097.
- Osawa, R. (1990), Formation of a Clear Zone on Tannin-Treated Brain Heart Infusion Agar by A *Streptococcus* sp. Isolated from Feces of Koalas. *Applied and Environmental Microbiology*, **56** (3): 829-831.
- Osawa, R., Fujisawa, T., Sly. L.I., (1995a), *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; Gallate Degrading Organisms Formerly Assigned to *Streptococcus bovis*. *System. Appl. Microbiol.* **18**: 74-78.
- Osawa, R., Walsh, T.P., (1993), Visual Reading Method for Detection of Bacterial Tannase. *App. Environ. Microbiol.* **59**: 1251-1252.
- Öztürk, A.D. (2006), “Production of Tannase by *Aspergillus niger*”, Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara.

- Pinto G, Couri S, Goncalves E (2006) “Replacement of methanol by ethanol on gallic acid determination by rhodanine and its impacts on the tannase assay,” *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, EJEAFCHe 5:5. <http://ejeafche.uvigo.es/5> (5)2006/009552006F.htm, 1560-1568.
- Powell, C., Clifford, M. N., Opie, S.C., Ford, M.A., Robertson, A. and Gibson, C.L. (1993), “Tea cream formation: the contribution of black tea phenolic pigments determined by HPLC,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **63**: 77 – 86.
- Purohit, J.S., Dutta, J.R., Nanda, R.K. ve Banerjee R. (2006), “Strain Improvement for Tannase Production from Co-Culture of *Aspergillus foetidus* ve *Rhizopus oryzae*,” *Bioresource Technology*, **97**: 795-801.
- Rana, N.K. and Bhat, T.K., (2005). Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. *J. Gen. Applied Microbiol.*, **51**: 203-212.
- Reed, J.D. (1995) – “Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes”. *J. Anim. Sci.* **73**: 1516-1528.
- Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete J.M., Rivas B., Felipe F.L., Cordovés C.G., Mancheño J.M., Muñoz R., (2009), Food Phenolics and Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **132** (2-3): 79-90.
- Rodriguez, H., Rivas, B., Cordoves, C.G., Munoz R. (2008a), Characterization of Tannase Activity in Cell-Free Extracts of *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T. *International Journal of Food Microbiology*, **121**: 92-98.
- 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.
- Rozès, N. ve Peres, C., (1998) , “Effects of Phenolic Compounds on The Growth and The Fatty Acid Composition of *Lactobacillus plantarum*,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, **49**: 108–111.

- Sabu, A., Kiran, G.S., Pandey, A., (2005), "Purification and Characterization of Tannin Acyl Hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620." *Food Technology and Biotechnology*, **43**: 133-138.
- Sabu, A., Augur, C., Swati, C. and Pandey, A., (2006). Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation. *Process Biochem.*, **41**: 575-580.
- Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A., (2004), "Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects." *Marcel Dekker Inc.*, 628p, New York, USA.
- Sarıkaya, Ö. (2005), "Funguslar ile Gallik Asit Üretiminde Çeşitli Bitkisel Atıkların Kullanılabilirliğinin Araştırılması," Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Eskişehir.
- Sasaki, E., Shimada, T., Osawa, R., Nishitani, Y., Spring, S. and Lang, E. (2005), "Isolation of tannin-degrading bacteria isolated from feces of the Japanese large wood mouse, *Apodemus speciosus*, feeding on tannin-rich acorns". *Syst Appl Microbiol.* **28**: 358–365.
- Saxena, S. and Saxena, R.K., 2004, "Statistical optimization of Tannase production from *Penicillium variable* using fruits (chebulic myrobalan) of *Terminalia chebula*," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **39**: 99-106.
- Seth, M., Chand, S. (2000), "Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori* – optimization of process parameters", *Process Biochemistry*, **36**: 39-44.
- Sharma, S., Bhat, T. K., Dawra, R. K. (2000), "A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine," *Analytical Biochemistry*, **279**: 85-89.
- Sharma, O. P., Bhat, T. K., Singh, B. (1998), " Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catecol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid ", *Journal of Chromatography*. **822**: 167-171.

- Sharpe, M.E ve Franklin, J.G. (1962), "Production of Hydrogen Sulfide by Lactobacilli with Special References to Strains Isolated from Cheddar Cheese," 8th., *Int.Cong.Microbiol*, 46.
- Sharpe, M.E. (1979), "Identification of the Lactic acid bacteria." In Love-Lock (Editor), *Identification Methods for Bacteriologists*. Society for Applied Bacteriology Technical Series 14. Academic Press, London, 243-259.
- Skene, I.K. and Brooker, J.D. "Characterization of Tannin Acylhydrolase Activity in The Ruminal Bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe*, **1** (6): 321-327.
- Soong, Y-Y., Barlow, P. J. (2006), "Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity," *Food Chemistry*, **97**: 524-530.
- Speck, M.L. (1976), *Compendium Of Methods For The Microbiological Examination Of Foods*, *American Public Health Association*, Washington, DC, 89.
- Srivastava, R. C., Husain, M. M., Hasan, S. K., Athar, M. (2000), "Green tea polyphenols and tannic acid act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties," *Cancer Letters*, **153**: 1-5.
- Stiles, M.E., Holzapel, W.H. (1997), "Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy." *International Journal Food Microbiol*, **36**: 1-29.
- Şahin, İ. (1995), "Endüstriyel Mikrobiyoloji". Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 151s, Bursa.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R. (1989), 3 ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, Eskişehir, No.74: 23-25, 240.
- Valeer, B.L., Ulmer, D.D., (1972), "Biochemical Effect of Mercury, Cadmium and Lead." *Annual Review in Biochemistry*, **41**: 91-128.

- Vaquero, I., Marcobal, A., Munoz, R.(2004), “Tannase activity by Lactic acid bacteria from grape must and wine,” *International Journal of Food Microbiology*, **96** (2): 199-204.
- Visser, R., Holzapfel, W.H., Bezuidenhout, J.J., Kotze, J.M. (1986), “Antagonism of Lactic Acid Bacteria against Phytopathogenic Bacteria,” *Applied and Environmental Microbiology*, **52** (3): 552-555.
- Yamada K, Iibuchi S, Minoda Y (1968). Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms. Isolation and identification of producing molds and studies on the conditions of cultivation. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 233-240.
- Yu, X.,Li, Y., Wu, D. (2004), “Enzymatic synthesis of gallic acid esters using microencapsulated tannase: effect of organic solvents and enzyme specificity,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **30**: 69–73.
- Yugarani, T., Tan, B. K. H., Teh, M., Das, N. P. (1992), “Effects of Polyphenolic Natural Products on the Lipid Profiles of Rats Fed High Fat Diets,” *Lipids*, **27**: 181-186.
- Zhong, X., Peng, L., Zheng, S. (2004). “Secretion, Purification, and Characterization Of A Recombinant *Aspergillus Oryzae* Tannase in *Pichia Pastoris*,” *Protein Expression And Purification*, **36**: 165–169.
- Zhu, J., Filippich, L. J. (1995), “Acute intra-abomasal toxicity of tannic acid in sheep,” *Veterinary and Human Toxicology*. **37**: 50-54.