

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra Sündüz YİĞİTTEKİN

***Bacillus* sp. 'den TANNAZ ÜRETİMİ VE ENZİM
KARAKTERİZASYONU**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2017

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Bacillus* sp. 'den TANNAZ ÜRETİMİ VE ENZİM
KARAKTERİZASYONU**

Esra Sündüz YİĞİTTEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2017 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Sadık DİNÇER
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Sevil TOROĞLU
ÜYE

.....
Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2015-3782**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Bacillus* sp. 'den TANNAZ ÜRETİMİ VE ENZİM KARAKTERİZASYONU**

**Esra Sündüz YİĞİTTEKİN
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Yıl: 2017, Sayfa: 83
Jüri : Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Sevil TOROĞLU
: Prof. Dr. Osman GÜLNAZ

Bu çalışmada, toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* sp. suşlarından tannaz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bakterilerin tannaz enzimi üretimi %1 tannik asit-%2.5 agar içerikli besiyerinde 37°C'de 96 saatlik inkübasyondan sonra mikroorganizmaların etrafında oluşan şeffaf zonlarla saptanmıştır. *Bacillus* sp. 2.11'den izole edilen enzim en iyi aktivite gösterdiği için bu suş çalışmada kullanılmıştır. *Bacillus* sp. 2.11'nin VITEK-2 Compact Sistem ile *Bacillus coagulans* olduğu belirlenmiştir.

Bacillus coagulans suşundan üretilen tannazın SDS-PAGE analizinde molekül ağırlıkları 17 kDa, 14 kDa ve 5 kDa olan 3 band tesbit edilmiştir. *Bacillus coagulans* ekstraselüler tannaz enzimi optimum aktivitesini 30°C ve pH 4.2'de göstermiştir. *Bacillus coagulans* ekstraselüler enzimi 80°C'de 15 dakika süreyle aktivitesini %64.80 koruyabilmiştir. *Bacillus coagulans* enzim aktivitesi, 1mM HgCl₂ ile (%74.7) aktivitesini koruyabilmiş, 1mM ve 5mM MnCl₂ ve 5mM FeCl₂ (%0) ile önemli derecede inhibe olmuştur. Bu sonuçlara göre, *Bacillus coagulans* enzimi sahip olduğu karakteristik özelliklerden dolayı endüstriyel alanda kullanımının uygun olduğu önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus coagulans*, tannaz, tannik asit, karakterizasyon

ABSTRACT

MSc THESIS

TANNASE PRODUCTION AND ENZYME CHARACTERIZATION FROM *Bacillus sp.*

Esra Sündüz YİĞİTTEKİN

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Year: 2017, Pages:83
Jury : Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Sevil TOROĞLU
: Prof. Dr. Osman GÜLNAZ

In this study, the tannase enzyme from *Bacillus sp.* strains isolated from soil samples were produced and characterized. Tannase production of these strains were determined by production of clear zones around the colonies on the 1% tannic acid- 2.5% agar containing medium, after 96 hours incubation at 37°C. The enzymes isolated from *Bacillus sp.* 2.11 strain used in this study because they showed the best activity. *Bacillus sp.* 2.11 was determined to be *Bacillus coagulans* by the VITEK-2 Compact System.

Three bands with molecular weights of 17 kDa, 14 kDa and 5 kDa were detected by SDS-PAGE analysis of the tannase produced from *Bacillus coagulans* strain. *Bacillus coagulans* showed extracellular tannase enzyme optimum activity at 30°C and pH 4.2. The *Bacillus coagulans* extracellular enzyme was able to maintain its activity for 64 minutes at 80 °C for 15 minutes. The enzyme activity of *Bacillus coagulans* was able to maintain its activity with 1mM HgCl₂ (74.7%) and was significantly inhibited by 1mM and 5mM MnCl₂ and 5mM FeCl₂ (0%). According to these results, *Bacillus coagulans* due to the characteristics of the enzyme, it can be suggested that industrial use is appropriate.

Key Words: *Bacillus coagulans*, tannase, tannic acid, characterization

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu çalışmada topraktan izole edilen *Bacillus* sp. türlerinin tannaz üretimi ve karakterizasyonu yapılmıştır.

Bacillus sp.' ler Çukurova Üniversitesi Kampüsünde doğal olarak yetişen *Cupressus arizonica* Greene (Mavi servi), *Pinus brutia* Tenore (Kızılcım), *Platanus orientalis* L. (Doğu Çınarı) ve *Thuja orientalis* L. (Doğu Mazısı) ağaçlarının rizosfer topraklarından izole edilmiştir. İzole edilen bakteriler tannik asitli besiyerinde üretilmiştir. Toplamda 51 suş izole edilmiş, bunlardan 23 suş besiyerinde zon oluşturduklarından tannaz pozitif, 28 suş zon oluşturmadığı için tannaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu bakterilerden 4 tanesi sıvı tannik asitli besiyerinde üretilerek tannaz üretimi en yüksek olan *Bacillus* sp. 2.11 suş belirlenmiştir. Yapılan deneylerde *Bacillus* sp. 2.11 ekstraselüler enzimi kullanılmıştır.

İzole edilen bakteri suşlarının hepsi yapılan gram boyama ve mikroskopik incelemede gram pozitif ve çubuk şeklinde bakteriler olarak tanımlanmışlardır.

VITEK-2 Compact Sistem tür tanımlama testinde ise en iyi tannaz aktivitesi gösteren *Bacillus* sp. suşları %95 olasılıkla *Bacillus coagulans* olarak tanımlanmıştır.

Bacillus coagulans ekstraselüler enzim aktivitesi 0,313 $\mu\text{mol/mL}$ olarak tesbit edilmiştir.

Bacillus sp. suşlarının 30.saatte logaritmik faza başladığı ve 38.saatten sonra yavaş yavaş durağan faza geçtikleri spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenmiştir.

Bacillus coagulans ekstraselüler tannazın optimum pH'sı 4.2 olarak tesbit edilmiş, pH 3.0, 3.4, 3.8, 4.6, 5.0, 5.4, 5.8, 6.2, 6.6, 7.0, 7.4, 7.6, 8.0, 8.4, 8.8, 9.0, 9.2, 9.6, 10.0, 10.4'de sırasıyla %14, %26, %45, %85, %77, %52, %41, %30, %46, %37, %61, %64, %58, %37, %41, %49, %35, %36, %23, %16 aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. *Bacillus coagulans* ekstraselüler enziminin bütün pH değerleri

dikkate alındığında enzimin asidik pH koşullarında kullanılacak özellikte olduğu gözlenmiştir.

Bacillus coagulans ekstraselüler tannaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 30 °C olarak bulunmuştur. Ayrıca enzimin 20°C'de %22, 40°C'de %55, 50°C'de %59, 60°C'de %54, 70°C'de %47, 80°C'de %20, 90°C'de %10, aktivite gösterdiği, 100°C'de ise %0 oranında inhibe olduğu saptanmıştır. *Bacillus coagulans* ekstraselüler enziminin 20°C ile 70°C aralığında yüksek bir aktiviteye sahip olduğu ve bu özelliği ile mezofilik özellikte olduğu gözlemlenmiştir.

Bacillus coagulans suşunun ekstraselüler enziminin 5 dakika süreyle ön inkübasyon uygulaması sonunda 80°C'de %40.15, 90°C'de %1.51 ve 100°C'de %39.42, 10 dakika süreyle ön inkübasyon uygulaması sonunda 80°C'de %61.47, 90°C'de %22.60 ve 100°C'de %25.65, 15 dakika süreyle ön inkübasyon uygulaması sonunda 80°C'de %64.80, 90°C'de %33.40 ve 100°C'de %59.40, 20 dakika süreyle ön inkübasyon uygulaması sonunda 80°C'de %57.87, 90°C'de %54.83 ve 100°C'de %62.43, 25 dakika süreyle ön inkübasyon uygulaması sonunda 80°C'de %41.67, 90°C'de %37.62 ve 100°C'de %38.13, 30 dakika süreyle ön inkübasyon uygulaması sonunda 80°C'de %56, ve 100°C'de %18.56 kalan enzim aktivitesi elde edilirken 30 dakika 90°C'de %0 oranında dramatik şekilde inhibe olduğu ortaya konmuştur. Enzimin termal stabilitesinin en yüksek olduğu değerin 80°'de 15 dakikalık ön inkübasyon (%64.80) olduğu saptanmıştır.

Bacillus coagulans tannaz enzim üzerine, enzim-kimyasal madde karışımının son konsantrasyonu 1-5 mM olacak şekilde hazırlanmış inhibitör ve divalent katyonların etkisini saptamak amacıyla enzim 37°C'de 1 saat ön inkübasyona tabii tutulmuş ve aktivite bakılmıştır. *Bacillus coagulans* ekstraselüler tannaz enzimi, 1 mM ve 5 mM konsantrasyon sırasıyla olacak şekilde EDTA %26.1 ve %45.4 CaCl₂'de %18.3 ve %13.3, HgCl₂'de %74.7 ve %35.6, ZnCl₂'de %37.6 ve %30.4, MgCl₂'de %48.4 ve %46.2, NiCl₂'de %10,3 ve %52.2, CuCl₂'de %43 ve %22.1, CoCl₂'de %41.4 ve %28 ve 1mM FeCl₂'de %20.5 aktivitesini

koruduğu görülürken $MnCl_2$ 'de her iki konsantrasyonda ve 5mM $FeCl_2$ 'de %100 oranında önemli derecede inhibe olduğu saptanmıştır.

Bacillus coagulans tannaz enziminin SDS-PAGE analizi sonucunda moleküler ağırlıkları 17 kDa, 14 kDa ve 5 kDa olan 3 band belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Üniversite hayatım boyunca beni bilgi ve deneyimleriyle aydınlatan, yüksek lisans dönemim boyunca bana büyük sabır, anlayış ve güler yüzle davranan, tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde her türlü desteği sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e sonsuz teşekkür ve minnetimi sunarım.

Tez savunmam sırasında bilgi ve birikimleriyle bana katkıda bulunan değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Sevil TOROĞLU ve Prof. Dr. Osman GÜLNAZ'a, üniversiteye başladığımdan itibaren idolüm olan, bilgileriyle hep aydınlatan değerli hocam Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e, tez çalışma ve yazımı boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Nihan ARABACI ve Arş. Gör. Burak KOÇAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne kadar öğrendiğim herşeyde katkısı olan sevgili hocalarım Dr. Yasemin KAYA, Uzman Biyolog Sevim KAMIŞLI ve Dr. Sayım AKTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Tez aşamasında yardımlarını esirgemeyen, üniversite hayatımın bana kazandırdığı değerli arkadaşlarım Biyolog Mustafa GENÇOĞLU, Biyolog Ecem Gizem KIZILKAYA, Biyolog Çağrı UYAR ve Uzman Biyolog Rima ÇELİK'e, toprak örneği almamda yardımcı olan Uzman Biyolog Ferhat GÖL'e, laboratuvar arkadaşlarım Uzman Biyolog Fatıma Masume USLU, Biyolog Anıl DELİK ve Biyolog Fatih SEZER'e teşekkür ederim.

Bana arkadaştan çok kardeş olan, her türlü zorluğu ve mutluluğu beraber yaşadığım Biyolog Zehra BOLAT ve Biyolog Mutiye ARSLAN'a teşekkür ederim.

Hayatımdaki en değerli varlıklarım olan, maddi ve manevi desteklerini asla esirgemeyen, bugünlere gelmem için elinden geleni yapan ve hala yapıyor olan, sevgimi, minnettarlığımı ve teşekkürümü kelimelere sığdıramayacağım canım babam Suat YİĞİTTEKİN'e ve canım annem Remziye YİĞİTTEKİN'e, hayatımdaki iyi ve kötü günlerimi birlikte geçirdiğim, tez dönemim boyunca desteklerini hep gördüğüm kuzen değil kardeş bildiğim Reyyan Maşite YURTTAŞ ve Tayfun OSMANOĞLU'na sonsuz teşekkürümü sevgi ve saygıyla sunarım.

Tezimi 2210 C Öncelikli Alanlar kapsamında değerlendirip burs ile destek olan TÜBİTAK- BİDEB'e, bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na ve maddi desteklerinden dolayı Ç.Ü. Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET.....	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Bacillus coagulans</i> 'ın Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	2
1.2. Gallik Asit.....	4
1.3. Tanenler.....	5
1.3.1. Hidrolizlenebilir Tanenler.....	7
1.3.1.1. Gallotanenler.....	8
1.3.1.2. Elajitanenler.....	9
1.3.2. Kondanse Tanenler.....	9
1.3.3. Kompleks Tanenler.....	10
1.4. Tannaz.....	10
1.4.1. Tannaz Kaynakları.....	11
1.4.1.1. Bitkiler.....	11
1.4.1.2. Hayvanlar.....	12
1.4.1.3. Mikroorganizmalar.....	12
1.4.1.3.(1). Fungal Tannaz.....	13
1.4.1.3.(2). Bakteriyel Tannaz.....	14
1.4.1.4. Mikrobiyal Tannazın Biyokimyasal Özellikleri.....	16
1.4.2. Tannazın Uygulama Alanları.....	17

1.4.2.1. Hazır Çay.....	18
1.4.2.2. Şarap ve Bira Üretimi.....	19
1.4.2.3. Gallik Asitin Üretimi.....	19
1.4.2.4. Hayvan Yem Katkısı.....	20
1.4.2.5. Endüstriyel Atıksu Arıtımı.....	20
1.5. Çalışmanın Amacı.....	21
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	23
3. MATERYAL VE METOD.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	29
3.1.1.1. Plate Count Agar (PCA).....	29
3.1.1.2. Nutrient Agar.....	29
3.1.1.3. LB Broth.....	30
3.1.1.4. Tryptic Soy Agar (TSA).....	30
3.1.1.5. Tannik Asit-Agar Besiyeri.....	31
3.1.1.6. Enzim Üretim Ortamı.....	32
3.1.2. Enzim Aktivitesi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	33
3.1.2.1. Substratın Hazırlanışı.....	33
3.1.2.1.(1). 0,05 M Sitrata Tamponu.....	33
3.1.2.1.(2). 0,6 M NaOH.....	33
3.1.2.2. Reaksiyon Durdurucu Çözeltinin Hazırlanışı.....	33
3.1.2.3. Renklendirme Çözeltisi.....	33
3.1.2.4. Katı Besiyerinde Tannaz Aktivitesi için Boyama Çözeltisinin Hazırlanışı.....	33
3.1.2.5. Kalibrasyon Grafiği İçin Kullanılan Gallik asit çözeltisinin Çözeltisinin Hazırlanışı.....	34
3.1.3. SDS-PAGE Elektrofrezini İçin Kullanılan Çözeltiler.....	34
3.1.3.1. Solüsyon A (Monomer (akrilamid/bis) Çözeltisi).....	34

3.1.3.2. Solüsyon B (4X)	34
3.1.3.3. Solüsyon C (4X)	34
3.1.3.4. %10 SDS (Sodium dedocyl sulfat)	34
3.1.3.5. %10 Amonyum Persülfat (AMPS)	34
3.1.3.6. TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)	35
3.1.3.7. Örnek Yükleme Tamponu (62,5 mM Tris (pH 6.8), %2 SDS, %10 gliserol, 0,72M 2-β-merkaptolanol, %0,05 bromfenol mavisi)	35
3.1.3.8. Yürütme Tamponu (0,025M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH 8.3)	35
3.1.3.9. Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama Çözeltisi	35
3.1.3.10. Yıkama (Bağlanmamış Boyayı Uzaklaştırma 'Destaining' Çözeltisi)	35
3.1.4. pH Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar	36
3.1.4.1. Sitrat Tamponu	36
3.1.4.2. Tris-Maleat Tamponu	36
3.1.4.3. Tris [Tris (Hidroksimetil)-Aminometan] Tamponu	37
3.1.4.4. Karbonat-Bikarbonat Tamponu	37
3.2. Metod	38
3.2.1. <i>Bacillus sp.</i> Bakterilerinin İzolasyonu	38
3.2.2. Katı Besi Yerinde Tannaz Pozitif <i>Bacillus</i> Türlerinin Tespiti	38
3.2.3. Sıvı Besiyerinde Tannaz Enziminin Üretilmesi	39
3.2.4. Bakteri Büyüme Eğrisinin Türbidometrik Sayım Yöntemi (Optik Dansite (OD600)) ile Belirlenmesi	39
3.2.5. Tannaz Aktivitesi İçin Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	40
3.2.6. Tannaz Aktivitesi	40
3.2.7. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması ...	41
3.2.8. Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması	42
3.2.9. Enzimin Termal (Sıcaklık) Stabilesinin Saptanması	42

3.2.10. İnhibitör ve Divalent Katyonların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	42
3.2.11. SDS-PAGE Yöntemi ile Enzimin Moleküler Ağırlığının Saptanması	43
3.2.11.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması (%12'lik)	43
3.2.11.2. Yükleme Jelinin Hazırlanması (%5'lik)	43
3.2.11.3. Örneğin ve Standartın Hazırlanması	44
3.2.11.4. Enzim Örneklerinin SDS-PAGE Jeline Yüklenmesi ve Yürütülmesi	44
3.2.11.5. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Görüntülenmesi	45
3.2.12. Bakterilerin Gliserol Stok ile -86°C'de Uzun Süre Saklanması	45
3.2.13. Gliserol Stokta Bulunan Bakterilerin Yeniden Canlandırılması	45
3.2.14. VITEK-II Kompakt Sistem İle Bakteri İdentifikasyonu	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
4.1. Toprak Örneklerinden <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması	47
4.2. Tannaz Pozitif Olan İzolatların Saptanması	47
4.3. Bakterilerin İdentifikasyonu	48
4.4. Katı Besiyerinde Tannaz Aktivitesinin Belirlenmesi	50
4.5. Kalibrasyon Grafiğinden Eğim Değerinin Belirlenmesi	51
4.6. En Yüksek Tannaz Aktivitesi Gösteren Suşun Belirlenmesi	51
4.7. <i>Bacillus coagulans</i> Suşunun Büyüme Eğrisinin Türbidometrik Sayım Yöntemi (Optik Dansite (OD ₆₀₀)) ile Belirlenmesi	53
4.8. <i>Bacillus coagulans</i> Enziminin Optimum pH Aralığı	54
4.9. <i>Bacillus coagulans</i> Enziminin Optimum Sıcaklık Aralığı	56
4.10. <i>Bacillus coagulans</i> Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular	58
4.11. <i>Bacillus coagulans</i> Enzimi Üzerine İnhibitör ve Divalent Katyonların Etkisi	60
4.12. Enzimin SDS-PAGE Analizine Ait Bulgular	62

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. <i>Bacillus</i> ve <i>Lactobacillus</i> cinsleri arasında yer alan <i>Bacillus coagulans</i> bakterisinin temel özellikleri (Vecchi ve Drago, 2006)	2
Çizelge 1.2. Tannaz enziminin mikrobiyal kaynakları (Bhat ve ark., 1998; Aguilar, 2007; Belur ve Mugeraya, 2011)	15
Çizelge 1.3. Tannazın biyokimyasal özellikleri	17
Çizelge 3.1. Plate Count Agar besiyerinin bileşimi	29
Çizelge 3.2. Nutrient Agar besiyerinin bileşimi	30
Çizelge 3.3. LB Broth besiyerinin bileşimi	30
Çizelge 3.4. Tryptic Soy Agar'ın bileşimi	31
Çizelge 3.5. Tannik Asit içeren besiyeri bileşimi (Mondal, 2001)	32
Çizelge 3.6. Tannik Asit içeren besiyeri bileşimi (Mondal, 2001)	32
Çizelge 3.7. Sitrik Asit Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	36
Çizelge 3.8. Tris-Maleat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	37
Çizelge 3.9. Tris Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	37
Çizelge 3.10. Karbonat-Bikarbonat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	38
Çizelge 3.11. Tannaz aktivite tayini için kalibrasyon grafiği hazırlanması	40
Çizelge 3.12. Ayırma jelinin içeriği	43
Çizelge 3.13. Yükleme jelinin içeriği	44
Çizelge 4.1. Çeşitli Toprak Örneklerinden İzole Edilen Suşlar	47
Çizelge 4.2. Tannik asit-Agar besiyerinde tannaz pozitif ve negatif olan suşlar	48
Çizelge 4.3. <i>Bacillus coagulans</i> Ekstraselüler Tannaz Enzim Aktivitesine İnhibitör ve Divalent Katyonların Etkisi	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Gallikasitin kimyasal yapısı (Bhat, 1998).....	4
Şekil 1.2.	Taninin moleküler yapısı	6
Şekil 1.3.	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).	8
Şekil 1.4.	Kondense taninlerin yapısı.....	10
Şekil 1.5.	Tannik asidin yapısı ve tannazın hidrolitik ürünleri (gallik asit ve glukoz) (Mondal et al.,2001).....	11
Şekil 4.1.	<i>Bacillus</i> sp. 2.11 suşunun gram boyama mikroskopik görüntüsü	49
Şekil 4.2.	VITEK tür tanımlama testinin % olarak sonucu	49
Şekil 4.3.	<i>Bacillus</i> sp. 2.11 numaralı suşun boyama işleminden önceki ve sonraki görünümü	50
Şekil 4.4.	Tannaz Aktivesi İçin Kalibrasyon Grafiği	51
Şekil 4.5.	Tannaz aktivitesi gösteren en iyi 4 suşun gösterdikleri absorban değerlerinin karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.6.	<i>Bacillus coagulans</i> Suşunun Büyüme Grafiği	54
Şekil 4.7.	<i>Bacillus coagulans</i> Suşundan Elde Edilen Ekstraselüler Tannaz Enziminin Optimum pH'sı.....	55
Şekil 4.8.	<i>Bacillus coagulans</i> Ekstraselüler Tannaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değeri.....	56
Şekil 4.9.	<i>Bacillus coagulans</i> Ekstraselüler Tannaz Enziminin Termal Stabilitesi	59
Şekil 4.10.	<i>Bacillus coagulans</i> Tannaz Enziminin SDS-PAGE ve Zimogram Sonucu	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µM	: Mikromolar
µmol	: Mikromol
AMPS	: Amonyum persülfat
Atm	: Atmosfer
Bis	: N,N'-metilen-bis-akrilamid
CBB	: Coomassie Brilliant Blue
Da	: Dalton
EDTA	: Etilendiaminotetra-asetik asit
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
rpm	: Dakikada devir sayısı
sp.	: Species (tür, tekil)
spp.	: Species (tür, çoğul)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Tris	: 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin
UV	: Ultraviyole
U/mg	: Unit/miligram
U/mL	: Units per milliliter
Vmax	: Maksimum hız
v/v	: Hacim/Hacim (volume/volume)

w/v : Ağırlık/Hacim (weight/volume)

1. GİRİŞ

Dünyada nüfusun artması, teknolojinin gelişmesi, hastalıkların artması, yaşam koşullarını etkileyecek birçok kaynağın azalması ve çevre kirliliğinin artması sonucunda insanları doğal ve kirlilik düzeyini azaltacak olan ürünlere yöneltmiştir. Bilimin de gelişmesinin etkisi olarak mikroorganizmalar en çok tercih edilen canlılar olurken mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler ise en çok tercih edilen ürünlerdir.

Endüstriyel üretim, gıda sanayisi, farmakoloji ve tıp gibi birçok alanda mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bunun en büyük nedeni mikroorganizmaların kolaylıkla elde edilebilmesi ve üretilen ürünün saf olmasıdır.

Enzimlerin üretilmesi ve bu enzimlerin birçok alanda kullanılması mikroorganizma tercihini de önemli kılmaktadır. Tercih edilen bakteri türünün enzimin yapısı ile ilgisi olmakla birlikte kolay izole edilebilmesi ve patojen/non patojen olmasına göre belirlenmektedir.

Günümüzde yapılan çalışmalarda ve enzim üretimlerinde *Bacillus* sp. suşları tercih edilmektedir. *Bacillus coagulans* ise son zamanlarda probiyotik olmasından dolayı çokça kullanılmaya başlanmıştır. Probiyotik özelliği sağlık açısından yararlı olması bu bakterinin önemini ve kullanılabilirliğini artırmaktadır.

Tanenler bitkisel ürünlerin tohumlarında, yapraklarında ve köklerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Çay, meyve suları ve şarap gibi birçok içeceklerde de bu bileşikler bulunmaktadır. Tanenler sindirim enzimlerini inhibe ettikleri için beslenmede istenmeyen (antinutritif) maddelerdir. Vitamin ve minerallerin kullanımını etkilemekle birlikte kanser oluşumu ile ilişkili olduğu ve hepatoksik olduğu belirlenmiştir. Bu sebeplerden dolayı sağlık açısından riskli bileşiklerdir (Rodriguez ve ark, 2008).

Tannaz biyoteknolojik öneme sahip olan enzimlerin önemli bir grubudur. Bu enzim tanenleri galik asit ve glukoza parçalar ve karboksil ester hidrolazlar ailesinde yer almaktadır (E.C. 3.1.1.20. tanen açilhidrolaz). Tannaz hidrolize

olabilen tanenlerdeki ester ve depsid bağlarını hidrolize eder ve böylece gallik asit ve glukoz ortaya çıkarmaktadır. Tannaz *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Lactobacillus* ve *Bacillus* dahil olmak üzere mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Mikrobiyal tannaz genellikle ekstraselüler enzimlerdir (Sarıkaya, 2005; Yao ve ark., 2014).

1.1. *Bacillus coagulans*'ın Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Bacillus coagulans; Gram (+), fakültatif aerobik, patojen olmayan, laktik asit üreten ve sporlu bir bakteridir. Probiyotikler içerisinde yer alan bu bakterilerin geliştiği optimum sıcaklık 35-50°C arasında olup optimum pH'ı 5.5-6.5 arasında değişebilmektedir. *Bacillus coagulans*'ın genel özellikleri Çizelge 1.1'de verilmiştir (Anonim, 2003).

Çizelge 1.1. *Bacillus* ve *Lactobacillus* cinsleri arasında yer alan *Bacillus coagulans* bakterisinin temel özellikleri (Vecchi ve Drago, 2006)

Özellikler	<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Katalaz	+	+	-
Oksidaz	-	+	-
Nitrat indirgeme	-	+	-
Spor	+	+	-
Hareketlilik	+	+	-/+
Laktik asit üretimi	+	-	-/+
Meso-diaminopimelik asit	+	+	-/+

Lactobacillus sporogenes bakterisi izole edildikten sonra tanımlanmış ve *B. coagulans* ile benzer karakteristik özellikler göstermesi nedeni ile *B. coagulans* olarak Horowitz-Wlassowa ve Nowotelnov tarafından (1933) sınıflandırılmıştır. Spor oluşturan, laktik asit üreten, fakültatif veya aerobik olan ve katalaz üreten bakterilerin *Bacillus* cinsi içerisinde sınıflandırılması gerektiği "Bergey's Manuel

of Determinative Bacteriology” kitabının 8. Baskısında bildirilmiştir (Vecchi ve Drago, 2006).

Bacillus coagulans, diğer *Bacillus* türlerinden; hücrede endosporun oluşum yerinin *Bacillus coagulans*'da terminal diğer *Bacillus*'larda sentral veya subterminal olması, sitokrom-c oksidazın olmayışı ve nitratı nitrite indirgeyememesi nedenleriyle farklılık göstermektedir. *Bacillus coagulans* asit üretmesine rağmen maltoz, manitol, rafinoz ve sükrozun fermentasyonundan gaz üretmemektedir. Asit üretmesinden dolayı süt ürünleri, meyve ve sebzelerde bozulmalara neden olmaktadır (Anderson, 1984; Cosentino ve ark., 1997; Ramon-Blanco ve ark., 1999; DeClerk ve ark., 2004). Ancak laktik asit ve bazı suşların da termostabil alfa-amilaz gibi diğer ürünleri üretmesi nedenleriyle endüstriyel açıdan önem taşımaktadır (Payot ve ark., 1999; Batra ve ark., 2002; Yoon ve ark., 2002).

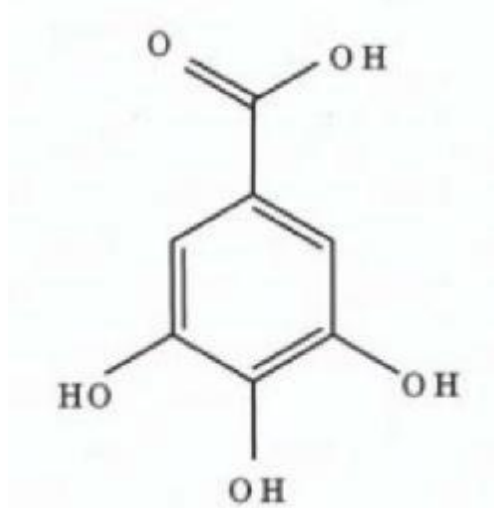
Bacillus coagulans, spor formunun dış tabakasının kalın olması nedeniyle aside, sıcağa, kimyasallara ve radyasyona oldukça dayanıklıdır. Kanatlı hayvanlara su veya yemle birlikte verildiğinde ve uygun koşullarda (vücut sıcaklığı, asitliği, safra ve diğer salgılarda) spor formundan aktif vejetatif hücrelere dönüşebilmektedir. *Bacillus coagulans*'ın spor formu termostabildir. Ayrıca bu bakterinin spor formu, canlılığını mide ve safra salgılarından etkilenmeden sürdürebilir ve bağırsağa ulaştığında hızla kolonize olabilmektedir. Sindirim sistemine yerleştikten sonra laktik asit ve diğer antogonistik maddeler üreterek patojenik bakterilerin gelişmesini engellerken, bağırsakta *L. acidophilus*'un gelişimini teşvik etmektedir.

Bacillus coagulans'ın kanatlılar ve domuz gibi hayvanların yemlerinde katkı olarak kullanılması etkili bir şekilde büyümeyi uyarıcı etki yapmaktadır. Bu bakteriler sindirimi artırır ve *E. coli*, *Staphylococcus* gibi enfeksiyona neden olan bakterilere karşı koruyucu olarak görev yapar (Anonymous, 2003a).

1.2. Gallik Asit

Gallik asit (GA yada 3,4,5-trihydroxyl-benzoic acid) bitkilerde, meyvelerde ve çeşitli besinlerde bulunan fenolik bileşiklerdendir. Anti-bakterial, anti-viral ve anti-inflamatuvar özelliklere sahiptir(You ve Park, 2010).

Gallik asit, polifenollerin bir grubudur ve polihidroksifenolik bileşik olarak, serbest form ya da daha yaygın olan gallotanin denilen tanin içeriğinde çeşitli bitki, meyve ve yiyeceklerde bulunan bir moleküldür. Chinese gall adlı bir bitkinin bileşenidir. Aynı molekül içinde hidroksil ve bir karboksil grup olmak üzere iki fonksiyonel grubu bulunur (Locatelli, 2013; Temel, 2012). Gallik asitin kimyasal yapısı Şekil 1.1.'de verilmiştir.



Şekil 1.1. Gallikasitin kimyasal yapısı (Bhat, 1998).

Gallik asit, tannaz ile birlikte tannikasitin hidrolizi veya sülfirik asit ile birlikte tannik asitin hidroliz sonucu elde edilebilir. Enzimatik sentez, saf üretim ve az enerji kullanımından dolayı tercih edilmektedir (Banerjee, 2004).

Gallik asit, yeşil çay, üzüm, çilek, muz gibi birçok doğal ürünlerde bulunmaktadır. Farmasötik, kozmetik, gıda ve kimyasal endüstrisinde kullanılmaktadır. Gallik asitin anti-bakteriyel, antiviral, anti-inflamatuvar gibi

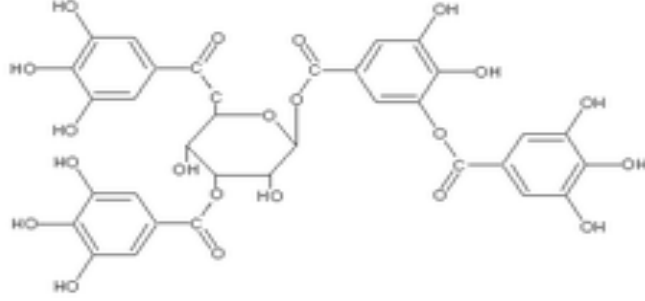
çeşitli biyolojik etkileri belirlenmiştir. Özellikle sülfonamid ile birlikte bir anti bakteriyel ajan olan trimethoprim (TMP) üretiminde farmasötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca anti kanser, anti mikrobiyal ve anti mutajenik gibi terapötik (tedavi edici) özelliklere sahiptir. Gallik asit aynı zamanda antitümöral ve sitotoksik aktivite göstermektedir. Lösemi, prostat kanseri, akciğer kanseri, mide, kolon, göğüs, boyun ve özofagus gibi çeşitli kanser hücrelerinde anti-kanser etkisi ortaya konmuştur (Soong ve Barlow, 2006; Babich ve ark., 2011; García-Rivera ve ark., 2011; Sharma ve ark., 2011b).

Gallik asit yağlar, sıvı yağ ve içeceklerde antioksidan olarak kullanılan propilgallat gibi gallik asit esterlerin enzimatik sentezi ile fotoğraf geliştirici (film banyosu ilacı), saç, deri ve kürk boyamada kullanılan pirogallolun imalatında kullanılmaktadır. Bunlar haricinde gallik asit mürekkep, boya, renk geliştiriciler ve yarı iletken fotosensitik (ışığa duyarlı) reçine üretiminde hammadde olarak da kullanılmaktadır (Mondal ve Pati, 2000a; Kar ve Banerjee, 2000).

1.3. Tanenler

Tanenler bitkilerde doğal olarak bulunan ve suda çözünebilen polifenollerdir. Moleküler ağırlıkları 300 Da ile 3000 Da aralığında değişebilir. Taninin ticari formu olan tanenler asit değildir. Fakat asit gibi adlandırılan polifenollerdir. Tanenler genellikle bitkilerin meyve, yaprak, kök, gövde ve tohumlarında bulunmakla birlikte özellikle bitkilerin doku ve organlarında bol miktarda birikirler. Tanenler çay, kolza, bakla ve sorgum gibi bitkilerden elde edilen, açık sarı-kahverengi toz, pul ya da süngersi bir kütle halinde olan biçimsiz (amorf) maddelere verilen addır (Mingshu, 2006; Aguilar ve ark., 2007).

Doğada ligninden sonra ikinci en fazla bulunan bitkisel fenoliklerler olan tanenler, gallik asit (3,4,5-hydroxybenzoic acid) ve glikoz un esteri olup kimyasal formülü $C_{14}H_{10}O_9$ dur. Tanik asit çayda vardır. Ticari ölçüde elde edildiği en önemli kaynak mazi meşesidir (Albertse, 2002).



Şekil 1.2. Taninin moleküler yapısı

Tanenlerin asıl özellikleri proteinlere bağlanmak ve çöktürmektir. Ayrıca insanlar ve hayvanlar tarafından tüketilen birçok gıda ve yemlerin besleyiciliği üzerinde büyük etkiye sahiptirler. Özellikle kurak sezonda ağaç ve çalı yaprakları, hayvan besisine önemli protein desteği sağlayabilirler. Ancak bu yem kaynakları genellikle antinutrisyonel faktörler, özellikle de tanenler yönünden zengindir. Bunun sonucunda tanenlerin toksisiteleri, beslenme üzerine hem olumlu hem de olumsuz etkileri vardır (Mueller-Harvey ve ark., 1999).

Tanenlerin mikroorganizma, hayvanlar ve çevreye birçok etkisi bulunmaktadır. Genellikle fenolik hidroksil gruplar, proteinler ile tanenlerin çözünmez ve sindirilemeyen kompleks oluşumuna imkan vermektedir. Böylece bunlar gıdanın besinsel değerini ve geviş getiren hayvanlarda gıda alımını azaltmaya yol açmaktadır. Bunların yanı sıra birçok mikroorganizmanın enzim aktivitesini engellemesi ve mikrobiyolojik saldırılara karşı direnç kazanması nedeniyle gelişmesini inhibe etmektedirler. Ancak tanenlerin antimikrobiyal ve toksik özellikleri olmasına karşı bazı bakteriler, filamentli funguslar ve mayalar tanenlere karşı tamamen dirençli ve onları kullanmazlar. Ayrıca tanenler tarımsal atıklarda çevrede ciddi kirliliğe sebep olmaktadır. Bu nedenle organizmalar üzerinde olumsuz etkisi de bulunmaktadır (Kumar, 1999; Goel, 2005).

Tanenlerin yara iyileştirici ve yapısal olarak pigmentler gibi görevi olmasına rağmen, metabolizmanın hücre içi düzeyinde direkt bir fonksiyonu bulunmamaktadır. Bitkilerde birikmiş olan tanenler, doğrudan tabaklama yoluyla

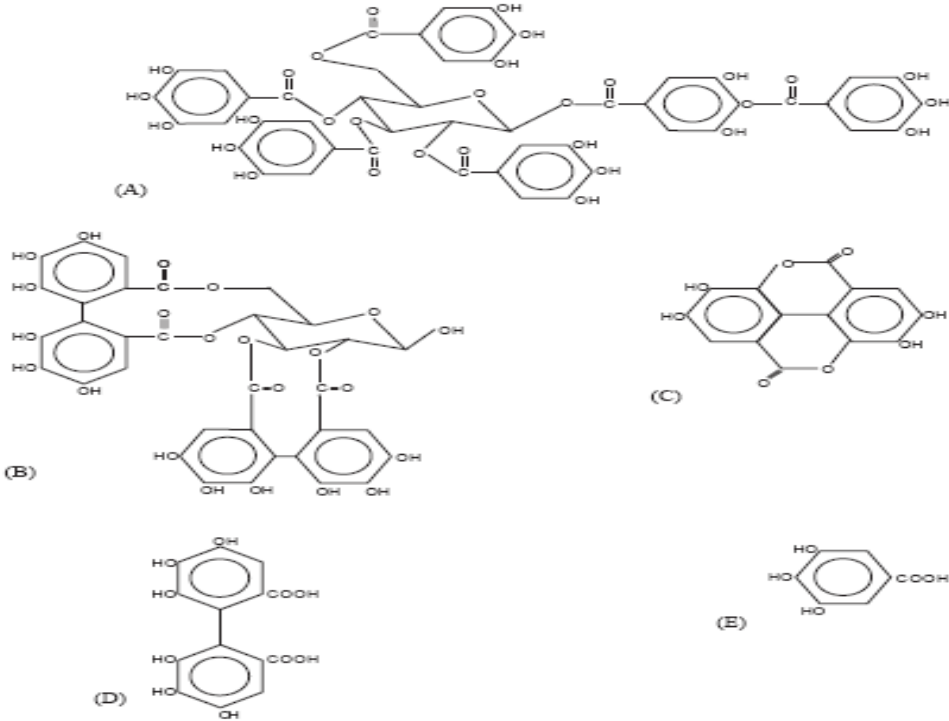
mikroorganizmaların istilacı ekstrasellüler enzimleri ve inaktivite olan virüsler sebebiyle bitkilerin savunmasız kısımlarını mikrobiyolojik saldırılardan korumaktadır. Bu mikroorganizmalar tarafından salınan enzimler, bitki ve tanen molekülünden protein veya polisakkaritler gibi mikrobiyolojik substratlar arasında kompleks oluşumu nedeniyle kısmen veya büsbütün olarak inaktivite olmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997).

Tannik asitin ticari ölçüde elde edildiği en önemli kaynak *Camellia sinensis* (çay) 'dir. Antiseptik bileşikler olan tanenler meşe palamudunda da bol miktarda bulunurlar. Tannik asit, bitkinin sıcak suyla ekstrakte edilmesiyle (çayın demlenmesi gibi) suya geçer. Daha sonra çözelti buharlaştırılır ve katı halde tanen (veya tannik asit) elde edilir (Okuda ve Yoshida, 1993).

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

Hidrolizlenebilir tanenler grubunda yer alan tanenler bir asit ya da enzim eşliğinde hidroliz olarak gallik asit, pirokateşik asit ve şeker gibi suda çözünebilir bileşikler verirler. Bunlar suda az, alkol ve asetonda iyi çözünürler. Bu gruptaki tanenler çekirdek merkezi olarak polioller (genellikle D-glukoz) içeren moleküllerdir. Bu poliollerin hidroksi grupları kısmen veya tümüyle elajik asit (elaji tanenler) ya da gallik asit (gallotanenler) gibi fenolik gruplarla esterleşmiştir. Elajik asitle esterleşenler ise elajitanenler, gallik asit ile esterleşen hidrolize olabilen tanenler ise gallotanenler olarak adlandırılmaktadır. Hidrolize olabilen tanenler ve ilişkili oldukları bileşikler Şekil 1.3' de verilmiştir (Niehaus ve Gross, 1997; Bhat, 1998).



Şekil 1.3. 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).

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

1.3.1.1. Gallotanenler

Gallotanenler gallik asit ve glukozun esterlerinden meydana gelir ve elajitanenlere göre daha basit yapıdadırlar. Gallotanenler, monomerik ürünlerde belirli enzimler, bazlar ve asitler tarafından kolayca hidrolize edilirler. Her hidroliz olabilen gallotanen molekülü genellikle çekirdeğinde D-glukoz ve 6 ila 9 galloksi grubundan meydana gelmektedir. Çekirdek ile esterleşen fenolik gruplar, bazen gallik asidin yüksek oligomerleri veya dimerleri tarafından oluşturulurlar (her tek

molekül “galloksi” olarak adlandırılır). Gallotanenlerin en bilineni; tannikasit (TA)’tir (Kanberoğlu, 2006; Mingshu ve ark., 2006).

1.3.1.2. Elajitanenler

Elajitanenler, gallotanenlerin galloyil gruplarının yükseltgen yarıma reaksiyonları sonucu oluşmaktadırlar. Elajitanenler, C-C bağlarına sahip olan ve gallotanenlere göre daha zor kırılabilen hidrolize olabilen tanen grubudur (Mingshum et al., 2006). Moleküler ağırlığı 300 ve 20.000 Da, amorf, zayıf asidik özelliktedirler. Ayrıca elajitanenler acı bir tada sahip hücre vakuelleri ve sitoplazmada bulunduğu düşünülen sekonder metabolitlerdir (Khadem ve Marles, 2010).

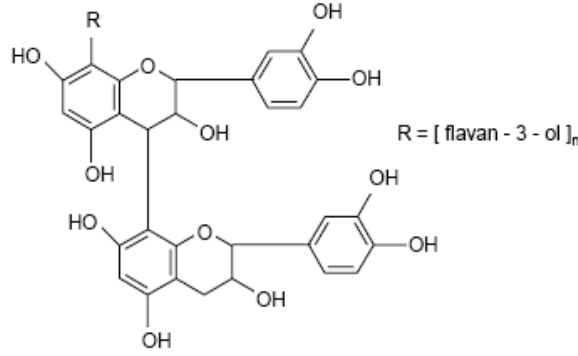
Hidrolizlerinde elajitanenlerdeki heksahidroksidifenolik asit ile glukoz arasındaki ester bağları kırılmaktadır. Böylece heksahidroksidifenolik asit elajik aside dönüşmektedir (Shi et al., 2005).

1.3.2. Kondanse Tanenler

Kondanse tanenler geniş bir gruba sahiptirler ve hidroliz olamazlar. Bu sınıfa ait tanenler ile hidrolize olabilen tanenler arasındaki en önemli fark, şeker içeren bir kısma sahip olmamalarıdır. Bu tanenler ısı karşısında kuvvetli asitlerle ya da bazı yükseltgeyici maddelerle flobafen denilen koyu kırmızı renkli çözünmez bileşikler oluşturmaktadırlar (Niehaus ve Gross, 1997; Albertse, 2002).

Kondanse tanenler, hidrolize karşı dirençli C-C bağlarıyla bağlanmış flavonoit birimlerinin (yani flavan-3-ol) oligomerleri veya polimerleridir (Şekil 1.4.). Ayrıca 2 ila 50 arasında veya daha fazla flavonoid birimi içerebilirler.

Kondanse tanenler “Proantosyanidinler” olarak bilinirler. Karmaşık yapıya sahip olan proantosyanidinler, sıkıştırılmış kimyasal yapıları nedeniyle çoğunlukla **kondanse tanenler** olarak adlandırılır (Kanberoğlu, 2006).



Şekil 1.4. Kondense taninlerin yapısı

1.3.3. Kompleks Tanenler

Kompleks tanenler, hidrolizlenebilir tanenler ve kondanse tanenlerin özelliklerini ortak paylaştıkları bir ara gruptur. Bir gallotanen veya ellajitanen birimine glikozit bağıyla bağlanmış epikateşin veya kateşin birimlerinden meydana gelmektedir (Mingshu, 2006; Haslam ve Tanner, 1970).

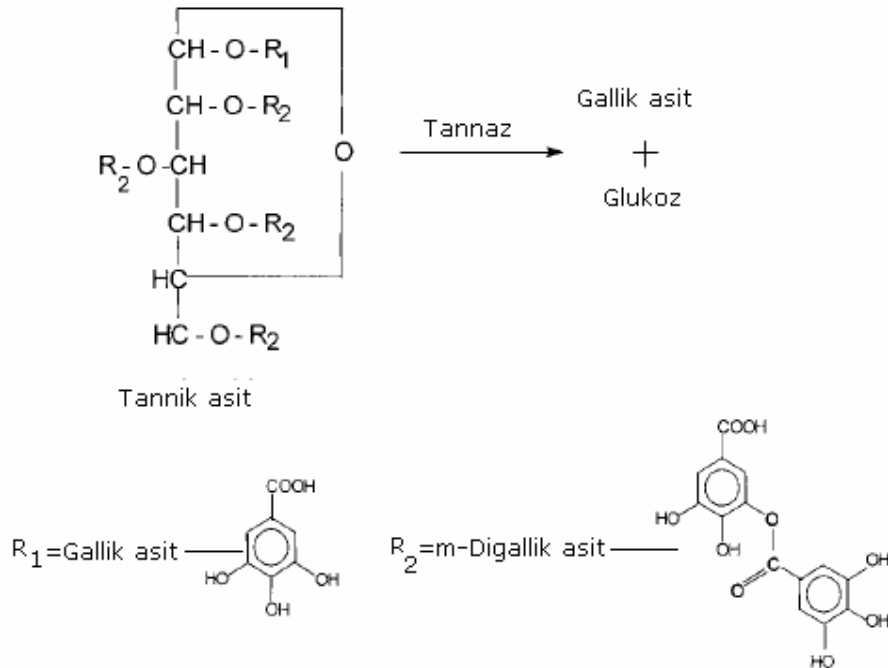
1.4. Tannaz

Tannaz olarak bilinen tanen açıl hidrolaz (EC 3.1.1.20, tannik asit gibi hidrolize olabilen tanenler ve gallik asit esterlerindeki ester ve depsit bağlarının hidrolizini katalizlemektedir. Tannik asitin tannaz ile hidrolizi sonucu gallik asit ve glukoz oluşturur ve böylece serbest hale getirir. Tannaz Teighem (1867) tarafından keşfedilmiştir (Lekha ve Lonsane, 1997; Sharma ve ark., 2000; Yu ve ark., 2004).

Tannaz taninin biyodegradasyonunda büyük önem taşır. Bakteri ve fungal kökenli bir enzim olan tannaz besin, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Taninler bazı mikroorganizmaların büyümelerini inhibe eder ve mikroorganizmaların biyodegradasyonunu yavaşlatır. Fakat geniş çapta bu polifenolik bileşikler substrat olarak kullanarak hidrolize edebilen mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bu canlılar biyodegradasyonda büyük önem

taşıyan bazı bakteriler, mantarlar ve tanin dirençli bazı mayalar olan mikroorganizmalardır (Scalbert, 1991).

Mikroorganizma, bitkiler ve hayvanlarda bulunan tannaz hem membrana (hücre zarı) bağlı hem de fermantasyon tipine dayalı hücre dışı enzim (ekstrasellüler) üretimi yapmaktadır. Tannaz gıda, içecek, bira, kozmetik, ilaç ve kimya endüstrilerinde propilgallat, pirogallolun, trimethoprim ve fotosentetikresin gibi maddelerin üretimi için kullanılmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997).



Şekil 1.5. Tannik asidin yapısı ve tannazın hidrolitik ürünleri (gallik asit ve glukoz) (Mondal ve ark.,2001b).

1.4.1. Tannaz Kaynakları

1.4.1.1. Bitkiler

Hidrolizlenebilir ve kondanse tanenler benzer bitkide üretilebilirler. Fakat genellikle dokularda yayılma göstermektedirler. *Caesalpinia coriariave*, *Anogeissus latifoliave* Kara halile (*Terminalia chebula*) meyvesi, gibi bitkilerin

yapraklarının çoğu hidrolizlenebilir tanence veya kondanse tanence zengindir. *Cassia auriculat*, akasya (*Acacia arabica*), sinameki (*Cassia fistula*) gibi ağaç kabukları da tannaz kaynağıdır (Lekha ve Lonsane, 1997).

1.4.1.2. Hayvanlar

Tannazın sığırların rumen (işkembe) mukozasında düşük seviyede bulunduğu ortaya konmuştur. Ayrıca tannazın sığır rumeninin (işkembe) mukoza zarından ve ince bağırsaktan elde edildiği belirlenmiştir (Lekha ve Lonsane, 1997).

1.4.1.3. Mikroorganizmalar

Enzim hayvan ve bitkiler tarafından da üretilmesine rağmen mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler tercih edilmektedir. Mikroorganizmaların biyokimyasal çeşitliliği, ekonomik ve teknik avantajları, hayvanlar ve bitkilere göre daha kolay genetik manipülasyona uğramaları, fermantasyon ile kısa zamanda yüksek miktarda enzim üretebilmeleri gibi avantajlardan dolayı endüstriyel enzimlerin üretimi açısından en önemli kaynaktır. Endüstriyel enzimlerden biri olan tannaz en çok mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Mikrobiyal tannazın tercih edilmesinin birçok sebebi vardır. Bunların başında mikrobiyal tannazın, diğer kaynaklardan olan (bitkiler veya hayvanlar) tannazdan daha kararlı olmasıdır. Ayrıca mikroorganizmaların yüksek spesifik üreme hızına sahip olmaları, genetik uygulamalarının daha basit ve daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi gibi nedenler ile bitkisel ve hayvansal kaynaklara göre tercih edilmektedir (Purohitve ark., 2006; Belur ve Mugeraya., 2011).

Mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğu tanini parçalayan tannaz enzimine sahiptir. Bunların başında funguslar gelmektedir. Mayalar ve bakteriler de tannaz üretmektedirler. Fungus ve mayalara göre bakterilerin yüksek spesifik büyüme hızlarının olması, tannaz üretimi için avantaj olarak görülmektedir. Fungal tannazlar hidrolizlenebilir tanenlerin farklı tiplerini; 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; Kumar ve ark., 1999).

Mantar türü olan *Aspergillus* sp. en etkili ve ticari tannaz aktivitesine sahip mikroorganizmadır. Bunun dışında *Bacillus pumilus*, *B. polymyxa*, ve *Klebsiella planticola* gibi bakteriyel kültürler de tannaz aktivitesine sahiptirler (Osawa ve Nishitani, 2006). Tannaz üretebilen mikroorganizmalar Çizelge 1.2.'de sunulmuştur.

Tannaz membrana bağlı ve bir miktar hücre dışına da salgılanabilen bir enzimdir. Mikrobiyal tannaz; hücre içi ve hücre dışı olarak sentezlenebilen, bazal ve indüklenebilen, indüktör olmayan karbon kaynaklarının yüksek derişimlerinde katabolik baskılamaya uğrayabilen bir esterazdır (Bradoo et al., 1997). Bakteriyel tannaz daima hücre dışı olarak üretilirken fungal tannaz büyük ölçüde hücre içi üretilmektedir (Mondal ve ark., 2000b; Mondal ve Pati, 2000a; Ayedand Hamdi, 2002).

1.4.1.3.(1). Fungal Tannaz

Mikroorganizma ve diğer organizmalar içerisinde tannazı en çok üreten mantar olarak bilinmektedir. Fungal tannaz çalışmaları hakkında literatürde kapsamlı araştırma bulunmaktadır (Öztürk, 2006). Fungal tannaz kaynakları Çizelge 1.2.'de verilmiştir.

Barthomeuf ve ark. (1994), *Aspergillus niger* LCF 8 suşu ile optimum üretim şartları ve suşun indüksiyonu, pH ve havalandırma parametrelerinin üretim verimi üzerinde etkisini saptamışlar ve yüksek verimde tannaz üretimi yapmışlardır. Enzimin yaklaşık 186,000 Dal büyüklüğünde bir glikoprotein olduğunu, optimum pH 5.0 ve 50°C'nin altındaki sıcaklıkta pH 3.5-8.0 arasında stabil olduğunu tesbit etmişlerdir.

Zakipour-Molkabadi ve ark. (2013), küflü çay yapraklarından izole edilen *Penicillium* sp. *EZ-ZH190* ile ürettikleri enzimi kısmen saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Tek karbon kaynağı olarak %1 tannik asit kullanılan submerged (batık)

kültürde 30°C 100 rpm 96 saat inkübe sonrasında üretilen maksimum enzim üretimi 4.33 U.mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Tannazın optimum sıcaklığı 35°C, optimum pH'ı 5.5 tesbit etmişler ve 50°C'de maksimum aktivitenin %50'sini koruduğu gözlemlenmiştir.

1.4.1.3.(2). Bakteriyel Tannaz

Bazı bakteri kültürleri ekstraselüler eksprese etme yeteneğini geliştirmiştir. Tanenleri bozarak galik asit ve glukoz salınır (Öztürk, 2006). Bakteriyel tannaz kaynakları Çizelge 1.2.'de verilmiştir.

Ayed ve Hamdi (2002), tannaz üretimini *Lactobacillus plantarum* suşundan 24 saat 2g/L tanik asit içeren minimal büyüme ortamında yapmıştır. Enzim üretimi optimum 37°C ve pH 6'da 2 g/L glukoz, 7 g/L tanik asit ve anoksik şartlarda 6 U/mL gerçekleşmiştir.

Aftab ve ark. (2016), bahçe toprağından izole ettikleri *Bacillus subtilis*' den tannazın üretilmiş ve karakterize etmişlerdir. Suş 24 saat içinde 41°C ve pH5.0 'da tannaz üretebilmişlerdir. Üretilen enzim % 96.25 verimle 4.86 misline kadar saflaştırmışlardır. Enzimin optimum sıcaklığı 45°C, optimum pH'ı 5.0 olarak saptamışlardır. Bununla birlikte, enzimin geniş bir sıcaklık aralığı (20-80°C) ve pH (3-10) arasında daha fazla işlevsel olduğunu ortaya koymuşlardır.

Çizelge 1.2. Tannaz enziminin mikrobiyal kaynakları (Bhat ve ark., 1998; Aguilar, 2007; Belur ve Mugeraya, 2011)

Bakteriler	Kaynak
<i>Achromobacter</i> sp.	Lewis ve Starkey, (1969)
<i>Bacillus pumilis</i>	Deschampsve ark., (1983)
<i>Bacillus polymyxa</i>	Deschampsve ark.,(1983)
<i>Corynebacterium</i> sp.	Deschampsve ark., (1983)
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Deschamps(1989)
<i>Selenomonas ruminatium</i>	Skene&Brooker(1995)
<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>Lactobacillu splantarum</i>	Ayed&Hamdi (2002); Kostinek, (2007), Nishitani ve Osawa (2004)
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	Nishitani, (2004);
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Nishitani, (2004); Kwon, (2008)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sabu, (2006)
Mayalar	Kaynak
<i>Candida</i> sp.	Aoki, (1976)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zhong, (2004)
<i>Pichia</i> sp.	Deschamps&Lebeault, (1984)
Mantarlar	Kaynak
<i>Aspergillus flavus</i>	Yamada ve ark., (1968)
<i>Aspergillus awamori</i>	Bradoo ve ark.,(1996)
<i>Aspergillus aureus</i>	Bajpai and Patil, 1996
<i>Aspergillus fischeri</i>	Bajpai ve Patil, (1996) Yamada, (1968); Batra ve Saxena (2005)
<i>Aspergillus niger</i>	Bradoo ve ark., (1996); Rana ve Bhat (2005); Cruz-Hernandez, (2006)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Bradoo ve ark., (1996)
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Van Diepeningen ve ark., (2004)
<i>Penicillium notatum</i>	Ganga, (1977)
<i>Penicillium islandicum</i>	Ganga, (1977)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bradoo ve ark., (1996)
<i>Penicillium acrellanum</i>	Bradoo ve ark., (1996)
<i>Penicillium caryophilum</i>	Bradoo ve ark., (1996)
<i>Penicillium charlesii</i>	Bradoo ve ark., (1996)

1.4.1.4. Mikrobiyal Tannazın Biyokimyasal Özellikleri

Çeşitli mikroorganizmalar incelenerek moleküler ağırlık, optimum pH ve sıcaklık özellikleri belirlenmiştir. Mikroorganizmaların biyokimyasal özellikleri Çizelge 1.3.' de verilmiştir.

Tannazın molekül ağırlığı 50-320 kDa aralığında bulunmuştur. Ayrıca tannazın iki veya daha fazla alt birimden oluştuğu bildirilmiştir. Genellikle mikrobiyal tannazın optimum sıcaklığı 20-60°C aralığında, termostabilitesinin ise 30-60° C aralığında olduğu belirlenmiştir. Tannazın optimum pH'sı 5-6 değerleri arasında bir asidik protein olarak bilinmektedir. Genellikle tannaz aktivitesi için kofaktörlere ihtiyaç duyulmaz. Ancak magnezyum gibi iki değerlikli kationlar sıklıkla enzim aktivitesini uyarır. Bunun nedeni enzim reaksiyonunun denge sabitinin değiştirilmesiyle veya enzim proteininin yüz yüze yüklenmesinin değiştirilmesiyle metal iyonlarıyla aktivasyon da dahil çeşitli mekanizmalara dahil olduğu için olabilir (Yao ve ark., 2014).

Çizelge 1.3. Tannazın biyokimyasal özellikleri

Mikroorganizma	Moleküler ağırlık, Optimum pH ve sıcaklık	Sıcaklık ve pH stabilitesi	Kaynak
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	pH 6.0; 60°C	pH 3.0–8.0; 30–60 °C.	Sharma ve ark., (1999)
<i>Aspergillus niger</i>	90 kDa, 180 kDa; pH 6.0; 60–70 °C	pH 3.5–7.0	Ramírez-Coroneli, (2003)
<i>Aspergillus niger</i> ATTC 16620	168 kD; pH 6.0, 40 °C	pH4.0-8.0, 30–40 °C	Sabu ve ark., (2006)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	85 kDa; pH 5.0; 40 °C	60 °C	Goncalves ve ark., (2012)
<i>Aspergillus phoenicis</i>	218 kDa; pH 6.0; 60 °C	pH 4.0–7.0; 50 °C	Riul ve ark., (2013)
<i>Lactobacillus plantarum</i> (recombinant)	50 kDa; pH 7.0; 40 °C	pH 6.0–8.0; 30 °C	Curriel ve ark., (2009)
<i>Enterobacter</i> sp.	90 kDa; pH 5.5; 40 °C	-	Sharma ve John., (2011a)
<i>Emericella nidulans</i>	302 kDa; pH 5.0; 45 °C	pH 4.0–5.0; 22–55°C	Goncalves ve ark., (2011)
<i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6	pH 5.75, 60 °C	-	Mondal ve ark., (2000b)
<i>Bacillus cereus</i> KBR9	pH 4.5; 40°C	pH 4.5–5.0; 30°C.	Mondal ve ark., (2001b)

1.4.2. Tannazın Uygulama Alanları

Tannaz, günümüzde endüstriyel kullanımı yaygınlaşmamış bir enzimdir. Bunun nedeni yüksek enzim maliyetinden ve tannaz enziminin fazla miktarda

üretilememesinden kaynaklandığı bilinmektedir. Tannaz son zamanlarda ürün sunuluşuna bağlı olarak farklı katalitik birimler ile **Biocon** (Hindistan), **Kikkoman** (Japonya), **ASA Specilaenzyme GmbH** (Almanya) ve **JFC GmbH** (Almanya) tarafından ticarileştirilmiştir (Lagemaat ve Pyle, 2001; Belmares ve ark., 2004).

Endüstriyel olarak önemli bir enzim olan tannaz yaygın olarak, gıda, hayvan yemi, içecek, biracılık, eczacılık ve kimyasal endüstrisinde uygulama alanına sahiptir (Sharma ve ark., 2000; Sabu ve ark., 2005; Adachi ve ark.,1968; Aguilar ve Sanchez, 2001).

Çay ve kahvenin aromasında kullanımı tannazın en büyük ticari uygulamasıdır. Tanen grubuna giren kateşin ya da epikateşin şarabın renginden sorumludur. Ancak bu bileşiğin hızlı oksitlenmesi sorun oluşturmaktadır. Şarap açılınca hızlı bir şekilde oksitlenen bu bileşik istenmeyen bir bulanıklığa sebep olmaktadır. Bu sorun tannaz kullanımı ile giderilmektedir (Temel, 2012).

Deri sanayiinde kullanılan tanenin atıklardan temizlenmesi tannaz varlığı ile oldukça ucuz ve hızlı bir şekilde sağlanmaktadır (Temel,2012).

Tannazın çok yönlü bir enzim olduğu düşünülmekte ve gıda, içecek, mayalanma, kozmetik, kimyasal ve eczacılık endüstrisi gibi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Öztürk, 2006). Kullanım alanları detaylı bir şekilde başlıklar halinde açıklanmaktadır.

1.4.2.1. Hazır Çay

Soğuk çay içeceklerin imalatında başta gelen temel problem soğuk su çözünebilirliğidir. Polimerik siyah çay fenoller, kahverengi bir çökelti olan çay kremasına yol açmaktadırlar. Çay kreması, çayın 40°C sıcaklığın altında birkaç saat kalmasıyla oluşmaktadır (Powell ve ark.,1993).

Çay kremasının çözünebilirliği için kimyasal ve enzimatik metodlar kullanılmaktadır. Bu çözünebilirlik problemi enzimatik metod ile siyah çay veya yeşil çayda yüksek kalite ve iyi renge dönüştürülerek çözülmektedir. Tannaz gallol gruplar arasında bulunan ester bağları ve çay yapraklarındaki çeşitli bileşenlerin

hidrolizini katalizlemektedir. Esterden arındırma reaksiyonu ile yeşil çayda bulunan gallik asit ve epikateşinin doğal düzeyini artırabilir. Bunun yanı sıra soğuk su çözünebilirliğine sahip ve çayın parlak kırmızımsı renginden sorumlu olan epitheflavic asitin büyük kısmını oluşturmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997).

1.4.2.2. Şarap ve Bira Üretimi

Tannaz, bira ve şarap sanayisinde de kullanılmaktadır. Çayda olduğu gibi köpüğün alınmasında, şarap ve biraya acı ve buruk bir tat veren flavonların, taninlerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Giovanelli, 1989).

Biranın depolanması esnasında fenolik ve diğer kimyasallar arasında kompleks oluşmaktadır. Bu da biranın normal rengini kaybetmesini ve bulanıklık oluşmasına neden olmaktadır. Birada bulanıklık oluşumunu azaltmak için tannaz ile lakkaz birlikte kullanılmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997).

Tanenler şarap yapımında bulanıklığa ve gıdanın yapısında ciddi problemlere neden olmaktadır. Tannaz ise bu problemleri çözmeye kullanılmaktadır (Belmares ve ark., 2004). Ayrıca eskiden şaraptaki istenmeyen fenolikleri uzaklaştırmak için kimyasal olarak arıtma uygulanırdı. Fakat şimdi tannaz, şarap tadını olumlu yönde etkileyen kafeik asit ve quinic asiti hidrolize etmek amacıyla kullanılabilir (Mondal ve ark., 2001b).

Tannaz meyve sularını berraklaştırmak ve stabilize etmek amacıyla da kullanılmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997). Bunun yanı sıra tannaz meyve sularında aynı amaçla laktaz enzimi ile birlikte de kullanılmaktadır (Kwon ve ark., 2008).

1.4.2.3. Gallik Asitin Üretimi

Gallik asit ya enzimatik ya da kimyasal olarak sentezlenmektedir. Buna rağmen enzimatik sentez seçici ve saflığından dolayı tercih edilmektedir. Tannaz enzimi tanen içeren maddeleri hidrolize etmek amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca tannaz farmasötik endüstrisinde trimethoprim ve önemli bir substrat olarak

kullanılan gallik asit üretimi için kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda gallik asit üretimi ve tannaz sentezi doğru orantılı olduğunu ve tannaz fazla sentezlenirse, gallik asit üretiminin de arttığı ortaya konmuştur (Banerjee, 2004).

1.4.2.4. Hayvan Yem Katkısı

Tanenlerin besinsel değeri yoktur. Buna rağmen tanen içeren bitkiler gıda ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Tanenler proteinler ile birlikte çözünmez kompleks oluşturmaktadır. Tanenlerin sindirici enzimlerin yanında endojen proteinler ve beslenme ile ilgili bu durumu geviş getirmeyen hayvanlarda önemli bir rol oynamaktadır. Tanenler normal sindirime engel olmasının yanında yüksek nitelikte proteinlerin vücuttan atılmasına neden olmaktadır. Ayrıca vücuda demirin alınmasını da engellediği belirlenmiştir. Midenin mukoza çeperine zarar vermesi, belli katyonların, proteinlerin ve temel aminoasitlerin salgıyla atılması tanenlerin diğer olumsuz etkileridir. Tanenlerin arzu edilmeyen olumsuz etkilerini ve meydana gelen bu durumları ortadan kaldırmak, hayvan yeminde ve gıdada sindirilebilirliği artırmak için tannaz enzimi kullanılmaktadır (Lekha ve Lonsane, 1997).

1.4.2.5. Endüstriyel Atıksu Arıtımı

Fenolik bileşikler ile kontamine olan atık suların arıtımında tannazdan yararlanılabilir. Endüstriyel atıksular, ait oldukları endüstri koluna göre değişiklik gösteren ve karakteristik olan bir takım organik kirleticileri barındırmaktadır. Atıksuların Yüksek organik içerdiklerinden dolayı atıksuların canlı ekosistemi üzerine olan olumsuz etkilere neden olduğu bilinmektedir. Bu sebepler deşarj standartlarına uygun hale getirilmesi zorunlu hale getirilmiştir. Bu organik kirleticilerin her birinin üzerine etkili olan enzimler için birer substrat olarak değerlendirilebilmektedir (Aguilar ve ark., 2001.b; Belmares ve ark., 2004).

Tanenler endüstriyel atıksularda organik kirletici olarak bulunurlar. Başlıca buldukları atıksular deri, bira ve şarap endüstrisi atıksuları olarak bilinmektedir.

Özellikle deri endüstrisi atıksuyu, yüksek miktarda tanen içermektedir. Bu durum çevre için tehlike oluşturmaktadır. Tanenlerin zararsız hale getirilmesi için tannaz enziminin kullanılması son zamanlarda gündeme gelmiştir (Belmares ve ark., 2004).

1.5. Çalışmanın Amacı

Tannaz başta mikroorganizmalar olmak üzere bitki ve hayvanlarda da doğal olarak bulunan bir enzimdir. Asıl görevi tanenleri parçalamak olan bu enzim birçok amaç için kullanılmaktadır. Gıda sanayisi başta olmak üzere farmakoloji ve atıksu arıtımında da kullanılmaktadır.

Bu çalışmada çeşitli toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* sp. türlerinden en iyi tannaz aktivitesi gösteren suş ile tannaz üretimi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Üretilen tannaz ile soğuk çay, bira ve şarap üretiminde meydana gelen köpüğün giderilmesi ve berraklaştırılması, hayvan yemi sanayisinde tanenlerin sindirilebilirliğini artırmak, gallik asit elde edilerek farmakolojide kullanılmasını sağlamak, endüstriyel atıksularda organik kirletici olan tanenleri ortadan kaldırmak amaçlanmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Mondal ve ark. (2000b), *Bacillus licheniformis* KBR 6 suşunda maksimum tannaz üretimini belirlemişlerdir. Bu suşun 36 saate kadar maksimum büyüme sağlamamasına rağmen 18 ile 21 saatlik büyümeden sonra glukozun var olması veya yok olması durumunda (1 g l^{-1}) %1.5 (w/v) tanik asitle 0.21 U/mL' de maksimum hücre dışı tannaz aktivitesi gerçekleştirdiğini ortaya koymuşlardır.

Banerjee ve ark. (2001), *Aspergillus aculeatus* DBF 9'dan elde edilen ekstrasüler ve intraselüler tannazın eşzamanlı üretimi üzerine yapılan karşılaştırmalı bir çalışma, yeni yapmışlardır. Bu suşun, sıvı kültürde hücre dışı formdan 24 saat içinde beş kat daha fazla hücre içi enzim ürettiğini belirlemişlerdir. Maksimum tannaz üretimini, % 1-2 (w / v) tanik asit ve % 0.05-0.1 (w / v) glikoz içeren kültür besiyerinde gerçekleştirmişlerdir. Her iki enzimin pH ve sıcaklık optimumları sırasıyla 5.0 ve 50-60°C olarak saptamışlardır. Ekstraselüler ve intraselüler tannaz yüksek sıcaklık, pH değerlerinde ve tuz (NaCl) konsantrasyonunda iyi stabilite gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Mondal ve ark. (2001b), topraktan izole ettikleri *Bacillus cereus* KBR9 ile maksimum büyüme, enzim üretimi ve bu enzimi karakterize etmişlerdir. Bu bakterinin durağan fazlarda (24 s) maksimum düzeyde tannaz üretiminin 0.22 U/ml olduğunu, maksimum büyüme ve enzim üretimini pH 4.5-5.0'de yaptığını ortaya koymuşlardır. Kısmi saflaştırılmış tannazın, optimum aktiviteyi pH 4.5 ve 40°C'de gösterdiğini ve aktivitenin 30°C' ye kadar pH 4.5-5.0 arasında stabil kaldığını ortaya koymuşlardır.

Batra ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada 35 *Aspergillus* ve 25 *Penicillium* türünün tannaz üretme kapasitelerini hem tannik asit agar plakasında hem de broth besiyerinde incelemişlerdir. 25 *Aspergillus* ve 20 *Penicillium* türünde broth besiyerinde tannaz üretimi gözlemlenmiştir. Potansiyel tannaz üretici *Aspergillus*'lar; *Aspergillus fumigatus* (8.3 IU/ml), *Aspergillus versicolor* (7.0 IU/ml), *Aspergillus flavus* (4.95 IU/ml) ve *Aspergillus caespitosum* (4.47 IU/ml)

iken *Penicillium*'lar arasında *Penicillium charlesii* (4.82 IU/ml), *Penicillium variable* (4.70 IU/ml), *Penicillium crustosum* (4.7 IU/ml) ve *Penicillium restrictum* (4.47 IU/ml) potansiyel cinslerdir. Bu mantarlardaki ham tannaz optimum pH 6.0 olan *A. caespitosum*, *P. crustosum* ve *P. variable* türleri hariç diğerlerinde optimum pH 5.0 olduğunu; optimum sıcaklık 40°C olan *A. caespitosum*, *P. charlesii*, *P. crustosum* ve *P. restrictum* hariç diğer türlerde optimum sıcaklık 60°C olarak ortaya koymuşlardır. Seçtikleri *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri arasından *A. versicolor* ve *P. restrictum*'dan üretilen tannaz 24 saat boyunca pH 3.0-8.0 aralığında stabil kaldığını; *A. versicolor*'dan üretilen tannazın 70°C'de 1 saat sonra %67 aktif kaldığı için sığağa dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir.

Battestin ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada *Paecilomyces variotii* ve *Aspergillus niger* cnpat 001 suşundan tannaz üretilip ve karakterizasyon yapmışlardır. *Paecilomyces variotii* ile *Aspergillus niger* cnpat 001 verilerini karşılaştırmışlardır. *P. variotii*'den üretilen tannazın pH 6.5'te optimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. *P. variotii* için optimum sıcaklığı 70°C olarak ortaya koyarken *A. niger* cnpat 001 suşunda 40°C'de optimum aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Katyonların ve anyonların, inhibitörlerin, yüzey aktif maddelerinin 1 mM preparatlarının *P. variotii*'deki tannaz aktivitesi üzerindeki etkilerini çalışmışlardır.

Rodríguez ve ark. (2008), çeşitli gıdalardan izole ettikleri *Lactobacillus plantarum* suşunun tanen parçalamasını spektrofotometrik yöntemler ile saptamışlardır. *Lactobacillus plantarum* CECT 748T tarafından tannik asitin enzimatik çözülmesini sıvı kültürlerde ve HPLC'de incelemişlerdir. Böylece tannik asitin önemli derecede eksildiği 7 günlük inkubasyon sonrasında *L. plantarum* hücrelerinde inkubasyon boyunca gözlemlenmediğini ortaya koymuşlardır. Ancak, 16 saatlik inkubasyon boyunca *L. plantarum*' un hücresiz parçaları tarafından tannik asit etkin bir şekilde çözüldüğünü belirlemişlerdir. Tannaz aktivitesinin en iyi pH 5.0 ve 30°C'de olduğunu ve en yüksek aktifliği 50°C'de %75 oranında gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Goel ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada tanenlerin *Enterococcus faecalis* tarafından ayrıştırılması profilini incelemek ve tannazı arındırmak amaçlamışlardır. *E. faecalis*'in tannik asidi (minimal ortamda% 1.0) galik asit, pirogallol ve resorsinole indirgediği gözlemlenmiştir. *E. faecalis* tannazının, amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulamalarının ardından DEAE seluloz ve Sefadex G-150 kullanarak % 41.7' lik bir iyileşme ile 18.7 katına kadar saflaştırdılar. Moleküler ağırlığı 45 kDa olarak bulunan enzimin, 40°C ve pH 6.0 değerinde optimum aktiviteyi gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Sharma ve John (2011a), yaptıkları çalışmada *Enterobacter* sp.' den üretilen tannazı saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığının 90 kDa, optimum sıcaklığının 40°C ve asidik pH aralığında aktive olduğunu ortaya koymuşlardır.

Yao ve ark. (2011), tannaz kodlayan tan410 adındaki gen ile çalışmışlardır. Bu genden ürettikleri tannazı saflaştırarak SDS-PAGE sonucunda moleküler ağırlığın 55 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Tannazın optimum sıcaklığı ve pH'ı 30°C ve 6.4 olarak bulmuşlardır. Aktivitenin Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Cd^{+2} ilavesi ile arttığını, Tan410'ın 4 M NaCl varlığında kararlı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Beniwal ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada *Enterobacter cloacae* MTCC 9125 suşundan ürettikleri termofilik tannazı ultra filtreleme ve iyon değişimi kromatografisini kapsayan iki aşamalı saflaştırma yöntemini kullanarak enzimi saflaştırmışlardır. Saflaştırma işlemler sonucunda %33.1 kazançla 8.47 kat saflaştırma gözlemlenmiştir. Tannazın moleküler ağırlığının SDS-PAGE elektroforezi sonucunda 31 ± 1 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzim optimum sıcaklığını 50°C, optimum pH' ını 5.5 olduğunu ve optimum sıcaklık ve pH'da 2 ve 4 saatlik inkübasyondan sonra aktivitesinin %50'sini koruduğunu ortaya koymuşlardır. Tannik asit için V_{max} 3.401 U/ml iken enzim K_m 'si 0.00337 M olarak bulmuşlardır. Divalent katyonlar arasında Mg^{+2} , Zn^{+2} ve Mn^{+2} nin enzimi aktifleştirici ve Fe^{+2} , Ba^{+2} ve Cu^{+2} ise engelleyici olduğunu belirtirken Tween20,

Tween80, TritonX-100 ve SDS gibi maddelerin enzim aktivitesinde önemli bir kayıp verdiğini ortaya koymuşlardır.

Gayen ve Ghosh (2013), *Penicillium notatum* NCIM923 suşundan ekstraselüler tannaz üreterek saflaştırdıkları enzimi karakterize etmişlerdir. Ham tannazın spesifik aktivitesi 1.31U /mg, saflaştırılmış tannaz aktivitesi ise 22.48 U / mg olarak, moleküler ağırlığını ise 97 kDa olarak tesbit etmişlerdir. Yaptıkları enzim karakterizasyonu sonucunda optimum sıcaklığı 35-40°C arasında, optimum pH'ı 5.0 ve enzimin 60°C pH 3.0 %40, pH 8.0 %60 korunduğunu ortaya koymuşlardır.

Riul ve ark. (2013), *Aspergillus phoenicis*'ten bir glukoz ve çözücüye toleranslı ekstraselüler tannazın üreterek saflaştırılması ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzimi orta düzeyde tannik asit içeren besiyerinde 30°C 100 rpm'de 72 saat sonunda elde etmişlerdir. %65 karbonhidrat içeriği olan saflaştırılan enzimin 120 kDa ve 93 kDa alt üniteleri ile 218 kDa'lık bir belirgin doğal moleküler ağırlığını belirlemişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C, optimum pH'ı 5.0-6.5, 50°C'de 1 saat boyunca kararlılığını koruduğunu ve çoğu iyon, deterjan ve organik çözücüler tarafından önemli ölçüde etkilenmediğini ortaya koymuşlardır.

Jiménez ve ark. (2014), *Streptococcus gallolyticus* UCN34'den alınan GALLO_1609 genini *Escherichia coli* BL21 (DE3) 'de aktif bir protein olarak klonlanmış ve eksprese etmişlerdir. Protein, daha önce tarif edilen bakteriyel tanenlere benzerlik gösterdiği için TanSg1 olarak adlandırmışlardır. Rekombinant tannazı, afinite kromatografisi ile saflaştırarak His-etiketli TanSg1'i üretmişlerdir. Saflaştırılmış TanSg1 proteini, 577 U / mg spesifik bir aktiviteye sahip olan,% 41 laktobasillus plantarum tannaz aktivitesinden daha yüksek olan tannaz aktivitesini gösterdiğini tesbit etmişlerdir. TanSg1, pH 6-8 ve 50-70 ° C'de optimum katalitik aktivite gösterdiğini ve geniş bir sıcaklık aralığında yüksek kararlılık gösterdiğini, 45°C'de inkübasyon süresi uzadıktan sonra bağıl aktivitesinin% 25'ini koruduğunu,

spesifik aktivitesi divalent katyolardan Ca^{+2} ile artırdığını ve Zn^{+2} ve Hg^{+2} ile dramatik bir şekilde azaldığını ortaya koymuşlardır.

Mizuno ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada *Aspergillus oryzae*’ den elde edilen rekombinant tannazın biyokimyasal özellikleri ile doğal enzimdeki tannazın biyokimyasal özelliklerini kıyaslamışlardır. Ekstraselüler doğal tannazı ticari enzim kaynağından saflaştırmışlar ve *Pichia pastoris*'de yüksek düzeyde eksprese edilen rekombinant tannaz, aktif bir ekstraselüler protein olarak saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış doğal ve rekombinant tannazların SDS-PAGE elektroforezi ile belirlenen moleküler ağırlıklarını sırasıyla 45-80 kDa ve 45-75 kDa olarak ortaya koymuşlardır. Saflaştırılmış ve rekombinant tannazlar için en uygun pH değerleri sırasıyla 4.0 ve 5.0 olduğunu ve 40°C’ ye kadar dayanıklı olduğunu, N-deglikozilasyondan sonra her iki enzimin de ısıya dayanıklılıkta azalma gösterdiğini kanıtlamışlardır.

Dincer ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada tannazı klonlanmış, *Lactobacillus plantarum*'dan karakterize edilmiş bir fermente gıdadan (Shalgam) ve TanLps geninden izole edilen *Lactobacillus plantarum*'dan üretmişlerdir. *L. plantarum*'un ekstraselüler enzim aktivitesini 63.58 U / L, moleküler ağırlığını 76.9 kDa olarak saptamışlardır. *L. plantarum* tannaz aktivitesi için optimum sıcaklığını 45°C, optimum pH aktivitesini ise pH 6.0 olarak tesbit etmişlerdir. Ekstraselüler tannazın 90°C'de 5 dakika boyunca kararlılığını % 78 , ZnCl2 (% 105) ile önemli ölçüde uyarıldığını ortaya koymuşlardır.

Kumar ve ark. (2015), *Klebsiella pneumoniae* KP715242 suşundan tannaz üretimi, saflaştırma ve karakterizasyon yapmışlardır. Enzim 8.55 kat saflaştırıldıktan sonra %9.5 verim elde etmişlerdir. Üretilen tannazın moleküler ağırlığı 38.20 kDa, optimum pH 5.5, optimum sıcaklık 50°C olarak belirlemişlerdir. Tannaz aktivitesindeki metal tuzlar, organik çözücüler, yüzey aktif maddeler, şelatörler ve çeşitli geleneksel engelleyicilerin etkileri incelemişlerdir. Metil gallat, sodyum tioglikolat ve ksilen enzimi en fazla engellediğini, metal iyonlar arasında Hg^{+2} tannaz aktivitesi üzerinde en fazla

engelleyici olduğunu, Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} enzim aktifleştiricileri olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca yüzey aktif maddeler ve şelatörlerin enzim aktivitesini engellediğini, ancak enzim aktivitesi üzerinde EDTA'nın herhangi bir önemli etkisine rastlanmadığını belirlemişlerdir.

Chaitanyakumar ve Anbalagan (2016), yaptıkları çalışmada *Staphylococcus lugdunensis*'ten tannaz kodlayan geni klonlanmış, enzimi saflaştırarak karakterize etmişlerdir. Enzimin moleküler ağırlığını 66 kDa, enzim aktivitesini 716 U/mg, optimum sıcaklığını 40 °C ve optimum pH'ını 7.0 olarak tesbit etmişlerdir. Zn^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} ve Mn^{+2} gibi metal iyonlarının tannaz aktivitesini inhibe ettiğini, düşük SDS konsantrasyonunda polar olmayan organik çözücülerin tannaz aktivitesinin arttığını ve polar kutuplu çözücülerin tannaz aktivitesini engellediğini ortaya koymuşlardır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Materyal olarak Çukurova Üniversitesi Kampüsünde doğal olarak yetişen *Cupressus arizonica* Greene (Mavi servi), *Pinus brutia* Tenore (Kızılçam), *Platanus orientalis* L. (Doğu Çınarı) ve *Thuja orientalis* L. (Doğu Mazısı) ağaçlarının topraklarından izole edilen bakteriler kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan Besiyerleri

3.1.1.1. Plate Count Agar (PCA)

Alınan toprak örneklerinden bakteri izole etmek amacıyla kullanılmıştır (Halkman, 2005).

Çizelge 3.1. Plate Count Agar besiyerinin bileşimi

Besiyeri bileşimi	g/ L
Pepton	5
Maya ekstraktı	2,5
D(+) Glukoz	1
Agar	12

Hazırlanan besiyeri kullanılmadan önce otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.1.2. Nutrient Agar

İzole edilen bakterilerin stok kültürleri için kullanılmıştır (Atlas, 2006).

Çizelge 3.2. Nutrient Agar besiyerinin bileşimi

Besiyeri bileşimi	g/ L
Pepton	10
Et özütü	10
NaCl	5
Agar	5

Hazırlanan besiyeri kullanılmadan önce otoklavda 121°C’de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.1.3. LB Broth

İzole edilen bakterilerin zenginleştirilmesi ve gliserol stok hazırlamak amacıyla kullanılmıştır (Manniatı ve ark, 1982).

Çizelge 3.3. LB Broth besiyerinin bileşimi

Besiyeri bileşimi	g/ L
Tripton	10
Maya	5
NaCl	10

Hazırlanan besiyeri kullanılmadan önce otoklavda 121°C’de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.1.4. Tryptic Soy Agar (TSA)

VITEK-II Kompakt Sistem kullanılarak bakterilerin identifikasyon analizi öncesinde bakterilerin üretilmesi amacıyla kullanılmıştır (Atlas, 2006).

Çizelge 3.4. Tryptic Soy Agar'ın bileşimi

Besiyeri bileşimi	g/ L
Et peptonu	5
NaCl	5
Agar	10

Hazırlanan besiyeri kullanılmadan önce otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.1.5. Tannik Asit-Agar Besiyeri

Tannaz pozitif olan mikroorganizmaların izolasyonu amacıyla kullanılmıştır.

Tannik asit, agar plak ile etkileşime girerek ortamın pH'sını hızlı bir şekilde düşürür. Bu nedenle besiyerinin katılaşması zorlaşır. Bu durumun gerçekleşmemesi için besiyeri hazırlanırken agar miktarı modifiye edilmiştir. Ayrıca tannik asit, yüksek sıcaklıkta yapısında bozulma meydana geldiği için 0.2 µm çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Çizelge 3.5'de belirtilen kimyasallar tannik asit hariç tartılmış ve üzerine %2,5 Agar ilave edilmiştir. Otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiş ve soğuması beklenmiştir. Besiyeri eli yakmayacak sıcaklığa düşürülmüş, %1 oranında tartılan tannik asit steril saf suda çözülerek 0,2 µm' lik steril filtreden geçirilmiştir. Besiyeri yavaşça çalkalandıktan sonra % 2 oranında 0,6 M NaOH steril filtreden geçirilmiş ve pH 7.0'a ayarlanmıştır. Son olarak besiyeri petri kaplarına dağıtılarak soğumaya bırakılmıştır (Mondal, 2001a).

Çizelge 3.5. Tannik Asit içeren besiyeri bileşimi (Mondal, 2001a)

Besiyeri bileşimi	g/ L
Tannik asit	10
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄	0,5
NH ₄ Cl	1
CaCl ₂	0,01
D-Glukoz	0,5
Agar	25

3.1.1.6. Enzim Üretim Ortamı

Çizelge 3.6'da belirtilen kimyasallar tartılarak saf suda çözdürülerek otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Daha sonra %1 oranındaki tannik asit saf suda çözdürülerek steril filtreden geçirilmiştir. %2 oranında 0,6M NaOH ile pH 7.0'a ayarlanır (Mondal, 2001a).

Çizelge 3.6. Tannik Asit içeren besiyeri bileşimi (Mondal, 2001a)

Besiyeri bileşimi	g/ L
Tannik asit	10
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄	0,5
NH ₄ Cl	1
CaCl ₂	0,01
D-Glukoz	0,5

3.1.2. Enzim Aktivitesi İçin Kullanılan Çözeltiler**3.1.2.1. Substratın Hazırlanışı**

100 mL 0,05 M sitrat tamponunun içerisinde 0.01 M Methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate çözdürülerek hazırlanmıştır (Sharma ve ark., 2000).

3.1.2.1.(1). 0,05 M Sitrat Tamponu

1,05 g sitrik asit 100 mL saf suda çözüldükten sonra 0,6 M NaOH ile pH 5.0' a ayarlanmıştır (Sharma ve ark., 2000).

3.1.2.1.(2). 0,6 M NaOH

2,4 g NaOH 100 mL saf suda çözünerek hazırlanmıştır.

3.1.2.2. Reaksiyon Durdurucu Çözeltinin Hazırlanışı

100 mL Methanol içerisinde 0,667 g Rhodanine çözdürülerek hazırlanmıştır (%0,667; w/v) (Sharma ve ark., 2000).

3.1.2.3. Renklendirme Çözeltisi

100 mL saf su içerisinde 2,8 g KOH çözdürülerek 0,5 N KOH hazırlanmıştır (Sharma ve ark., 2000).

3.1.2.4. Katı Besiyerinde Tannaz Aktivitesi için Boyama Çözeltisinin Hazırlanışı

0,01 N HCl içeren distile su içerisinde 0,01 M FeCl₃ çözülerek hazırlanır. Katı besiyerinde tannaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanılır. Bu çözelti deney öncesinde taze olarak hazırlanmalıdır (Mondal ve ark., 2009).

3.1.2.5. Kalibrasyon Grafiği İçin Kullanılan Gallik asit çözeltisinin Çözeltisinin Hazırlanışı

0,5 mM gallik asit 0,05 mM sitrat tamponu içerisinde çözünerek hazırlanmıştır (Sharma ve ark., 2000).

3.1.3. SDS-PAGE Elektrofrezini İçin Kullanılan Çözeltiler**3.1.3.1. Solüsyon A (Monomer (akrilamid/bis) Çözeltisi)**

29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Buzdolabında 4°C'de koyu renkli/kahverengi şişede saklanmıştır. Akrilamid nörotoksik bir madde olduğundan kullanırken eldiven ve maske takılmalıdır (Bollag ve ark, 1996; Temizkan ve Arda, 2008).

3.1.3.2. Solüsyon B (4X)

75 mL 2 M Tris-HCl (pH 8.8), 4 mL %10'luk SDS ve 21 mL distile su karışımından oluşur. Buzdolabında 4°C'de saklanmıştır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.3. Solüsyon C (4X)

50 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 mL %10'luk SDS ve 46 mL distile su karışımından oluşur. Buzdolabında 4°C'de saklanmıştır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.4. %10 SDS (Sodium dodecyl sulfate)

10 g SDS distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

3.1.3.5. %10 Amonyum Persülfat (AMPS)

SDS-PAGE jellerinin hazırlanmasında polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılmıştır. 0,5 g Amonyum Persülfat distile su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır (Temizkan ve Arda, 2008).

3.1.3.6. TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)

Polimerizasyonun gerçekleşmesi için katalizör olarak kullanılmıştır.

3.1.3.7. Örnek Yükleme Tamponu (62,5 mM Tris (pH 6.8), %2 SDS, %10 gliserol, 0,72M 2-β-merkaptolanol, %0,05 bromfenol mavisi)

0,075 g Tris 5 mL distile suda çözüldükten sonra HCl ile pH 6.8'e ayarlanmış ve 0,2 g SDS, 1 mL gliserol, 0,0855 mL 2-β-merkaptolanol, 0,005 g bromfenol mavisi eklendikten sonra distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Kullanılacak hacimlere bölünerek derin dondurucuda (-20°C) saklanmıştır (Bae ve ark, 1999).

3.1.3.8. Yürütme Tamponu (0,025M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH 8.3)

3 g Tris, 14,4 g glisin, 1 g SDS tartıldıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Buzdolabında 4°C'de saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

3.1.3.9. Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama Çözeltisi

SDS-PAGE jelinin elektroforez işleminden sonra boyanması ve protein bantlarının görünür hale gelmesi amacı ile kullanılmıştır. 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası 500 mL metanolde çözüldürüldükten sonra 100 mL asetik asit (glasiyel) eklenerek çözelti distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında (6 ay) saklanabilir (Temizkan ve Arda, 2008).

3.1.3.10. Yıkama (Bağlanmamış Boyayı Uzaklaştırma 'Destaining' Çözeltisi)

SDS-PAGE jelinin Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandıktan sonra jeldeki boya fazlalığının geri alınarak bantların netleşmesi amacı ile kullanılmıştır. 125 mL metanol, 175 mL asetik asit ve 2200 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 1 ay saklanabilir (Temizkan ve Arda, 2008).

3.1.4. pH Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar

3.1.4.1. Sitrat Tamponu

Tannazın pH 3.0-5.8 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0,1 M sitrik asit çözeltisi (21,01 g/L) ve 0,1 M sodyum sitrat çözeltisi (29,41 g/L $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) ve distile su istenilen pH değeri için aşağıda verilen oranlarda karıştırılarak tampon hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

Çizelge 3.7. Sitrik Asit Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	0.1 M Sitrik Asit mL	0.1 M Sodyum Sitrat mL	Distile su mL
3.0	46,5	3,5	50
3.4	40,0	10,0	50
3.8	35,0	10,5	50
4.2	31,5	18,5	50
4.6	25,5	24,5	50
5.0	20,5	29,5	50
5.4	16,0	34,0	50
5.8	11,8	38,2	50

3.1.4.2. Tris-Maleat Tamponu

Tannazın pH 6.2-7.4 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0,2 M Tris-Maleat çözeltisi; 3,63 g Tris (24,2 g/L), 3,48 g Maleik asit (23,2 g/L) ve distile su ile 150 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Bunun yanında 0,2 M NaOH (8 g/L) çözeltisi; 0,8 g NaOH, 100 mL distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden istenilen pH değerine sahip tampon aşağıda verilen oranlarda karıştırılarak hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

Çizelge 3.8. Tris-Maleat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	0.2 M Tris-maleat mL	0.3 M NaOH mL	Distile su mL
6.2	25	15,75	59,25
6.6	25	21,25	53,75
7.0	25	24	51
7.4	25	27	48

3.1.4.3. Tris [Tris (Hidroksimetil)-Aminometan] Tamponu

Tannazın pH 7.6-9.0 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0,2 M Tris (Trizma base) çözeltisi (24,2 g/L) ve 0,2 M HCl çözeltisi ve distile su istenilen pH değeri için aşağıda verilen oranlarda karıştırılarak tampon hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

Çizelge 3.9. Tris Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	0.2 M Tris mL	0.3 M HCl mL	Distile su mL
7.6	25	2,5	72,5
8.0	25	4,05	70,95
8.4	25	8,25	66,75
8.8	25	13,4	61,6
9.0	25	19,2	55,8

3.1.4.4. Karbonat-Bikarbonat Tamponu

Tannazın pH 9.2-10.4 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0,2 M susuz sodyum karbonat çözeltisi (21,0 g/L) ve 0,2 M sodyum bikarbonat çözeltisi (16,8 g/L) ve distile su istenilen pH değeri için aşağıda verilen oranlarda karıştırılarak tampon hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

Çizelge 3.10. Karbonat-Bikarbonat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	0.2M Susuz Sodyum Karbonat mL	0.2M Sodyum Bikarbonat mL	Distile su mL
9.2	2	23	75
9.6	8	17	75
10.0	13.75	11.25	75
10.4	19.25	5.75	75

3.2. Metod

3.2.1. *Bacillus sp.* Bakterilerinin İzolasyonu

1. Doğu çınarı, doğu mazısı, mavi servi ve çam ağaçlarının 0-5 cm derinlikteki topraklarından örnekleme yapılmıştır. Toprak örneklerinden 2'er gr tartılarak 10'ar mL steril serum fizyolojik tuzlu su içerisinde vorteks ile homojenize edilmiştir.
2. İzolasyon işlemi 2 paralel halinde yürütülmüştür. Bunlardan 1'er tanesi 85°C'de 15 dk inkübe edilerek endosporuz bakterilerin eliminasyonu sağlanmıştır.
3. Her bir toprak süspansiyonundan 10 'ar mL tannik asit içerikli buyyona 1mL (Mondal ve ark., 2001a) ekim yapılmış, 72 saat boyunca 37°C'de 150 rpm'de orbital çalkalayıcıda üremeye bırakılmıştır.
4. İnkübasyon sonunda bu besiyerlerinden PCA'ya azaltma yöntemi ile ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Tek düşen koloniler PCA'ya çizgi ekimle yine 37°C'de 24 inkübasyondan sonra buzdolabında (+4 °C)' de saklanmıştır.

3.2.2. Katı Besi Yerinde Tannaz Pozitif *Bacillus* Türlerinin Tespiti

İzole edilen bakteriler bir gece boyunca inkübe edilerek tanen/agarlı besiyerine nokta ekim yapılmış ve 37°C'de 48-96 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra 0.01 M FeCl₃ ile boyanarak ve 1M NaCl ile yıkanarak biyodegradasyon zonu tesbit edilmiştir. En fazla zon çapına sahip olan bakteri suşları üretici organizma olarak belirlenecek ve gliserol stoku yapılarak deney zamanına kadar -86°C'de saklanacaktır (Kumar ve ark., 2010).

3.2.3. Sıvı Besiyerinde Tannaz Enziminin Üretilmesi

Katı besiyerinde tannaz pozitif bakteriler enzim üretim ortamını içeren 10 mL'lik tüplere ekilerek 37°C'de 24 saat 150-200 rpm çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 98 mL olan aynı besiyeri ortamı içeren erlenlere her örnekten 2 mL ilave edilmiş ve 37°C'de 24 saat 150-200 rpm orbital inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra bakteri kültürü 10.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj (Sigma 2-16 K) yapıldıktan sonra süpernatant (üst faz) ve pellet kısmı (çökelti) ayrılmıştır. Süpernatant kısmı enzim aktivite analizlerinde kullanılmıştır.

3.2.4. Bakteri Büyüme Eğrisinin Türbidometrik Sayım Yöntemi (Optik Dansite (OD₆₀₀)) ile Belirlenmesi

Türbidometrik sayım yönteminde spektrofotometre veya kolorimetre'den yararlanılmaktadır. Yöntemin prensibi, incelenecek olan sıvı örnekte mikroorganizma sayısı ne kadar çoksa, bu sıvının bulanıklılığı (türbiditesi) da o derece artmasına dayanmaktadır. İncelenen ortamda bulanıklık arttıkça spektrofotometreden gelen ışınlar (I₀), ortamda daha fazla tutulacak yani bir deyişle ortam daha az ışının geçmesine izin verecektir. Böylece ortamı delip geçen ışın miktarı (I) daha az olacaktır (I<I₀). Türbidometrik yöntemlerle sıvı bir ortamdaki bulanıklılığın, dolayısıyla da mikroorganizma üremesinin derecesi 'optik dansite' (OD) cinsinden ölçülebilmektedir (Temiz, 2008). Çalışmada bakteri örnekleri LB Broth içeren 10 mL'lik tüplere ekilerek 37°C'de 24 saat 150-200 rpm çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 98 mL olan enzim

ortamı içeren erlenlere her örnekten 2 mL ilave edilmiş ve 37 °C’de 24 saat 150-200 rpm çalkalamalı inkübatöre konarak her saat başı (1-12 saat ve 24-48 saat) örnek alınarak 600 nm’de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Ölçüm tamamlandıktan sonra elde edilen sonuçlar ile bakterilerin büyüme grafiği elde edilmiştir (Songre-Ouattara ve ark, 2008; Palacios ve ark, 2008; Luechai ve Dharmsthiti, 2010).

3.2.5. Tannaz Aktivitesi İçin Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Enzim aktivitesinin belirlenmesi için, aşağıda belirtildiği gibi hazırlanan örneklerin her birinden 0,5 mL tüplere alınmış ve birine 300 µl Rhodanine eklenerek 30°C’de 5 dakika inkübasyon yapılmış, 200 µl 0,5 N KOH eklenmiş ve 30°C’de 5 dakika inkübe edilmiş, 4 mL saf su ilave edilerek 30°C’de 5 dakika inkübasyon yapılmıştır 700 nm dalga boyunda, 96 kuyucuklu ‘Multiskan FC Mikroplaka Okuyucu’ ile blank’e karşı ölçülmüştür. Gallik asit konsantrasyonuna (µg/mL) karşı okunan absorbans değerleri çizilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

Çizelge 3.11. Tannaz aktivite tayini için kalibrasyon grafiği hazırlanması

	Blank	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5
0,05 mM Sitrat tamponu	0,5	0,875	0,75	0,5	0,25	0
Stok çözelti(mL)	0	0,125	0,25	0,5	0,75	1
Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu (µg/mL)		1	1	1	1	1

3.2.6. Tannaz Aktivitesi

İzole edilen enzim örneğinden tannaz aktivitesi tayin edilirken, aktivite enzim, blank ve kontrol grubu olarak bakılmıştır. Enzim, substrat ve 0,05 M sitrat tamponu ayrı ayrı 30 °C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. Enzim örneği (250 µl

enzim+250 µl substrat), blank (250 µl 0,05 M sitrat tamponu+250 µl substrat), kontrol grubu (250 µl substrat) 30 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Her birine 300 µl Rhodanine eklenerek 30 °C'de 5 dakika inkübasyon yapılmıştır. 200 µl 0,5 N KOH eklenmiş ve 30 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Sadece kontrol grubuna daha önce 30 °C'de 5 dakika inkübe edilmiş 250 µl enzim ilave edilmiştir. Her bir tüpe 4 mL saf su ilave edilerek 30 °C'de 5 dakika inkübasyon yapılmıştır. 520 nm dalga boyunda 96 kuyucuklu 'Multiskan FC Mikroplaka Okuyucu' ile ölçüm yapılmıştır. İnkübasyon işlemleri ısıtıcı soğutucu bloklarda ve su banyosunda yapılmıştır. Ölçüm sonunda tannaz aktivitesi Eşitlik 3.1.'e göre hesaplanmıştır (Sharma ve ark., 2000).

Eşitlik (3.1)

Aktivite= (Enzim Örneği-Blank)-(Kontrol-Blank)

3.2.7. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için Sitrat (pH 3.0-5.8), Tris-Maleat (pH 6.2-7.4), Tris (pH 7.6-9.0) ve Karbonat-Bikarbonat (pH 9.2-10.7) tamponları kullanılarak farklı pH değerlerine sahip (pH 3.0-10.7) ve içerisinde 0.01 M methyl gallate olan substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Aktivite tayini için Enzim, substrat ve 0,05 M sitrat tamponu ayrı ayrı 30 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Enzim örneği (250 µL enzim+250 µL substrat), blank(250 µL 0,05 M sitrat tamponu+250 µL substrat), kontrol grubu (250 µL substrat) 30 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Her birine 300 µL Rhodanine eklenerek 30 °C'de 5 dakika inkübasyon yapılmıştır. 200 µL 0,5 N KOH eklenmiş ve 30 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Sadece kontrol grubuna daha önce 30 °C'de 5 dakika inkübe edilmiş 250 µL enzim ilave edilmiştir. Her bir tüpe 4 mL saf su ilave edilerek 30 °C'de 5 dakika inkübasyon yapılmıştır. 520 nm dalga boyunda 96 kuyucuklu 'Multiskan FC Mikroplaka Okuyucu' ile ölçüm yapılmıştır

3.2.8. Enzimin Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın saptanması için 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C'lik sıcaklıklar seçilmiştir. Aktivite tayinleri için 20-80° aralığındaki denemeler ısıtıcı-soğutucu bloklarda, 90-100 °C aralığındaki denemeler yağ banyosunda yapılmıştır. Aktivite tayini için 250 µL enzim ve 250 µL substrat karıştırılarak (optimum pH değerinde hazırlanmış) standart aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.9. Enzimin Termal (Sıcaklık) Stabilitesinin Saptanması

Termal (sıcaklık) stabilitesinin saptanması için enzim 80-90-100°C sıcaklıklarda 0-5-10-15-20-25-30 dakika ön inkübasyona bırakılmışlardır. Ön inkübasyon uygulamasından sonra 250 µL enzim ve 250 µL substrat (optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerinde hazırlanmış) karıştırılarak optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklıkta 5 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.10. İnhibitör ve Divalent Katyonların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim inhibitörü olarak EDTA, metal iyonları olarak MgCl₂, CuCl₂, CoCl₂, HgCl₂, NiCl₂, MnCl₂, CaCl₂, FeCl₂ ve ZnCl₂ stok çözeltileri hazırlanarak kullanılmıştır. Enzim ve çözelti karışımının son konsantrasyonu 1 mM (1 µL çözelti ve 99 µL enzim) ve 5 mM (5 µL çözelti ve 95 µL enzim) olacak şekilde hazırlandıktan sonra saat 37°C'de ön inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Quan ve ark, 2002). Ön inkübasyondan sonra 250 µL enzim ve 250 µL substrat (optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerinde hazırlanmış) karıştırılarak optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklıkta standart aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.11. SDS-PAGE Yöntemi ile Enzimin Moleküler Ağırlığının Saptanması

Tannaz enziminin moleküler ağırlığının saptanması amacıyla %10'luk SDS-PAGE kullanılmıştır. %12 konsantrasyonda ayırma jeli ve %5 konsantrasyonda yükleme jeli hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

3.2.11.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması (%12'lik)

8 mL Monomer (Solüsyon A), 5 mL Tampon (Solüsyon B), 7 mL distile H₂O karışımının havası alındıktan sonra (5 dakika degaz işlemiyle moleküler oksijenin uzaklaştırılması) 66 µL Amonyum persülfat ve 15 µL TEMED eklenerek jel kasetine enjektör yardımıyla yeterli miktarda doldurulmuştur. Jelin üst yüzeyi atmosferik oksijenin difüzyonunu önlemek ve düzgün bir tabaka elde etmek amacı ile ince bir su tabakası veya 0.3 mL su ile doyurulmuş n-butanol ile kapatılarak oda sıcaklığında 30-60 dakika süreyle polimerizasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.12. Ayırma jelinin içeriği

Solüsyonlar	Miktar
Sol A	8 mL
Sol B	5 mL
Distile su	7 mL
AMPS	(%10) 66 µL
TEMED	15 µL

3.2.11.2. Yükleme Jelinin Hazırlanması (%5'lik)

Ayırma jelinin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra jelin üst yüzeyindeki distile su dökülerek, 1,5 mL Monomer (Solüsyon A), 2,25 mL Tampon (Solüsyon C), 5,25 mL distile su karışımının havası alındıktan sonra (5 dakika degaz işlemiyle moleküler oksijenin uzaklaştırılması) 30 µL Amonyum persülfat ve 10 µL TEMED eklenerek ayırma jelinin üzerine enjektör yardımıyla yeterli miktarda dengeleme jeli dökülüp örnek kuyucuklarının oluşması için tarak

yerleştirilmiştir (Bu sırada tarağın dışlarının altına hava kabarcığı sıkışmamasına dikkat edilmelidir. Çünkü oksijen polimerizasyonu inhibe eder ve kuyucukların bozuk olmasına yol açar. Bu nedenle önce tarağın bir ucu daldırılır, daha sonra diğer ucu yavaşça yere paralel konuma getirilerek sıvıya tamamen batırılır). Atmosferik oksijen difüzyonunu önlemek amacıyla üst yüzey su ile kaplanmış ve oda sıcaklığında 30-60 dakika süreyle polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra tarak bir taraftan başlayarak ve kuyucukların bozulmamasına dikkat edilerek yavaşça kaldırılmıştır (Bollag ve ark, 1996).

Çizelge 3.13. Yükleme jelinin içeriği

Solüsyonlar	Miktar
Sol A	1,5 mL
Sol C	2,25 mL
Distile su	5,25 mL
AMPS	30 µL
TEMED	10 µL

3.2.11.3. Örneğin ve Standartın Hazırlanması

Enzim ve örnek yükleme tamponu eşit hacimde eppendorf tüpünde karıştırılmıştır. Aynı zamanda standart (marker) protein karışımı da örnek yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra tüm tüpler 5 dakika 95°C'de kaynar su banyosunda bekletilmiştir.

3.2.11.4. Enzim Örneklerinin SDS-PAGE Jeline Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Protein örnekleri 20 µL, marker protein ise 4 µL konsantrasyonda jele yüklenmiştir. Örnekler jele yüklendikten sonra üst yüzey saf su ile yıkanmıştır. Yürütme tamponu elektroforez sisteminin alt bölümündeki işaretli yere (elektrodun temas edebileceği bir yüksekliğe) kadar doldurulduktan sonra jellerin bulunduğu kaset, jelin alt kısmında hava kabarcığı oluşmayacak şekilde elektroforez aygıtına

yerleştirilmiş ve elektroforez sisteminin üst bölgesi de yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Sistem güç kaynağına bağlanarak 20 mA akımda yaklaşık 4 saat yürütülmüştür.

3.2.11.5. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Görüntülenmesi

Elektroforez işleminden sonra jel dikkatlice cam plakalar arasından çıkarılmış ve CBB R-250 ile 45 dk. oda sıcaklığında (çalkalayıcı üstünde) boyanmıştır. Boyama işleminden sonra jele bağlanmış fazla boyanın uzaklaştırılması için birkaç kez boyayı geri alma çözeltisi değiştirilerek 1 gece boyayı geri alma çözeltisinde bekletilen jel şeffaflaşması için %10 gliserol içeren gliserollü su içinde 3 saat bekletilmiş ve jel MiniBis UW SDS-PAGE jel dökümantasyon cihazında görüntülenmiştir. Protein örneklerine bağlanan boya jelden çıkmadığı halde jelin diğer bölgelerindeki boya ortamdaki uzaklaşır ve örnekler görünür hale gelirler.

3.2.12. Bakterilerin Gliserol Stok ile -86°C'de Uzun Süre Saklanması

İzole edilen *Bacillus sp.* suşlarının 6 ay kadar saklanabilmesi için gliserol stok yapılmıştır. *Bacillus sp.* suşları 5 mL LB Broth içeren tüplere ekilmiş ve 37°C'de 24 saat orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Gliserol stok için 121°C'de 1,2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiş eppendorf tüpleri ve gliserol kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında toplam hacmin %20'si gliserol olacak şekilde gliserol ilave edilmiş ve steril eppendorf tüplerine 1,5 mL hacimde ilave edilerek -86°C'de saklanmıştır.

3.2.13. Gliserol Stokta Bulunan Bakterilerin Yeniden Canlandırılması

Gliserol stokta -86°C'de saklanan bakteri örneklerinden 1,5 mL alınarak 5 mL hacmindeki LB Broth besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de, 150 rpm'de 24 saat orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda sıvı besiyerinden Nutrient agar'a azaltma ekim yapılarak 37°C'de 1 gece inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra tek düşmüş kolonilerden saf kültür elde edilerek stok kültür hazırlanıp +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.14. VITEK-II Kompakt Sistem İle Bakteri İdentifikasyonu

VITEK-II Kompakt Sistem ile gram boyaması yapılan bakterilerin identifikasyonu yapılmıştır. İdentifikasyonu yapılacak bakteri örneği TSA besiyerine çizgi ekim yapılmış ve 37°C'de 18-20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 1 gece %70'lik etil alkolde bekletilen VITEK tüplerine 3-3,5 mL steril serum fizyolojik su ilave edilmiş ve steril kürdan ile alınan bakteri serum fizyolojik su içerisinde vorteks ile homojen hale getirilmiştir. Macfarland cihazına tüp yerleştirilerek 360° döndürülmüştür ve yoğunluk 1.80-2.20 aralığında ayarlanmıştır. VITEK tüplerine *Bacillus* kitleri yerleştirilerek bu cihazında okunmuştur. Bakterilerin türlerinin ne olduğunu bize % cinsinden sonuç vermiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Toprak Örneklerinden *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

Yapılan çalışmada Çukurova Üniversitesi Kampüsü'nden alınan toprak örneklerinden izole edilen bakteri sayıları Çizelge 4.1'de verilmiştir. İzole edilen bakteriler Nutrient agar ortamında çizgi ekim şeklinde üretildikten sonra, yapılacak analizlerde kullanılmak üzere, stok kültür şeklinde +4°C'de buzdolabında saklanmışlardır.

Çizelge 4.1. Çeşitli Toprak Örneklerinden İzole Edilen Suşlar

Toprak örnekleri	İzole edilen suşlar
<i>Pinus brutia</i> Tenore (Kızılcım)	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 1.10, 1.11, 1.12, 1.13, 1.14, 1.15, 1.16, 1.17, 1.18, 1.19
<i>Thuja orientalis</i> L. (Doğu mazısı)	2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14, 2.15
<i>Cupressus arizonica</i> Greene (Mavi servi)	3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14
<i>Platanus orientalis</i> L. (Doğu Çınarı)	4.1, 4.2, 4.3

4.2. Tannaz Pozitif Olan İzolatların Saptanması

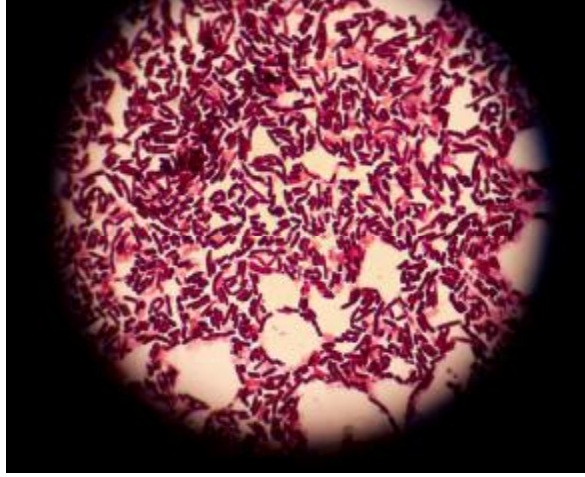
Tannik asit-Agar besiyerine nokta ekim şeklinde ekimi yapılan bakteriler 37°C'de 48-96 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda 23 suş besiyerinde zon oluşturduklarından tannaz pozitif, 28 suş zon oluşturmadığı için tannaz negatif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2. Tannik asit-Agar besiyerinde tannaz pozitif ve negatif olan suşlar

Tannaz pozitif suşlar		Tannaz negatif suşlar		
1.1	2.11	1.2	2.2	4.1
1.3	2.12	1.5	2.3	4.3
1.4	2.14	1.6	2.4	
1.9	3.3	1.7	2.7	
1.13	3.4	1.8	2.13	
1.18	3.6	1.10	2.15	
2.1	3.7	1.11	3.1	
2.5	3.8	1.12	3.2	
2.6	3.10	1.15	3.5	
2.8	3.11	1.16	3.9	
2.9	3.14	1.17	3.12	
2.10	4.2	1.19	3.13	

4.3. Bakterilerin İdentifikasyonu

Tannaz pozitif olan bakteri suşlarının *Bacillus* sp. olarak tanımlanması için gram boyama ve VITEK-2 Compact ile tür tanımlama testi yapılmıştır. Yapılan gram boyama sonucunda bakteri suşlarının mikroskopik incelemede tüm bakteri suşlarının gram pozitif ve çubuk şeklinde bakteriler olarak tanımlanmışlardır. VITEK tür tanımlama testinde ise en iyi aktivite gösteren *Bacillus* sp. suşlarının %95 olasılıkla *Bacillus coagulans* olarak tanımlama yapılmıştır.

Şekil 4.1. *Bacillus* sp. 2.11 suşunun gram boyama mikroskopik görüntüsü

DUKURUVA UNIV. FEN. FAK. BİYOL. BÖL.

Biyolojik Materyal: Laboratuvar Raporu 02.Eyl.2008 01-26 CDT sayfa 1/2
 Sistem No: 4888 02.Eyl.2008 01-26 CDT sayfa 1/2

İzolat Grubu: 2-11
 Kart Tipi: BCL Test Çeşidi: 300013422F09 (4888)

Biyolojik Materyal: 0352100554007020
 Organizma Adı:

Yorumlar:

İdentifikasyon Bilgileri	Kart: BCL	Lot No: 238287720	Son Kullanım Tarihi: 13.Nis.2014 13:00 CDT
	Tamamlanma: 02 Eyl 2008 01:52 CDT	Durum: Son	Analiz Zamanı: 14.25 saat

Seçilen Organizma: *Bacillus coagulans*
 Biyokimya: 0352100554007020 Uyarı: Çok iyi identifikasyon

BRT Organizma:

Ayrıca Analiz Organizmaları ve Testler:

Analiz Mesajları:

Uyumsuz Olan Tipik Biyotip(ler):

Bacillus coagulans Pyc4888 CDEX(SF)

Biyokimyasal Detaylar																	
1	SKVL	+	3	LysK	-	4	AspK	-	5	LeuK	+/+	7	ProA	+	8	ProA	-
9	BGLAL	+	10	PyrS	-	11	ADAL	+	12	AlaA	-	13	TyrA	+	14	ONAG	-
15	APPNA	+	16	CDEX	-	17	BGLAL	+/+	18	GLVD	-	19	IND	-	20	UAC	-
21	ELLM	+	22	MUK	-	23	AMAH	+	24	MFE	+	25	GlyA	-	26	IMAH	+
27	AMPK	+/+	28	MBLZ	-	29	NAD	+	30	PLE	-	31	SDA	-	32	GLU	+
33	BANX	+	34	PHC	-	35	PNATE	-	36	AGLU	+/+	37	STAG	-	38	STRE	+/+
39	PHU	+/+	40	BGLU	-	41	JBB	+	42	PSCNs	-	43	NAC 0.5%	-	44	KAA	-
45	OLD	+/+	46	BGC	-	47	TTZ	-	48	PCVb R	-	49			50	KAA	-

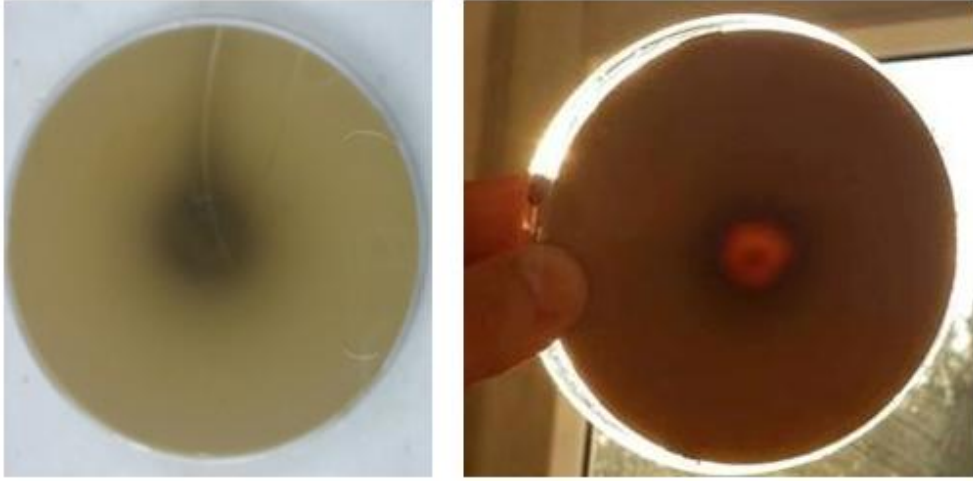
Vitek VITEK 2 Sistemi Sürümü: 07.07
 Mik. Yorum Modülü: ACS Permeabilite Son Organizma Tanı
 ACS Permeabilite Sürüm No: 1.0

Tarama Yorum Modülü: ACS Permeabilite Son Organizma Tanı
 Sayfa 1 / 1

Şekil 4.2. VITEK tür tanımlama testinin % olarak sonucu

4.4. Katı Besiyerinde Tannaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Tannik asit-Agar besiyerine nokta ekim şeklinde ekimi yapılan bakteriler 37°C'de 48-96 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyerleri 0,01 M FeCl₃ ile boyanarak boyama öncesi ve sonrası fotoğraflanmıştır. Bakteri zonu etrafında oluşan şeffaflıktan aktivitenin var olduğu gözlemlenmiştir.

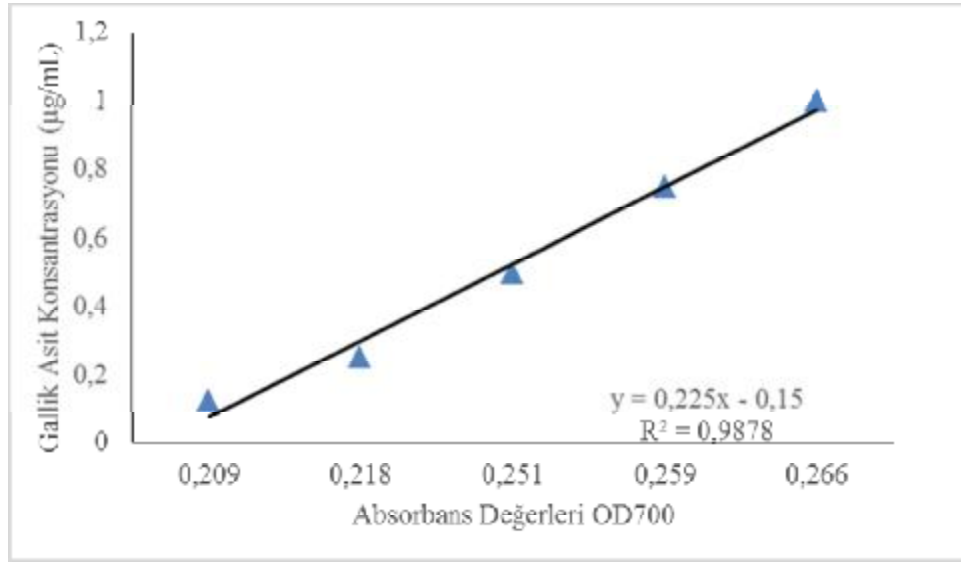


Şekil 4.3. *Bacillus* sp. 2.11 numaralı suşun boyama işleminden önceki ve sonraki görünümü

Kumar ve ark., 2010, tannaz üreten bakterilerin katı agar plakta seçilebilmesi için yeni bir metod geliştirmiştir. Daha önce kullanılan ve yaygın olan metotta plaklarda meydana gelen pigmentasyon oluşumu dikkate alınmıyordu. Yapılan bu yöntem ile tannaz üreten bakteriler plak testi kullanılarak agar plakaları üzerinde gösterildi. Tanen-protein kompleksini bölen bu yöntem ortama ilave edilen tannik asit ile oluşan ve tannaz aktivitesiyle meydana gelen bakteri kolonisi etrafında şeffaf bölgede tannik asit bozulması sonucu fark edilmektedir. Bu yöntem geleneksel yöntemlerden farklı olarak bakteri kolonisi etrafında oluşturulan zon bölgesinin açıkça görülebilir olması ve pigmentasyon oluşmamasıdır. Sonuç alınması ve inkübasyon ile geliştirme 72-96 saat sürmüştür. Fakat bu yöntem yeni bir yöntem olup daha kısa zaman içinde daha net ve daha hassas sonuçlar vermiştir.

4.5. Kalibrasyon Grafiğinden Eğim Değerinin Belirlenmesi

Tannaz aktivitesinin yorumlanması için 0.125, 0.25, 0.50, 0.75 ve 1 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan 0,05 M gallik asit çözeltilerinin 520 nm'deki absorbans değerleri saptanmıştır. Şekil 4.4'de gallik asit konsantrasyonları ve absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki verilmiştir.



Şekil 4.4. Tannaz Aktivesi İçin Kalibrasyon Grafiği

4.6. En Yüksek Tannaz Aktivitesi Gösteren Suşun Belirlenmesi

Enzim üretimi ve karakterizasyonu için kullanılmak üzere, *Bacillus* sp. suşları enzim üretim ortamında 37°C 150 rpm'de 24 saat orbital inkübatörde inkübe edildikten sonra yapılan aktivite analizleri sonucunda basil şekilli suşlar arasında *Bacillus coagulans* suşu en yüksek tannaz aktivitesine sahip olan suşlar olarak tespit edilmiş ve yapılacak çalışmalarda bu suşun ürettiği ekstrasülüler enzim kullanılarak gerekli analizler yapılmıştır.

Not 1: Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucu aktivitenin çok yüksek olması nedeniyle enzim, pH 5.0 sitrat tamponu ile 1:1 oranında seyreltilmiştir.

Not 2: 1 Unite tannaz aktivitesi 24 saat sıvı tannik asitli besiyerinde 150-200 rpm çalkalamada, 30°C, pH 5.0'da bir dakikada 1 L hacimde 1 µmol tannik asiti hidroliz eden enzim miktarı olarak tanımlanan eşitlik (3.1) yardımıyla hesaplanmıştır.

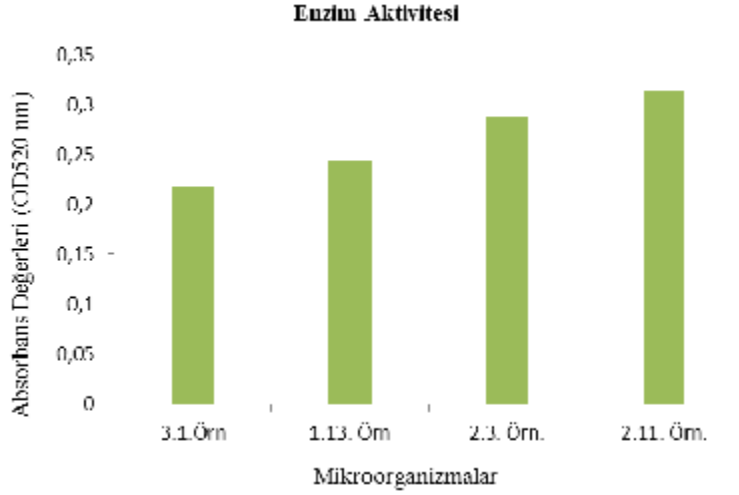
Bacillus coagulans ekstraselüler enzim aktivitesi 0,313 µmol/mL olarak spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenmiştir.

Mondal ve ark., (2000b), *Bacillus licheniformis*'ten 18-21 saat büyümesinden sonra glukozun (1 g L⁻¹) varlığında ve yokluğunda %1.5 w/v tannik asitle maksimum ekstraselüler tannaz aktivitesini 0.21 U/mL olarak bulmuş olup maksimum büyümenin 36 saatten önce meydana gelmediğini bildirmişlerdir.

Mondal ve ark. (2001b), topraktan izole ettikleri *Bacillus cereus*'un maksimum tannaz üretimini 0.22 U/ mL olarak saptamışlardır.

Batra ve ark. (2005), tannaz üretimini *Aspergillus* türlerinden *Aspergillus fumigatus* 8.3 IU/ml, *Aspergillus versikolor* 7.0 IU/ml, *Aspergillus flavus* 4.95 IU/ml ve *Aspergillus caespitosum* 4.47 IU/ml iken *Penicillium*'lar arasında *Penicillium charlesii* 4.82 IU/ml, *Penicillium variable* 4.70 IU/ml, *Penicillium crustosum* 4.7 IU/ml ve *Penicillium restrictum* 4.47 IU/ml olarak tesbit etmişlerdir.

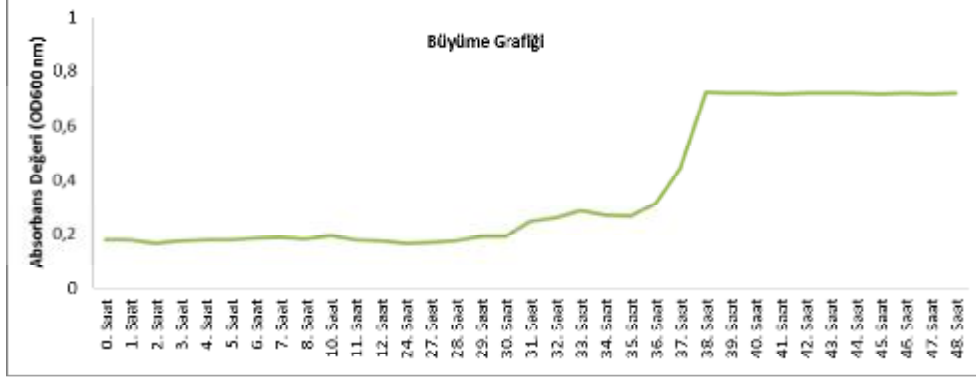
Fuentes-Garibay ve ark. (2015), *Pichia pastoris* suşunda 48 saat inkübasyon sonucunda ekstraselüler enzim üretimini 0.57 U/ml olarak saptamışlardır.



Şekil 4.5. Tannaz aktivitesi gösteren en iyi 4 suşun gösterdikleri absorbans değerlerinin karşılaştırılması

4.7. *Bacillus coagulans* Suşunun Büyüme Eğrisinin Türbidometrik Sayım Yöntemi (Optik Dansite (OD₆₀₀)) ile Belirlenmesi

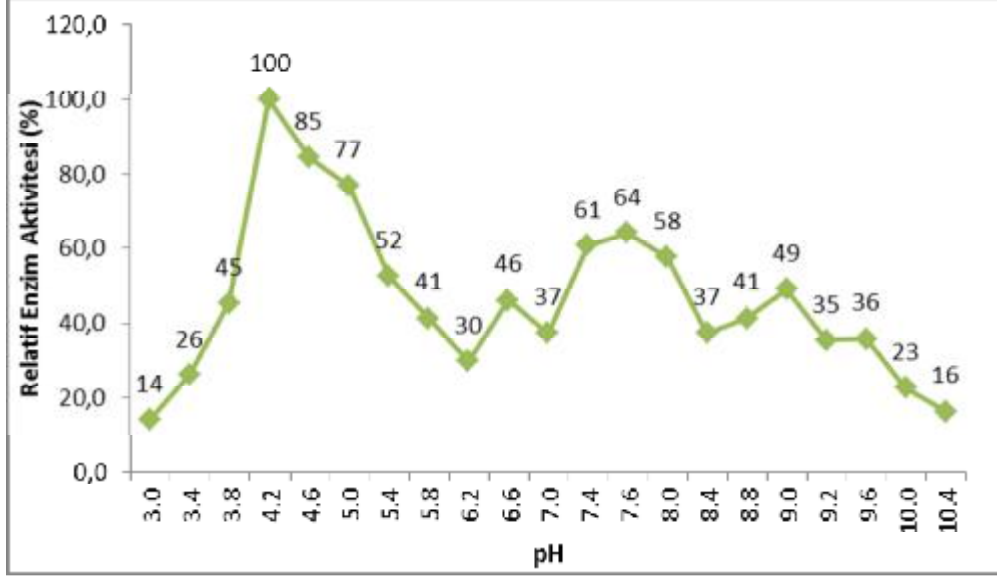
Bacillus coagulans suşu, LB Broth besiyerine stok besiyerinden inoküle edilerek 37°C’de 200 rpm’de 1gece (16-18 saat) inkübe edildikten sonra %1 tannik asit içerikli besiyerine %1 (v/v) oranında inoküle edilmiştir. Kültürden 1’er saat aralıklarla örnek alınarak OD₆₀₀ ‘de absorbans degerleri kaydedilmiştir. Kör olarak bakteri içermeyen besiyeri kullanılmıştır.



Şekil 4.6. *Bacillus coagulans* Suşunun Büyüme Grafiği

4.8. *Bacillus coagulans* Enziminin Optimum pH Aralığı

Bacillus coagulans tannaz Sitrat (pH 3.0-5.8), Tris-Maleat (pH 6.2-7.4), Tris (7.6-9.0), Karbonat-Bikarbonat (9.2-10.4) tamponları ile 30°C'de 5 dakika inkübasyon gerçekleştirilerek relatif aktivite değeri saptanmıştır. En yüksek aktiviteye pH 4.2'de (%100) Sitrat tamponunda sahip olduğu saptanmıştır. *Bacillus coagulans* ekstraselüler enziminin farklı pH değerlerine ait sonuçlar grafikte verilmiştir. Enzim pH 4.2-4.6 aralığında ortalama %92.5 aktivite gösterirken, pH 5.0-9.0 ortalamanın %49.42'e, pH 9.2-10.4 aralığında ise %27.5 değerine gerilediği saptanmıştır.



Şekil 4.7. *Bacillus coagulans* Suşundan Elde Edilen Ekstraselüler Tannaz Enziminin Optimum pH'sı

Barthomeuf ve ark. (1994), *Aspergillus niger* LCF 8 suşundan tannaz üretmiş, enzim karakterizasyonu sonucu optimum pH'ını 5.0 olarak saptamışlardır.

Mondal ve ark. (2001b), topraktan izole ettikleri *Bacillus cereus* KBR9 suşundan ürettikleri tannazı karakterize etmeleri sonucu optimum pH 4.5-5.0 olarak belirlemişlerdir.

Ayed ve Hamdi (2002), *Lactobacillus plantarum*'dan ürettikleri tannazın karakterizasyonu sonucunda optimum pH'ını 6.0 olarak ortaya koymuşlardır.

Ilori ve ark (2007), bahçe toprağından izole ettikleri *Bacillus sp.* organizmalarının tannaz enzimi karakterizasyonu sonucu optimum tannaz aktiviteisini asidik olarak pH4.5 saptamışlardır.

Goel ve ark. (2011), *Enterococcus faecalis*'den ürettikleri tannazın karakterize sonucu optimum pH'ını 6.0 olarak saptamışlardır.

Beniwal ve ark. (2013), *Enterobacter cloacae* MTCC 9125 suşundan ürettikleri termofilik tannazın optimum pH'ını 5.5 olarak saptamışlardır. Ulusoy

(2013), *L. plantarum* ekstraselüler enzimin optimum pH aktivitesini 6.0, *L.brevis* ekstraselüler enzimin optimum pH aktivitesini 8.0 olarak saptamıştır. Zakipour-Molkabadi ve ark. (2013), *Penicillium* sp. *EZ-ZH190* ile ürettikleri enzimin karakterizasyonu sonucu optimum pH'ını ise 5.0 olarak saptamışlardır.

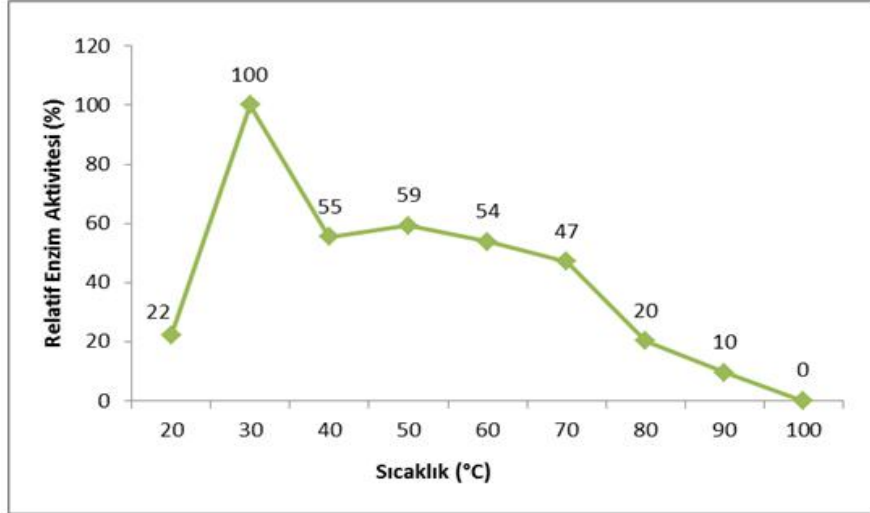
Kumar ve ark. (2015), *Klebsiella pneumoniae* KP715242 suşundan tannaz üreterek yaptıkları karakterizasyon sonucunda pH'ını 5.5 olarak belirlemişlerdir.

Aftab ve ark. (2016), bahçe toprağından izole ettikleri *Bacillus subtilis* suşundan ürettikleri tannazın optimum pH'ını 5.0 olarak saptamışlar.

Literatürle karşılaştırma yapıldığı zaman çalışmamızda ürettiğimiz tannazın en düşük pH değerine sahip olduğu belirlenmiştir.

4.9. *Bacillus coagulans* Enziminin Optimum Sıcaklık Aralığı

Bacillus coagulans enziminin optimum sıcaklığını saptamak amacıyla 20-100°C sıcaklık aralığında aktivite analizleri yapılmıştır. Analizler için kullanılan substrat optimum aktivitenin gerçekleştiği pH 4.2 Sitrat tamponundan hazırlanmış ve 5 dakika inkübasyon gerçekleştirilerek relatif aktivite değeri saptanmıştır.



Şekil 4.8. *Bacillus coagulans* Ekstraselüler Tannaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değeri

Bacillus coagulans ekstraselüler enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 30°C olmakla birlikte sıcaklık değerleri incelendiğinde 20°C'de %22, 40°C'de %55, 50°C'de %59, 60°C'de %54, 70°C'de %47, 80°C'de %20, 90°C'de %10, 100°C'de %0 olarak saptanmıştır. 20-70°C aralığında ortalama %56.28 aktiviteye sahipken, 80-100°C aralığında aktivitenin yaklaşık %48 oranında azalma göstererek ortalama %8.9 aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar dikkate alındığında, *Bacillus coagulans* ekstraselüler enziminin 20°C ile 70°C aralığında yüksek bir aktiviteye sahip olduğu ve bu özelliği ile mezofilik özellik göstermektedir.

Mondal ve ark. (2001b), *Bacillus cereus* KBR9 suşundan ürettikleri tannazın optimum sıcaklık aktivitesini 40°C olarak saptamışlardır.

Mahapatra ve ark. (2005), *Aspergillus awamori nakazawa*'dan ürettikleri ve saflaştırdıkları tannazı karakterize etmişler ve aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı 35°C olarak saptamışlardır.

Chhokar ve ark. (2010), *Aspergillus heteromorphus* MTCC 8818 suşundan ekstraselüler enzim tannaz üretmek saflaştırmışlar optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlemişlerdir.

Goel ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada *Enterococcus faecalis* tannazını karakterize etmişler, aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı 40°C olarak belirlemişlerdir.

Yao ve ark. (2011), tannaz kodlayan tan410 adındaki genden ürettikleri tannazı saflaştırarak karakterize etmişler ve aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı 30°C olarak bulmuşlardır.

Beniwal ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada *Enterobacter cloacae* MTCC 9125 suşundan ürettikleri termofilik tannazı saflaştırarak karakterize etmiş, enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı 50°C olarak saptamışlardır. Jana ve ark. (2013), *Bacillus subtilis* PAB2' den tannaz üretmişler ve aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı 40°C olarak belirlemişlerdir.

Wu ve ark. (2015), *Streptomyces sviveus* suşundan tannaz üreterek karakterize etmişler, optimum aktivite gösterdiği sıcaklığı 50°C olarak saptamışlardır.

Chaitanyakumar ve Anbalagan (2016), *Staphylococcus lugdunensis*'ten tannaz kodlayan geni klonlanmış, enzimi saflaştırarak karakterize etmiş, aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı 40°C olarak belirlemişlerdir.

4.10. *Bacillus coagulans* Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular

Bacillus coagulans suşundan elde edilen ekstraselüler tannaz enziminin termal stabilitesinin saptanması amacıyla 80-90-100°C aralığında 5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika süreyle ön inkübasyondan sonra aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerindeki substrat ile analizler gerçekleştirilmiştir.

Bacillus coagulans ekstraselüler enziminin 5 dakikada 80°C'de %40.15, 90°C'de %1.51 ve 100°C'de %39.42 kalan enzim aktivitesi elde edilmiştir. Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen bütün sıcaklık değerlerinde (80-100°C) 5 dakika süreyle ortalama %27.03 oranında orjinal aktivitesini korumuştur.

Enzim 10 dakikada 80°C'de %61.47, 90°C'de %22.60 ve 100°C'de %25.65 kalan enzim aktivitesi elde edilmiştir. Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen bütün sıcaklık değerlerinde 10 dakika süreyle ortalama %36.57 oranında orjinal aktivitesini korumuştur.

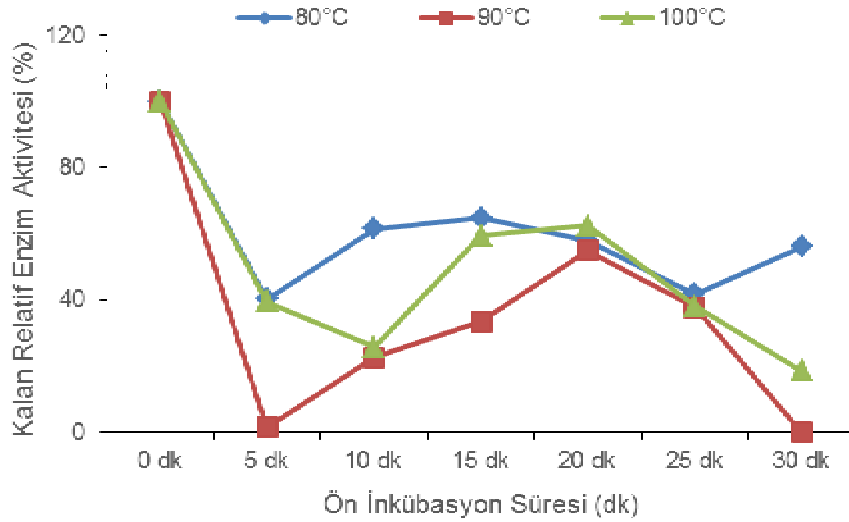
Enzim 15 dakikada 80°C'de %64.80, 90°C'de %33.40 ve 100°C'de %59.40 kalan enzim aktivitesi elde edilmiştir. Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen bütün sıcaklık değerlerinde 15 dakika süreyle ortalama %52.53 oranında orjinal aktivitesini korumuştur.

Enzim 20 dakikada 80°C'de %57.87, 90°C'de %54.83 ve 100°C'de %62.43 kalan enzim aktivitesi elde edilmiştir. Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen bütün sıcaklık değerlerinde 20 dakika süreyle ortalama %58.38 oranında orjinal aktivitesini korumuştur.

Enzim 25 dakikada 80°C'de %41.67, 90°C'de %37.62 ve 100°C'de %38.13 kalan enzim aktivitesi elde edilmiştir. Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen bütün sıcaklık değerlerinde 25 dakika süreyle ortalama %39.14 oranında orjinal aktivitesini korumuştur.

Enzim 30 dakikada 80°C'de %56, 90°C'de %0 ve 100°C'de %18.56 kalan enzim aktivitesi elde edilmiştir. Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen bütün sıcaklık değerlerinde 30 dakika süreyle ortalama %25 oranında orjinal aktivitesini korumuştur.

Bacillus coagulans ekstraselüler tannaz enziminin termal stabilitesi elde edilen veriler dikkate alındığında bütün sıcaklık değerlerinde 0-30 dakikalık ön inkübasyon süresi boyunca ortalama %39,75 değerinde enzim aktivitesi göstermiştir. Elde edilen bu sonuç enzimin mezofil olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.9. *Bacillus coagulans* Ekstraselüler Tannaz Enziminin Termal Stabilitesi

Batra ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada *A. versicolor*'dan ürettikleri tannazın 70°C'de 1 saat sonra %67 aktif kaldığı için sıcağa dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir.

Gonçalves ve ark. (2012), *Aspergillus ochraceus*'dan ürettikleri ekstraselüler tannazın karakterizasyonunu yapmışlar, enzimin aktivitesini 1 saat boyunca 40°C'den 60°C'ye kadar korunduğunu saptamışlardır.

Beniwal ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada *Enterobacter cloacae* MTCC 9125 suşundan ürettikleri tannazı saflaştırarak karakterize etmişler 2 ve 4 saatlik inkübasyondan sonra aktivitesinin %50'sini koruduğunu ortaya koymuşlardır.

Riul ve ark. (2013), *Aspergillus phoenicis*'den bir glukoz ve çözücüye toleranslı ekstraselüler tannazın üreterek saflaştırarak karakterizasyonunu yapmışlar 50°C'de 1 saat boyunca kararlılığını koruduğunu saptamışlardır.

Zakipour-Molkabadi ve ark. (2013), *Penicillium* sp. EZ-ZH190 ile ürettikleri enzimi kısmen saflaştırmış ve karakterize etmişler, 50°C'de maksimum aktivitenin %50'sini koruduğu gözlemlemişlerdir.

Jiménez ve ark. (2014), *Streptococcus gallolyticus* UCN34'den alınan GALLO_1609 genini *Escherichia coli* BL21 (DE3) 'de aktif bir protein olarak klonlanılmış ve eksprese etmişler, 45°C'de aktivitesinin% 25' ini koruduğunu belirlemişlerdir.

4.11. *Bacillus coagulans* Enzimi Üzerine İnhibitör ve Divalent Katyonların Etkisi

Bacillus coagulans tannaz enzim üzerine, enzim-kimyasal madde karışımının son konsantrasyonu 1 ve 5 mM olacak şekilde hazırlanmış inhibitör ve divalent katyonların etkisini saptamak amacıyla enzim 37°C'de 1 saat ön inkübasyona tabii tutulduktan sonra optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerindeki substrat ile analizler yapılmıştır.

Çizelge 4.3. *Bacillus coagulans* Ekstraselüler Tannaz Enzim Aktivitesine İnhibitör ve Divalent Katyonların Etkisi

Kimyasal	Kalan Relatif Aktivite (%)	Kalan Relatif Aktivite (%)
	1 mM Konsantrasyon	5 mM Konsantrasyon
Kontrol	100	100
EDTA	26,1	45,4
CaCl ₂	18,3	13,3
HgCl ₂	74,7	35,6
MnCl ₂	0	0
ZnCl ₂	37,6	30,4
MgCl ₂	48,4	46,2
NiCl ₂	10,3	52,2
CuCl ₂	43	22,1
CoCl ₂	41,4	28
FeCl ₂	20,5	0

Bacillus coagulans ekstraselüler tannaz enzimi, enzim-EDTA karışımının son konsantrasyonunun 1 mM olduğunda enzimin %26.1, karışımın son konsantrasyonunun 5 mM olduğunda ise enzimin %45.4 oranında aktivitesini koruduğu görülmüştür. Diğer kimyasal maddelerle de aynı olacak şekilde yapılan analizlerde enzim CaCl₂'de %18.3 ve %13.3, HgCl₂'de %74.7 ve %35.6, , ZnCl₂'de %37.6 ve %30.4, MgCl₂'de %48.4 ve %46.2, NiCl₂'de %10.3 ve %52.2, CuCl₂'de %43 ve %22.1, CoCl₂'de %41.4 ve %28 ve 1mM FeCl₂'de %20.5 aktivitesini koruduğu görülürken MnCl₂'de her iki konstanrasyonda ve 5mM FeCl₂'de %100 oranlarında önemli derecede inhibe olduğu görülmüştür.

Yao ve ark. (2011), tannaz kodlayan tan410 adındaki genden tannaz üretirek saflaştırmışlar ve karakterize etmişler, aktivitenin Ca⁺², Mg⁺² ve Cd⁺² ilavesi ile arttırğını saptamışlardır.

Beniwal ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada *Enterobacter cloacae* MTCC 9125 suşundan ürettikleri tannazı saflaştırmışlar, yaptıkları karakterizasyon sonucunda, Mg^{+2} , Zn^{+2} ve Mn^{+2} , nin aktifleştirici ve Fe^{+2} , Ba^{+2} ve Cu^{+2} ise engelleyici olduğunu belirtirken Tween20, Tween80, TritonX-100 ve SDS gibi maddelerin enzim aktivitesinde önemli bir kayıp verdiğini ortaya koymuşlardır.

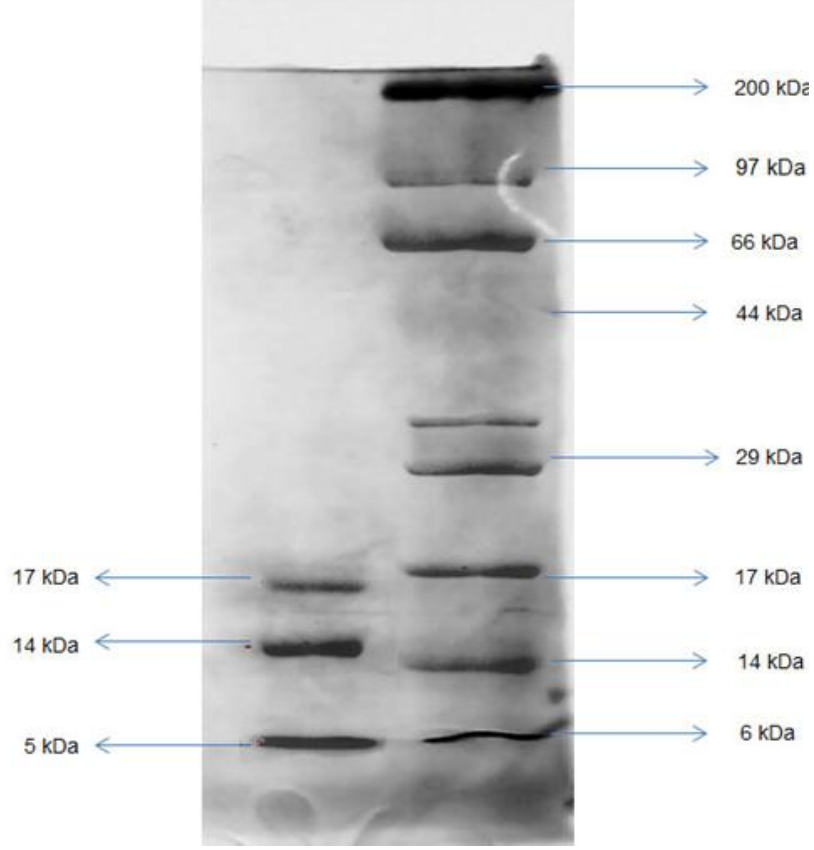
Jiménez ve ark. (2014), *Streptococcus gallolyticus* UCN34'den alınan GALLO_1609 genini *Escherichia coli* BL21 (DE3)'de klonlamış, tannaz üreterek saflaştırmış, karakterizasyon sonucunda enzim aktivitesinin Ca^{+2} ile artırdığını ve Zn^{+2} ve Hg^{+2} ile dramatik bir şekilde azaldığını ortaya koymuşlardır.

Diñçer ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada tannazı klonlanmış, *L. plantarum*'dan tannaz üreterek karakterize etmiş, $ZnCl_2$ (% 105) ile önemli ölçüde uyarıldığını ortaya koymuşlardır.

Kumar ve ark. (2015), *Klebsiella pneumoniae* KP715242 suşundan tannaz üretimi, saflaştırma ve karakterizasyon yapmışlar, Hg^{+2} , nin tannaz aktivitesi üzerinde en fazla engelleyici olduğunu, Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} enzim aktifleştirileri olduğunu, EDTA'nın herhangi bir önemli etkisine rastlanmadığını saptamışlardır.

4.12. Enzimin SDS-PAGE Analizine Ait Bulgular

Bacillus coagulans enziminin %10'luk homojen SDS-PAGE sistemi kullanılarak yapılan analiz sonucu elde edilen protein bandları şekil 4.10'da gösterilmiştir. SDS-PAGE analizi sonucunda moleküler ağırlığı 17 kDa, 14 kDa ve 5 kDa olan 3 protein bandı elde edilmiştir. Protein bandlarının moleküler ağırlıklarının saptanmasında kullanılan standart protein (Broad Range Markers: sc-2361- 500 UL 200 kDa 97 kDa 66 kDa 44 kDa 29 kDa 17 kDa 14 kDa 6 kDa) kullanılmıştır



Şekil 4.10. *Bacillus coagulans* Tannaz Enziminin SDS-PAGE ve Zimogram Sonucu

Goel ve ark. (2011), *Enterococcus faecalis*'den ürettikleri tannazı karakterize etmiş moleküler ağırlığını 45 kDa olarak saptamışlardır.

Sharma ve John (2011a), yaptıkları çalışmada *Enterobacter* sp.' den tannaz üretmişler, enzimi saflaştırarak karakterize etmişler ve moleküler ağırlığını 90 kDa olarak belirlemişlerdir.

Beniwal ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada *Enterobacter cloacae* MTCC'den ürettikleri tannazı karakterize etmişler, SDS-PAGE analizi sonucunda moleküler ağırlığı 31 ± 1 kDa olarak saptamışlardır.

Gayen ve Ghosh (2013), *Penicillium notatum* NCIM923 suşundan ekstraselüler tannaz üreterek saflaştırdıkları enzimi karakterize etmişler, moleküler ağırlığını ise 97 kDa olarak tesbit etmişlerdir.

Jana ve ark. (2013), *Bacillus subtilis* PAB2' den tannaz üretmişler, karakterize etmişler, moleküler ağırlığını 52 kDa olarak saptamışlardır.

Riul ve ark. (2013), *Aspergillus phoenicis*'ten ekstraselüler tannazın üreterek saflaştırılması ve karakterizasyonunu yapmışlar, 120 kDa ve 93 kDa alt üniteleri ile 218 kDa'lık bir belirgin doğal moleküler ağırlığını ortaya koymuşlardır.

Dincer ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada tannazı klonlanmış, *L. plantarum*'dan karakterize edilmiş bir fermente gıdadan (Shalgam) ve TanLps geninden izole edilen *Lactobacillus plantarum*'dan üretmişler, *L. plantarum*'un, moleküler ağırlığını 76.9 kDa olarak saptamışlardır.

Chaitanyakumar ve Anbalagan (2016), yaptıkları çalışmada *Staphylococcus lugdunensis*'ten tannaz kodlayan geni klonlanmış, enzimi saflaştırarak karakterize etmişler, moleküler ağırlığını 66 kDa olarak belirlemişlerdir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Enzimler tüm biyokimyasal reaksiyonların hemen hemen hepsinde görev yapan canlı sistemlerinin metabolizmasını oluşturan biyolojik katalizörlerdir. Günümüzde enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarındaki çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması sebebiyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, gittikçe önem kazanmaktadır. Endüstriyel enzimler dünya pazarında meyve suyu, biracılık, yem sanayisi, süt ve süt ürünleri, nişasta ve deterjan gibi farklı alanlarda kullanılmışlardır. Ayrıca Endüstriyel enzimlerin çoğu ekstrasellüler özelliğe sahiptirler. Gelişen biyoteknoloji sayesinde, son zamanlarda keşfedilen yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur (Vroemen, 1983; Paulo ve Gübitz, 2003 Kıran ve ark, 2006).

Enzimler bitki, hayvan ve mikroorganizma olmak üzere 3 ana kaynaktan elde edilmektedir. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimler uzun yıllardan beri kullanılmasına rağmen mikrobiyal kaynaklı enzimler tercih edilmektedir. Bu durumun nedenlerinin başında bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlerin dünyanın mevcut taleplerini karşılayamamaları, mikrobiyal kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal enzimlere göre daha yüksek katalitik aktivite göstermeleri, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha ucuz olmaları mikrobiyal enzimin tercih edilme nedenlerindedir (Wiseman, 1987; Rao ve ark., 1998).

Tannaz, bakteri veya fungal kökenli bir enzim olup tanen biyodegradasyonda büyük önem taşıyan, besin, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan enzimlerdendir. Tannaz gıda, içecek, bira, ilaç, kimya kozmetik endüstrilerinde propil gallat, pirogallolun, trimethoprim ve fotosentetik resin gibi maddelerin üretimi için kullanılmaktadır. Bu enzim hazır çay, kahve, meyve suları ve biranın köpük oluşumunun engellenmesi ve berraklaştırılması, üzüm şarabının stabilizasyonu ve besinlerin detannafikasyonu gibi amaçlarla gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tannaz deri endüstrisinde tanen bakımından çok kirli

atıklardan tanenin temizlenmesi ve hayvanlarda yem alanında taze yaprak tüketimi ve yapraklarla alınan tanenlerin hayvanların yem sindirilebilirliği üzerine etkisi ve tanenlerin tannaz enzimiyle biyodegradasyonu amacıyla önemli bir kullanım alanı teşkil etmektedir (Scalbert, 1991; Frutos ve ark., 2004; Pinto ve ark. 2006; Aguilar ve ark., 2007)

Bu çalışmada, bir çok farklı kullanım alanı bulunan, özellikle hayvan yemlerinde ve gıda endüstrisinde tanen hidrolizini sağlamak amacıyla *Bacillus coagulans* tannaz enziminin endüstride en iyi şekilde kullanımı üzerine araştırmalar yapılmıştır.

Çalışmada toplam 51 *Bacillus* sp. suşu izole edilmiş, katı besiyeri kullanılarak tannaz üretme yetenekleri araştırılmıştır (Çizelge 4.1). İzole edilen suşların 23'ünün tannaz enzimi üretme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2).

Yapılan gram boyama sonucunda bakteri suşlarının mikroskopik incelemede tüm bakteri suşlarının gram pozitif ve çubuk şeklinde bakteriler olarak tanımlanmışlardır. VITEK-2 Compact tür tanımlama testinde ise en iyi aktivite gösteren *Bacillus* sp. suşlarının %95 olasılıkla *Bacillus coagulans* olduğu tanımlanmıştır.

Spektrofotometrik aktivite analizleri sonucunda, 4 *Bacillus* sp. suşu arasından 2.11 suşunun en yüksek tannaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

Yapılan olarak spektrofotometrik ölçümler sonucunda *Bacillus coagulans* ekstraselüler enzim aktivitesi 0,313 μ mol/mL belirlenmiştir.

Bacillus coagulans' dan elde edilen ekstraselüler enzimin optimum aktivitesini pH 4.2'de gösterdiği saptanmıştır.

Bacillus coagulans ekstraselüler enziminin pH 3.0, 3.4, 3.8, 4.6, 5.0, 5.4, 5.8, 6.2, 6.6, 7.0, 7.4, 7.6, 8.0, 8.4, 8.8, 9.0, 9.2, 9.6, 10.0, 10.4'de sırasıyla %14, %26, %45, %85, %77, %52, %41, %30, %46, %37, %61, %64, %58, %37, %41, %49, %35, %36, %23, %16 aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 4.7). Enzim

pH 4.2-4.6 aralığında ortalama %92.5 aktivite gösterirken, pH 5.0-9.0 aralığında ortalamanın %49.42'e düştüğü, pH 9.2-10.4 aralığında ise ortalamanın daha da düşerek %27.5 değerine gerilediği görülmüştür (Şekil 4.7).

Bacillus coagulans ekstraselüler enziminin bütün pH değerleri dikkate alındığında enzimin asidik pH koşullarında kullanılacak özelliğindedir.

Bacillus coagulans ekstraselüler tannaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 30 °C olarak bulunmuştur. İnkübasyon sıcaklığı 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C olduğu zaman elde edilen relatif aktivite değerleri sırası ile %22, %100, %55, %59, %54, %47, %20, %10, -%3-70°C aralığında ortalama %56.28 aktiviteye sahipken, 80-100°C aralığında aktivitenin yaklaşık %48 oranında azalma göstererek ortalama %8.9 aktiveye sahip olduğu saptanmıştır.

Bacillus coagulans ekstraselüler enziminin 20°C ile 70°C aralığında yüksek bir aktiviteye sahip olduğu ve bu özelliği ile mezofilik özellik göstermektedir (Şekil 4.8).

Bacillus coagulans ekstraselüler enziminin termal stabilitesini saptamak amacıyla 80-90-100°C aralığında 5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika süreyle ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Bacillus coagulans suşunun ekstraselüler enziminin **5 dakika süreyle** ön inkübasyon uygulaması sonunda 80°C'de %40.15, 90°C'de %1.51 ve 100°C'de %39.42, **10 dakika süreyle** ön inkübasyon uygulaması sonunda 80°C'de %61.47, 90°C'de %22.60 ve 100°C'de %25.65, **15 dakika süreyle** ön inkübasyon uygulaması sonunda 80°C'de %64.80, 90°C'de %33.40 ve 100°C'de %59.40, **20 dakika süreyle** ön inkübasyon uygulaması sonunda 80°C'de %57.87, 90°C'de %54.83 ve 100°C'de %62.43, **25 dakika süreyle** ön inkübasyon uygulaması sonunda °C'de %41.67, 90°C'de %37.62 ve 100°C'de %38.13, **30 dakika süreyle** ön inkübasyon uygulaması sonunda 80°C'de %56, 90°C'de %0 ve 100°C'de %18.56 kalan enzim aktivitesi elde edilmiştir (Şekil 4.9).

Bütün değerler dikkate alındığında, *Bacillus coagulans* ekstraselüler enzim termal stabilitesinin en yüksek olduğu değerin 80°'de 15 dakikalık ön inkübasyon (%64.80) olduğu saptanmıştır.

Bacillus coagulans ekstraselüler enzimi üzerine, enzim-kimyasal madde karışımının son konsantrasyonu 1 ve 5 mM olacak şekilde hazırlanmış inhibitör ve divalent katyonların etkisini saptamak amacıyla enzim 37°C'de 1 saat ön inkübasyona tabii tutulmuştur.

Bacillus coagulans ekstraselüler enziminin 1 mM ve 5 mM konsantrasyon sırasıyla olacak şekilde EDTA'da %73.9 ve %54.6, CaCl₂'de %81.7 ve %86.7, HgCl₂'de %25.3 ve %64.4, ZnCl₂'de %62.4 ve %69.6, MgCl₂'de %51.6 ve %53.8, NiCl₂'de %89.7 ve %47.8, CuCl₂'de %57 ve %77.9, CoCl₂'de %58.6 ve %72, FeCl₂'de %79.5, oranında inhibisyon gerçekleşmiştir (Çizelge 4.3).

Bacillus coagulans ekstraselüler enziminin en fazla 1mM ve 5 mM MnCl₂ ve 5 mM FeCl₂ ile %100 oranında inhibe olduğunu ve en az 1 mM HgCl₂ %25.3 oranında inhibe olduğu diğer bir deyişle %74,7 oranında HgCl₂'e dirençli olduğu saptanmıştır.

Bacillus coagulans tannaz enziminin SDS-PAGE analizi sonucunda, moleküler ağırlığı 17 kDa, 14 kDa ve 5 kDa olan 3 protein bandı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada elde ettiğimiz veriler sonucunda toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus coagulans* tannaz enziminin sahip olduğu karakteristik özellikleri ile birçok endüstriyel alanda kullanılması ve ekonomik açıdan değerlendirilmesi önerilebilir. Bunun sonucunda, üretilen mikrobiyal tannaz enziminin, soğuk çay, bira ve şarap üretiminde meydana gelen köpüğün giderilmesi ve berraklaştırılmasında, ruminant hayvanlar tarafından tüketilen bitki yapraklarında ve yemlerde bulunan fazla tanenlerin hidrolize edilmesinde, gallik asit elde edilerek farmakolojide kullanılmasında, endüstriyel atıksularda organik kirletici olan tanenleri ortadan kaldırılmasında tannaz enzimi kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Naby, M. A., El-Tanash, A. B., Sherief, A. D. A., 2016. Structural Characterization, Catalytic, Kinetic and Thermodynamic Properties of *Aspergillus oryzae* Tannase. International Journal of Biological Macromolecules, 92, 803-811.
- Adachi, O., Watanabe, M., Yamada, H., 1968. Studies on Fungal Tannase Part II. Agric. Biol. Chem. 32, 1079–1085.
- Aftab, M. N., Mukhtar, H., Ikram-Ul-Haq, 2016. Production and Characterization of Tannase From A Newly Isolated *Bacillus subtilis*. Pakistan Journal of Botany, 48(3), 1263-1271.
- Aguilar, C.N., Sanchez, G., 2001, Review: Sources, Properties, Applications and Potential Uses of Tannin Acyl Hydrolase, Food Sci. Tech. Int., 7 (5):373–382.
- Aguilar, CN., Augur, C., Favela-Torres, E. And Viniestra- González, G., 2001b, Induction and Repression Patterns of Fungal Tannase in Solid-State and Submerged Cultures, Process Biochemistry, 36:565-570.
- 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, South Africa, 122s.
- Anderson, R.E., 1984. Growth and Corresponding Elevation of Tomato Juice Ph by *Bacillus coagulans*. J. Food Sci., 49: 647-649.
- Anonymous, 2003a. *Bacillus coagulans* (*Lactobacillus sporogenes*)- A New Generation Probiotics [Http://Lactospore.Com/Lsporo.Htm](http://Lactospore.Com/Lsporo.Htm).

- Aoki, K., Shinke, R., Nishira, H., 1976. Chemical Composition and Molecular Weight of Yeast Tannase, *Agricultural and Biological Chemistry*, 2: 297-302.
- Atlas, R. M., 2005. *Handbook of Media for Environmental Microbiology*. Second Edition. CRC Press Publishing Company, New York. 10: 0-8493-3560-4.
- Ayed, L., Hamdi, M., 2002. Culture Conditions of Tannase Production by *Lactobacillus plantarum*, *Biotechnology Letters*, 24: 1763-1765.
- Babich H., Schuck A. G., Weisburg J. H., Zuckerbraun H. L., 2011. Research Strategies in The Study of the Pro-Oxidant Nature of Polyphenol Nutraceuticals, *Journal of Toxicology*, 1-12.
- Bae, H. D., Yanke, L. J., Cheng, K.-J., Selinger, L.B., 1999. A Novel Staining Method for Detecting Phytase Activity. *Journal of Microbiological Methods* 39, 17–22.
- Bajpai, B. , Patil, S., 1996. Tannin Acyl Hydrolase (EC 3.1.1.20) Activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12:217-220.
- 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.
- Banerjee, R. 2004. Gallic Acid, *Concise Encyclopedia of Bioresource Technology*, 629-634.
- Barthomeuf, C., Regeat, 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, N., Singh, J., Banerjee, U.C., Patnaik, P.R., Sobia, R.C., 2002. Production and Characterization of A Thermostable B-Galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 36: 1-6.

- Batra, A., & Saxena, R. K. (2005). Potential Tannase Producers From the Genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Process Biochemistry*, 40(5), 1553-1557.
- Battestin, V., Pinto, G. A. S., & Macedo, G. A., 2007. Biochemical Characterization of Tannases from *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus niger*. *Food Science And Biotechnology*, 16(2), 243.
- 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.
- Beniwal, V., Kumar, A., Goel, G., & Chhokar, V., 2013. A Novel Low Molecular Weight Acido-Thermophilic Tannase from *Enterobacter cloacae* MTCC 9125. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(2), 132-137.
- Bhat, T. K., Singh, B., Sharma, O. P., 1998. Microbial Degradation of Tannins; A Current Perspective, *Biodegradation*, 9: 343-357.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J., 1996. *Protein Methods* (2nd Edt). Viley-Liss Press, Usa. 414s.
- Bradoo, S., Gupta, R. A., Saxena, R. K., 1997. Parametric Optimization and Biochemical Regulation of Extracellular Tannase from *Aspergillus japonicus*, *Process Biochemistry*, 32(2):135-139.
- Bradoo, S., Gupta, R., Saxena, R.K., 1997. Parametric Optimization and Biochemical Regulation of Extracellular Tannase from *Aspergillus japonicus*, *Process Biochemistry*, 32(2):135-139.
- Chaitanyakumar, A., Anbalagan, M., 2016. Expression, Purification and Immobilization of Tannase from *Staphylococcus lugdunensis* MTCC 3614. *AMB Express*, 6(1), 89.
- Chhokar, V., Beniwal, V., Salar, R. K., Nehra, K. S., Kumar, A., Rana, J. S., 2010. Purification and Characterization of Extracellular Tannin Acyl Hydrolase

- from *Aspergillus heteromorphus* MTCC 8818. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(5), 793-799.
- Cosentino, S., Mulargia, A.E., Pisano, B., Tuveri, P., Palmas, E., 1997. Incidence and Biochemical Characteristics Of Bacillus Flora in Sardinian Dairy Products. *Int. J. Food Microbiol.*, 97: 147-156.
- Cruz-Hernandez, M., C. Augur, R. Rodriguez Contreras-Esquivel, J., Aguilar, C.N., 2006. Evaluation of Culture Conditions for Tannase Production by *Aspergillus niger* GH1. *Food Technol. Biotechnol.*, 44: 541-544.
- Curiel, J. A., Rodríguez, H., Acebrón, I., Mancheño, J. M., De Las Rivas, B., Munoz, R. O. S. A. R. I. O., 2009. Production and Physicochemical Properties of Recombinant *Lactobacillus plantarum* Tannase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6224-6230.
- De Clerk, E., Rodríguez-Díaz, M., Forsth, G., Lebbe, L., Logan, N.A., De Vos, P., 2004. Polyphasic Characterization of *Bacillus coagulans* Strains, Illustrating Heterogeneity Within This Species and Emended Description of The Species. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27: 50-60.
- Deschamps, A. M., Otuk, G. And Lebeault, J. M., 1983. Production of Tannase and Degradation of Chestnut Tannins by Bacteria, *J. Ferment Technol.*, 61(1):55-59.
- 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.
- Dincer, S., Ulusoy, S., Yigittekin, E. S., 2015. Characterization and Cloning of Tannase from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Biotechnology*, (208), S64-S65.
- Fuentes-Garibay, J. A., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., Guerrero-Olazarán, M., & Viader-Salvadó, J. M., 2015. Tannase Sequence from A Xerophilic *Aspergillus niger* Strain and Production of the Enzyme in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 57(5), 439-447.

- Ganga, P. S., Nandy, S. C., Santappa, M., 1977. Effects of Environmental Factors on the Production of Fungal Tannase, *Leather Sci.*, 24:8–16.
- García-Rivera D., Delgado R., Bougarne N., Haegeman G., Berghe W., 2011. Gallic Acid Indanone and Mangiferin Xanthone are Strong Determinants of Immunosuppressive Anti-Tumour Effects of *Mangifera Indica* L. Bark in MDA-MB231 Breast Cancer Cells, *Cancer Letters*, 305 (1):21–31.
- Gayen, S., & Ghosh, U., 2013. Purification and Characterization of Tannin Acyl Hydrolase Produced by Mixed Solid State Fermentation of Wheat Bran and Marigold Flower by *Penicillium Notatum* NCIM 923. *Biomed Research International*, 2013.
- Giovanelli, G., 1989. Enzymatic Treatment of Malt Polyphenols for Beer Stabilization. *Industrial Bevanda (Ita)*, 18,497-502.
- Goel, G., Kumar, A., Beniwal, V., Raghav, M., Puniya, A. K., & Singh, K., 2011. Degradation of Tannic Acid and Purification and Characterization of Tannase from *Enterococcus faecalis*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(7), 1061-1065.
- Goel, G., Puniya, A. K., Singh, K., 2005. Tannic Acid Resistance in Ruminant Streptococcal Isolates, *Journal of Basic Microbiology*, 45 (3): 243-245.
- Goncalves, H. B., Riul, A. J., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Guimarães, L. H. S., 2011. Extracellular Tannase from *Emericella nidulans* Showing Hypertolerance to Temperature and Organic Solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(1), 29-35.
- Gonçalves, H. B., Riul, A. J., Quiapim, A. C., Jorge, J. A., Guimarães, L. H. S., 2012. Characterization of A Thermostable Extracellular Tannase Produced Under Submerged Fermentation by *Aspergillus ochraceus*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(5), 4-4.
- Halkman, K., 1991. Tarım Mikrobiyolojisi. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, Ankara, No:1214, 82s.

- Haslam, E. and Tanner, R.J.N., 1970. Spectrophotometric Assay of Tannase, *Phytochemistry*, 9: 2305–2309.
- Horowitz-Wlassowa, L.M., Nowetelnow, N.H., 1933. Über Eine Sporogene Milchsäurebakterienart, *Lactobacillus sporogenes* N. Sp. Cent F. Bak. II Abt., 87: 331.
- Ilori, O., Adebuyose, S. A., Amund, O.O., O, B.O., 2007. A Study Of Tannic Acid Degradation by Soil Bacteria. *Pakistan Journal Of Biological Sciences* 10 (18): 3224-3227.
- Jana, A., Maity, C., Halder, S. K., Das, A., Pati, B. R., Mondal, K. C., & Mohapatra, P. K. D. (2013). Structural Characterization of Thermostable, Solvent Tolerant, Cytosafe Tannase from *Bacillus subtilis* PAB2. *Biochemical Engineering Journal*, 77, 161-170.
- Jiménez, N., Barcenilla, J. M., De Felipe, F. L., De Las Rivas, B., & Muñoz, R., 2014. Characterization of A Bacterial Tannase From *Streptococcus Gallolyticus* UCN34 Suitable for Tannin Biodegradation. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 98(14), 6329-6337.
- 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.
- Khadem S, Marles R.J., 2010. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy-and Polyhydroxybenzoic Acids: Ocurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules*, 15: 7985-8005.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Pinto, C., 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, M., Beniwal, V., & Salar, R. K., 2015. Purification and Characterization of A Thermophilic Tannase from *Klebsiella Pneumoniae* KP715242. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 745-751.
- 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.
- Kumar, R., Kumar, A., Nagpal, R., Sharma, J., Kumari, A., 2010. A Novel and Sensitive Plate Assay For Screening of Tannase-Producing Bacteria. *Ann Microbiol* 60:177–179.
- 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., 1997. Production and Application of Tannin Acyl Hydrolase : State of Art, *Advances in Applied Microbiology*, 44: 215-260.
- Lewis, J.A. And Starkey, R.L., 1969. Decomposition of Plant Tannins by Some Soil Microorganisms, *Soil Science.*, 107:235–241.
- Locatelli, C., Filippin-Monteiro, F. B., & Creczynski-Pasa, T. B., 2013. Alkyl Esters of Gallic Acid As Anticancer Agents: A Review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 233-239.
- Luechai, S., Dharmsthiti, S.C., 2010. Cultivation of *Lactobacillus plantarum* KV1 in Whey-Containing Medium for use as Starter in Vegetable Fermentation. *International Journal Of Biotechnology And Biochemistry*, Vol.6, Nr.6, Pp. 877–888.

- Mahapatra, K., Nanda, R. K., Bag, S. S., Banerjee, R., Pandey, A., Szakacs, G., 2005. Purification, Characterization and Some Studies on Secondary Structure of Tannase From *Aspergillus awamori nakazawa*. *Process Biochemistry*, 40(10), 3251-3254.
- Maity, C., Das Mohapatra, P.K., Pati, B.R., Mondal., K.C., 2009. A Simple Gel Detection Method of Microbial Tannin Acyl Hydrolase (Ec 3.1.1.20). *World J Microbiol Biotechnol* 25:733–735.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982. *Molecular Cloning*. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, 345s.
- Mingshu, L., Qiang, H., Dongying, J., 2006. Biodegradaton of Gallotannins and Ellagitannins, *Journal of Basic Microbiology*, 46 (1): 68-84.
- Mizuno, T., Shiono, Y., & Koseki, T., 2014. Biochemical Characterization of *Aspergillus Oryzae* Native Tannase and the Recombinant Enzyme Expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(4), 392-395.
- Mondal, K. C., Banerjee, R., & Pati, B. R., 2000a. Tannase Production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, 22(9), 767-769.
- Mondal, K. C., Pati, B. R., 2000b. Studies on the Extracellular Tannase from Newly Isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6, *Journal of Basic Microbiology*, 40 (4): 223-232.
- Mondal, K.C., Banerjee, D., Jana, M. Ve Pati, B.R., 2001a. Colorimetric Assay Method for Determination of the Tannin Acyl Hydrolase Activity, *Analytical Biochemistry*, 295: 168-171.
- Mondal, K. C., Banerjee, D., Banerjee, R., & Pati, B. R., 2001b. Production and Characterization of Tannase From *Bacillus cereus* KBR9. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 47(5), 263-267.
- Mueller-Harvey, I., 2001, Analysis of Hydrolysable Tannins, *Animal Feed Science and Technology*, 91:3-20.

- Niehaus, J. U. & Gross, G. G., 1997. A Gallotannin Degrading Esterase From Leaves of Pedunculate Oak. *Phytochemistry* 45:1555–1560.
- Nishitani, Y. Ve Osawa, R., 2005. Deceptive Halo Formation by Tannase Defective Bacteria on Tanin-Treated Plate Media. *Microbes Environmental*, 20 (2): 117-119.
- Nishitani, Y., Sasaki, E., Fujisawa, T., 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.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., 1993. Classification of Oligomeric Hydrolysable Tannins and Specificity of their Occurrence in Plants. *Phytochemistry*, 32: 507-521.
- Osawa, R., Nishitani, Y., 2006. Note A Novel Colohimetric Method to Quantify Tannase Activity of Viable Bacteria.
- Öztürk, A.D., 2006. Production Of Tannase By *Aspergillus Niger*, Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- Palacios, M.C., Haros, M., Sanz, Y., Rosell, C.M., 2008. Selection of Lactic Acid Bacteria with High Phytate Degrading Activity for Application in whole wheat Breadmaking. *LWT* 41, 82–92.
- Payot, T., Chemaly, Z., Fick, M., 1999. Lactic Acid Production by *Bacillus coagulans*-Kinetic Studies and Optimization of Culture Medium for Batch and Continuous Fermentations. *Enzyme Microbial Technol.*, 24:191-197.
- Powell, C., Clifford, M.N., Opie, S.C., Ford, M.A., Robertson, A., Gibson, C.L., 1993. Tea Cream Formation: The Contribution of Black Tea Phenolic Pigments Determined by Hplc. *J. Sci. Food. Agric.*, 63, 77 – 86.

- Purohit, J.S., Dutta, J.R., Nanda, R.K., Banerjee R., 2006. Strain Improvement for Tannase Production From Co-Culture of *Aspergillus foetidus* *Rhizopus Oryzae*, *Bioresource Technology*, 97: 795-801.
- Ramírez-Coronel, M. A., Viniegra-Gonzalez, G., Darvill, A., Augur, C. (2003). A Novel Tannase from *Aspergillus niger* with β -Glucosidase Activity. *Microbiology*, 149(10), 2941-2946.
- Ramon-Blanco, C., Sanz-Gomez, J.J., Lopez-Diaz, T.M., Otero, A., Garcia-Lopez, M.L., 1999. Numbers and Species of *Bacillus* During the Manufacture And Ripening of Castellano Cheese. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 54: 385-388.
- Rana, N.K. 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.
- Riul, A. J., Goncalves, H. B., Jorge, J. A., & Guimarães, L. H. S., 2013. Characterization of A Glucose and Solvent-Tolerant Extracellular Tannase from *Aspergillus phoenicis*. *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85, 126-133.
- Rodriguez, H., Landete, J. M., Curiel, J. A., De Las Rivas, B., Mancheño, J. M., Muñoz, R., 2008. Characterization of the P-Coumaric Acid Decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3068-3072.
- Sabu, A., Kiran G. S., Pandey, A., 2005. Purification and Characterization of Tannin Acyl Hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620, *Food Technology 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.

- Sarıkaya, Ö., 2005. Funguslar İle 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.
- Scalbert A., 1991. Antimicrobial Properties of Tannins. *Phytochemistry* 30:3875-3883.
- Sharma, S., Bhat, T. K., Dawra, R. K. 1999. Isolation, Purification and Properties of Tannase from *Aspergillus niger* Van Tieghem. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(6), 673-677.
- Sharma, S., Bhat, T. K., Dawra, R. K., 2000. A Spectrophotometric Method For Assay Of Tannase Using Rhodanine. *Analytical Biochemistry*, 279(1), 85-89.
- Sharma, K. P., John, P. J. 2011a. Purification and Characterization of Tannase and Tannase Gene From *Enterobacter* Sp. *Process Biochemistry*, 46(1), 240-244.
- Sharma A., Gautam S. P., Gupta A. K., 2011b. Surface Modified Dendrimers: Synthesis and Characterization for Cancer Targeted Drug Delivery, *Guptabioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(11):3341-3346
- Shi, B., He, Q., Yao, K., Huang, W. And Qing L., 2005, Production of Ellagic Acid from Degradation of Valonea Tannins by *Aspergillus niger* and *Candida utilis*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80:1154–1159.
- Skene, I. K. And Brooker, J. D., 1995. Characterization of Tannin Acyl Hydrolase Activity in the Ruminal Bacterium *Selenomonas Ruminantium*, *Anaerobe*, 1:321–327.

- Songre-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Icard-Verniere, C., Humblot, C., Diawara, B., Guyot, J.P., 2008. Enzyme Activities of Lactic Acid Bacteria from A Pearl Millet Fermented Gruel (Ben-Saalga) of Functional Interest in Nutrition. *International Journal of Food Microbiology* 128,395-400.
- 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.
- Temel O., 2012. Laktik Asit Bakterilerinin Tannaz Üretim Yeteneklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Bölümü. Eskişehir.
- Temiz, A., 2008. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınevi. 4.Baskı. Ankara. 291 S.
- Temizkan, G., Ve Arda, N., 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, 345s.
- Ulusoy, S., 2013. Laktik Asit Bakterilerinden (Lab) Tannaz Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi. Biyoloji Bölümü. Adana.
- Van Diepeningen, A.D., Debets, A.J.M., Varga, J., Van Der Gaag, M., 2004. Efficient Degradation of Tannic Acid by Black *Aspergillus* Species, *Mycol. Res.*, 108 (8): 919–925.
- Vecchi, E., Drago, L., 2006. *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: Misidentification or Mislabelling *Int. J. Probiotics Prebiotics*, 1(1): 3-10.
- Wu, M., Wang, Q., Mckinstry, W. J., Ren, B., 2015. Characterization of A Tannin Acyl Hydrolase from *Streptomyces Svicesus* with Substrate Preference for Digalloyl Ester Bonds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6), 2663-2672.

- 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.
- Yao, J., Fan, X. J., Lu, Y., & Liu, Y. H., 2011. Isolation and Characterization of A Novel Tannase from A Metagenomic Library. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3812-3818.
- Yao, J., Guo, G.S., Ren, G. H., Liu, Y.H., 2014. Production, Characterization and Applications of Tannase *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 101:137– 147.
- Yoon, H., Lee, K., Kim, H.Y., Kim, H.K., Shin, D., Hong, B., And Cho, H., 2002. Gene Cloning and Biochemical Analysis of Thermostable Chitosanase (TCH-2) from *Bacillus coagulans* CK108. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(5): 986-995.
- You B., Park W., 2010. Gallic Acid-Induced Lung Cancer Cell Death is Related to Glutathione Depletion As Well As Reactive Oxygen Species Increase, *Toxicology in Vitro*, 24 (5):1356–1362.
- 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.
- Zakipour-Molkabadi, E., Hamidi-Esfahani, Z., Sahari, M. A., Azizi, M. H., 2013. A New Native Source of Tannase Producer, *Penicillium* Sp. EZ ZH190: Characterization of the Enzyme. *Iranian Journal of Biotechnology*, 11(4), 244-250.
- Zhong, X., Peng, L., Zheng, S., Sun, Z., Ren, Y., Dong, M., Xu, A., 2004. Secretion, Purification and Characterization of A Recombinant *Aspergillus oryzae* Tannase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 36(2), 165-169.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana'da tamamladı. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2013 yılında bu bölümden mezun oldu. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.