154131

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRK MEŞE MAZISINDAN KİMYASAL VE BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE GALLİK ASİT ELDE EDİLMESİ

NİLÜFER MUTLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA –2004

T.C

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRK MEŞE MAZISINDAN KİMYASAL VE BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE GALLİK ASİT ELDE EDİLMESİ

NİLÜFER MUTLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 13.08.04 tarihinde aşağıdaki juri tarafından oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet ÇETİN	Prof. Dr. Şeref GÜÇER	Prof. Dr. Ülkü ÖZALP
(Danışman)	(Üye)	(Üye)

ÖZET

Bu çalışmada büyük endüstriyel öneme sahip gallik asidin, kimyasal ve biyoteknolojik olmak üzere iki farklı yoldan eldesi amaçlanmıştır.
Bunlardan birincisi Kimyasal yöntem, diğeri ise mikroorganizmalar ile yapılan Biyoteknolojik yöntemdir. Literatürde araştırılan çalışmalar, biyoteknolojik yöntemle yapılan izolasyonun endüstriyel açıdan daha önemli olduğunu ve daha yüksek verimle gerçekleştiğini göstermektedir.
Gallik asit, doğada bir meşe türü olan *Quercus Infectoria* mazısının dalları üzerinde bulunan patolojik bir üründe, glükoz molekülleri ile ester halinde bulunmaktadır. Esterleşmiş haldeki bu ürün, Türk meşe mazısında oldukça yüksek miktarda bulunmaktadır.
Gallik Asit'in çeşitli alanlarda uygulama bulmuştur. Kimya ve farmakoloji endüstrisi için önemli olup ayrıca gıda endüstrisinde kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Quercus İnfectoria, Tanenler, Tannik Asit, Gallik Asit, Tannaz Enzimi.

ABSTRACT

In this study it is aimed to perform isolation of industrial important gallic acid with chemical and biotechnological methods. One of them is Chemical method and another one is Biotechnologic that is used microorganisms. Researched study from literature shows that, biotechnological method for the isolation is more important industrial way. In nature gallic acid is found as bounded to glucose molecule which is present in gall-nut of *Quercus Infectoria*. High amount of this esterified product is found in Turkish oak gall-nut.

Gallic acid finds application in various fields. İt is important for chemical and pharmaceutichal industries. Beside it is extensively used in the preparation of raw materials for food industry.

Key words: Quercus İnfectoria, Tannase, Tannic Acid, Gallic Acid,

İÇİNDEKİLER **Sayfa No**

1. GİRİŞ.....1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....2
3. MATERYAL ve YÖNTEM..... 14
3.1. Materyal.....14
3.2. Yöntem 14
3.2.1. Tannik asidin izolasyonu.....15
3.3. Kimyasal Yöntem.....18
3.4. Biyoteknolojik Yöntem.....21
3.4.1. Besi Yeri ve Kimyasal Maddeler.....21
3.4.1.1. Besi Yerleri.....21
3.4.1.2. Kimyasal Maddeler.....21
3.4.2. Fermentasyon Ortamın Hazırlanması.....22
3.4.2.1. pH Ayarlanması.....22
3.4.2.2. Tannik Asitli besiyerinin hazırlanmasında kullanılan Tannik Asidin Sterilizasyonu.....22
3.4.2.3. pH Ayarlanmasında Kullanılan NaOH Çözeltisinin Sterilizasyonu.....23
3.4.2.4. Küflerin Aşılanması.....23
3.4.2.5. Fermentasyon ortamına sporların aşılanması.....23
3.4.3. Fermentasyon.....23
3.4.3.1. Fermentasyon Süresince Tannaz Enzimin Aktivitesinin Belirlenmesi.....24
3.4.4. Fermentasyon Ortamından Gallik Asidin İzolasyonu.....26
4. BULGULAR.....26
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....29
6. KAYNAKLAR.....30
EKLER.....36
TEŞEKKÜR.....41
ÖZGEÇMİŞ.....42

SİMGELER DİZİNİ

g: Gram

µl: Mikrolitre

µg: Mikrogram

nm: Nanometre

Km: Michaelis sabiti

Vmak: Maksimum hız

L: Litre

ŞEKİLLER DİZİNİ **Sayfa**

Şekil: 2.1. Gallik Asit.....3

Şekil: 2.2 Ellajik Asit.....6

Şekil: 2.3 Tannik Asit.....6

Şekil: 2.4 Kateşik Tanenler (Proantosiyanid).....7

Şekil: 2.5 Hidroliz Reaksiyonu.....8

Şekil: 3.2.1.1. Bitkisel Drog'tan Tannik Asit İzolasyonu.....15

Şekil: 3.2.1.1. Bitkisel Drog'tan Tannik Asit Ekstraksiyonu.....16

Şekil: 3.2.1.3. Tannik Asidin soklet ile Ekstraksiyonu.....17

Şekil: 3.3.1. Tannik Asidin Hidrolizi.....18

Şekil: 3.4.3.1.1. 1. Örneklemede elde edilen optimum süreler.....25

Şekil: 3.4.3.1.2. 2. Örneklemede elde edilen optimum süreler.....25

Şekil: 3.4.3.1.3. 3. Örneklemede elde edilen optimum süreler.....25

Şekil: 4.1. pH =4.3'de Koloni Çaplarının Karşılaştırması.....27

Şekil: 4.2. pH =5.5'de Koloni Çaplarının Karşılaştırması.....27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge: 3.3.1. Hidroliz Süresinin Optimizasyonu.....19

Çizelge: 3.3.1.1. Tannik Asidin Spektroskopik Değerlendirmesi.....19

Çizelge: 3.3.1.2. Gallik Asidin Spektroskopik Değerlendirmesi.....20

Çizelge: 4.1. Farklı pH Değerlerindeki Çapların Karşılaştırılması.....26

EKLER

Ek:1 Saf Tannik Asit ve Ekstraksiyon sonucu elde edilen maddenin IR spektrumları.....37

Ek:2 Ekstraksiyon sonucu elde edilen maddenin IR spektrumu.....38

Ek:3 Hidroliz sonucu elde edilen maddenin IR spektrumu.....39

Ek:4 Saf Gallik Asidin IR spektrumu.....40

Ek:5 Mikroorganizmaların Görünümü.....41

Ek:6 Saf Gallik Asit ve Fermentasyon sonucu elde edilen Gallik Asidin UV Spektrumları.....42

1. GİRİŞ

Tanen terimi ilk defa 1796'da Seguin tarafından, bitki ekstrelerinde bulunan ve hayvan derilerindeki proteinlerle birleşebilen maddeler için kullanılmıştır. Bitkilerde tanenler ''tannoit'' adı verilen kompleks halde bulunurlar. Bazıları ise şekerlerle esterleşmiş halde bulunurlar. Bunlarda 'tannozit' veya Tannik Asit adı verilir.

Her iki grubun da bulunduğu bitkisel drog adı : **Gallae Quercinae** (Meşe Mazısı). Quercus İnfectoria (Türk Meşesi)'nın genç dalları üzerine Alderia Gallaetinctoriae isimli sineğin oluşturduğu patolojik üründür.

Türk meşe mazısı %45-50 oranında, Çin meşe mazısı % 70 oranında Tannik Asit içermektedir. Çalışmamızın hedefi Gallik Asidin farklı yöntemlerle Türk meşe mazısından izolasyonudur. Birinci yöntem Kimyasal hidroliz, diğeri ise mikroorganizmalar aracılığı ile hedeflediğimiz Biyoteknolojik yöntemdir. Oldukça büyük bir endüstriyel öneme sahip olan Gallik Asit, Tannik Asidin yapısında glukozla esterleşmiş olarak bulunmaktadır. Gallik Asit kimyasal ve ilaç endüstrisinin yanında Propyl Gallat, Pyrogallol, Trimetoprimin ve Fotosensitiv reçinelerin üretiminde kullanılmaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Mikroorganizmaların rol aldığı biyolojik olaylar ve meydana getirdikleri ürünler binlerce yıldanberi bilinmektedir. İnsanların bu ürünlerle tanışmaları ve arkasından yaptıkları ilk buluşlar ve edindikleri deneyimler önce bireysel olmuş, daha sonra bunlar toplumların genel kültürlerine mal olmuştur (Pamir 1985).

Fermentasyon terimi ilk olarak alkollü içkiler elde edilirken şeker ve nişastalı maddelerin fermentasyon sonucu, ortamda kabarcıklar şeklinde açığa çıkan karbondioksit gazının kaynamaya benzer bir durum yaratması nedeniyle kullanılmıştır.Günümüzde fermentasyon çok daha geniş anlamda kullanılmaktadır.(Çetin 1983)

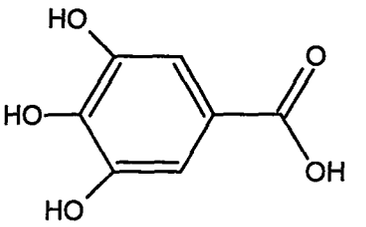
1929 Alexander Fleming'in penisilini bulması, daha sonra streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklin grubu antibiyotiklerin bulunması ve 1942'den sonraki yıllarda fermentasyon yolu ile antibiyotiklerin elde dilmesi büyük bir ilaç endüstrisinin kurulmasına yol açmıştır.Daha sonraki yıllarda birçok organik çözücü, alkoller, organik asitler, amino asitler, vitaminler, dekstran ve efedrin gibi maddeler biyoteknoloji çalışmaları ile elde edilmiştir.(Çetin 1983)

Etil alkol, aseton, laktik asit, tiamin, riboflavin gibi ürünleri üretmek için daha çok funguslar ve bakterilerden yararlanılmaktadır. Geniş çapta bir organik maddenin üretimi sayılmasa da bazı hastalıkların tedavisinde gereksinim duyulan aşıların üretiminde bugün endüstrinin bir kolu haline gelmiştir.(Pamir 1985)

Mikrobiyal son ürün olan organik, amino, nükleik asitler ve onlarla ilişkili bileşikler, vitaminler, enzimler steroid hormonlar ve antibiyotikler çok çeşitli yerlerde kullanılmaktadır (Pamir 1986).

Mikrobiyal yolla üretimi gerçekleştirilen organik asitlerden biri Gallik asittir. Kimyasal olarak 3,4,5-trihidroksibenzoik asit diye adlandırılır, $C_7H_6O_5$ kapalı formülü ile gösterilmekte. Molekül ağırlığı 170.2'dir. (Şekil 2.1) (Anonymus 1989).

Gallik asit mutlak metanol ve kloroformda iğnecikler halinde kristallenir.210 ^{0} C'de erime noktası gösterir.1g'ı 87 ml su, 3 ml kaynar su,6 ml alkol, 100 ml eter, 10 ml gliserol, 5ml aseton içinde çözünür ve ışığa duyarlı olduğu için ışıktan korunmalıdır (Anonymus ,1989) İnce tabaka kromatografisinde: Adsorban, silika jel G;çözücüsistemi, butanol:asetik asit :formik asit (5:4:1) Rf 0,698 (Bratati Kar, Rintu Banerjee, Bimal Chandra Bhattacharyya).



Şekil 2.1. Gallik Asit

Besinlerle alınan taze sebze ve meyvelerin bazı kanser türlerine karşı koruyucu etki gösterdiğine dair önemli delliler mevcuttur. Genellikle bu koruyucu etkinin,besinlerde bulunan antioksidan özellikli bileşiklerden kaynaklandığına inanılmaktadır.

Bununla beraber son yıllarda yürütülen çalışmalar, bitkilerden elde edilen polifenolik bileşikler'den gallik asidin antioksidan etki veya farklı bir mekanizma ile antikanserojen etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Shahrzad S, Bitsch I., 1998).

Özellikle içilen şarap ve çayın in vitro ve in vivo koşullarda antioksidatif etki gösterdiği açıklanmıştır . Gallik Asit kimya ve ilaç endüstrisinin yanında Propyl Gallate , Pyrogallol, Trimetoprim'in ve fotosensetif reçinelerin üretiminde kullanılmaktadır.Ayrıca boya ,ilaç ve kimyasal madde üretim endüstrisinde de yararlanılmaktadır. (Harborne,1986; Hertog , 1993; Namiki 1990).

Gallik asitin farklı kullanım alanları vardır. I Dünya Savaşı sırasında İngilizlerin suda çözünen boyaların ve indigonun Almanya'ya girmesine engel olması üzerine gallosiyanin sentezinde gallik asit kullanılmıştır. Boya endüstrisinin yanı sıra tıpta bazı deri hastalıklarının tedavisinde ki ilaçların hazırlanmasında gallik asiten yararlanılmaktadır.
(May and Herrick,1930).

Gallik Asit fotografçılıkta, fotoğraf geliştirici madde olarak kullanılan pirogallol üretiminde de başlangıç maddesi olarak önem taşımaktadır. (May and Herrick, 1930;Kumar et al.,1992). Ayrıca, pirogallol (1,2,3-trihidroksibenzen) endüstride yaygın olarak kullanılan bir polifenol olduğu bildirilmektedir. (Yoshida and Yamada ,1985; Kumar et al; 1992). Kimyasal olarak pirogallol Gallik Asidin prolizi ile sentezlenir. Mikrobiyal olarak, topraktan izole edilen *Citrobacter* türleri Gallik asit'i dekarboksile ederek pirogallol oluşturduğu saptanmıştır. (Kumar et al,1992)

Gallik asit ayrıca deri tabakalamada , serbest mineral asitlerin, dihidroksiaseton ve alkoloidlerin tayininde kullanılır (Anonymus,1989). Bu asitin sülfirik asit ile kondensasyonu sonucu hekza – hidroksiantrakinon meydana gelir (Rehm, 1967).Farmosotik ve gıda ürünlerin imalinde çok sık kullanldığına ait çalışmalar vardır. (Pourrat et al, 1985).

Böylece, gallik asit tıp ve eczacılıkta, boya, kimya ve besin endüstrisine kadar çok geniş bir alanda çeşitli amaçlarla kullanılan bir organik asittir. Bir çok madde için öncü madde olma özelliği taşımaktadır.

İlk defa Scheele, palamutların su enfüzyonlarında gelişen bir küf mantarını incelerken gallik asiti bulmuştur (Pamir,1978; Rehm, 1967). Daha sonra bir fransız araştırmacı bu küf mantarını izole ederek bunun Aspergillus niger olduğunu ilk defa açıklamıştır (Van Tieghemn 1967).

Bu küf günümüzde faklı suşları ile tanınmaktadır.*Penicillum glaucum* grubu küf mantarları da taneni gallik aside hidrolize edebilirler (Pamir,1978).

Tanen terimi ilk defa 1796 yılında Seguin tarafından , bitki ekstrelerinde bulunan ve hayvan derilerindeki proteinlerle birleşebilen maddeler için kullanılmıştır . Tanenler bitkilerde bulunan azotsuz, polifenolik yapılı, su ve metanolde çözünen, eter ve kloroformda az çözünen, buruk lezzette, deriyi tabakalama yeteneğinde olan bileşiklerdir.(Çubukçu.1976;Baytop,1980; Tanker,1985).Antiseptik ve aynı zamanda astrenjan etkiye sahip oldukları saptanmıştır (Öztığ, 1971)

Tanenler solüsyondan protein çöktüren, suda çözünen polifenollerdir (Nelson et al .,1995; Scalbert,1991) . Leguminaceae, Polygonaceae, Rosaceae, Rubiaceae ve Gymnospermae'den Fagaceae familyaları tanen taşıyan türler bakımından özellikle zengindir (Bate-Smith, 1977)

Bitkinin bütün organları tanen ihtiva edebilir.Herhangi özel bir doku veya organda (kabuk, odun, yaprak, meyva veya kök) büyük miktarlarda tanen birikebilir.(Scalbert, 1991). Özellikle Cortex'ler (C.Quercus, C.Granati, C.Hippocastani, C.Chinae), Radix ve Rhizoma'larda (R.Ratanhiae, Rh. Rhei) da bol miktarda tanen bulunduğu, fakat bunların dışında yapraklar (Folia Rhois Coriariae), çiçekler (F.Rosae), meyvalar (ceviz perikarpı, nar kabuğu),tohumlar (Sem.Colae) ve bazı patolojik organlarda (Galiae) da tanen bulunabildiği ifade edilmektedir (Mueller-Harvey et al., 1987;Ishimaru et al., 1987).

Tanenler yapılarına göre iki büyük gruba ayrılırlar:

2.1 Hidroliz olabilen tanenler (Gallik tanenler)(Haslam 1961,1989)

2.2 Kondanse tanenler (Proantosiyanidinler) (Haslam 1961,1989; Scalbert,1991; Gross,1992)

Gallik asit, hidroliz olabilen tanenlerden (Gallik tanenlerden) elde edilir. Hidroliz olabilen tanenler asit fenollerinin karbonhidratlarla yaptıkları esterlerdir (Baytop, 1980) . Bunlara eskiden ''pirogallik tanenler'' de denilmekteydi . Çünkü kuru kuruya distilendiklerinde pirogallol vermektedirler (Tanker ve Tanker,1985) Karbonhidrat olarak genellikle glukoz , asit fenol olarak da gallik veya digallik asit (gallik tanenler) veya ellajik asit (Ellajik tanenler)'ler bildirilmekteydi (Çubukçu, 1976;Baytop, 1980).

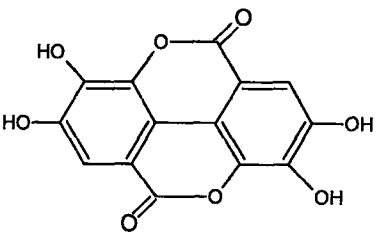
Hidroliz olabilen tanenler Gallo-tanenler ve Ellajik-tanenler diye ikiye ayrılırlar (Baytop,1980; Tanker ve Tanker,1985; Scalbert,1991). Gallik tanen taşıyan bitkiler Gallae Sinensis, Gallae Quercinae, Valonea, Rhizoma Rhei, Cortex Granati, C. Quercus, Folium Eucalypti'dir (Baytop, 1980).

Ellajik tanenler daha kompleks bir yapıya sahiptirler. Bu tip tanenler ellajik asit ihtiva etmektedirler. Ellajik asit, canlı bitkilerde ozlarla ,yarı asetal bağı ile birleşmiş olarak bulunur (Tanker ve Tanker, 1985).

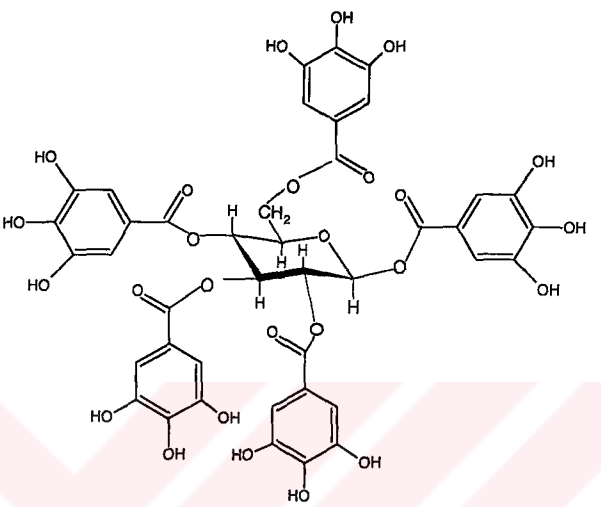
Hidroliz olabilen tanenlerin hazır öncül molekülü 1,2,3,4,6-pentagalloglukoz olduğu bildirilmektedir (Gross,1992).

Gallotanenler aralarında gallik asitinde bulunduğu galloil alt birimlerinin, pentagalloilglukoz öncül molekülünde meta depsit bağları olarak bağlarla bağlanması sonucu oluşurlar. (Haslam, E., Howarth, R.D. et al. 1961)

Gallotanenler bromlu su ile bir çökelek vermezler. Farmakopelerde tanen, tanin ve ya tannik asit (Asidum tannicum T.K.) ismi altında kayıtlı bulunan madde digallik asitin D (+) glukoz ile yaptığı esterlerin bir karışımıdır. Bu karışımda özellikle pentadigalloilglikoz bulunduğu saptanmıştır (Pharmacognosy- Phytochemistry Med. Plants 1999).



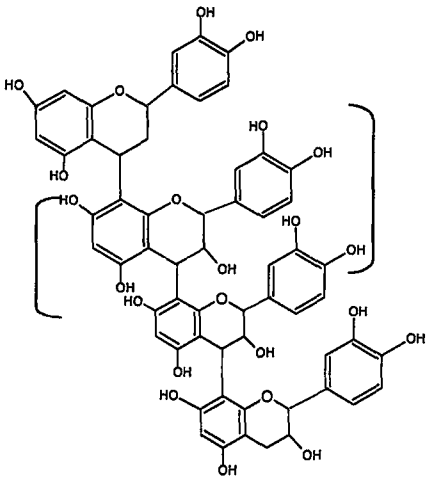
Şekil 2.2 Ellajik Asit



Şekil 2.3 Tannik Asit

Hidroliz olmayan kondanse tanenlere '' kateşik tanenler '' adı verilir . Bu maddeler asitlerle veya tannaz enzimi ile hidroliz olmazlar . Kuvvetli asitlerle sıcakta veya oksidasyon ajanlarıyla kırmızı veya esmer renkli bileşikler verirler . Bunlara ''flobafen '' adı verilir . Kuru distilasyon ile pirokateşol verirler. (Bruneton J.1999).

Kateşik tanenler cynidol (pentahidroksi flavan)' ın bir kondenzasyon ürünüdür. Sudaki çözeltileri demir tuzlarıyla zeytin yeşili bir renk verir ve bromlu su ile çökerler. Bu özellikleriyle bu tip tanenler gallik tanenlerden kolaylıkla ayrılmaktadır (Baytop, 1980) .



Şekil: 2.4. Kateşik Tanenler (Proantosiyanid) (n:1,2,3)

Tanenlerin bitkilerdeki rolü pek iyi bilinmemektedir. Meyvalar olgunlaştıkça tanen miktarının azalması bitkinin bu maddeyi kullandığını göstermektedir. Bununla beraber bir çok tanen bitki için artık madde olduğu düşünülmektedir.

Tanenler antiseptik özelliklerinden dolayı mikroorganizmaların sebep olduğu çürüme, kuruma ve hayvanlar tarafından oluşturulan zarara karşı bitki protoplastlarını korur..Bu tip fenolik bileşikler daha çok sistematik ilişkilerde belirteç olarak faydalıdır. Aynı zamanda şekerlerin oluşumu ve iletimi, antioksidan ve stoplazmanın homojenliğini sağlayan koruyucu koloidler olarak iş görürler (Yakar-Tan, 1976; Yentür,1984)

Tanenler haricen astrenjan ve dahilen antidiyaretiktir. Deri ve mukozada bir tabaka yapar ve deri yüzeyini daha az permeabl hale getirir. İnce damarlarda damar daraltıcı etkisi vardır. Bu sebeple yüzeysel yaralarda ve hemoroidlerde kullanılır.Tanen ekstreleri yanıklarda antiflamatuar olarak kullanıldığı bildirilmektedir. Bazı tanen ekstrelerinin (Örn.Acer taneni) mantar, bakteri ve bazı virusların gelişimini durdurduğu tespit edilmiştir. Böylece tanenli bitkisel ilaç hammaddelerinin bilhasa akciğer hastalıklarında antiseptik olarak kullanılması doğrulanmış bulunmaktadır. (Tanker, 1985)

Mazı taneni pentagalloilglukoz, hekzagalloilglukoz esterlerinin karışımından oluşur.Bitki Türkiye'nin hemen hemen bütün ormanlık bölgelerinde yetişsede, en çok Güney Doğu Anadolu'da yetişir. Türkiye'de elde edilen mazıya Gallae Turcicae

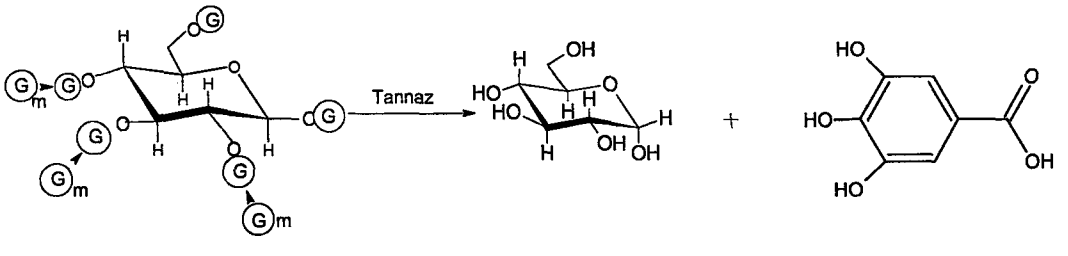
(Türkmazısı) (Baytop,1980), Suriye'de elde edilene Gallae Halepensis adı verilir (Tanker, 1985).

Meşe türleri kuzey yarımkürede ve A.B.D'de yaygın olarak yetişir. Akdeniz ülkelerinde birçok meşe türü doğal yayılış göstermektedir. Mazı (Gallae-Gallae Quercinae); Cynips gallae tinctoriae (Hymenopterae), Cynips insana Westw ve Cynips colari isimli hakiki mazı arılarının (Acatay, 1969; Erdem, 1976; Anonymus, 1991) meşe (Quercus infectoria, Fagaceae) tomurcuklarında açtığı bir kanala bıraktığı yumurta sebebiyle hipertrofik büyüme neticesinde oluşan eden patolojik bir üründür. (Tanker,1985). Hakiki mazı arıları yumurtalarını tomurcuk, çiçek, meyva, yaprak ve bunların saplarıyla kök gibi çeşitli bitki kısımlarına teker teker veya birkaçı bir arada olmak üzere bırakırlar ve bu sırada çabuk sertleşen bir salgı maddesiyle onları tesbit ederler.Yumurtadan çıkan kurtlar bulundukları bitki kısımlarının gelişmesine mani olurlar ve buralardaki bitki dokularını tahrip etmek suretiyle çeşitli şekil ve büyüklükte yumrular (mazılar) meydana getirdikleri saptanmış (Acatay, 1969; Erdem, 1976).

Bitki önce kurdun etrafında protein, şeker ve yağ bakımından zengin, ince cidarlı bir besin tabakası ile bunun etrafında sert ve kalınca beyaz renkli koruyucu bir tabaka meydana getirir. Bu iki tabaka iç mazıyı teşkil eder. İç mazını etrafında epidermis ile örtülü ve tanence zengin bir dış tabaka meydana gelir. Mazı arıları bütün hayat safhalarını mazıların içinde geçirirler. Meydana gelen erginler yumruları delerek dışarıya çıkarlar (Atacay, 1969)

Bu çalışmada gallotanen bakımından zengin olan türk meşe mazısı Quercus İnfectoria 'dan kimyasal ve biyoteknolojik yöntemlerle gallik asit eldesi planlanmıştır.

Fermentasyon yoluyla tanenden gallik asit oluşumu, tannik asit molekülünün hidrolitik parçalanmasından ibarettir. Bu hidrolitik parçalanma tannaz denilen özel bir enzim tarafından yapılır.



Şekil 2.5. Hidroliz reaksiyonu (m:1,2,3) (G : Gallik Asit)

Günümüzde mikrobiyal biyoteknoloji yöntemleriyle üretilen saf kimyasal maddelerin ve enzimlerin sayısı gittikçe artmaktadır. Mikrobiyal ürünler; biyolojik olarak parçalanma ve yenilenebilir substratlardan (tarım ürünleri) üretilme gibi aranan önemli özelliklere sahiptirler. Biyokonversiyon (biyodönüşüm) kullanılan immobilize biyokatalistler (hücre veya enzimler) ılımlı reaksiyon koşulları altında istenen moleküllerin yüksek verimlilikte elde edilmesine izin vermektedir. Ayrıca söz edilen tüm biyoprosesler çevre üzerinde pozitif bir etkiye sahiptir.(Pamir 1985)

Tannaz enzimi (Tannin Açil Hidrolaz E.C. 3.1.1.20) , 1786'da Sheele tarafından keşfedilmiştir. En önemli kullanım alanlarından biri fermantasyon yoluyla Gallik asit eldesi. Tannik asit molekülünün tannaz enzimi ile hidrolitik olarak glukoz ve gallik asite parçalanmasına dayanır (Şekil)

Hazır çay endüstrisinin yanında (Coggon and Sanderson 1972), şarap yapımında (Yamada and Tanaha 1972, Chal and Yu 1983) kullanılmaktadır. Ayrıca malt polifenollerinin stabilizasyonunda, bira ve meyve suyunun berraklaştırılmasında kullanılmaktadır.

İlginç bir kullanım alanıda, kahve aromalı içeceklerin aromasını artırmada kullanılmaktadır.
(Gustavo A.S. Pinto, Selma G.F. Leite 2001) .

Önemli kullanım alanlarından biri de Gallik asidin esterlerinin sentezidir. Özellikle propil gallat gıda endustrisinde oldukça önemli bir yer teşkil etmektedir.(Gaathon et al 1989)

Fermentasyon ortamında Tannik Asit varlığında, Aspergillus; Fusarium; Rhizopus; Helicostrylum ve Cunnighamella gibi çeşitli küflerle (Knudson 1913; Haslam &Stangroom 1966; Barthomeuf et al.1994; Lekha & Losane 1994; Bajpai & Patil 1996; Bradoo et al.1996)
Achromobacter, Bacillus, Psedomonas, Selenomonas gibi bakterilerle (Deschaps et al.1983; Shene& Brooker 1995) yaptıkları çalışmalarda en iyi Tannaz enzimi üretici mikroorganizma Aspergillus Niger olduğu belirlenmiştir.

Mondal ve Patil 1999'da yaptıkları çalışmada , orman topraklarından izole ettikleri Bacillus licheniformis kullanmışlar ve fermentasyon süresi boyunca tüketilen Tannik asit ve oluşan Gallik asit ortamdan alınan 10 µl örnekler ile kağıt

kromatografisinde takip edilmiştir (Whatman-1mm; çözücü sistemi olarak n-butanol, asetik asit, su 4:1:5 oranlarında)

2001 yılında Mondal ve Patil'nin yaptıkları bir başka çalışmada Aspergillus aculeatus DBF9 suşunu kullanmışlardır. İzole ettikleri mikroorganizmaların Tannik Asit agarlı besiyerine inokulasyonunu yaptıktan sonra, açık berrak zon oluşturan mikroorganizma bu çalışma için seçilmiştir. İdentifikasyonu yapılan mikroorganizma Aspergillus aculeatus DBF9 olduğu belirlenmiş.

Bu mikroorganizma, Tannaz enzimini hücre içi ve hücre dışı olmak üzere iki farklı şekilde ürettiği belirlenmiştir. Çalışmanın devamında tannaz enzimi saflaştırılmış ve optimum koşulları belirlenmiştir. Maksimum Tannaz üretimi için optimum pH =5 olarak bulunurken, optimum sıcaklık hücre içi ve hücre dışı enzim için 50 C ve 60 C gibi iki farklı değer belirlenmiştir.

Yapılan denemede bu mikroorganizma tarafından salgılanan Tannaz enzimi yüksek sıcaklık yanında, yüksek tuz konsantrasyonuna da toleranslı olduğu belirlenmiş. Sonuç olarak *Aspergillus aculeatus* tarafından üretilen Tannaz enzimi biyoproses endüstrisinde ve kirlilik kontrolünde kullanıma elverişli olduğu kanıtlanmış.

Bajpai ve Patil tarafından (1997)' de yapılan bir çalışmada Aspergillus niger, Aspergillus fischarii, Fusarium solanii ve Trichoderma viride suşlarının, metil gallat; gallik asit; ve pirogallol ile indüklenmesi sonucu Tannaz enzimin aktivitesi araştırılmıştır.

Kullanılan suşlar için indükleme oranları sırasıyla Aspergillus fischeri (26.7), Fusarium solanii (26.1), Tricoderma viride için (40.7) olarak saptanmış ve sonuçta Aspergillus niger'in bazal enzim aktivitesinden yoksun olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın devamında tannik asidin artan konsantrasyonlarındaki tolerans limitleri belirlenerek, %3'lük Tannik asit konsantrasyonunda indüklenen Fusarium solanii Tannaz enzimi üretimi için en uygun suş önerilmiştir.

Bradoo,Gupta ve Saxena (1996) 50 adet küf arasında yapılan tarama sonucunda en iyi Tannaz üretici miklroorganizma olarak Aspergillus japonicus'u seçmişler.

Sıvı yüzey yöntemi ile yapılan çalışmada, fermantasyon ortamına ilave edilen % 0.2'lik konsantrasyonunda (glükoz; arabinoz; fruktoz; galaktoz; sukroz gibi şekerlerin, karboksimetilselluloz ve nişasta gibi karbonhidratların) Tannaz üretimi üzerindeki

etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda % 0.2'lik glukoz varlığında maksimum Tannaz üretimi gözlenmiştir.

Çalışmanın devamında, glukozun farklı konsantrasyonları (% 0.6-%10 arası) kullanılarak yine maksimum Tannaz üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir.Bunların yanı sıra, pH ve sıcaklık optimizasyonu da yapılmış olup, sonuç olarak maksimum Tannaz üretimi için % 0.2'lik glukoz konsantrasyonu, pH=6'da 30-35 C koşulları belirlenmiştir.

2003'te Singh ve Bhat meşe ormanından izole edilen ve identifikasyonu yapılan *Aspergillus niger* van Teighem kullanmışlar ve poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile Tannaz enzimin esteraz ve depsidaz aktivitesini araştırarak bu alt birimlerin molekül ağırlıklarını belirlemişlerdir. Yapılan çalışma sonucu jel'de iki farklı yerde band gözlenmiştir.Molekül ağırlıkları sırasıyla 102kDa ve 83 kDa olarak belirlenmiştir. Çalışmada ilgi çeken nokta, araştırıcılar kullendıklar *Aspergillus niger* suşunu fermantasyon ortamına geçmeden önce, yatık Tannik asit agar üzerinde geliştirmeleridir.Çalışmanın bir sonraki aşamasında (fermentasyon ortamından izole ettikleri Tannaz enzimin farklı substratlar için Km va Vm değerlerini belirlemişlerdir. Büyük Vm / Km oranı, enzimin substrata olan ilgisinin çok küçük konsantrasyonlarda bile maksimum olduğunu gösterir (Sagel 1976).

Singl ve Bhat'in çalışmasında farklı substrat olarak Tannik asit, Metil Gallat ve Propil gallat kullanarak Vm/Km değerleri sırasıyla 2.53, 1.62 re 0.58 olarak felirlenmiştir. Sonuçta Tannaz enzimi için en iyi substrat Tannik asit olduğu saptanmıştır (Sing ve Bhat, 2003)

2002'de Sharma ve Gupta yaptıkları çalışmada, *Aspergillus niger* van Teighem'den üretilen tannaz enzimini kullanarak gıda endüstrisinde önemli bir antioksidan olan propil gallat'ı sentezlemeyi başarmışlar.

Propil gallat'ı n-propanollü susuz ortamda, Tannik Asit ile bir transesterifikasyon reaksiyonu sonucu % 86 verimle sentezlemişler.

Sonuç olarak Aspergillus niger van Teighem tarafından üretilen Tannaz enzimi, lipaz ve proteaz gibi susuz ve ya minimum su gerektiren ortamlarda kullanılabileceği doğrulanmış bu da kimyasal prosesler için oldukça iyi bir sonuçtur.

Ayed ve Hamdi (2002) depolanmış zeytin atıklarından izole ettikleri *Lactobacillus plantarum* ile yaptıkları çalışmada, fermentasyon ortamına glukoz

ilavesinin Tannaz enzimi aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemişlerdir.Yapılan çalışmada pH=6'da 37 C'de oksijensiz ortamda ,2g/L glukoz, 7g/L tannik asit varlığında maksimum Tannaz aktivitesi belirlenmiştir (6U/ml). Ölçümler spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir (Iibuchi S. 1967).Karşılaştırma yapma amacıyla çalışmanın devamında , fermentasyon ortamına glukoz ilave etmeden yapılan denemelerde maksimum Tannaz aktivitesi 15 g/L Tannik asit varlığında belirlenmiştir.

(Gupta et al.1997) *Aspergillus japonicus* ile yaptıkları çalışmada, Tannaz aktivitesini 329U/ml belirlerken,*Lactobacillus plantarum* için maksimum enzim aktivitesi 6 U/ml belirlemişler. Deschamps et al. (1983) çalışmalarında Klebsiella'dan salgılanan Tannaz için 0.54 U/ml belirlemişler.

Misro et al (1997) topraktan izole ettikleri ve identifikasyon sonucu Rhizopus oryzae (RO.II T RB 13) NRL 21498 ile immobilizasyon koşulları altında tannik asidin gallik aside hidrolizini incelemişler ve enzimin immobilizasyonu değil, doğrudan doğruya spor solüsyonunun immobilizasyonunun yapılması bu çalışmanın önemini artırmaktadır. Katı destek olarak kalsiyum alginat boncukları kullanmışlardır. Maksimum Gallik asit için ortam koşullarını optimize edilmiş.

Besi ortamı olarak, modifiye edilmiş Czapex Dox kullanılmış (Chen, 1967). pH=5 'te % 2 tannik asit, varlığında 4 günlük inkubasyon sonucu maksimum Gallik asit elde etmişlerdir. İmmobilizasyonda katı destek olarak kullanılan kalsiyum alginat üzerinde glutaraldehid ile yapılan değişiklik, hidroliz prosesinde düşüşe neden olmuştur. Sonuç olarak kalsiyum alginat ile immobilize edilmiş sporlar üç kez başarı işe kullanılmıştır.Böylece, günümüzde geliştirilen immobilizasyon teknikleri ile biyoteknolojik proseslerin kullanımı daha da avantajlı hale gelmektedir.

1985'te Pourrat et al. *Aspergillus niger* kullanarak Caesalpina spinosa meyvalarındaki tanenlerin hidrolizi gallik asit üretimine bir çalışma yapmış ve %30'luk bir verimle gallik asit elde etmişlerdir.

Aynı bitkiyi kullanarak kimyasal hidroliz ile gallik asit elde edilişine ait bir çalışma, iki farklı yöntem ile 1988'de Gonzalez ve Rivadeneyra tarafından yapılmıştır. Birinci yöntemde tanenler 100^0 C'de 1.5-4 saat 2.8 N'lik sülfürik asit ile reaksiyona sokularak % 95'lık saflıkta %11.40 verim elde etmişlerdir.

İkinci yöntemde ise Nazarenka tekniği ile tanenler sodyum hidroksit ile 1 saat muamele edildikten sonra, hidroklorik asit ile ısıtılarak %98 saflıkta % 19'luk bir verim elde ettiklerini ifade etmektedirler.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Materyal olarak Uludağ Universitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde izole edilmiş ve identifikasyonu gerçekleştirilmiş A.niger'in yanısıra A. niger ATCC 16404 ve Ege Üniv. Yüksek Teknoloji Enst . tarafından izole edilip, tanısı yapılan A.niger olmak üzere 3 suş kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan bitkisel materyal, Balıkesir iline bağlı Savaştepe ilçesi koruluğundaki meşe (Quercus infectoria, Fagaceae) ağaçlarından kuru olarak toplanan mazı (Gallae Quercinae)' lardır.

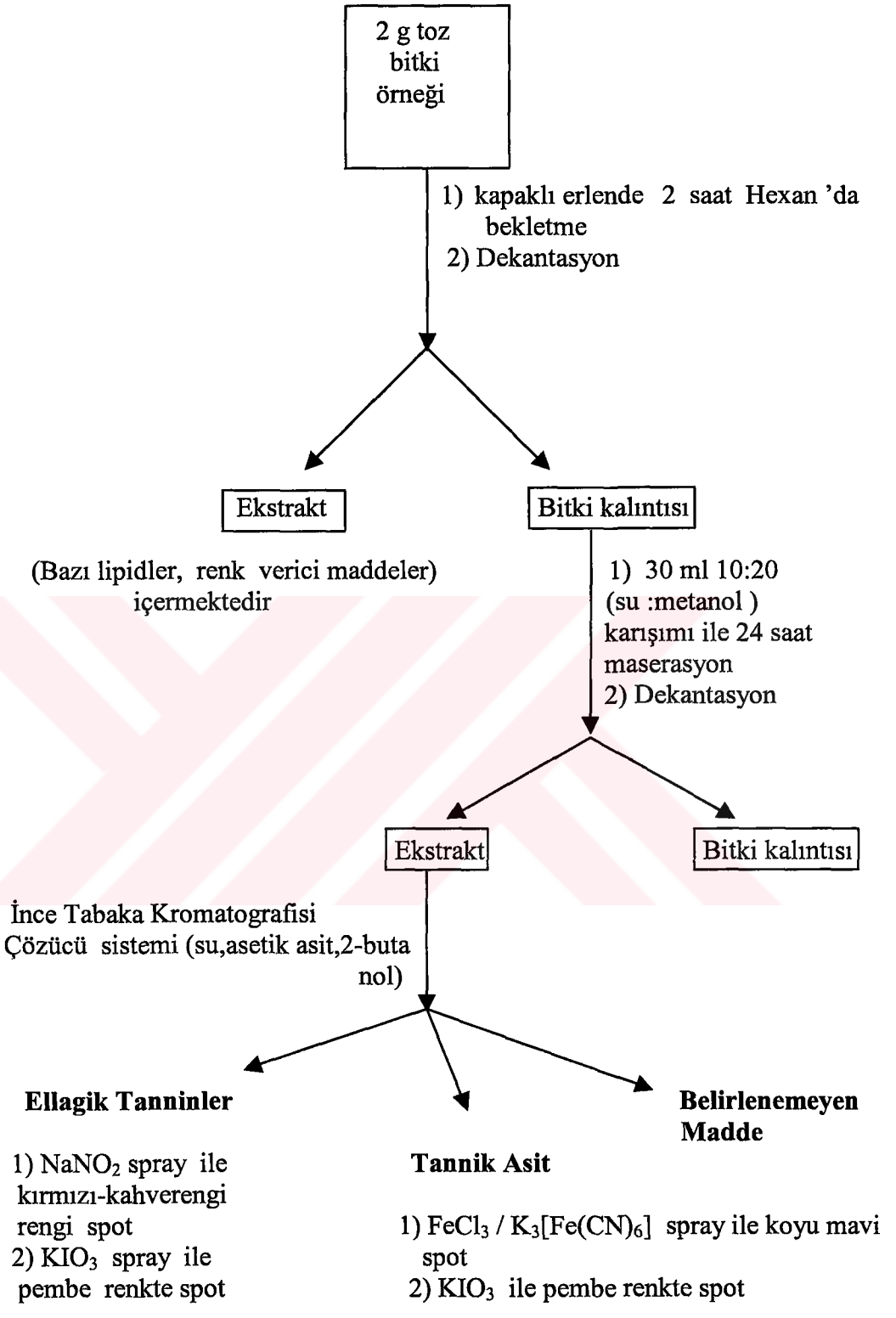
3.2 Yöntem

Çalışma , Tannik Asidin izolasyonundan sonra **Kimyasal** ve **Biyoteknolojik** olmak üzere iki farklı yöntem ile yürütüldü. Kimyasal Yöntem Akım Şemaları Şekil 3.2.1.1 ve Şekil 3.2.1.2 'de verilmiştir.

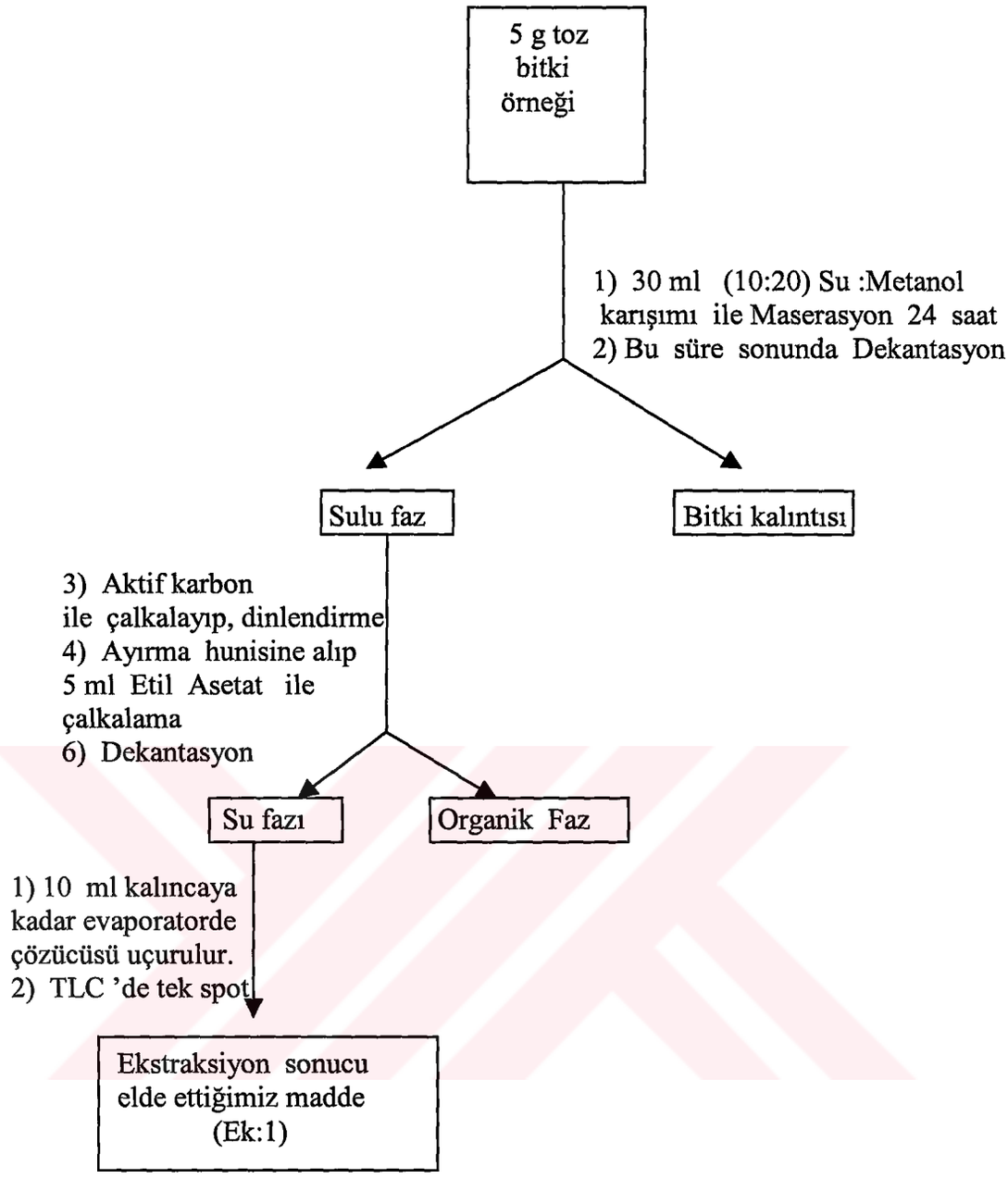
Sadece metanol –su karışımı ile yaptığımız ekstraksiyonda, elimize geçen ekstrakt Ellagik asit ve Tannik asit içermektedir. İnce Tabaka Kromatografisi ile yaptığımız belirlemede $NaNO_2$ spray ile Ellagik Asit kırmızı-kahverengi rengi spot, $FeCl_3/K_3[Fe(CN)_6]$ karışımı ile Tannik Asit koyu mavi spot vermektedir.

Sadece metanol ile yaptığımız ekstraksiyondan sonra, Dietil eter ilavesi ve aktif karbonla çalkalamadan sonra tek spot gözlenmiştir. Tannik Asit olduğunu tahmin ettiğimiz maddenin IR spektrumu alınmıştır.(Ek :1; Ek:2;)

3.2.1. Tannik Asidin İzolasyonu

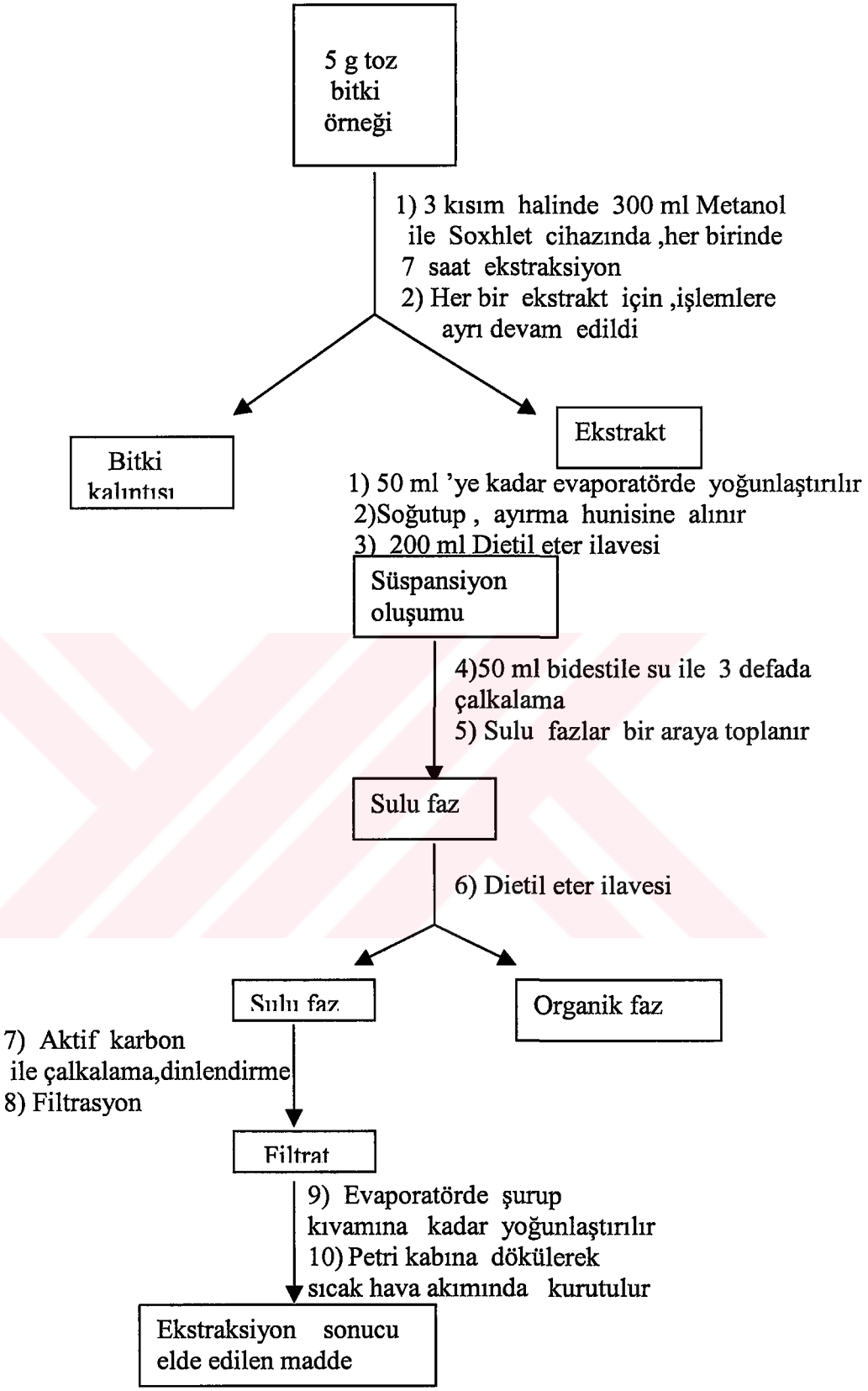


Şekil 3.2.1.1 Bitkisel drog'tan Tannik Asidin İzolasyonu
(Wilson and Hagerman.1990, Hagerman et al.1997, Bate-Smith.1977, Willis and Allen. 1998; Porter, 1989; Mueller-Harvey et al., 1987).



Şekil:3.2.1.2 Bitkisel drog' tan Tannik Asidin Ekstraksiyonu

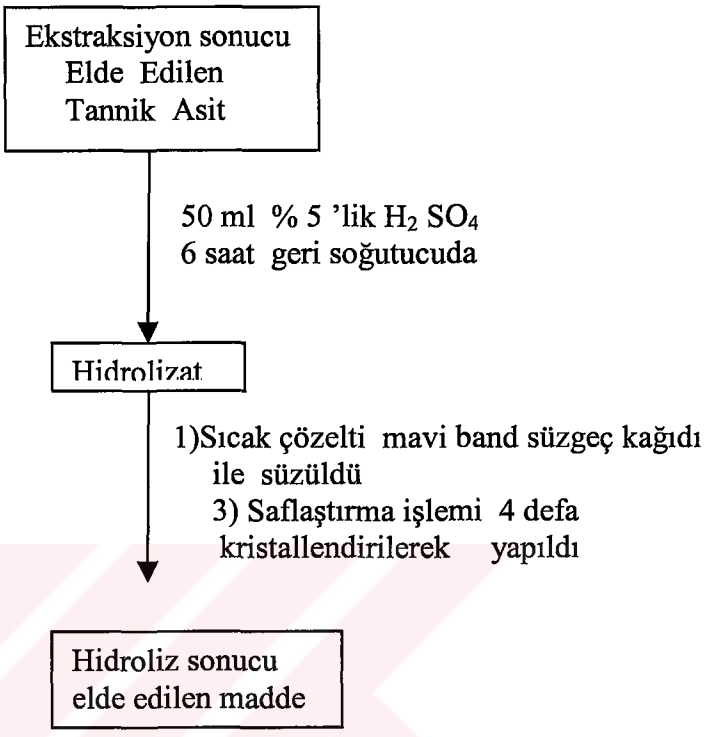
(Ek:1 Saf Tannik Asit ve Ekstraksiyon sonucu elde edilen maddenin IR)



Sekil: 3.2.1.3. Tannik asidin sokslet ekstraksiyon ile izolasyonu (Pharmazcutische Biol. 1988) **Ek:2 Tannik Asit IR**

3.3. Kimyasal Yöntem

Hidroliz işlemi asidik ortamda 250 ml balonda geri soğutucuda, 100°C' de gerçekleştirildi. Bu amaçla % 5'lik(w/w)H_2SO_4 çözeltisi kullanıldı .



Şekil : 3.3.1 Tannik Asidin hidrolizi (Galvez et al. 1997)

Ek:3 Hidroliz sonucu elde edilen maddenin IR spektrumu
Ek:4 Saf Gallik Asit IR spektrumu

IR spektrumlar karşılaştırıldığında, saf Gallik asit ile Hidroliz sonucu Gallik asit olduğunu tahmin ettiğimiz maddenin spektrumları uyumludur.

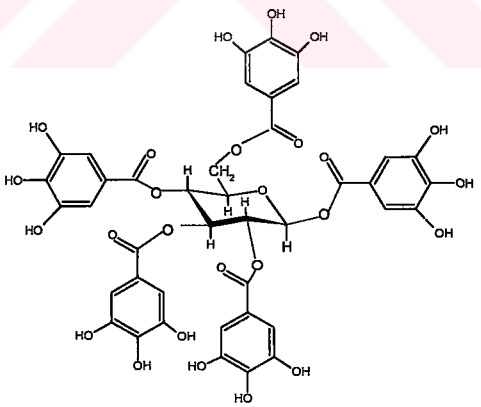
Hidroliz süresi 6, 12, 24, 36, 48, 60, 66, 72, 78 saatleri için hidroliz şeması takip edilerek, optimize edildi. Sonuçlar Çizelge 3.3.1.'de verildiği gibidir.

Çizelge 3.3.1. Hidroliz süresinin optimizasyonu

Bitkisel Drog (gram)	Tannik Asit (gram)	Gallik Asit (gram)	Hidroliz süresi (saat)
10	2	0.085	6
10	2	0.126	12
10	2	0.365	24
10	2	0.458	36
10	2	0.622	48
10	2	0.785	60
10	2	0.984	66
10	2	0.987	72
10	2	0.987	78

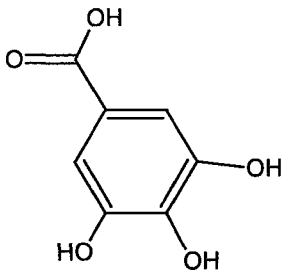
3.3.1. Ekstraksiyon ve Hidroliz sonucu elde edilen Tannik Asit ve Gallik Asidin Spektroskopik olarak değerlendirmesi

Çizelge 3.3.1.1. Tannik asidin spektroskopik değerlendirilmesi

Dalga Boyu	Fonksiyonel Grup	
3380	-OH	
1610, 1532, 1445	Aromatik C-C	
1705	Karbonil	
1340-1315	-OH ve Ester bağları	
1200	C-OH bağları	Tannik Asit

Çizelge3.3.1.2. Gallik asidin spektroskopik değerlendirilmesi

Dalga Boyu	**Grup**	
3496	**- OH**	
1703	**C=O**	
1469, 1450	**Ar –CH= gerilmesi**	



Gallik Asit

3.4. Biyoteknolojik Yöntem

3.4.1. Besi yerleri ve Kimyasal Maddeler

3.4.1.1. Besi yerleri

a) Potato Dekstroz Agar (PDA) (Merck): Patates Dekstroz Agar 40 g/L olacak şekilde distile suda eritilerek 121^0 C'de 15 dak. otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

b) Tanik Asitli Besiyeri: Kullanılan besiyerinin bileşimi aşağıdaki şekildedir.

Tanik Asit.....10g/L
$NaNO_3$..... 3.0g/L
$MgSO_4.7H_2O$..... 0.5g/L
KCl..... 0.5g/L
$FeSO_4.7H_2O$..... 0.01g/L
KH_2PO_4..... 1.0g/L
Agar..... 30g/L
pH=4.3 (Ortamın kendi pH'sı)

c) Sıvı Besi Ortamı: Tannik asitli besi ortamı ile aynı bileşimde, fakat agar içermemektedir.

3.4.1.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmada; 0.1N'lık NaOH çözeltisi kültür mikroorganizmalarının geliştirilmesinde kullanılan besi ortamın pH'sının ayarlanmasında; Tween 80'in %2'lik çözeltisi ise küf solusyonlarının hazırlanması sırasında kullanılmıştır.

Tannaz enzimin aktivitesini belirlemek için 0.1 N'lık KOH çözeltisi; Rhodanin'in % 0.697 w/v metanoldeki çözeltisi.

3.4.2. Fermentasyon Ortamın Hazırlanması

3.4.2.1. pH Ayarlanması

Belirtilen oranlarda hazırlanan Tannik Asitli besiyeri pH ayarlanması amacıyla ön denemeye alınmıştır. Ortam pH'sının 4.30 olarak belirlenmesinden sonra pH' nın 5,5'a ayarlanmasında steril 0,1 N NaOH kullanılmıştır (El-Gazzar ve ark.1986). Yapılan ön denemeler için, besiyerinde amaçlanan pH'lara ulaşılmada gerekli NaOH miktarı pH metre kullanılarak belirlenmiştir (Halkman ve Akçelik 2000)

Tannik Asitli besiyerinin hazırlanması sırasında, Tannik Asit dışında belirtilen tuzlar belirtilen miktarda tartılarak suda çözünmüştür ve otoklavda 120 ^{0}C de 11 dk. süre sterilize edilmiştir.70^{0}C ye Soğutuldukdan sonra daha önceden sterilize edilmiş % 10'luk Tannik Asit çözeltisi ilave edilmiştir.

3.4.2.2. Tannik Asitli besiyerinin hazırlanmasında kullanılan Tannik Asidin Sterilizasyonu

Hazırlanan % 10'luk Tannik Asit çözeltisi N_2 gazı basıncı altında steril membran filtreden geçirilmiştir.(Sharma 2001) Membran filtre olarak organik çözücülere, asit ve alkalilere dayanıklı teflon PFA olarak adlandırılan 0,47 mm çaplı filtre (Cole-Parmer) kullanılmıştır. Filtre kağıdı olarak, gözenek çapı 0,45 µm olan filtre çapına uygun (47 mm), sartolon polyamId özellikteki fIltre kağıdı (Sartorious) kullanılmıştır. Böylece sterilizasyon sıcaklığında meydana gelebilecek kimyasal yapı değişiklikleri ve olası hataların giderilebileceği düşünülmüştür. Besiyerleri steril petrilere dökülerek aşılamaya hazır duruma getirilmiştir.

3.4.2.3. pH Ayarlamasında Kullanılan NaOH Çözeltisinin Sterilizasyonu

0,1 N NaOH çözeltisinin sterilizasyonunda tindelizasyon (90^0C 'de 1saat 3 gün süreyle) yöntemi kullanılmıştır.

3.4.2.4. Küflerin Aşılanması

Küfler araştırma süresince on günde bir yatık Potato Dekstroz Agarda yenilenerek, 4^0 C'de muhafazaya alınmıştır. Deneme aşamasında, yatık agardan 1 öze dolusu spor alınarak bir ml steril fizyolojik su içeren tüplerde tüp karıştırıcısı kullanılarak süspansiyon haline getirilmiştir.

pH'sı 5,5'a ayarlanmış ve pH'sı 4,3 olan normal besiyeri steril petri kaplarına döküldükten sonra, merkezde tek noktaya olacak şekilde steril ince uçlu pipet yardımı ile aşılanmıştır. Aşılama yapılan petri kaplarında kurumanın engellenmesi için naylon poşetlere yerleştirilerek 30^0 C'de inkübasyona bırakılmıştır (Şahin ve Dandin 1999)

3.4.2.5. Fermentasyon ortamına sporların aşılanması

Çalkalamalı kültürde yapılan fermentasyon çalışmasında, fermantasyon ortamına spor aşılanması yapmadan önce, stok kültür yatık PDA'da 30 C'de 10 gün boyunca inkübe edilmiş. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, tüplere %2'lik Tween 80 solüsyonundan ilave edilerek sporların sıvı ortama geçmesi sağlanmış. Daha sonra hazırlanan spor solüsyonlarından alınan 1 ml'lik örnekler ile fizyolojik tuzlu suda dilüsyonlar yapılmıştır.

3.4.3. Fermentasyon

100 ml'lik erlenlere konulan 50 ml'lik sıvı tannik asitli besiyerine inoküle edilen spor sayısı 10^6 adet/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Fermentasyon, 30^0 C sıcaklık 150 r.p.m. çalkalama hızı ile pH=5.5'ta 3 tekrarlı yapılmıştır.

3.4.3.1. Fermentasyon süresince Tannaz enzimin aktivitesinin belirlenmesi

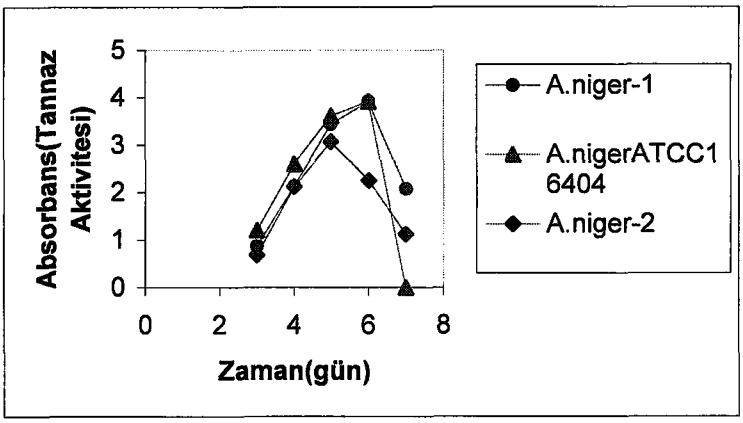
Fermentasyon boyunca oluşan Tannaz enzimi UV-VIS Scanning Spektrofotometre (Shimadzu UV-VIS 1208) ile λ=520 nm'de yapılmıştır.(Sharma 2000) Fermentasyon deneyleri sırasında, fermentasyon ortamından steril koşullarda her 24 saate boş deney tüplerine 0.4 ml örnek alınmıştır. Üzerine, %0.667w/v Rodanin'in metanolde hazırlanmış çözeltisinden 0.2 ml ve 0.2 ml 0.5 N KOH çözeltisinden ilave edilmiştir .30^0 C'de 5 dk'lık inkubasyondan sonra 9.2 ml distile su ilave edilerek seyrelme yapılmıştır.Maksimum Tannaz enzimin'in salgılandığı süre belirlendi.

Üç paralel örnek ile çalışıldığında bu sürenin altıncı gün olduğu belirlenmiştir.

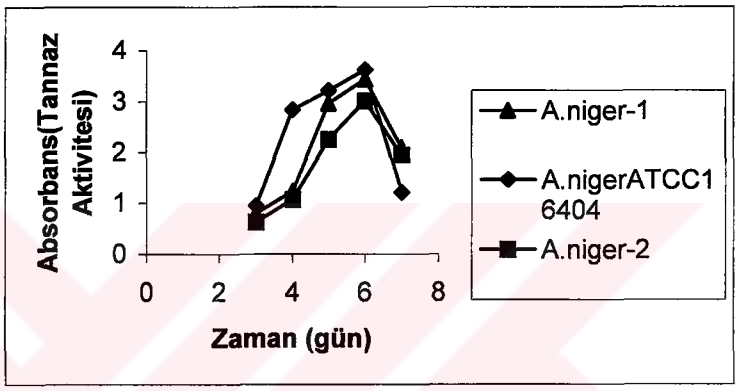
Spektroskopik ölçümlerde standart çözelti olarak, mikroorganizma ilave etmeden Tannik Asit'li sıvı besi ortamından kullandığımız çözeltidir.

λ=520 nm'de, yukarıda belirtilen bazik koşullarda Tannik asit ve Rodanin arasında kompleks oluşmadığında dolayı çözeltisi absorbans vermez iken, fermentasyonun ilerleyen sürelerinde oluşan Gallik asit miktarına bağlı olarak Rodanin ile λ=520 nm'de pembe renkte kompleks oluşmaktadır.

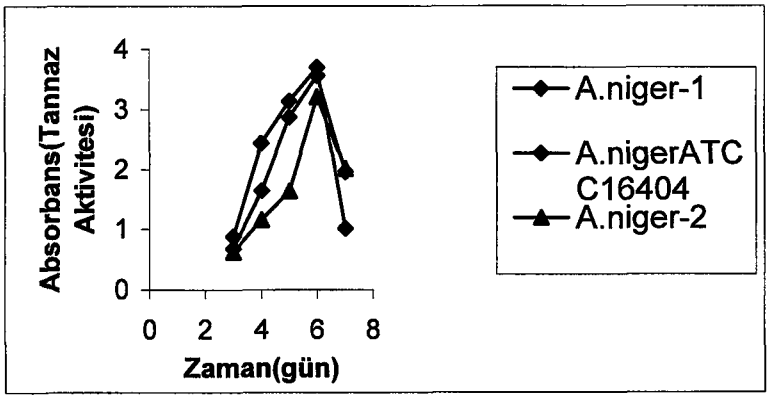
Spektroskopik ölçümler bu temele dayanarak yapılmıştır. (Sharma Shweta 2000.)



Şekil 3.4.3.1.1. 1. örneklemede elde edilen optimum süreler



Şekil 3.4.3.1.2. 2. örneklemede elde edilen optimum süreler



Şekil 3.4.3.1.3. 3. örneklemede elde edilen optimum süreler

3.4.4. Fermentasyon Ortamından Gallik Asidin İzolasyonu:

Gallik Asit, ılık suda az çözünen soğuk suda nerede ise hiç çozünmeyen organik bir asit olduğu için, fermentasyon ortamından doğrudan doğruya kristallendirme ile izole edildi.

Altıncı günün sonunda, fermentasyon ortamında oluşan miseller ve gelişen küfler, Whatman No:1 filtre kağıdından süzüldükten sonra soğukta kristallenmeye bırakıldı. 36 saatin sonunda, erlende parlak ipeksi görünümünde iğne şeklinde kristaller oluştu. Fermentasyon sonucu elde ettiğimiz ve gallik asit olduğunu tahmin ettiğimiz madde metanolde iğnecikler şeklinde kristallenmiştir.

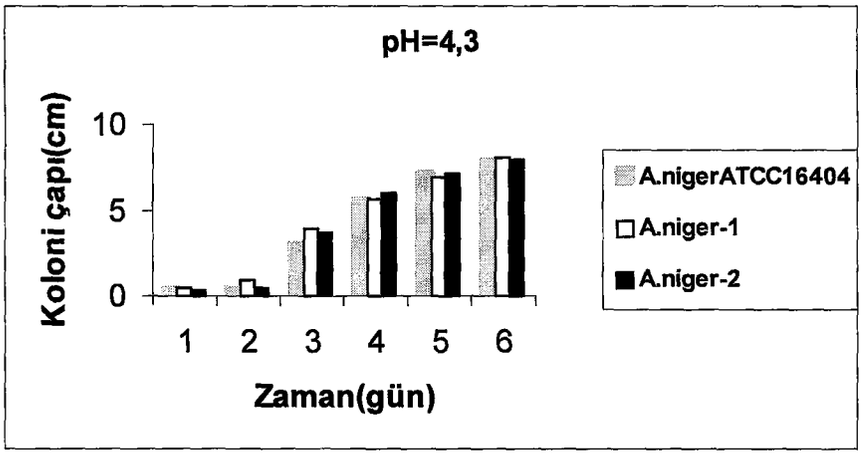
Erime noktası tayini uygulanmasında saf gallik asit'in E.N.=255-260 °C, bizim elde ettiğimiz ürünün E.N.= 249-256 °C olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

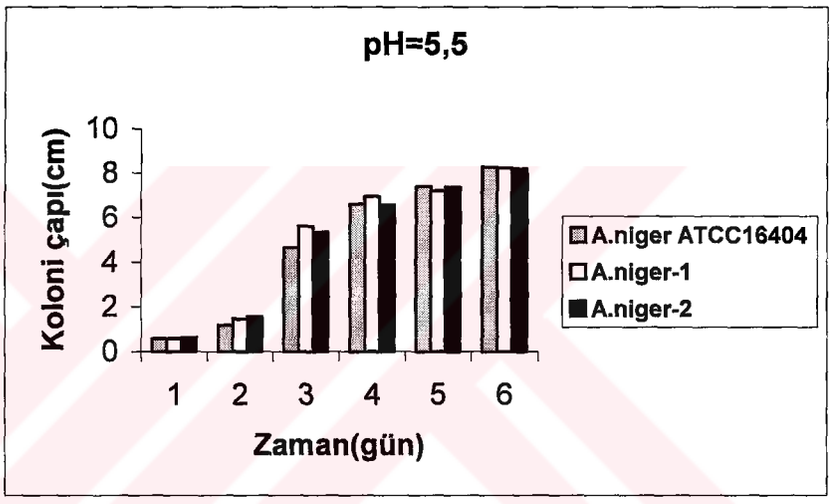
Çalışma başlangıçta iki farklı pH'da gerçekleştirilmiştir . Besi ortamının doğal pH'sı 4.3, ayrıca kaynak araştırması sonucu Aspergillus niger küfü için en uygun olabilecek pH=5.5 değerleridir (Debdulal Banarjee et al. 2001) .Hazırlanan Tanik asit agarlı besiyeri (Sharma 2000) petri kaplarına dökülerek,merkeze nokta ekimi yapılmıştır. Petriler 30 °C de 6 gün inkübe edilmiş ve her 24 saate bir koloni çapı ölçülmüştür.

Çizelge 4.1. Farklı pH değerlerindeki ortalama koloni çapları (cm)(n=5)

Mikroorganizma	**Aspergillus niger ATCC**		**Aspergillus niger-1**		**Aspergillus niger-2**	
Gün	pH=4.3	pH=5.5	pH=4.3	pH=5.5	pH=4.3	pH=5.5
1.gün	0.45	0.57	0.48	0.58	0.35	0.63
2.gün	0.48	1.17	0.96	1.46	0.46	1.56
3.gün	3.06	4.65	3.89	5.60	3.65	5.35
4.gün	5.65	6.60	5.60	6.95	5.95	6.58
5.gün	7.21	7.40	6.90	7.20	7.10	7.36
6.gün	7.91	8.27	8.10	8.23	7.95	8.20



Şekil 4.1. pH 4,3 'de koloni çaplarının karşılaştırılması



Şekil 4.2. pH 5,5 'de koloni çaplarının karşılaştırılması

Çizelge 4.1'den de izlenebileceği gibi, deneme materyali olan 3 suşun aynı pH'lardaki 1.gün koloni çapları birbirine yakındır. pH 4.3 ve 5.5'deki koloni çaplarındaki farklar ise dikkat çekicidir. Özellikle pH=5.5' daki koloni çapının, 4.3 pH'ya göre fazla oluşu, her üç suşun ortama göstermekte pH'nın çok etkili olduğunu ifade etmektedir. Bu sonuç Iacazzio ve ark.(2000) yılında yaptıkları çalışmayı desteklemektedir.

Koloni çaplarının 6 gün boyunca yapılan ölçümlere göre 1 ve 2 gün, kullanılan suşların ortama adaptasyon süreci geçirdikleri ve 2 günden sonra bu süreci tamamladıkları gözlenmiştir. 3 günden sonra *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus*

niger-1 ve *Aspergillus niger*–2 suşlarının hızla sporlanma göstererek koloni çapını artırdıkları belirlenmiştir. Bu artış pH=5.5'da daha fazla olmuştur (Şekil 4.2). Elde edilen bulgulara göre Tannik asidin hidrolizasyon koşulları pH= 5.5 olup, en iyi performansı önemli bir fark olmasa da *Aspergillus niger* ATCC(16404)'nolu suş göstermiştir.

Ek: 5 Mikroorganizmalarin görünümü

Makroskobik gözlerde ise, pH= 4.3'de pH=5.5'a . göre bütün suşlar zayıf sporlanma göstermişlerdir. Sporlar çok küçük ve seyrek bir yayılma ile gelişme gösterirken, pH 5.5'da yapı daha büyük, daha sıkı koyu siyah renkte olduğu gözlenmiştir. Bu da pH 5.5 değerinin tannik asit kullanımında daha etkili olduğunun bir sonucu olarak değerlendirilmiştir.

Tannaz enzimin'in aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan spektroskopik ölçümler sonucunda, maksimum enzim'in salgılandı süre optimize edilmiş oldu.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mikroorganizmalar ile yapılan hidroliz işlemi, daha ılımlı koşullarda ve yüksek verimle gerçekleşmektedir. Kimyasal yöntem ile hidroliz'de maksimum % 50 verime, 100°C'de 72 saat süre sonunda ulaşıldı. Biyoteknolojik yöntemde ise % 85-% 87 arası verim 30°C'de elde edildi.

Üç farklı suş ile yaptığımız paralel çalışmalarda, maksimum Tannaz Enzimin salgılandığı koşullar optimize edildi, böylece ortamda oluşan maksimum Gallik Asit miktarı belirlendikten sonra, Gallik Asidin izolasyonu yapıldı. Bu optimum süre sonunda oluşan Gallik Asit izole edilmediği taktirde, fermentasyon ortamında besin kaynağı tükendiğinden dolayı, mikroorganizmalar tarafından sekonder metabolit olarak kullanılmaya başlanıyor ve miktarında düşüş meydana geliyor.

Çalışmada kullanılan Aspergillus suşları'ın, Tannaz üretebilme kapasitelerini de incelemiş olduk. *Aspergillus niger* ATCC 16404 en fazla salgılarken, *Aspergillus niger*-1ve *Aspergillus niger*-2 birbirine yakındır.

Fermentasyon ortamından Gallik Asidin izolasyonu ve saflaştırılması oldukça kolaydır, çünkü ortamda safsızlık teşkil edecek maddeler yoktur, Tannik Asidin yapısındaki glukoz *Aspergillus* suşları tarafından besin kaynağı olarak kullanıldığında geriye sadece Gallik Asit kalmaktadır.Bu anlamda, Kimyasal yönteme göre ortamdan saflaştırılması kolaylaşmaktadır.

Literatürde saf Gallik Asitin erime noktası 238-240 °C olarak verilmiş, kimyasal ve enzimatik yolla elde edilen Gallik Asitin erime noktası 237-238 °C olarak bulunmuştur. Sonuç olarak elde ettiğimiz ürün yüksek saflık derecesine sahiptir.

Fermentasyon sonucu elde edilen son ürün ile saf Gallik Asitin spektrofotometrik ve kimyasal tayinleri yapıldığında sonuçların birbirine uygun olduğu görülmüştür. Spektrofotometrik tayin , her iki ürünün metanoldeki çözetilerinin metanole karşı UV spektrofotometre de okumasıyla yapılmıştır. 200 ile 400 nm arası taranmış ve spektrofotometrik eğrileri çizilmiştir (Ek: 6). Saf Gallik Asit ve fermentasyon sonucu elde edilen ürünün aynı şekilde 220 nm ve 260 nm' de pik vermiştir. Buda elde edilen ürünün Gallik Asit olduğunu göstermektedir.

Üniversitemizin Ziraat Fak. Gıda Müh. kendi izolatı olan *Aspergillus niger*-1'inde Tannaz Enzimini salgıladığını belirlemiş olduk. Sonuç olarak pH 5.5'ta, 6 gün (144 saat) sonunda, fermentasyon ortamında maksimum Gallik Asit oluşmaktadır.

Çalışmanın Endüstriyel boyutta kullanımı için, fermentasyon ortamındaki koşullar üzerinde geliştirmeler yapılarak Gallik Asit verimi üzerine araştırmalar yapılabilir. Aynı şekilde mikroorganizmaların defalarca kullanımı için doğrudan doğruya spor solüsyonlarının immobilizasyonu yapılabilir, çünkü Tannaz enzimini saflaştırarak immobilizasyonunu yapmak ekonomik açıdan oldukça pahalıdır ve zaman alıcı bir işlemdir

KAYNAKLAR

BATE – SMİTH, E.C., 1977. Astringent tannins of Acer species. Phytochemistry 16, 1421- 1426.

BATE – SMİTH, E.C., 1972. Detection and determination of ellagitannins. Phytochemistry 11, 1153-1156.

BAJPAİ, B.; S. 1996. Tannin acyl hydrolase (EC. 3.1.1.20) activity of *Aspergillus, Penicilium, Fusarium* and *Trichoderma.* World J. Microbiol. Biotechnol., 12: 217- 220.

BAYTOP, T., 1980. FARMAKOGNOZİ, Cilt I (Genel Farmakognozi), Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul, 103-110.

BHAKTİ BAJPAİ and SHRİDHAR PATİL. 1997. İnduction of Tannin acyl hydrolase (EC.3.1.1.20) activity in some members of *fungi imperfecti* .

BHAT K.TEJ, BHUPİNDER SİNGH & OM P.SHARMA. 1998. Microbial degradation of tannins-A current perspective . *Biodegradation* 9: 343-357.

BHATİA S.I., A.K.VERMA, JOGİNDER SİNGH and K.L. BAJAJ. 1972. A sensitive colometric method for microdetermination of Gallic acid with Sodium Cobaltnitrite

BRADOO SAPNA, GUPTA RENİ and SAXENA R.K. 1997. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular Tannase from *Aspergillus japonicus* . Process Biochemistry , Vol.32 , No:2, 135-139.

BRADOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R.K. 1996. Screening of extracellular tannase. App.Microbiol. 42: 325-329 .

BRATATİ KAR, RİNTU BANERJEE, BİMAL CHADRA BHATTACHARYYA. 2002. Optimization of physicochemica parameters for Gallic acid production by evolutionary operation- factorial design techniqe. Process Biochemistry 37; 1395-1341.

COGGON, P. and SANDERSON, G.W., 1972. Mnufacture of instant tea. Patent Ger. Offen 2.304 073 (cl. A. 23f) 16 Aug.1973.

ÇETİN T.E. 1983, Endüstriyel Mikrobiyoloji, Tıp Fakultesi Vakfı-BAYDA Yayın No:2 Fatih Gençlik Vakfı Matbaa İşletmesi, s 478-480. İstanbul.

DEBDULAL BANARJEE, KESHAB C. MONDAL and BİHAS R . PATİ . 2001. Production and Characterization of extracellular Tannase from newly isolated *Aspergillus aculeautus* DBF9. J. Basic Microbiol. 41:6, 313-318.

EL-GAZZAR, FE., G. RUSUL, E.H. MARTH. 1986. Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* in The Presence of Sodium Chloride. Journal of Food Protection. 49(6):461-466.

GALVEZ GARRO, B.REİDL and A.H. CONNER. 1997. Analytical Studies on Tara Tannins., Holzforschung. (51) 235-243.

GROSS,G.G., 1992,Enzymes in the Biosynthesis of Hydrolysable Tannins. Plenum Press, New York.

GUSTAVO A.S. PİNTO; SELMA G.F. LEİTE; SELMA C. TERZİ; SONİA CARİ. 2001. Selection of Tannase-produsing *Aspergillus niger* strains. Brezilian Journal of Microbiology

GUPTA, M.N. 1992. Eur.J.Biochem. 25:203.

HAGERMAN, A.E., ZHAO, Y., JOHNSON, S., 1997. Methods for determination of condensed and hydrolysable tannins. In: Shahidi, F. (Ed), Aninutrients and

Phytochemicals in Food , ACS Symposium Series No:662. American Chemical Society, pp.209-222 (Chapter 12)

HAGERMAN, A.E. and BUTLER, L.G., 1978. Protein precipitation method for quantitative determinetion of tannin. J.Agriculture Food Chem., 26, 809-812

HASLAM E. ve R.J.N.Tanner. 1970, Spectrophotometric assay of Tannase .Phytochemistry, Vol.9, 2305-2309.

HASLAM, E. and TANNER, R.J.M., 1970. Spectrophotometric assay of tannase. Phytochemistry., 9, 2305-2309.

HASLAM,E., HOWARTH, R.D., MİLLS, S.D., ROGERS, H.J., ARMİTAGE, R., SCARLE,
T., 1961. Gallotannins, Part II . Some esters and depsides of gallic acid, J.Chem.Soc. 1836-1842.

HALKMAN , H. ve M. AKÇELİK .2000. Gıdalarda Mikrobiyolojik Analizi 1. Temel İlkeler. " Alınmıştır. Gıda Mikrobiolojisi ve Uygulamaları" Sim Matbaacılık Ltd. Ştd., Ankara s.221-223.

ISHİMARU, K., NONAKA, G-I., NİSHİOKA, I., 1987. Tannins and related compounds. Chem. Pharm. Bull. 36, 3319-3327.

IACAZİO GİLLES, PERİSSOL CLAUDE, FAUNE BRUNO. 2000. A new tannase substrate for spectrophotometric assay. Journal of Microbiological Methods . 42, 209-214.

J. van de LAGEMAAT, D.L.PYLE. 2001. Solid state fermentation and bioremediation development of a continous process for the production of fungal tannase. Chemical Engineering Journal . 84, 115-123.

KESHAB C. MONDAL, RİNTU BANARJEE & BİHAS R. PATİ . 2000. Biotechnology Letters 0: 767-769.

KUMAR, R., VAİTHHİYANATHAN, S., 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. Anim.Feed Sci. Technol. 30, 21-38.

LAMİA AYED & MONTAR HAMDİ. 2002. Culture condition of Tannase production by Lactobacillus Plantarum . Biotechnology Letters 24: 1763-1765.

LEKHA, P.K., LONSANE, B.K. Adv.Appl.Microbiology. 1997, 44:215

LEKHA, P.K.; LOMANE, B.K. 1997. Production and application of Tannin acyl hydrolase. Adv. App. Microbiol.; 44: 215-260.

LİEWEN, M.B. ve E.H. MARTH. 1985. Growth of Sorbate –Resistant and – Sensitive Strains of Penicillium roquefortii in the Presence of Sorbate . Journal of Food Protection 48 (6) :525-529.

MİSRO S. K.; KUMAR M.R., BANERJEE R, BHATTACHARYYA B.C., 1997. Production of Gallic acid by immobilization of *Rhizopus oryzae* .Bioprocess Engineering 16, 257-260.

MONDAL K.C. and PATİ B.R. 2000. Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6 . Journal Basic Microbiol, 40:4, 223-232.

MUELLER- HARVEY, I., REED, J.D., HARTLEY, R.D., 1987. Characterisation of phenolic compounds, including flavonoids and tannins, of 10 Ethiopian browse species by high performance liquid chromatography. J.Sci. Food Agric. 39, 1-14.

PAMİR H. 1985. Fermantasyon Mikrobiyolojisi. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları No:936.

PHARMACOGNOSY-PHYTOCHEMİSTRY MEDİCİNAL PLANTS. 1999. Jean Bruneton.

PHARMAZCUTİSCHE BİOLOGİE 4. Drogenanalyse II. p: 366. Germany.

POURRAT, H., REGERAT, F., POURRAT, A. and DANİEL, J., 1985, Production of Gallic Acid from Tara by a Strain of Aspergillus niger, J.Ferment. Technol., 63:4, 401- 403.

RİTA BHARDWAY, BİRBAL SİNGH ve JEY K. BHAT. 2003. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* MTCC 2425. J.Basic Microbiol. 43, 449-461.

SHARMA SHWETA ve MNİSHWAR N. GUPTA . 2003. Synthesis of Antioxidant Propyl Gallate Using Tannase from *Aspergillus niger* van Teighem in Nonaqueous Media Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters 13, 395-397.

SEGEL, I.H., 1976. Biochemical Calculation, John Willey and Sons, New York, pp.208-246.

SHARMA SHWETA, BHAT T.K., and DAMRA R.K. 1999. İsolation, purification and
properties of tannase from *Aspergillus niger* van Teighem . World Journal of Microbiology & Biotechology . 15, 673-677.

SHARMA SHWETA, T.K. BHAT, and R.K. DAWRA . 2000. A Spectrophotometric Method for Assay of Tannase Using Rhodanine . Analytical Biochemistry. 279, 85-89.

ŞAHİN, İ., ve A. DANDİN. 1999. Propiyonik Asit ve Ca-Propiyonatın Gıda Kaynaklı Küfler Üzerinde Etkileri. Dünya Gıda 36-39.

TANKER, M.ve TANKER, N., 1985, Farmakognozi, Cilt:I, Ankara Üniv. Ekzacılık Fak. Yayınları, Ankara, 273-283.

TSAI, W.Y., K.P.P. SHAO, L.B. BULLERMAN. 1984. Effect of Sorbate and Propionate on Growth and Aflatoxin Production of Sublethally İnjured *Aspergillus parasicus.* Journal of Food Science 49:86-90.

YAMADA D. and TANNAKA, T., 1972. Wine making using tannase in the fermentation process. Jappan App. 7133, 151. Patent . Ger. Offen 2.224.100 (cl. 128) Nov. 1972 .

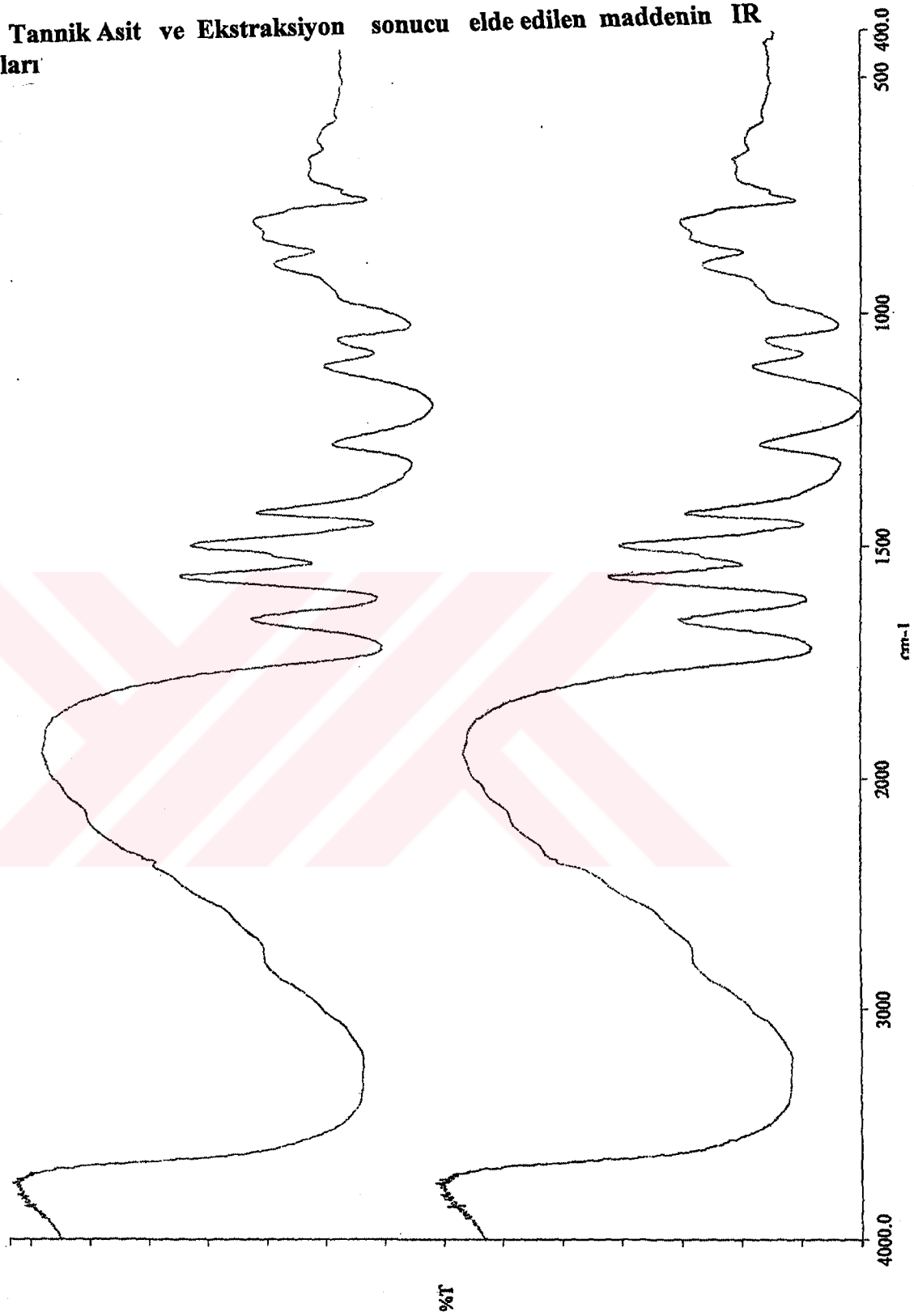
YOSHİDA, T., OKUDA, T., MEMON, M.U., SHİNGU, T., 1985. Tannins of rosaceous medicinal plants 2. Gemin-A, Germin-B, and Gemin-C, new dimeric ellagitannins from Geum Japonicum. J.Chem. Perkin Trans.I. 315-321.

WİLSON, T.C., HAGERMAN, A.E., 1990. Quantitative determination of ellagic acid. J. Agric. Food. Chem. 38,1678-1683.

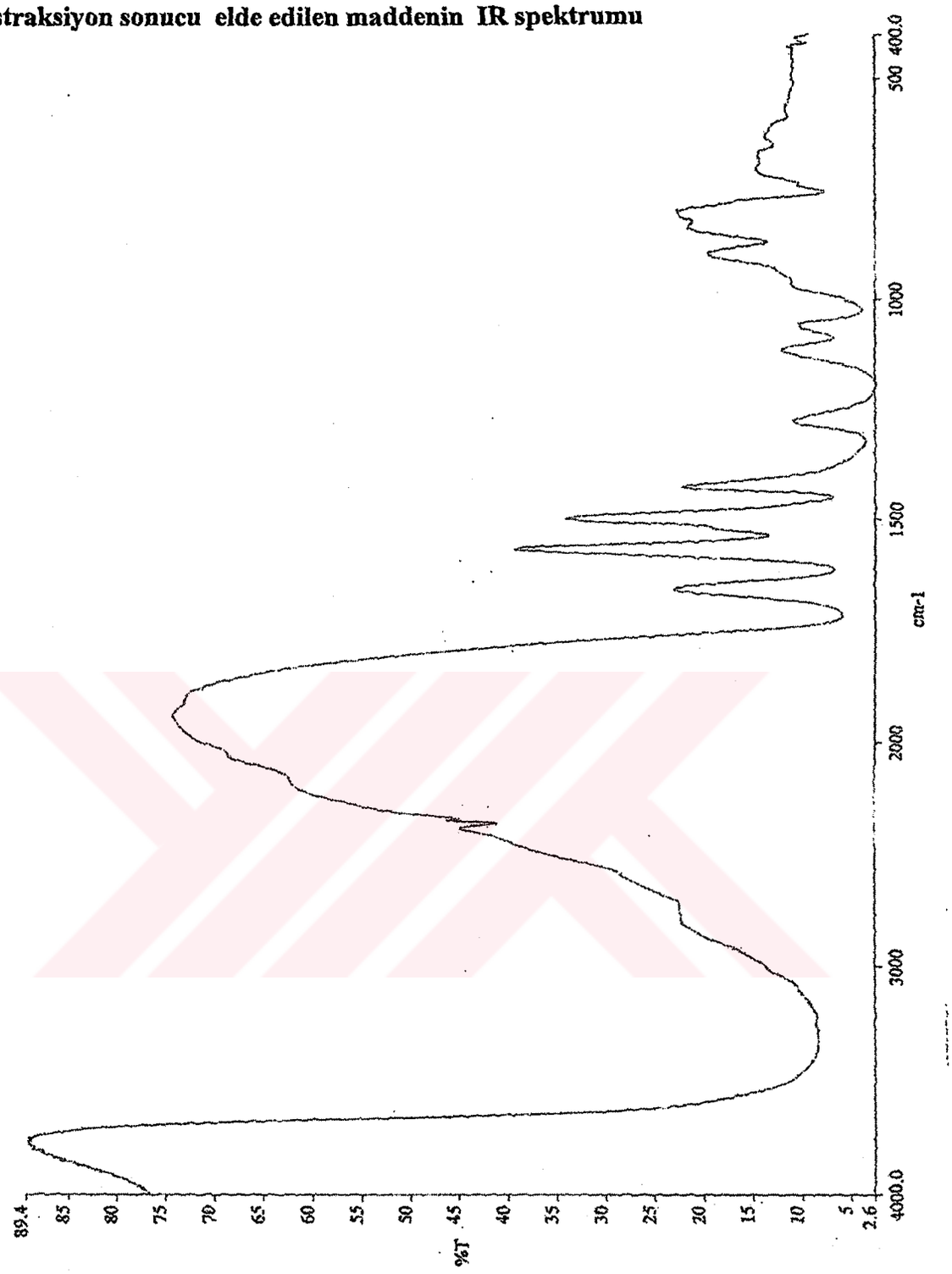
WİLLİS, R.B., ALLEN , P.R., 1998. İmproved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. Analyst 123, 435-439.

EKLER

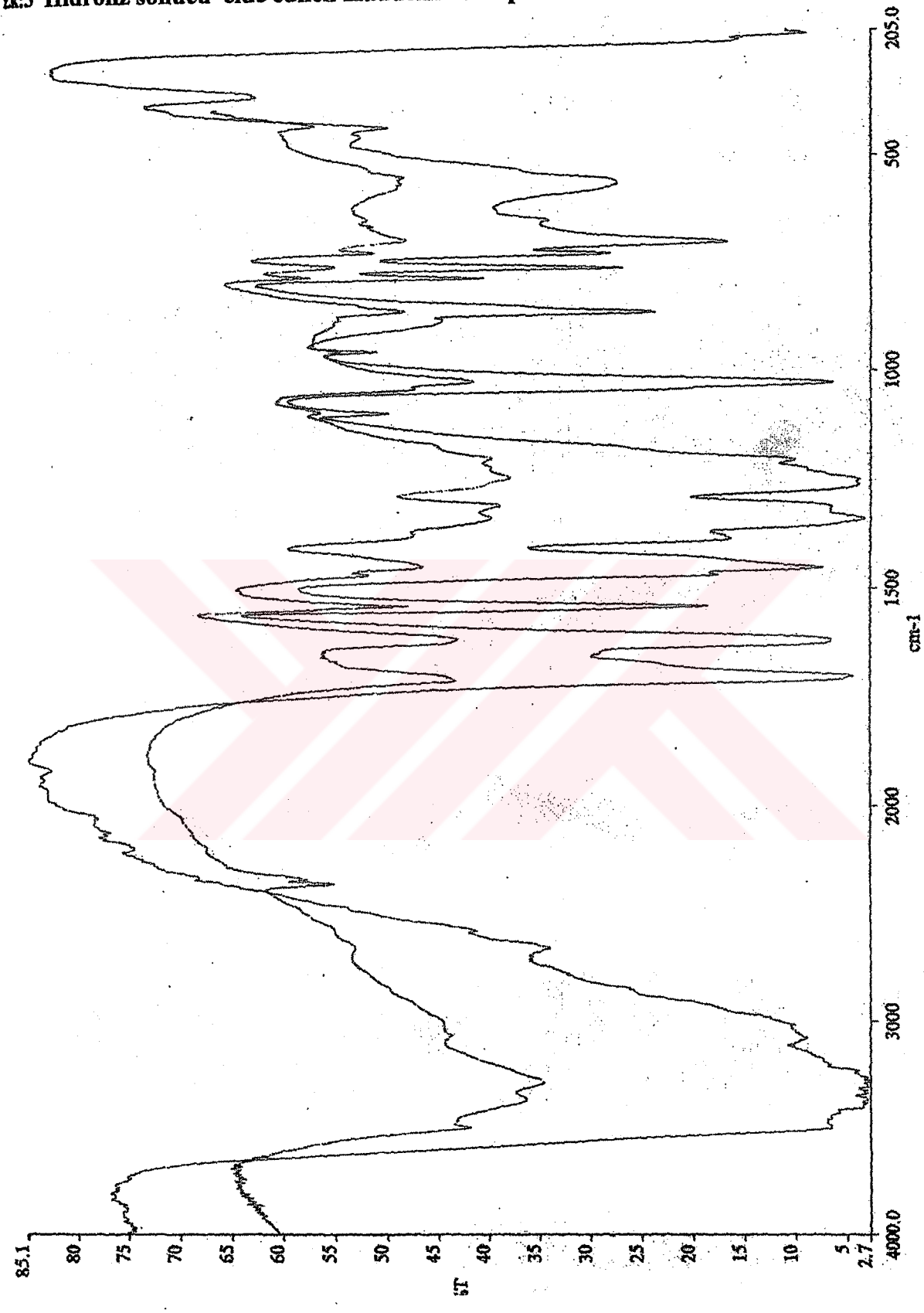
Ek:1 Saf Tannik Asit ve Ekstraksiyon sonucu elde edilen maddenin IR spektrumları



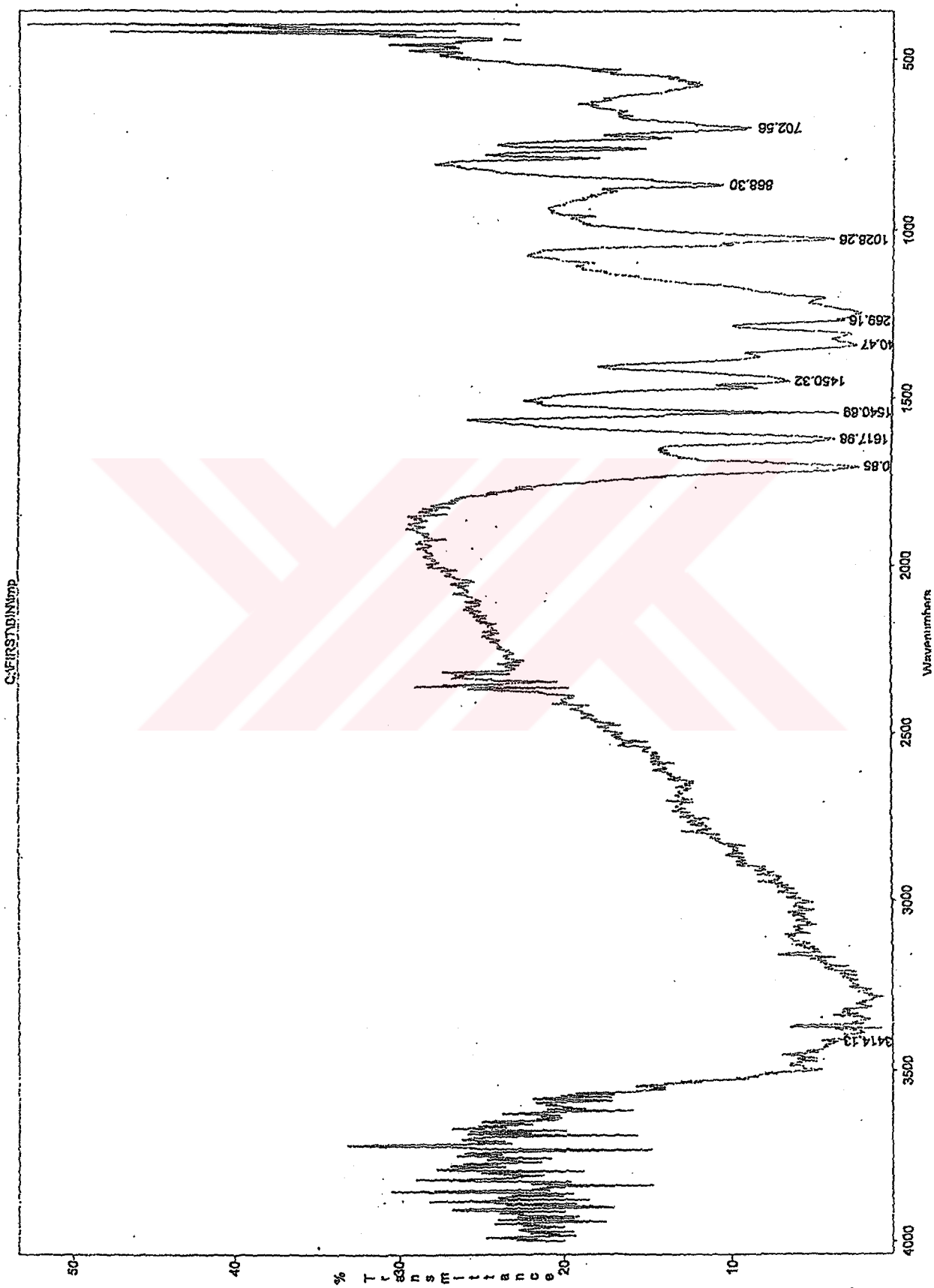
Ek:2 Ekstraksiyon sonucu elde edilen maddenin IR spektrumu



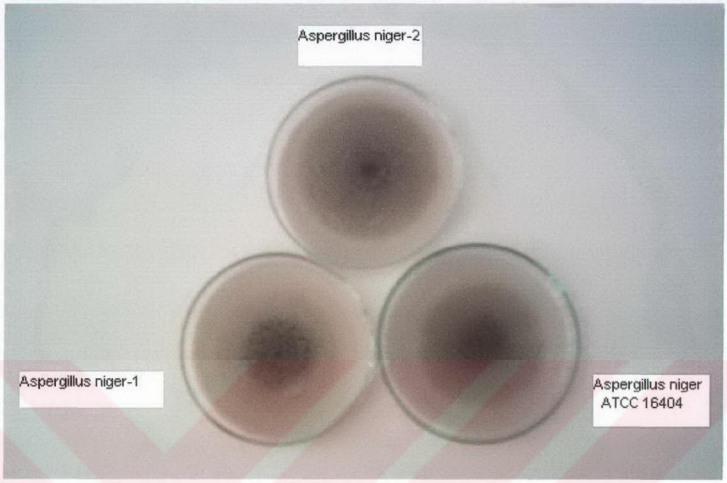
Ek:3 Hidroliz sonucu elde edilen maddenin IR spektrumu.

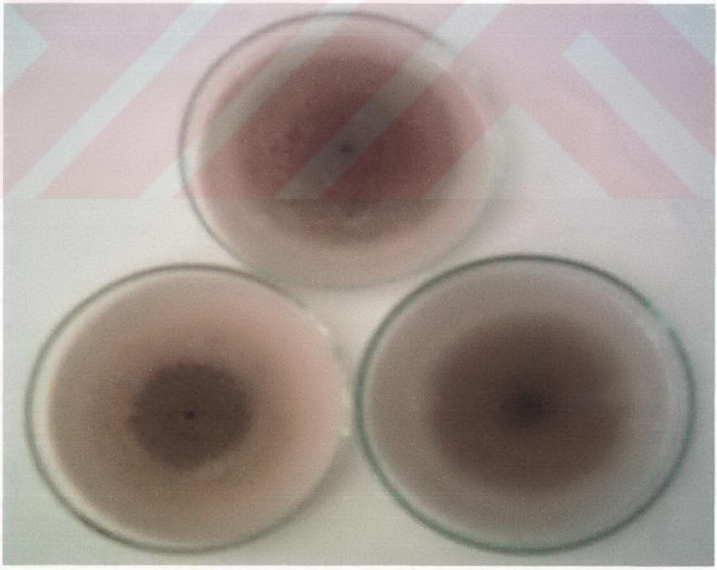


Ek:4 Saf Gallik Asidin IR spektrumu



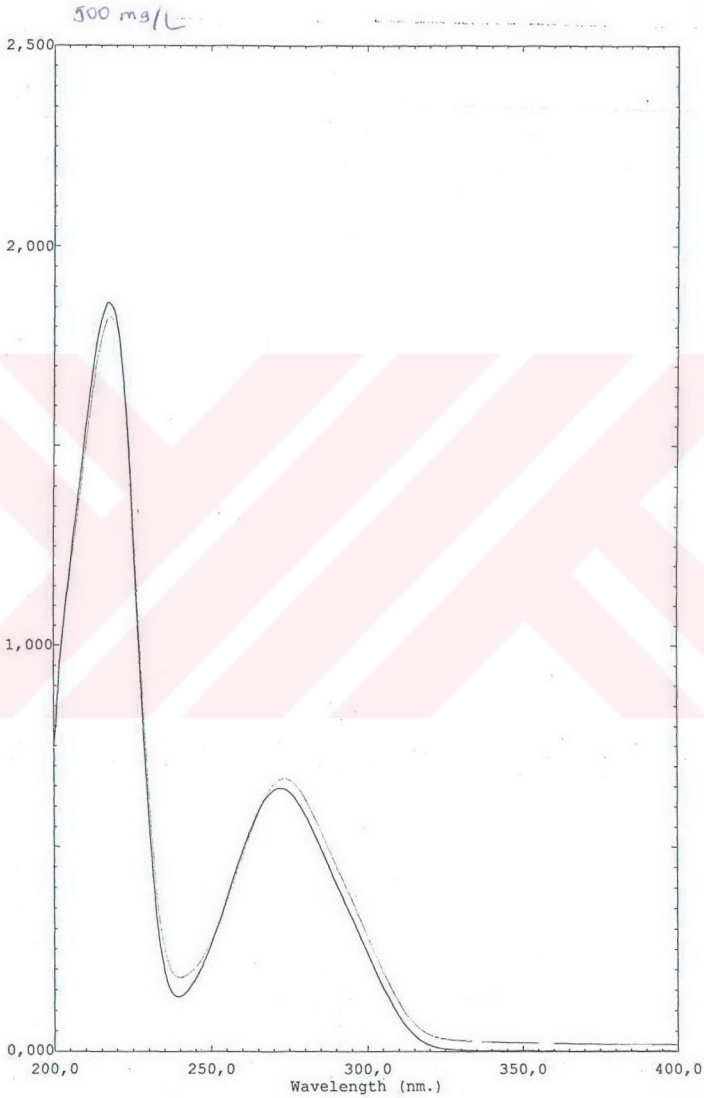
Ek-5 Mikroorganizmaların pH 5.5'ta gelişme durumu





Mikroorganizmaların yakından görünüşü

Ek:6 Saf Gallik Asit ve Fermentasyon sonucu elde edilen Gallik Asidin UV Spektrumları



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez danışman Sayın Hocam Prof.Dr.Mehmet ÇETİN'e yardımlarından ve değerli bilgilerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Sayın Hocam Yrd.Doç.Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU'na teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Bulgaristan (Rusçuk)' ta doğdu. İlk, orta öğrenimini Bulgaristan'da, lise öğrenimini Bursa' da tamamladı. Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakultesi Kimya Bölümü'nden 1999 yılında mezun oldu. 2000 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans yapmaya başladı. 2001 yılında, aynı üniversitede araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Halen Uludağ Üniversitesinde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.