



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Anoxybacillus ayderensis* KSİLANAZININ
KLONLANMASI, ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

(Doktora Tezi)

Züleyha AKPINAR

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU**

**RİZE
2024**

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalında, Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU danışmanlığında, Züleyha AKPINAR tarafından hazırlanan *Termofilik Anoxybacillus Ayderensis Ksilanazının Klonlanması, Üretimi, Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu* adlı bu tez çalışması, 30/04/2024 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle/~~oy çokluğuyla~~ başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Ünvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU	
Üye	: Prof. Dr. Fatih Şaban BERİŞ	
Üye	: Prof. Dr. Şevki KAYIŞ	
Üye	: Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ	
Üye	: Doç. Dr. Derya EFE	

ETİK BEYAN

Su Ürünleri Doktora Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Termofilik *Anoxybacillus ayderensis* Ksilanazının Klonlanması, Üretimi, Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

30/04/2024

Züleyha AKPINAR

ÖN SÖZ

'*Anoxybacillus ayderensis* ksilanazının klonlanması, üretilmesi, saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu' adlı tez çalışması Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Su Ürünleri Anabilimdalı'nda Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır. Araştırma ve çalışmalar Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Moleküler Genetik Laboratuvarı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Doktora tez çalışmamın her aşamasında, birikimleri ve deneyimleriyle bu çalışmayı gerçekleştirmemde büyük katkısı bulunan, bilimsel desteğinin yanı sıra hiçbir zaman için benden manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezin tüm sürecinde değerli katkılarda bulunan Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Fatih Şaban BERİŞ, Prof. Dr. Şevki KAYIŞ ayrıca Doç.Dr. Derya EFE ve Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım, Öğr. Gör Dr. İsmail AKSU, Müride KALEMCİ, Muhammet EMANET ve Arş. Gör. Dr. Mert MİNAZ'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim boyunca maddi ve manevi destek sunan ETKA Biyoteknoloji Genel Müdürü Erkan AYDIN, Dr. Zafer SEÇGİN ve Büşra ABANOZ SEÇGİN'e teşekkürlerimi sunarım. Son olarak, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen hayatım boyunca minnettar kalacağım aileme yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Züleyha AKPINAR

2024 / RİZE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN.....	II
ÖN SÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	VIII
KISALTMALAR.....	IX
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Mikrobiyal Enzimler	3
1.2. Ekstremofiller ve Ekstremofilik Enzimler (Ekstremozimler).....	3
1.3. Termofiller	4
1.4. Hemiselüloz ve Ksilan	5
1.5. Ksilan Kimyasal yapısı	6
1.6. Ksilanların Sınıflandırılması	7
1.7. Ksilanın Üç Boyutlu Yapısı	7
1.8. Ksilanaz Üreten Organizmalar	8
1.9. Ksilanaz Üretimi	10
1.10. Ksilanaz Verimini Etkileyen Faktörler	11
1.11. Ksilanaz Sentezinin Düzenlenmesi	12
1.12. İndüksiyon.....	12
1.13. Moleküler Düzeyde Ksilanazın İndüklenmesi	14
1.14. Ksilanazın Biyokimyasal Özellikleri	14
1.14.1. Moleküler Ağırlık.....	14
1.14.2. Sıcaklık.....	15
1.14.3. pH.....	15
1.14.4. Substrat Spesifikliğı	16
1.14.5. Metal İyonları ve İnhibitörleri.....	17

1.14.6. K_m ve V_{max}	18
1.15. Termofilik Ksilanazlar	19
1.16. Ksilanaz Gen Kaynakları	21
1.17. Ksilanaz Genlerinin Klonlanması ve Ekspresyonu.....	21
1.17.1. Ksilanaz Genlerinin Ekspresyonu	21
1.17.2. Heterolog Klonlama	22
1.17.3. <i>Escherichia coli</i> 'de Ekspresyon	23
1.18. Ksilanazda pH ve Sıcaklığın Etkisi.....	24
1.19. Ksilanazların Sınıflandırılması.....	25
1.20. Aile 39 β -ksilozidaz Yapısı.....	27
1.21. Ksilanazların Aile 10 Ve Aile 11 Adıyla Sınıflandırılması	27
1.22. Aile 10 Endoksilanaz Yapısı	27
1.23. Aile 11 Endoksilanaz Yapısı	28
1.24. Ksilanazların Bazı Uygulama Alanları	28
1.25. Termofilik Ksilanaz Uygulaması	29
1.26. Protein Mühendisliği	30
1.27. Enzim Üretiminde Rekombinant DNA Teknolojisi.....	31
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	32
2.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler.....	32
2.2. Ksilanazın Nitel Olarak Belirlenmesi	32
2.3. Genom Çapında Analiz Yapılarak <i>A. ayderensis</i> 'te Olası Ksilanaz Genlerinin Belirlenmesi	33
2.4. <i>A. ayderensis xyn</i> Gen Dizisinin Belirlenmesi ve Enzimin Modellenmesi.....	34
2.5. Enzimin Fiziksel Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	36
2.6. <i>A. ayderensis xyn</i> Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	36
2.7. Enzim Üretimi.....	37
2.8. pETAAyXYN Enziminin Rekombinant Üretimi.....	37
2.9. Isı Dejenerasyonu Uygulaması	38
2.10. İyon Değişim Kolon Kromatografisi	38
2.11. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi	39
2.12. Biyokimyasal Çalışmalar	40
2.12.1. Protein Miktarının Belirlenmesi	40

2.12.2. Ksilanaz Aktivite Deneyi	40
2.12.3. pETAAYXYN'nin Optimum Sıcaklığı.....	42
2.12.4. pETAAYXYN'nin Optimum pH'sı	42
2.12.5. pETAAYXYN'nin Kinetik Parametreleri	42
2.12.6. pETAAYXYN'nin Isıl Kararlılığı	43
2.12.7. Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	43
2.12.8. Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Organik Maddelerin Etkisi.....	43
2.12.9. SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)	44
3. BULGULAR.....	46
3.1. <i>A. ayderensis</i> 'in Ksilanolitik Aktivitesi.....	46
3.2.İntrasellüler <i>A. ayderensis</i> ksilanazın (<i>xyn329</i>) Biyoinformatik Tanımlanması	46
3.3. Rekombinant Olarak Üretilen Yaban Tip AAYXYN329 Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu.....	49
3.3.1. Kaba Ekstrakt	49
3.3.2. Isı Şoku Uygulaması	50
3.3.3. İyon Değişim Kromatografisi Uygulaması (İDKK).....	50
3.3.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması	52
3.3.5. AAYXYN329'nin Saflaştırma Tablosu	53
3.3.6. AAYXYN329'nin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi	54
3.3.7. Optimum Sıcaklık.....	55
3.3.8. Optimum pH (AAYXYN329).....	56
3.3.9. Kinetik Çalışmalar.....	57
3.3.10. Metal İyonlarının Etkisi.....	57
3.3.11. Organik Maddelerin Etkisi	58
3.3.12. Isıl Kararlılık	59
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	60
5. GENEL DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER	67
KAYNAKÇA.....	68

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anabilim Dalı : Su Ürünleri

Tez Türü : Doktora

Danışman : Dr. Öğr. ÜYESİ Hakan KARAOĞLU

Hazırlayan : Züleyha AKPINAR

Yıl : 2024

Sayfa Sayısı : 95

ÖZET

TERMOFİLİK *Anoxybacillus ayderensis* KSİLANAZININ KLONLANMASI, ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Birçok endüstriyel uygulamada kullanılan ksilanaz enzimi, en önemli enzim gruplarından biridir. Ksilanazlar, lignoselülozda bulunan ana hemiselüloz olan ksilanı hidrolize eden ana enzimlerdir. Ksilanazlar ayrıca çok çeşitli endüstriyel uygulamalara sahiptir. Bu nedenle, yeni ksilanazların keşfi, birçok endüstride verimliliği ve sürdürülebilirliği artırma potansiyeline sahiptir. Günümüzde, kâğıt hamuru, kâğıt endüstrisi, buğday unu ve kümes hayvanlarının yemlerinde ksilanaz kullanımı giderek artmaktadır ve bu enzime talep büyümektedir. Bu çalışma *Anoxybacillus ayderensis* ksilanaz geninin klonlanması, gen ürününün izolasyonu ve karakterizasyonunu içermektedir. Aynı zamanda ksilanazı kodlayan *xyn* geninin 329 (anlamli protein üreten gen büyüklüğü) bp'lık kısmı klonlandı ve baz dizilimi belirlendi. Bu tez çalışmasında, endüstriyel kullanıma uygun termofilik karaktere ve üstün biyokimyasal özelliklere sahip bir ksilanaz açığa çıkarılmıştır. Bu yeni ksilanaz geni, *Anoxybacillus ayderensis*'te hücre içi olarak (AAyXYN329) bulundu ve rekombinant olarak üretilmiştir. AAYXYN329 geniş pH ve sıcaklık aralığında önemli aktivite gösterirken, optimum aktivite koşulları olarak pH 6,5 ve sıcaklık 65°C olarak belirlenmiştir. Enzimin yarılanma ömrü 65°C'de 72 saat olarak hesaplanmıştır. Enzimin 75 gün boyunca +4°C'de pH 6,0-9,0 arasında aktivitesini kaybetmediği tespit edildi. AAYXYN329'un k_m , k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla $4,09824 \pm 0,2245 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 96,75 1/sn ve 23,61/ L/g.s -1 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, *A. ayderensis*'in ksilanazı birçok endüstriyel süreçte kullanılabilecek yüksek potansiyele sahip olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus ayderensis*, termofilik, ksilan, hücre içi, ksilanaz

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Department : Aquaculture

Thesis Type : Doctoral Thesis

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Hakan KARAOĞLU

Author : Züleyha AKPINAR

Year : 2024

Pages : 95

ABSTRACT

II

CLONING, PRODUCTION, PURIFICATION, AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THERMOPHILIC XYLANASE FROM *Anoxybacillus ayderensis*

Xylanase enzyme, which is used in many industrial applications, is one of the most important enzyme groups. Xylanases are the main enzymes to hydrolyze xylan, the major hemicellulose found in lignocellulose. Xylanases also have a wide range of industrial applications. Therefore, the discovery of new xylanases has the potential to enhance efficiency and sustainability in many industries. Nowadays, the use of xylanase in pulp, paper industry, wheat flour and poultry feed is gradually increasing, and the demand for this enzyme is growing. This study includes cloning of the *Anoxybacillus ayderensis* xylanase gene, isolation and characterization of the gene product. At the same time, 329 bp of the xyn gene encoding xylanase was cloned and its base sequence was determined. Here, we report a xylanase with thermophilic character and superior biochemical properties for industrial use. The new xylanase is discovered in *Anoxybacillus ayderensis* as an intracellular xylanase (AAyXYN329) and recombinantly produced. While AAyXYN329 shows significant activity over a wide pH and temperature range, optimal activity conditions were determined as pH 6.5 and 65 °C. The half-life of the enzyme was calculated as 72 h at 65 °C. The enzyme did not lose activity between pH 6.0-9.0 at +4 °C for 75 days. K_m , k_{cat} and k_{cat} / K_m values of AAyXYN329 were calculated as $4.09824 \pm 0.2245 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 96.75 1/sec, and 23.61/ L/g.s⁻¹, respectively. In conclusion, the xylanase of *A. ayderensis* has an excellent potential to be utilized in many industrial processes.

Keywords: *Anoxybacillus ayderensis*, thermophilic, xylan, intracellular, xylanase

KISALTMALAR

μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
aa	: Amino asit
AAyXYN329	: <i>Anoxybacillus ayderensis</i> ksilanazı
bp	: Baz çifti
BSA	: Bovin serum albümin (sığır proteini)
DEAE	: Dietil amino etil
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik
HEKK	: Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi
İDKK	: İyon değişim kolon kromatografisi
k_{cat}	: Enzimin substrat dönüşüm katsayısı
kDa	: Kilodalton
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MW	: Moleküler ağırlık
OD	: Optic density (optik yoğunluk)
PAGE	: Poly acrilamide gel electrophoresis (poliakrilamid jel elektroforezi)
pETAAYXYN	: <i>Anoxybacillus ayderensis</i> ksilanazının pET-28a(+) içerisine klonlandığı recombinant gen
SDS	: Sodium dodecyl sulphate (sodyum dedosil sülfat)
V_{max}	: Velocity maximum (enzimin maksimum hızı)
<i>xyn</i>	: Ksilanaz geni

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Ksilanaz üreten bazı termofilik mikroorganizmalar	20
Tablo 2. Ksilanaz geninin klonlandığı bazı mikroorganizmalar	23
Tablo 3. SDS-PAGE jeli bileşenleri.....	44
Tablo 4. AAYXYN329'un saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu	54



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Ksilanın molekül yapısı.....	8
Şekil 2. Ksilan molekülünü hidrolize eden enzimler.....	8
Şekil 3. Ksilanın hidrolizi	9
Şekil 4. <i>Anoxybacillus ayderensis</i> 'in katı besiyerinde ksilanaz aktivitesi.....	46
Şekil 5. <i>A. ayderensis</i> 'in (WP_042534831) filogenetik ağacı.....	47
Şekil 6. Çoklu sekans dizilemesi	48
Şekil 7. AAyXYN329'un üç boyutlu yapısı	49
Şekil 8. AAyXYN329'un kaba ekstraktında protein ve ksilanaz aktivitesi tayini	50
Şekil 9. AAyXYN329'da ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve ksilanaz aktivitesi tayini.....	50
Şekil 10. AAyXYN329'a ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği	51
Şekil 11. AAyXYN329'a ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve ksilanaz aktivitesi tayini.....	52
Şekil 12. AAyXYN329'a ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği.....	53
Şekil 13. AAyXYN329'a ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve ksilanaz aktivitesi tayini	53
Şekil 14. AAyXYN329aa'nın saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi.....	55
Şekil 15. AAyXYN329 'un optimum sıcaklık grafiği.....	56
Şekil 16. AAyXYN329'un optimum pH grafiği	56
Şekil 17. AAyXYN329'a ait Michaelis-Menten eğrisi	57
Şekil 18. AAyXYN329 enzimine ait metal iyonları (aktivatör ve inhibitör) etki grafiği	58
Şekil 19. AAyXYN329 enzimine ait organik madde grafiği	59

GİRİŞ

Enzimler çoğunlukla protein yapısında olan ve hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden biyomoleküllerdir. Enzimler hücre içinde enzim sentezleme yeteneğine sahip mikroorganizmalar tarafından oluşturulur. Sentezlenen enzimler hücre içinde yapım ve yıkım olaylarına katılırlar (Gangadhar, 2013). Enzimler hücre içinde pek çok tepkimede görev aldığı gibi in vitro reaksiyonlarda da tıpkı hücrede olduğu gibi işlev görme kabiliyetine sahiptir (Ekinci vd., 2016).

Çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere, hücrelerde önemli metabolik görevleri olan enzimler, günlük ve ekonomik olarak hayata girmiştir (Wiseman, 1987). Enzimler metabolizmanın katalitik temel taşı olup, sadece biyolojik toplulukta değil, aynı zamanda tasarımcılar/mühendisler, kimya mühendisleri ve diğer bilimsel alanlarda yapılan araştırmalar nedeniyle dünya çapında yoğun araştırmaların odak noktası olmuştur. Antik çağdan beri enzimler birçok üretimde (örneğin şarap üretimi, peynir, ekmek, nişasta modifikasyonu vb. gibi) süreçlerde merkezi bir rol oynamıştır. Yirminci yüzyılın son yarısında, mikroorganizmaların kullanımına ilişkin temel anlamda metabolik ürünler ve enzimlerle ilgili yapılan araştırmalar bize potansiyel endüstriyel uygulamaların eşi benzeri görülmemiş bir genişlemede ilerlediğini göstermiştir. Enzimler büyüyen ve gelişen dünya pazarı sektöründe oldukça büyük ve yaygın kullanım alanına sahiptir (Turker, 2004). Sanayide enzim kullanımının %29'unun deterjan ürünlerinde, %11'nin kâğıt endüstrisinde, %17'sinin deri, tekstil ürünlerinde, %34'ünün tarım ve gıda da ise bir paya sahip olduğu bilinmektedir (Outtrup & Jorgensen, 2002). Enzim üretiminde mikroorganizmalar diğer organizmalara kıyasla; daha hızlı çoğalabildiği, üretiminin daha kolay olduğu ve sıradışı şartlarda daha rahat bir şekilde üreyebildiği için mikrobiyal kaynaklı enzimler bilim insanları tarafından daha çok tercih edilmektedir (Aehle, 2007).

Hidrolazlar, enzim piyasalarının yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır. Endüstriyel enzimler sınıfında proteazlardan sonra en büyük ikinci grubu glikosidazların içinde bulunduğu selülozlar, amilazlar ve hemiselülozlar oluşturmaktadır. Hemiselülozların içinde, toplam ticari enzim satışlarının büyük oranını ksilanazlar oluşturur. Bu enzimlerin kullanım potansiyellerinin yüksek olması nedeniyle satış rakamlarının da giderek artması beklenmektedir. Ksilanazlar sanayinin gıda (meyve ve sebze işleme,

bira, şarap üretimi), yem (hayvan yemi) ve teknik alanda (kâğıt ve kâğıt hamuru) üç sektörünü de kapsayan geniş bir yelpazede yüksek potansiyele sahiptir (Ozdemir & Kayı, 2019).

Son zamanlarda endüstriyel enzimlerin kullanımındaki en önemli konu, enzim preparatların maliyetinin düşük olması gerektiğidir. Ksilanaz, selüloz, amilaz, pektinaz, lipaz ve proteaz gibi enzimlerde yapılan çalışmalar genellikle bu enzimlerin ucuz maliyete üretilmesi ve kompozisyonun sürekli ve sürdürülebilir olmasıdır.

Teknik olarak sanayide kullanılan tipik enzimler, tekstil sanayisinde, kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrilerinde, deterjan sanayinde yoğun olarak kullanıldığı gibi aynı zamanda biyoyakıt ve organik madde sentezinde de kullanılabilirler. Bunlardan ticari olarak temin edilebilen enzimlere örnek olarak lipazlar, amilazlar, selülozlar, ksilanazlar ve katalazlar verilebilir. Çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılan ksilanaz enzimi bu enzim grupları arasından en önemlilerinden biridir (Li vd., 2018). Viikari ve arkadaşlarının (1986) keşfi ile önemli ölçüde endüstride ksilanazların endüstride kullanımı artmıştır. O zamandan beri araştırmacılar dikkatlerini selüloz ve kâğıt endüstrilerinde kullanılan daha yeni mikrobiyal izolatlara, ksilanazlara doğru çevirdiler. Ksilanazların esas olarak bakteri, (Gilbert & Hazlewood, 1993; Sunna & Antranikian, 1997) mantar, (Sunna & Antranikian, 1997) filamentli mantarlardan (Ball & McCarthy, 1989; Beg vd., 2000) ve mayalardan (Hrmova vd., 1984; Liu vd., 1998, 1999) izole edildikleri rapor edilmiştir.

Yıllar içinde kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisindeki ksilanazların ticari kullanımı istikrarlı bir şekilde artmıştır. Günümüzde, kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde (Bedford & Classen, 1992) kullanımının yanı sıra, ksilanazlar ayrıca buğday ununda ve kümes hayvanlarının yem katkı maddeleri olarak da kullanılmaktadır (Maat vd., 1992). Aynı zamanda ksilanazlara, bitkisel yağların çıkarılması için hamur işleme ve fırınlanmış ürünlerin kalitesi ve nişasta iyileştirilmesinde (Wong & Saddler, 1992), tarımsal silaj ve tahıl yeminin besin özelliklerinin artırılmasında (Kuhad & Singh, 1993), pektinaz ile kombinasyon halinde meyve sularının berraklaştırılmasında (Biely, 1985) ve keten, kenevir, jüt ve rami (Kapoor vd., 2001; Puchart vd., 1999; Sharma, 1987) gibi bitkisel lif kaynaklarının zamkının giderilmesi için selülozun hidrolizine ihtiyaç duyulmuştur.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Mikrobiyal Enzimler

Endüstriyel alanda kullanılan çoğu enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, kararlı ve ucuz olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, fazla miktarda elde edilmeleri gibi avantajları sayesinde bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere göre daha fazla tercih edildiğini göstermektedir (Wiseman, 1987). Bu mikroorganizmalar patojen veya toksik olmamalarının yanı sıra enzim üretme potansiyeline göre seçildikleri bilinmektedir. Son yıllarda mikroorganizma kaynaklı enzimler yaygın kullanıldığı için bu alanlarda mikroorganizma kullanımına ihtiyaç duyulmuştur (Demain & Solomon, 1981).

Enzimler katalizledikleri reaksiyonun çeşidine göre 6 ana gruba ayrılmışlardır. Ticari öneme sahip olan enzimlerin çoğu, hidrolazlar şeklinde tanımlanmakta olup, çoğunlukla mikrobiyal kökenlidir. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi; çeşitli ürünlerin kullanım alanlarının, çeşitliliğinin ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle birçok enzime farklı alanlarda ihtiyaç duyulması; gibi nedenlerden ötürü endüstriyel enzimlerle ilgili olarak yapılan çalışmalar gittikçe önemli hale gelmektedir. Son zamanlarda rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak rekombinant enzimlerin üretimi giderek yaygınlaşıp yüksek boyutlara ulaşmıştır (Gessese, 1998).

1.2. Ekstremofiller ve Ekstremofilik Enzimler (Ekstremozimler)

Çoğunlukla tek hücreli olup sıradışı koşullarda yaşama gereksinim duyan ve bu koşullarda rahatça gelişen organizmalara ekstremofiller denir. Ekstremofilik mikroorganizmalar; kutupların düşük sıcaklıklarında, volkanların yüksek sıcaklıklarında, çok düşük (pH 0-3) ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamaya uyum göstermiş canlılardır (Niehaus vd., 1999; Gul-Guven, 2007; Zeikus, 1979). Dolayısıyla, bu ortamda yaşayan organizmalar mezofillerin yaşamlarını devam ettiremeyecekleri koşullarda aktivite gösteren ve ekstremofilik enzimler olarak ismilendirilen enzimleri üretirler (Belkin & Jannasch, 1985).

Ekstremofilik enzimler, endüstriyel uygulamalar için büyük öneme sahip sıcaklık, basınç, pH ve tuzluluk gibi olağanüstü şartlarda çalışan enzimlerdir. Mezofilik enzimler ise endüstriyel enzimlerden istenen zorlu reaksiyon şartlarında enzim kararlılığındaki eksiklerden dolayı ekstremofilik enzimlere nazaran daha az tercih edilirler (Gul-Guven, 2011).

1.3. Termofiller

Çevredeki en önemli değişkenlerden biri sıcaklıktır. Sınıflandırma faktörü belirlenirken, yaşayan organizmaların çevresindeki sıcaklığı uyumuna bağlı olarak yapılır. Bu yüzden sıcaklık biyolojik sistematığın en temel unsurlarından biri sayılır. Mikroorganizmalar genel olarak psikrofil, mezofil ve termofil olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Dekker & Richards, 1976). Termofilik organizmalar kendi içinde ılımlı termofil (45-65 °C) ve hipertermofil (85 °C) olarak iki gruba ayrılırlar (Demirjiian vd., 2001).

Sıradışı şartlarda yaşamak, üremek, gelişmek için organizmalar metabolik ve diğer hücresel fonksiyonlarını bu ortamlara uyumlanmak zorundadır. Termofillerin hücre membranı doymuş yağ asitlerinden oluşur. Bu yağ asitleri hücreye hidrofobik ortam sağlayıp ve yüksek sıcaklıkta yaşaması için hücreyi olduğunca sert ve sıkı tutar. Termofilik organizmaların hücresel elemanları (hücre membranı) ve bileşenleri (nükleik asitler, enzimler, proteinler, vb.) yüksek sıcaklığa dayanıklıdır (65-85 °C). Dolayısıyla bu bileşenler sıradışı alkali koşullara, asidik denatüranlara ve proteolize karşı dayanıklıdır (Kristjansson & Asgeirsson, 2002; Haki vd., 2003)

Termofilik ve hipertermofilik organizmalara ait enzimler genellikle yüksek sıcaklıklarda güçlü aktivite gösterirken 40°C'nin altında etkin bir aktivite göstermezler (Gomes & Steiner, 2004). Termofilik karakterde olup, sıcaklığa dirençli olan enzimlerle mezofilik enzimlerin amino asit içeriği göz önüne alınarak yapılan kıyaslama sonucunda, termofilik kökenli enzimlerde; glisin yerine alaninin, lizin yerine arjinin amino asitininin daha fazla yer aldığı görülmüştür. Sıcaklığa en hassas amino asit olan sistein ise termofilik enzimlerin yapısında daha sınırlı düzeyde bulunmaktadır. Termofilik proteinlerin kararlılığında hidrofobik etkileşimlerle önemli bir rol aldığı gösterilmiştir. Sıcaklığa dirençli proteinler hidrofobik interaksyonlarla

dimer oluşturarak ısı hidrolize karşı daha dirençli hale geçmektedir. Amino asit içeriğindeki farklılığa ek olarak termofilik proteinler, çeşitli disülfid bağları, molekül içi aromatik yapılar, zengin hidrojen bağları içermekte ve elektrostatik mekanizmalarla yüksek sıcaklığı tolere edebilmektedir (Kumar & Nussinov, 2001).

Yüksek ısı kararlılıkları, çeşitli denatürantlara olan dirençleri ve yüksek stabiliteleri nedeniyle birçok endüstriyel uygulamalarda termofilik karakterli enzimler tercih edilmektedir. Termofilik enzimlerin en geniş kullanıldığı alanlar içerisinde deterjan, gıda, yem, nişasta, tekstil, deri, kâğıt hamuru ve farmasötik endüstrisi yer alır (Gomez & Steiner, 2004).

Bugün endüstride kullanılan ksilanazların çoğu mezofilik kökenli olmasına rağmen biyoteknolojik süreçte ekstremofilik kaynaklardan izole edilen enzimler çok büyük fayda sağlamaktadır. Substratın biyoyararlanımı veya çözünürlüğünü arttırmada, viskozite ve kontaminasyon riskini azaltmada ayrıca yüksek sıcaklığın gerekli olduğu durumlarda bir soğutma adımının ekonomik olamayacağı için termofilik enzimlerin kullanılması ekonomik bakımından gereklidir.

1.4. Hemiselüloz ve Ksilan

Doğal olarak bitki biyokütlesini oluşturan lignoselülozik bileşenlerin %20-30'u hemiselülozik maddelerden oluşan heterojen polisakkaritlerdir (Timell, 1967). Bitki biyokütlesi, dünya yakıt pazarındaki talebi karşılayacak kadar kısa bir değişirme döngüsüne sahip kimyasal hammaddeler için alternatif bir doğal kaynaktır. Ksilan, hemiselülozun ana bileşenidir ve yararlı son ürünlere bozunma potansiyeli yüksek olan ikinci en bol yenilenebilir kaynaktır. Bu nedenle, hemiselüloza dayalı ucuz teknolojilerin geliştirilmesi istenmektedir. Ksilanın, selüloz ile birlikte, hammadde için küresel talebin çoğunu yakın gelecekte olmasa da ilerleyen zamanlarda karşılayacağı öngörülmektedir. Bilim insanları kömür ve ham petrolün 50 yıl içinde biyokütle ile rekabet edeceği tahmin edilmektedir (Goheen, 1981).

Dünyadaki en bol yenilenebilir biyokütle olan lignoselülozun temel bileşenlerini lignin, selüloz, hemiselüloz ve küçük miktarlarda pektin ve protein oluşturur. Bitkinin türü, yaşı, büyüme aşaması ve diğer koşulları bu bileşenlerin oranlarına bağlıdır (Kumar vd., 2009)

Hemiselüloz içeriği tam olarak tanımlanmamıştır (Polizeli vd.,2005) ama bitki hücre duvarında bir polimer sınıfı olan ve çok miktarda bulunan ksilan, pentoz ve heksoz şekerlerinden oluşan bileşiktir (Uday vd., 2016). Hemiselüloz olarak adlandırılan sınıfın ana bileşeni şekerlerdir. Hemiselüloz hidroliz olduğunda ksilan üretir (Polizeli vd., 2005).

Schulze, 1891’de ilk olarak, bitki materyallerinden izole edilen veya seyreltik alkali ile ekstrakte edilen bölüngüler için hemiselüloz terimini ortaya atmıştır. Hemiselülozlar başlıca ksilan, mannan, galaktan ve arabinan gibi heteropolimerlerden oluşur. Bu hemiselüloz fraksiyonlarının sınıflandırılması mevcut şeker parçalarının türlerine bağlıdır.

Sert odunsuların hemiselülozu daha çok ksilan içerirken, yumuşak odunsuların hemiselülozu daha çok glukomannon içermektedir. Sert odunların % 20-25’i, otsuların % 15-20’si ve yumuşak odunların önemli bir kısmını glikomannan ve ksilanlar oluşturmaktadır. Tahıl saplarının kuru ağırlığının % 20-30’u ksilandan oluşur (Aspinal vd., 1970). Ksilan çeşitlerinin tümü D-ksilopiranoz omurgasına β (1 $\rightarrow$ 4) ile bağlıdır, fakat biyokütle kaynağına bağlı olarak farklı kompozisyonlar içerirler (Ebringerova vd., 2005).

1.5. Ksilan Kimyasal yapısı

Ksilanlar, α -arabinofuranoz ve/veya α -glukuronik asitlerin yan dallarına sahip β -1,4-glikosidik bağı ile bağlı D-ksiloz (bir pentoz şekeri) monomerlerinden oluşan bir çeşit polisakkaritlerdir. Buna ek olarak bir ksilan molekülünün yapısında, selüloz grubu olmayan D-mannoz, D-glukoz, L-arabinoz, D-galaktoz, ve D-galakturonik asit gibi monosakkaritler de bulunmaktadır (Polizeli vd., 2005; Shallom & Shoham, 2003; Bastawde, 1992). Kaynaklarına ve ekstraksiyonlarına bağlı olarak ksilan, farklı polisakkarit ve kompozisyonlarından meydana gelir (Harmsen vd., 2010). Ksilanın kimyasal yapısına bakıldığında, yan gruplarda iç içe geçmiş kovalent bağların ve ligninin üstünü örten kılıf ile çeşitli noktalar arasındaki hidrojen bağlarının varlığı gözükmemektedir (Joseleau vd., 1992). Ksilanın ana zinciri β -ksilopiranozdan oluşur (Whistler & Richards, 1970). En yaygın hemiselülozik polisakkarit olan ksilan, kara bitkilerinin hücre duvarının toplam kuru ağırlığının %30-35’ini oluşturur (Joseleau vd., 1992).

L-1,4-ksilanlar, bir homopolimerik omurga zincirine sahip, 1,4-bağlı L-D-ksilopiranoz birimlerinden meydana gelmiş bir heteropolisakkaritleridir. Bu omurga; O-asetil, K-L-arabinofuranosil, K-1,2' ye bağlı glukuronik veya 4-O-metilglukuronik asitten meydana gelir (Aspinall, 1959). Bu lineer ksilanlar guar tohumu ve tütün saplarından izole edilmiştir (Eda vd., 1976). Odun ksilanlarının molekül yapıları; sert odunlarda O-asetil-4-O metilglukuronoksilanlardan, yumuşak odunlarda ise arabino-4-O-metilglukuronoksilanlardan oluşmuştur. Sert odunların ksilanlarının polimerizasyon derecesi (150-200), yumuşak odununkinden (70-130) daha yüksektir (Timell, 1965). Tahıl ksilanları, D-glukuronik asit veya 4-O-methyl eter ve arabinozdan oluşur (Brillouet & Joseleau, 1987). Pentozanlar olarak da adlandırılan yıllık bitkilerin endospermik arabinoksilanları, suda daha fazla çözünür (Ferreira-Filho, 1994).

1.6. Ksilanların Sınıflandırılması

Ksilanın omurgasında bulunan ortak yapıları bakarak; doğrusal homoksilan, arabinoksilan, glukuronoksilan ve glukuronoarabinoksilan olmak üzere ksilanlar çeşitli türlerde sınıflandırılır. Ksilanlar, çeşitli bitkilerde kısmen asetillenmiş bir formda bulunur.

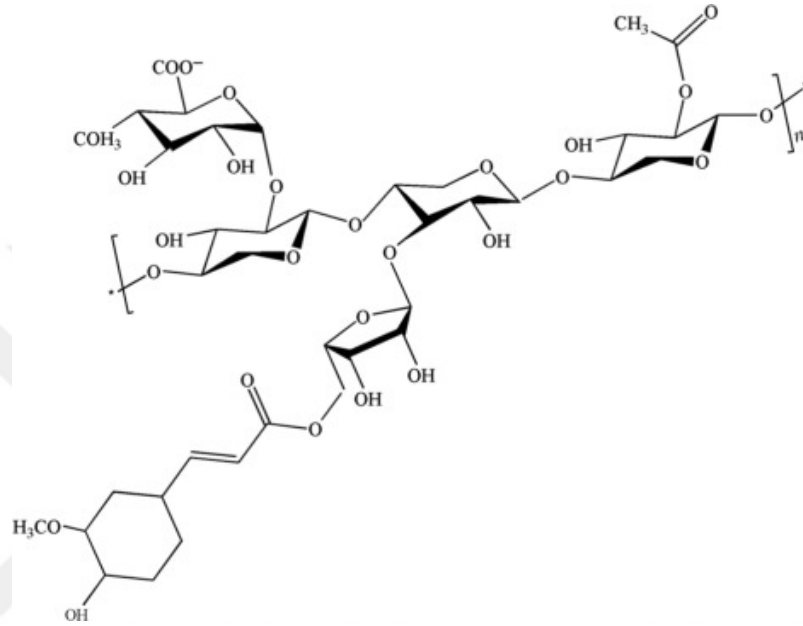
Ksilanlar yapılarına göre 4 kategoriden oluşur;

- **Arabinoksilanlar**, sadece yan zincir olarak α -L-arabinofuranosil ięerir.
- **Glukuronoksilanlar**, sadece α -D-glukuronik ve bunun 4-O-metil türevlerini ięerir.
- **Glukurono arabinoksilanalar**, hem α -D-glukuronik hem de α -L-arabinofuranosil ięerir.
- **Galakto glukurono arabinoksilanlar**, kompleks β -D-galaktopiranosil oligosakkaritlerden oluşur.

1.7. Ksilanın Üç Boyutlu Yapısı

Ksilan moleküllerinin üç boyutlu yapısı Atkins (1992) tarafından tanımlanmıştır. Ksilan omurgası, kristalize koşullar altında üç kat sol-el konformasyonu gösterir; glikosidik bağlantının geometrisi yan zincirlerden etkilenmez. Omurganın nihai yapısını zincirler arasındaki etkileşimin son

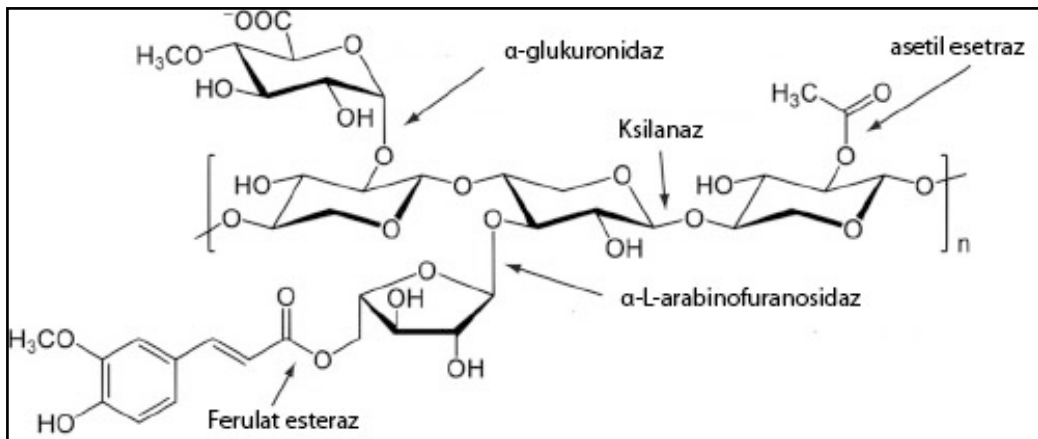
konformasyonu belirler. Elektron kırınım modeli üç katlı konformasyonu doğrular ve zincirlerin altıgen morfolojiye sahip bir trigonal kafes içinde organize edildiğini gösterir (Şekil 1). Ksiloz halkası üzerindeki 5. pozisyonundaki tek hidrojen yerleşimi, zincir içindeki ve zincirlerin birbiriyle yaptığı hidrojen bağı etkileşimleri üzerinde etkiye sahiptir (Atkins, 1992).



Şekil 1. Ksilanın molekül yapısı

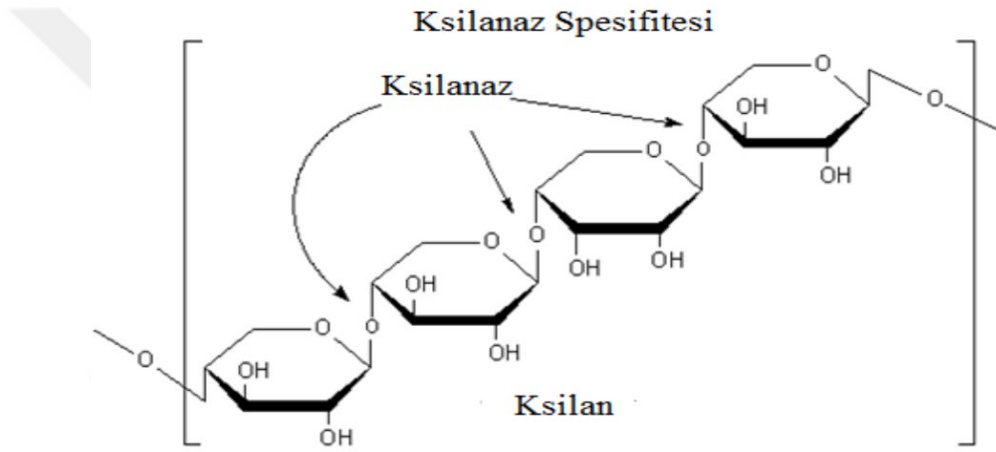
1.8. Ksilanaz Üreten Organizmalar

Ksilan heterojen yapılu kimyasal bir bileşiktir (Şekil 2). Bu nedenle onun hidrolizi için çeşitli etki biçimine sahip enzimler gerekmektedir.



Şekil 2. Ksilan molekülünü hidrolize eden enzimler.

Ksilanazlar bitki hücre duvarının bir bileşeni olan karmaşık β -1,4 polisakkarit ksilanın omurgasını parçalayan hidrolitik enzimlerdir. Ksilanazlar ve onunla ilişkili dallanma enzimleri (Şekil 3); bakteriler, aktinomisetler, maya ve mantarlarda ksilanın dolayısıyla hemiselülozların hidrolizini sağlarlar. Mikroorganizmalar tarafından üretilen çeşitli ksilanazlar; ksilanı sindirmesi nedeniyle, gıda endüstrisinde, deterjan, ekmek hamuru, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi gibi birçok endüstriyel alanda önemli enzim grubu haline gelmişlerdir (Hatanaka, 2012; Golugiri vd., 2012; Singh vd., 2013).



Şekil 3.Ksilanın hidrolizi

Bakteri, mantar, aktinomiset ve çeşitli mikroorganizmalarda bulunan β -1,4-D endoksilanaz (E.C.3.2.1.8) ve β -ksilosidaz (EC.3.2.1.37)'in ksilanı kolayca hidrolize edildiği bulunmuştur (Puls & Schuseil, 1991).

Ksilanazların çeşitli uygulamaları ve sahip olduğu ensütriyel önem, glikozil hidrolaz ailesinin bu önemli enzimi biyokimyasal ve moleküler yönleri üzerine araştırmaları teşvik etmiştir. Özellikle biyodönüşüm ve ağartma alanında, biyoteknolojik kullanımlar için ksilanazların gelecekteki beklentileri göz önüne alındığında, ksilanazların biyosentezin düzenlenmesi ve etki mekanizması açısından özelliklerini analiz edilmesi çok önemlidir. Son yıllarda giderek artan sayıda yayında, yeni kaynaklardan elde edilen çok sayıda ksilanazın, klonlamalarını, dizilemelerini, mutajenezlerini ve kristalografik analizlerini tanımlamaktadır. Ksilanazlar endüstriyel

olarak önemli enzimler olduğundan, enzimin çeşitli yönlerini kapsayan birçok makale yayınlanmıştır (Prade, 1995; Biely, 1985)

Endüstriyel işlemlerde ksilanaz uygulaması, çeşitli faktörler nedeniyle sınırlı ticari kullanımına sahiptir. Ksilanın doğal dallanmasından dolayı sınırlı hidrolizi, dar pH aralığı, ısıl kararsızlık, substratın erişilmezliği, enzim üretiminin inhibisyonu ve maliyeti gibi nedenler enzimin kullanımına sınır getirmektedir. Yüksek aktiviteleri, ılımlı reaksiyon koşulları ve substrat kaybının minimum seviyede olması gibi nedenlerle mikrobiyal ksilanazlar (1,4-L-D-ksilan ksilanohidrolaz, EC 3.2.1.8), ksilan hidrolizi için tercih edilen katalizörlerdir. Enzimatik hidroliz, işlemin ekonomik uygulanabilirliğini sınırlayan faktörlerden biridir. Ticari uygulamalar daha ucuz enzim kullanımını gerektirir. Genetik mühendisliği, daha yüksek enzim ekspresyonu seviyeleri ve verimli işlemi ekonomik hale getirmek için ksilanazların büyük ölçekli ifadesinde önemli rol oynar. Bu nedenle daha fazla miktarda enzim üretilmesi için; mantar, bakteri ve mutant suşlarıyla indüklenmeleri gerekmektedir. Bu yüzden mikroorganizmadan ksilanaz geninin klonlanması ve izolasyonu gibi işlemleri uygulamak verimli bir adımdır (Herna'ndez vd., 2008; Deesukon vd., 2011). Böylece biyoteknolojik gelişmeler yenilenemeyen kaynakları ticari olarak daha değerli pazarlanabilir hale dönüştürür.

Ksilanazlar bakteri, alg, mantar, protozoa, gastropodlar ve eklembacaklılar gibi çok sayıda organizma tarafından üretilir (Dekker & Richards, 1976). Bakteri ve mantarların çoğu dönüştürülebilir son ürün olan ksilozu hidroliz etmek için hücre dışı ksilanazları salgılar. Ruminal mikroorganizmalar da ruminant yemindeki yüksek diyetetik hemiselüloz içeriği nedeniyle güçlü ksilanaz üreticileri olduğu bilinmektedir. Ayrıca ksilanazın varlığının tespit edildiği başka organizmalarda vardır. Bu organizmalara; prokaryotlar, ökaryotlar, deniz yosunları, salyangozlar, böcekler, tohumlu karasal bitkiler, çimlenen tohumlular (Walia vd., 2013a), deniz ortamlarındaki bakteri ve siyanobakteriler ksilanaz üreticileri olarak örnek verilebilir (Annamalaiet vd., 2009).

1.9. Ksilanaz Üretimi

Ksilanotik enzimler, verimli şekilde çalışmak için; uygun bir indükleyici substrata ve bir optimum ortama (tampon) ihtiyaç duyar. Çoğu ksilanaz selülozla

birlikte aktivite gösterir. Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisinde istenilen şartlar ise selüloz aktivitesi içermeyen ksilanazlardır ve bu da yeni ksilanaz araştırmalarına ortam hazırlamıştır. Bu araştırmalar sonucunda filamentli mantarların güçlü enzim seviyeleri nedeniyle yüksek maya ve bakterilerden daha iyi özellikte ksilanaz üreticileri olduğu bulunmuştur. Ancak bu ksilanazların da genellikle selülozlarla birlikte aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Steiner vd., 1987). Karbon kaynağı olarak sadece ksilanı kullanan seçici ksilanaz türleri *Trichoderma* ve *Aspergillus*'da tespit edilmiştir. Bu suşlar selülozik substratların bulunduğu ortamlarda hem selüloz hem de ksilanaz üretir (Biely, 1993). Hücre dışı enzimler, ortamda bulunan karbon kaynaklarının hidrolizinde aktif olarak yer alır. Bu nedenle hücrelerin selüloz tarafından kontamine olmayan daha düşük bir karbon / azot oranı altında büyütülmesi selüloz içermeyen ksinitik sistem üretmesine sebep olabilir (Biely, 1991). Bununla birlikte *Clostridium stercorarium* (Berenger vd., 1985), *Thermomonospora curvata* (Stutzenberger & Bodine, 1992) ve *Neurospora crassa* (Deshpande vd., 1986) tarafından maksimum ksilanaz üretimi için ortamda, selülozik substratların da gerekli olduğu bulunmuştur. *Aspergillus awamori*, *Penicillium purpurogenum* (Haltrich vd., 1996), alkalifilik termofilik *Bacillus* sp. NCIM 59 (Dey vd., 1992) gibi bazı mikroorganizmalarda ksilanaz üretiminin en uygun olduğu ortam; mısır koçanı, buğday kepeği, pirinç kepeği, pirinç samanı, mısır sapı gibi daha ucuz hemiselülozik substratlardır. Mantarlarda ksilanaz aktivitesi bakterilerden daha yüksektir. Şu ana kadar mantarlar arasında bildirilen en yüksek ksilanaz aktivitesi *Trichoderma reesei*'de 3350 IU ml⁻¹ ünitedir (Haapala vd., 1994). *Trichoderma hamatum*'un substrat olarak buğday samanını kullandığı enzimde 7000 IU g⁻¹ ünite olarak bulunduğu bildirilmiştir (Grajeck, 1987).

1.10. Ksilanaz Verimini Etkileyen Faktörler

Ksilanazların verimini standart parametrelere ek olarak birkaç anahtar faktör etkiler. Ksilanaz ekspresyonu heterojen substratlar üzerinde gerçekleştiğinde, ekspresyon seviyesi üzerinde karmaşık etki meydana gelir. Karbon kaynağı olarak kullanılan ksilooligosakkaritlerin kimyasal yapısı ve oranı ksilanaz aktivitesi üzerinde çoğu zaman inhibe edici etkiye sahiptir. Genel olarak; indükleyici moleküllerin yavaş salınması ve kültür filtrasyonunun indükleyiciyi metabolize edilemeyen türevine

dönüştürme olasılığı, ksilanazın aktivitesini artırır. Ksilanazlar substrata sıkıca bağlanır. Fermantasyon sırasında üretilen enzimin bir kısmı genellikle çözünmeyen substrat ile birlikte bağlı enzim olarak kaybolur ve atılır. Ksilanaz üreticisinin metabolik enzimleri olan proteazlar (Penbroke vd., 1992) ve transglikozidazlar gibi enzimler de enzimin gerçek verimini etkiler. Bir fermantasyon prosesinde elde edilen ksilanazın aktivitesini ve verimliliğini arttırabilen diğer biyoproses parametreleri pH ve sıcaklıktır (Hrmova vd., 2001).

1.11. Ksilanaz Sentezinin Düzenlenmesi

Son yıllarda mikrobiyal ksilanolitik sistemleri hakkında bilgi artışı olmasına rağmen, olası ticari uygulamalarda verimli ksilanaz enzimini üretmek ve geliştirmek için ksilanazların indüksiyonu, sekresyonu ile ilgili daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmuştur. Ksilanaz üretiminin indüklenebilirliği çeşitli bakteri ve mantarlar tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. Genel olarak ksilanaz indüksiyonu karmaşıktır ve indükleyicinin yapısına ve organizmanın türüne göre değişiklik gösterir. Bir türde maksimum ksilanaz aktivitesi üreten bir indükleyici, diğer bir türdeki aktivitenin inhibitörü olabilir (Hrmova vd., 1989) Substrat türevleri ve enzimatik son ürünler genellikle ksilanazların indüksiyonunda önemli bir pozitif rol oynayabilir fakat çok daha yüksek konsantrasyonlarda son ürün enzimin inhibitörü olarakta işlev görebilmektedir.

1.12. İndüksiyon

Yüksek molekül ağırlığına sahip bir polimer olan ksilan, hücre duvarına nüfuz edemez. Ksilanın düşük moleküler kütleli parçaları, ksilanaz biyosentezinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu fragmentleri; ksiloz, ksilobiyoz, ksilooligosakkaritler, ksiloz ve glikozun heterodisakkaritleri ve bunların konumsal izomerleri oluşturur. Bu moleküller, az miktarda yapısal olarak üretilen enzimin etkisiyle ksilandan hidrolize edilerek ayrılır. Selülozun ayrıca birkaç reaksiyonda ksilanazın bir indükleyicisi olarak hareket ettiği gösterilmiştir ancak indükleyici etkinin selülozla mı yoksa kirletici ksilan fraksiyonu ile mi gerçekleştiği açık değildir. *Streptomyces* sp.'de ksilanaz aktivitesinin selülozik substratın kristalinitesi ile arttığı

görülmektedir (Morosoli vd., 1986). Şeker kamışı, *Cellulomonas flavigena*'da ksilanaz ve β -ksilozidazın en iyi indükleyicisi olarak bulunmuştur (Perez-Avalos vd., 1996).

Çam ksilanı tarafından indüklenen *Aspergillus* sp. (2MI)'de sentezlenen ksilanaz, diğer ksilan çeşitleriyle indüklenen ksilanazlardan daha yüksek stabilite göstermiştir (Raquel vd., 1997). Ksiloz varlığında *Bacillus pumilus* (Paul&Varma, 1990), *Streptomyces lividans* 66 (Kluepfel vd., 1990) ve *Aureobasidium pullulans*'ta daha yüksek enzim verimleri elde edilmiştir (Leathers vd., 1984) Bununla birlikte, *Cryptococcus albidus*'ta (Biely, 1985) ksiloz, ksilanaz üretimini baskımlarken, termofilik aktinomisetlerde (McCarthy vd., 1985) ksilanaz ekspresyonunun düzenlenmesi konusunda hiçbir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Ksilobiyozun, *T. reesei* (Hrmova vd., 1986) ve *Aspergillus terreus*'ta (Hrmova vd., 1991) ksilanazın spesifik bir indükleyicisi olduğu bulunmuştur. Maya ve mantarların ksilanolitik sistemleri de ksilobiyozun konumsal izomerleri tarafından indüklenmiştir. *Cryptococcus albidus* ta, ksilobiyozun konumsal izomerleri, hücrelerin onlara tepkisinin daha yavaş olması nedeniyle ksilobiyozdan (Biely & Petrakova, 1984) farklı davranır, ancak enzim verimleri, doğrudan indükleyici olmadıklarını gösteren izomerik ksilobiyozların varlığında daha yüksektir. D-ksilan fragmentlerinin yanı sıra metil-L-D-ksilopiranosid, *Streptomyces* sp. (Nakanishi & Yasui 1980; Marui vd., 1985) ve *Cryptococcus* ve *Trichosporon* (Biely, 1980; Yasui vd., 1984) gibi maya cinslerinde ksilanazı indükler. *Trichosporon cutaneum* (Hrmova vd., 1984) ve *Trichoderma lignonum* da (Defaye vd., 1985) tioksilobiozun, ksilanaz aktivitesini indüklediği bulunmuştur. Ayrıca, tüm L-ksilopiranozitlerin, indüksiyon kapasiteleri de aglikonun yapısına bağlı olduğundan, ksilanaz indükleyicileri olarak kullanılmadıkları bildirilmektedir.

Bu heterodisakkaritlerin pozisyonel izomerlerinin sentezinde transglikozilasyon enzimlerinin rolü *Aspergillus terreus* (Hrmova vd., 1991) ve *T. reesei* (Hrmova vd., 1986) türlerinde gösterilmiştir. Ksilanaz indükleyicileri olarak tanımlanan düşük moleküler kütleli maddeler, sitoplazmaya translokasyonları için transferaz enzimlerine ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle, kültür filtratındaki indükleyicilerin veya gerekli enzimlerin seviyesi de ksilanaz sentezini etkiler.

1.13. Moleküler Düzeyde Ksilanazın İndüklenmesi

Moleküler düzeyde enzim indüksiyonu ve ksilanaz biyosentezi hakkındaki bilgiler daha az araştırıldığı için sınırlıdır. Bunun nedeni indükleyicilerin deneysel koşullarda hücrelere taşınmasını sağlayan sistemlerin, hücresiz sistemlerde bulunmamasından dolayıdır (Biely, 1993). Bazı organizmalarda ksilanaz ve selüloz oluşumu için indüksiyon düzenlemesi bildirilmiştir (Hrmova vd., 2001; Nevalainen & Palva, 1978). Mutasyonların pleiotropisinden anlaşılabileceği üzere, iki enzim sisteminin sentezini yöneten ek bir bağlantı hem selüloz hem de ksilanaz genlerinin ortadan kaldırılmasına sebep olmaktadır (Hazlewood ve Gilbert, 1993).

Estabén vd., (1992)'de *Bacillus circulans* WL-12'nin glukozla büyüdüğü kültürlerinde ksilanazın tespit edilmediğini, ancak ksiloz, mannoz ve selülozun ksilanaz üretimini desteklediğini bulmuşlardır. *Butyrivibrio fibrisolvens* GS 113'teki ksilanaz ve ksilosidazın aynı koordinat kontrolü altında olduğu, ksilan tarafından indüklendiği ve glukoz tarafından baskılandığı ortaya koyulmuştur (Utt vd., 1991). *Bacillus. pumilus*'tan (Moriyama vd., 1987; Panbangred vd., 1983) L-ksilanaz genleri içeren DNA fragmentlerinin analizi, ksilanaz ve ksilosidaz genlerinin yakından ilişkili olduğunu ve 14,4 kb'lik bir DNA fragmentinin bağlantılı olduğunu göstermiştir fakat aynı operon tarafından kontrol edilmediği tespit edilmiştir.

1.14. Ksilanazın Biyokimyasal Özellikleri

1.14.1. Moleküler Ağırlık

Ksilanazların özellikleri hakkındaki mevcut bilgilerin çoğu bakteri ve mantar enzimleri üzerine yapılan çalışmalardan bulunmuştur. Mikrobiyal ksilanazlar, moleküler kütleleri 8-145 kDa aralığında olan tek alt birimli proteinlerdir (Sunna & Antranikian, 1997). Buna örnek olarak bazı türlerden izole edilen ksilanazların moleküler ağırlıklarını verebiliriz. *Thermotoga maritima*'nın ksilanazının 120 kDa olduğu bildirilmiştir (Liebl vd., 2008). Ayrıca SDS-PAGE analiziyle *Bacillus subtilis*'ten elde edilen ksilanazın 21,4 kDa olduğu bildirmişlerdir (Kosciow vd., 2016).

1.14.2. Sıcaklık

Bakteri ve mantar kaynaklı endoksilanazların optimum sıcaklıkları 40 ile 60°C arasında değişmektedir. Fungal ksilanazlar genellikle bakteriyel ksilanazlardan daha az termostabildir. *Ceratocystis paradoxa* mezofilik kökenlidir ancak termostabil ksilanaz üreten mantardır ve ürettiği ksilanaz 1 saatlik 80°C'de stabiliteye sahiptir (Dekker & Richards, 1975). *Acremonium alcalophilum* JCM 7366'da hem karboksimetil selüloz hem de ksilanaz aktivitelerine sahip düşük sıcaklıkta çalışan aktif bir enzime sahip olduğu bildirilmiştir.

Ksilanazların bulunduğu organizmalara göre çalıştığı sıcaklık aralıkları değişkenlik göstermektedir. *Pseudopedobacter saltans*'tan elde edilen ksilanazın 10-55°C arasındaki sıcaklıkta çalıştığı bildirilmiştir (Sharma vd., 2018). Zou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; *Sphingobacterium* sp. TN19'dan gelen ksilanazın %65'in üzerinde maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 20-28°C olarak tespit edilirken, 10°C'de maksimum %40 aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (Zou vd., 2009). *Pediococcus acidilactici*'deki ksilanazın aktivite gösterdiği sıcaklık aralığını 10-80°C olarak bildirmişlerdir (Adiguzel vd., 2019). *Bacillus licheniformis*'tan izole edilen ksilanazın çalıştığı sıcaklık 25-75°C olarak verilmiştir (Ghosh vd., 2019). Rahmani ve arkadaşlarının 2019'da *Kitasatospora* sp. ksilanazını üzerinde yaptığı çalışmada %50 maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığını 30-65°C olarak bildirmişlerdir. *Bacillus* sp. deki ksilanazın 40-90°C arasındaki sıcaklıkta aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Shrinivas vd., 2010). *Thermotoga petrophila*'dan elde edilen ksilanazın 70°C'de %40, 100°C'de %70 maksimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ul-Haq vd., 2012).

1.14.3. pH

Farklı organizma kaynaklarından elde edilen D-ksilanazlar genellikle geniş bir pH aralığında (Dekker & Richards, 1975; Sunna & Antranikian, 1997) kararlı olup 4-7 pH aralığında optimum aktivite gösterir. *Aspergillus kawachii* (Ito vd., 1992) ve *Penicillium herque* (Funaguma vd., 1991) gibi mantarlardan elde edilen ksilanazlar, asidik karakterde optimum pH (2-6) aktivite gösterir. *Talaromyces amestolkiae*'den elde edilen ksilanazın optimum pH aralığı 2,2-5,5'tir (Nieto-Dominguez vd., 2015). Farklı çalışmada bir maya türü olan *Aspergillus niger*'den elde edilen ksilanazın %73

maksimum aktiviteyle pH:3,5'ta, %78 maksimum aktiviteyle pH:4,5'ta çalıştığı bildirilmiştir (Patel vd., 2018). *Anoxybacillus* sp. 3M türünden izole edilen ksilanazın pH:7'de %50, pH:4,5'ta %46 maksimum aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Marcolongo vd., 2019). *Aspergillus oryzae*'den gelen ksilanazın %60 maksimum aktiviteyle çalıştığı aralığın pH:7-9 olduğu bulunmuştur (Suzuki vd., 2010).

Paenibacillus terrae türünden alınan ksilanazın %90 maksimum aktiviteyle çalıştığı pH 7 olduğu tespit edilmiştir (Kim vd., 2018). Yin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Thermobifida halotolerans* türünden izole ettikleri ksilanazın pH:4-10,6 arasında aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Yin vd., 2019).

Çeşitli kaynaklardan elde edilen endoksilanazlarda izoelektrik noktaları 3 ile 10 arasında değişiklik göstermektedir. Bakterilerin iki tipte ksilanaz ürettiği bunların da genel olarak yüksek moleküler kütleli asidik ksilanaz ve düşük moleküler kütleli bazik ksilanaz oldukları bilinmektedir. Ancak mantarlarda bu tür bir ilişkinin gözlemlenmediği, yaygın olarak düşük moleküler kütleli ksilanazların da bazik karakterde olduğu bilinmektedir (Kocabaş vd., 2017).

1.14.4. Substrat Spesifikliğı

Ksilanı degrade eden enzimlerin etki mekanizmasıyla ilgili bilgiler, substrat özgülüğü, yan zincir ikamelerinin aktivite üzerindeki rolü, parçalanmış bağların özgülüğü ve son ürünler üzerine yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Mantar kökenli ksilanazlar iki şekilde karakterize edilir. Bunlar esas olarak iki tiptedir; arabinozu serbest bırakmayan dallanmayan veya ana zincir bağlantılarını kesmenin yanı sıra arabinozu yan zincir değişimlerini serbest bırakan dallanmadır (Reily, 1981). *Neurospora crassa* (Mishra vd., 1984) ve *Aspergillus niger* (Takenishi, & Tsujisaka, 1973) gibi mantar kökenli birçok ksilanazın arabinozu, arabinoksilandan serbest bıraktığı bulunmuştur. *Streptomyces roseiscleroticus*'ta bulunan endoksilanazın da dallanma yapan bir enzim türü olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, *Trichoderma harzianum* (Wong vd., 1986) ve *Aspergillus niger*'in başka bir suşundan elde edilen ksilanazların, arabinoksilandan serbest arabinoz oluşturmadığı bulunmuştur.

Ksilanaz aktivitesine yüksek dallı polisakkaritlerdeki yapıların etki ettiği yaygın olarak gözlenmektedir. Bununla birlikte *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*

ve diğerkaynaklarda, dallanma noktalarına yakın ana zincir bağlantılarına daha fazla afiniteye sahip enzimler de bulunmaktadır (Dekker & Richards, 1976).

Ksilanazlar ayrıca çeşitli selülozik substratlara karşı aktivitelerinde de farklılık gösterir. Bunlardan birkaçı sadece ksilan üzerinde etki gösterirken, *Myrothecium verrucaria*, *Penicillium capsulatum* ve *P. funiculosum* kaynaklı spesifik olmayan ksilanazlar karboksimetil selüloz ve ksilanı substrat olarak kullanmaktadır. Bazı ksilanazların diğerksilanazlara göre serbest özgüllüğün sebebinin katalitik grubun yerleşiminin spesifikliğinden kaynaklandığı bilinmektedir. Genel olarak ksilanazların spesifikliği şekerler arası bağlantıya doğrudur (Dekker & Richards, 1976). *C. thermocellum* kaynaklı endoglukanazın arpadaki L-1,3 bağlantılarını, L-glukanı ve diğersubstratlardaki L-1,4 bağlantılarını hidrolize ettiği bulunmuştur. Endoglukanazlarla transglikozilasyonun, katalitik bölgenin her iki tarafında stereospesifik bağlanma bölgeleri içerdikleri için substratla aynı bağlantıya sahip ürünlere yol açtığına inanılmaktadır (Coughlan, 1992).

Hidroliz reaksiyonunda doğal substrat olarak arabinoksilanı *Bacillus subtilis* 'in kullandığı bildirilmiştir (Rasmussen vd., 2010). Yine *Aspergillus flavus* 'ta doğal subsrat olarak kullanılan ksilan beechwoodun (kayın ağacı kerestesi) hidroliziyle ksilobiyoze ve ksilopentoz elde edilmiştir (Chen vd., 2019). Yin ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada *Bacillus* sp. türünde β -1,4 ksilanı subsrat olarak kullanmıştır (Yin vd., 2010). *Acetivibrio thermocellus* 'un subsrat olarak buğday arabinoksilanı kullandığı ve hidroliz sonucunda ksiloz ürününü elde ettiği bulunmuştur (de-Camargo vd., 2018). Doğal bir subsrat türü olan mısır koçanı ksilanını *Aspergillus flavus* 'un ksilobiyoze, ksilotrioz, ksilopentoz, ksiloheksoz türevlerine dönüştürdüğü bilinmektedir (Chen vd., 2019). *Streptomyces thermocarboxydus* doğal substrat olarak kullandığı beta-1,4 ksilanı hidroliz etmiştir (Kim vd., 2010). *Streptomyces* sp. TN119 'un da yulaflı ksilanı hidroliz ettiği bildirilmiştir (Zhou vd., 2010).

1.14.5. Metal İyonları ve İnhibitörleri

Ksilanazlar ayrıca çeşitli organik madde ve metal iyonlarına karşı olan aktivitelerinde de farklılık gösterir. Bazı metal iyonları ve organik maddeleri aktiviteyi arttırıcı etki gösterirken bazıları da düşürücü etki göstermektedir. *Cellulosimicrobium cellulans* türünden elde edilen ksilanaz üzerinde yaptıkları çalışmalarda 50 mM

konsantrasyonuna sahip Ca^{+2} iyonun residual aktiviteyi %20 civarına düşürdüğü tespit edilmiştir (Yuan vd., 2016).

Pseudozyma hubeiensis'ten gelen ksilanaz üzerinde Co^{+2} iyonun inhibe edici etkisi olduğu bildirilmiştir (Mhethras vd., 2016). *Zea mays* türünden elde edilen ksilanaz üzerinde yapılan çalışmada 10 mM Cu^{+2} varlığı enzimin residual aktivitesinin düşmesine neden olduğu bulunmuştur (Han & Chen, 2010). Fe^{+3} metal iyonun varlığı *Scheffersomyces stipitis*'teki ksilanazda %80 inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Basaran & Ozcan, 2008). 5 mM K^{+} iyonu varlığının *Penicillium oxalicum*'taki ksilanazda inhibe edici etkisinin olduğu bulunmuştur (Ye vd., 2017). N^{-} Asetilimidazolün *Pseudozyma hubeiensis* türünden elde edilen ksilanaz üzerine inhibe edici etkisinin olduğu bildirilmiştir (Mhethras vd., 2016). *Termitomyces clypeatus*'taki ksilanazda 3 M üre varlığı enzimi inhibe etmiştir (Bhattacharyya vd., 1997). Tris (hidroksimetil) aminometan varlığı *Selenomonas ruminantium* türünden elde edilen ksilanazın inhibe olmasına neden olmuştur (Jordan vd., 2009). 5 mM SDS varlığı *Thermomyces dupontii*'den izole edilen ksilanazın aktivitesini düşürücü etkide olduğu tespit edilmiştir (Guerfali vd., 2009).

5 mM Al^{+3} metal iyonu varlığıyla yapılan deneyde *Talaromyces amestolkiae*'dan elde edilen ksilanaz aktivitesini başlangıç aktivitesine oranla %120 arttırdığı bulunmuştur (Nieto-Dominguez vd., 2015). 1 mM Ba^{+2} varlığı, *Thermotoga petrophila*'daki ksilanazın aktivitesini arttırıcı özellikte olduğu bulunmuştur (Zhang vd., 2019). *Clostridium* sp. B(OH)_3 türünden elde edilen ksilanazın 1mM Co^{+2} varlığında aktivitesi %139'a ulaşmıştır (Li vd., 2018). 5 mM Fe^{+2} varlığı *Talaromyces amestolkiae*'den elde edilen ksilanazın aktivitesini %125'e arttırmıştır (Nieto-Dominguez vd., 2015).

1.14.6. K_m ve V_{max}

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada birçok ksilanazın kinetik parametreleri açığa çıkarılmış ve enzimlerin büyük bir çoğunluğun Micheal-Menten grafiğine uygun olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmalara bakıldığında değerlerin 0,0099-80,14 mM arasında değişkenlik gösterdiği ortaya koyulmuştur. Yapılan bir çalışmada substrat olarak ksilobiyozun kullanıldığı *Halalkalibacterium halodurans*'tan elde edilen ksilanazın K_m değerinin 80,14 mM olduğu bulunmuştur (Muzard vd., 2009).

Ksilohexozun substrat olarak kullandığı *Rasamsonia emersonii*' den izole edilen ksilanazın K_m değerinin 0,09 mM olduğu gözlemlenmiştir (Rasmussen vd., 2006). *Bifidobacterium breve*'deki ksilanazın K_m değeri 0,05 mM'dır (Hyun vd., 2012). Yine başka bir çalışmada 4-nitrofenil alfa-L-arabinofuranozidazın substrat olarak kullanıldığı *Thermotoga petrophila*'dan izole edilen ksilanazın K_m değeri 6,125 mM olduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2019).

1.15. Termofilik Ksilanazlar

Thermonospora fusca (McCarthy vd., 1985), termofilik *Bacillus* sp. (Gruninger & Fiechter, 1986) ve *Bacillus stearothermophilus* (Khasin vd., 1993) gibi termofilik bakterilerin ürettiği ksilanazlar, 65-80°C aralığında optimum sıcaklıkta aktivite gösterir. 37°C'de termotoleranslı bir *Aspergillus* suşu tarafından üretilen termostabil ksilanaz, 80°C'de maksimum aktivite gösterir (Mendicuti vd., 1997). Termofilik anaerob *Clostridium stercorarium*'un ürettiği ksilanaz A, optimum 70°C sıcaklığa ve 80°C 'de 90 dakikalık bir yarı ömre sahipken, *Thermotoga* sp.'den izole edilen ksilanazın pH 5,5'te optimum 105°C 'lik bir sıcaklığa ve 95°C'de 90 dakikalık bir yarı ömre sahiptir (Simpson vd., 1991). *Dictyoglomus* sp.'in ürettiği ksilanaz 90°C 'de 80 dakikalık bir yarı ömür sergilemiştir (Mathrani & Ahring, 1991). Termofilik mantarlar arasında, *Thermoascus aurantiacus*'taki ksilanazın 24 saat boyunca 70°C'de stabil olduğu ve 80°C'de 54 dakikalık bir yarı ömre sahip olduğu bilinmektedir (Yu vd., 1987). Termostabil ksilanazlar üreten diğer termofilik mantarlar arasında pH 5-6.5'ta 65- 75°C'lik sıcaklıkta optimum aktivite gösteren *Paecilomyces variota* (Krishnamurthy & Vithayathil, 1989) ve *T. byssochlamydoides* (Yoshika vd., 1981) bulunur. Son zamanlarda, termofilik aktinomisit *Microtetraspora flexuosa* SIIX'ten elde edilen endoksilanazların, pH 6.0'da 80°C'lik optimum sıcaklığa sahip olduğu gözlemlenmiştir (Berens vd., 1996). Aktinomisetlerde ksilan parçalayıcı enzimlerin yaygınlığına rağmen, *Microbispora*, *Saccharomonospora*, vb. gibi diğer termofilik aktinomisetler gruplarındaki ksilanazlar hakkında ise nispeten az bilgi mevcuttur. Tablo 1 'de, ksilanaz üreten termofilik organizmalardan birkaçı tanımlanmaktadır.

Tablo 1. Ksilanaz üreten bazı termofilik mikroorganizmalar

Kaynak	Ksilanaz	Optimum Şartlar				Referans
		Büyüme		Aktivite		
		pH	Sıcaklık (°C)	pH	Sıcaklık (°C)	
Termofilik Bakteri						
<i>Bacillus acidocaldarius</i>		3,5-4,0	65	4,0	80	Uchino ve Fukuda, 1983
<i>Thermobifida fusca</i>		-	-	-	55-60	Weng ve Sun, 2005
		-	-	-	55	Umemoto vd., 2009
<i>Bacillus</i> sp. 41M-1						
<i>Bacillus licheniformis</i>	X-II	-	-	7,0	75	Damiano vd., 2006
<i>Bacillus thermoalkalophilus</i>		9,0	60	6,0-7,0	60-70	Rajaram ve Varma, 1990
<i>Lentinula edodes</i>	Xyl16-3	-	-	5,0	90	Ramos vd., 2000
<i>Thermobifida fusca</i>		-	-	7,0	80	Zhao vd., 2015
<i>Thermotoga petrophila</i>	A5IL00	-	-	-	90	Ul Haq vd.,2012
<i>Thermophilic bacillus</i> sp		7,0	65	6,5-7,0	78	Gruninger & Fiechter, 1986
<i>Thermotoga maritima</i> (MSB 8)	A	7,0	80	6,2	92	Winterhalter & Liebl, 1995
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>		-	-	-	55-60	Adsul vd., 2009

Hodgson'un (1994)'un bahsettiği gibi, çoğunlukla yüksek teknolojiye dayanan endüstriyel enzimlerin gelecekteki senaryosunda etkileyici değişiklikler öngörülmektedir. Novo, Genencor ve Diversa gibi çok uluslu şirketler, benzersiz mikroorganizmalardan oluşan geniş bir kültür koleksiyonu oluşturarak ve enzim faaliyetlerini tarayarak biyolojik çeşitliliği harekete geçirmeyi planlamaktadır. Diversa (eski adıyla Rekombinant Biyokataliz), tüm ekstremofilik canlılardaki DNA'yı spesifik olarak toplayıp ve DNA'dan türetilen ekspresyon kütüphanelerinin biyoplanlamasını gerçekleştirmek için bilinen enzim dizilerine dayanan proplar oluşturmaktadır. Onları kullanan şirketler için ne kadar önemli finansal etkiye sahip olduğu bilinen ekstreozimlerin, yılda 80 milyon dolarlık satışa sahip olan *Taq* polimeraz örneğinden açıkça anlaşılmaktadır (Persidis, 1998). Ekstrem ortamlardan izole edilen enzimlerin belirli uygulamalarda kullanılmasında istenilen işlevlere sahip yeni işlevli proteinler olarak tasarlanıp kullanılması sağlanır. İlginç ve yeni özelliklere sahip olmalarına rağmen, ekstremofilik enzimler henüz ticarileştirilmemiştir. Son

zamanlarda, Genencor International (Rochester, NY), deterjan ve kumaş endüstrilerinde kullanılmak üzere alkali bir bakteriden izole edilen selüloz 103'ü piyasaya tanıtmıştır. Bu ekstremolekülün ilk büyük ölçekli ticari uygulamasıdır. Rekombinant DNA teknolojisinin ve protein mühendisliğinin ortaya çıkışıyla, bu tür enzimler için muazzam bir gelecek öngörülmektedir (Chen vd., 2018).

1.16. Ksilanaz Gen Kaynakları

Ksilanaz üreten mikroorganizmalar bazı özelliklerine göre şu şekilde sıralanmıştır (Köksal, 1998). Bakterilerden örnek olarak; *Bacillus* sp., *Cellulomonas fimi*, *Staphylococcus* sp. SG-1, *Thermotoga maritima* MSB8 vb verilebilir. Funguslardan; *Trichoderma*, *Fusarium*, *Thermomyces* gibi türler *Aspergillus niger* ve *Aspergillus nidulans* gibi küf mantarlarının da ksilanaz ürettiği bilinmektedir. Actinomyceteslerde *Thermomonospora curvata*, *Streptomyces* sp gibi türlerle rekombinant mikroorganizmalar da ksilanaz üreten canlılar arasında yer aldığı bilinmektedir.

1.17. Ksilanaz Genlerinin Klonlanması ve Ekspresyonu

1.17.1. Ksilanaz Genlerinin Ekspresyonu

Ksilanaz üretiminin ticari olarak gerçekleştirilmesi ve ekonomik uygulanabilirliği için, enzimleri hiper üretebilen organizmaları tanımlamak gerekir. Rekombinant DNA teknikleri, protein üretimini arttırmanın yollarını kullanır. Ksilanaz genleri, farklı mikrobiyal cinslerden çeşitli uygun konakçılara klonlanmıştır. Ksilan parçalayıcı enzimleri kodlayan bakteri genlerinin, genoma bitişik veya selülozla ilişkili fonksiyonları kodlayan diğer genlere yakın olduğu bulunmuştur. *Pseudomonas fluorescens subsp.*'te selüloz, ksilanaz ve arabinofuranosidaz genleri aynı yönde transkribe edilmiş ve sadece 148 bp (Kellett vd., 1990) ile ayrılırken, ikinci ksilanaz geni endoglukanaz geninin 125 bp'si içinde haritalandırılmıştır. *Bacillus polymyxa* türünde, ksilanaz ve endoglukanaz genleri 155 bp (Gosalves vd., 1991) ile ayrılmıştır. Benzer şekilde, ksilanaz ve L-ksilozidaz genleri arasındaki yakın bağlantı, *Bacillus pumilus* (Moriyama vd., 1987) ve *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*'da (Luthi vd., 1990) vardır. Ksilan parçalayıcı enzimleri kodlayan genlerin bu sıklıkta

kümelenmesine rağmen, polisistronik transkripsiyon için kanıt yoktur (Hazlewood & Gilbert, 1993). *Bacillus stearothermophilus*'un 21 genomunun 4.2-kb kromozomal segmentinin nükleotid sekans verileri, L-ksilosidaz geninin ksilanaz geninin yukarı akımında bulunduğunu göstermiştir. Daha ileri analizlerde, iki genin sadece 2 bp ile ayrıldığını ve bağımsız olarak transkribe edildiğini gösterilmiştir (Baba vd., 1994).

1.17.2. Heterolog Klonlama

Ksilanaz genleri birçok çalışmada, farklı mikrobiyal cinslerden izole edilmiş ve *E. coli* ile eksprese edilmiştir. *E. coli*'deki ekspresyon genellikle ana organizmadan daha düşük bulunmakla birlikte sitoplazmik veya periplazmik parçalara bağlanır. *E. coli*'de gerçekleşen glikozilasyon ve rekombinant ksilanazlardaki hücre içi birikimi gibi post-translasyonel modifikasyon yokluğu, düşük aktivite seviyesine neden olmaktadır. Rekombinant *E. coli*'de alkalifilik *Aeromonas* (Kudo vd., 1985), alkalifilik *Bacillus* (Honda vd., 1985), termofilik *Bacillus* sp. (Shendye & Rao, 1993) ve *Cellulomonas* sp. (Bhalerao vd., 1990)'deki ksilanazlar hücre dışı aktivite gösteren enzimlerdir. *Bacillus stearothermophilus* T-6'dan klonlanan ksilanaz geninin pH 9.0 ve 65 °C'de optimal aktivitede olması onun ilgi çekici olduğunu göstermiştir (Gat vd., 1994). Çeşitli organizmalarda varlığı tespit edilen ksilanazların klonlanması ve ekspresyonu ile ilgili bilgiler Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Ksilanaz geninin klonlandığı bazı mikroorganizmalar

Organizma kaynağı	Vektör	Moleküler ağırlığı (MW kDa)		Ekspres edilen ksilanaz miktarı (U ml ⁻¹)	Referans
		Yabani protein	Rekombinant protein		
<i>Bacillus</i> sp. C125	pBR 322	43	43	0.47	Honda vd.,1985
<i>B. circulans</i> NRC 9024	pUC 19	59	59	0.04	Yang vd., 1989
<i>B. polymyxa</i> NRC 2822	pBR 322	51	48	0.037	Yang, vd., 1988
<i>Aspergillus niger</i>	pPICZαBNH8	-	-	-	Choengpanya vd., 2015
<i>Medicago sativa</i>	pISV2678	-	-	-	Xiong vd.,2007
<i>Bacillus</i> sp. NCIM 59	pUC 8	35	35	2.0	Shendye & Rao, 1993
<i>Prevotella ruminicola</i>	pET-28a	-	-	-	Dodd vd., 2009
<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>	pET-28a(+)	-	-	-	Teeravivattanakit vd., 2016
<i>Bacillus pumilus</i>	pET21a	-	-	-	Park vd., 2017

Ksilanolitik organizmaların çoğu, tek bir gen ürününün transkript sonrası işlenmesinden veya daha sık olarak çoklu genlerin ürünleri olarak ortaya çıkabileceği çoklu izomerik formları üretir. Ksilanazların heterojenliğinin nedeni, diferansiyel glikozilasyon veya proteoliz gibi post-translasyonel modifikasyonlara bağlanmıştır (Hazlewood & Gilbert, 1993). Daha önceki çalışmalarda *Aeromonas* sp.'den elde edilen iki ksilanazın, benzer hidrolitik immünolojik ve fizikokimyasal özelliklerinden dolayı aynı genden farklı olarak modifiye edilmiş ürünler gibi görüldüğü gözlemlenmiştir (Wong vd., 1988).

1.17.3. *Escherichia coli*'de Ekspresyon

E. coli'de ekspresyon ile ksilanaz üretimi, alkali *Aeromonas* sp. (Kudo vd., 1985), *Bacteroides ruminicola* (Whitehead & Hespell, 1989) ve *Fibrobacter succinogenes* 135 (Hu vd., 1991) gibi suşlarda yapılmıştır. *C. saccharolyticum* suşunda bulunan termostabil bir ksilanaz klonlanmış ve *E. coli*'de yüksek miktarda eksprese edilmiştir. Rekombinant olarak eksprese edilen enzimin, 80 °C'de 2-3 dakikalık bir termal yarı ömre sahip olduğu bulunmuştur (Luthi vd., 1990). Her ne kadar bu enzim endüstriyel uygulama için ideal kriterlere sahip olamasa da, izole

edilmiş genin kendisi, biyoteknolojik çalışmalarda enziminin özelliklerini daha da iyileştirmede mutagenез için bir başlangıç materyalini oluşturur. Son zamanlarda Koo ve arkadaşları (1996) yaptıkları çalışmada, konakçı *E. coli*'deki suşundan aldıkları ksilanazı çok yüksek miktarda ekpres etmişlerdir. Rekombinant enzimin, pH 5,4'te 60°C'lik optimum sıcaklıktaki aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. *E. coli* konakçı suşunda *B. subtilis* ve *B. circulans* ksilanazının ekspresyonu da yapılmıştır. *B. circulans* ksilanazını kodlayan bir gen, *E. coli*'de kullanılan dejenere kodonların frekansını taklit etmek için tasarlanmıştır. Sentetik *B. circulans* geni daha sonra tek kodon ikamesi (Thr147Ser) yoluyla *B. subtilis* ksilanaz genine dönüştürülmüştür. Her iki sentetik geni içeren plazmidler, *E. coli*'de doğrudan ekspresyon için daha da modifiye edilmiştir. Lac promotörünün kontrolü altında, sitoplazmada çözelti formunda 300 mg l-1 kadar yüksek seviyelerde rekombinant ksilanaz üretilmiştir. Ürünlerin karakterizasyonu, saflaştırılmış rekombinant proteinin doğru şekilde işlendiğini ve enzimatik olarak aktif olduğunu göstermiştir (Sung vd., 1993). *C. fimi* cenA'nın 5' ucuna eklenmiş *B. subtilis* ksilanaz geni, *E. coli*'de yoğun olarak eksprese edilmiştir (Tomme vd., 1994). Bu füzyon proteinin hem mikrokristal selüloz hem de rejenere selüloz için güçlü afinite sergilediğini ortaya koymuştur.

1.18. Ksilanazda pH ve Sıcaklığın Etkisi

Bakteriyel ve mantar kaynaklı ksilanazlar, mezofilik sıcaklıklarda (40-60 °C), nötr (özellikle bakteriyel ksilanaz) veya hafif asidik (özellikle mantar kaynaklı ksilanaz) pH'da optimum aktivite gösterir (Walia vd., 2014). Bunun yanısıra aşırı pH aralığında (2-11), 5 ile 105 °C arasında değişen sıcaklıkta ve ayrıca yüksek (NaCl-30%) tuz konsantrasyonunda aktif ve kararlı olan ksilanazlar da vardır (Waino & Ingvorsen, 2003). Ekstrem habitatlara adapte olan mikroorganizmalar tarafından bu enzimler üretilir. Bakteriler, aktinomisetler ve mantarlar genel olarak asidik pH gereksinimlerinin aksine, büyüme ve enzim üretimi için nötre yakın pH'ya ihtiyaç duyarlar (Ball & McCarthy, 1989). Bununla birlikte, bazı alkalifilik basillerin büyüme ve enzim üretimi için pH aralığı 9- 10 civarı olan ortamları tercih ettiği bilinmektedir. (Okazaki vd., 1984). *Streptomyces flavogriseus* (Ishaque & Kluepfel, 1981) ve *Bacillus* sp. NCIM 59'da (Chauthaiwale & Rao, 1994) selülazlara ve ksilanazlara ek olarak eşzamanlı glikoz (ksiloz) izomeraz üretimi bilinmektedir.

Termofilik ksilanazların yüksek sıcaklıkta kontaminasyon riski en aza yakın ve substrat viskozitesi de düşüktür. Birçok çalışmada sıcaklığın ksilanaz aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Termofilik ksilanazlarda sıcaklığı arttığı çalışmalarda (özellikle 30 ve 60 °C' deki sıcaklıklar arasında) aktivitesinin de arttığı gözlemlenmiştir (Maurelli vd., 2008; Murugan vd., 2011). Termofilik ksilanazların maksimum enzim aktivitesi 85°C olduğu bilinmektedir (Fan G vd., 2011; Luo vd., 2009). Aynı şekilde sıcaklık kadar pH da ksilanaz aktivitesi üzerinde önemli bir parametredir. Ksilanazların maksimum aktivite gösterdiği aralık genellikle pH 4.0-7.0 olduğu parametrelerdir. Bu aralığın dışındaki pH değerlerinde genellikle aktivite azalır (Pal & Kanum, 2011; Batista vd., 2017). Ancak yüksek pH (6.0-11.0) aralığında da aktivite gösteren ksilanazlar vardır (Barabote vd., 2010; Morris vd., 1998).

1.19. Ksilanazların Sınıflandırılması

Ksilanın karmaşıklığı ve heterojenliği, çeşitli ksilanazların bolluğunda özgülükler, birincil diziler ve kıvrımlar yüzünden sadece substrat özgülüğü ile bu enzimlerin sınıflandırılması sınırlamalara yol açmıştır. Fizikokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılmış ksilanazlar moleküler ağırlığı (<30 kDa) ve bazik olan ve moleküler ağırlığı yüksek (>30 kDa) ve asidik olarak iki grup olarak ikiye ayrılır. (Wong & Saddler, 1992). Ksilanazların yaklaşık %70'i bu sistem tarafından sınıflandırılmasına rağmen özellikle mantar ksilanazları bu tip sınıflandırılmaya dahil değildir. Daha sonra eksiksiz bir sınıflandırma sistemiyle genel olarak glikosidazlar (EC 3.2.1.x) sınıfı altında ksilanazlar tanıtılmıştır (Yeğin & Büyükkilleci, 2015).

Bu sistem katalitik enzimlerin birincil yapı karşılaştırmaları üzerine ve ilgili dizilerin ailelerinde gruplandırma yaparak sınıflandırılır.

Ksilanolitik enzimler, ksilani hidroliz eden enzimlerdir. Bunlar arasında β -1,4-Endoksilanaz, β -Ksilozidaz, α -L-araninofuranozidaz, α -glukuronidaz, asetil ksilan esteraz ve fenolik asit (ferulik ve p-kumarik asit) esteraz yer almaktadır.

Endo-1,4,- β -Ksilanaz: (1,4- β -D-xylanxylanohydrolase, EC. 3.2.1.8) Ksilan omurgasını rastgele hidroliz eden enzimdir.

β -Ksilozidaz: (β -Xylosidase; 1,4- β -D-Xylosidase; 1,4- β -D-Xylan Xylohydrolase EC.3.2.1.37)

Kısa oligosakkaritleri parçalar. Ksilanda bulunan yan gruplar α -L-Arabinofuranozidaz, α -D-glukuronidaz, galaktozidaz ve asetil ksilan esterazlar tarafından molekülden kopartılarak serbest kalırlar.

Endoksilinazlar genel olarak bakteri ve mantar kaynaklı üretilen enzimlerdir. Bununla birlikte bitkisel kökenli endoksilanazlarda saptanmıştır. Su yumuşakçaları dahil bazı gelişmiş hayvanlarda da ksilan üretimi gerçekleştiği bildirilmiştir.

Exo-1,4- β -D-Ksilozidaz (EC.3.2.1.37): D-ksiloz birimlerini indirgen olmayan uçtan keserek 1,4- β -D-ksilo-oligosakkarit hidrolizini katalizlenmesini sağlar.

α -Arabinofuranozidazlar (EC.3.2.1.55): Ksilan hidrolizinde bazen birden fazla enzim görev almaktadır. 1,4- β -D-ksilan omurgasının hidrolizi sırasında β -1,4-endoksilanaz ve yan zincirleri koparan enzimlerin aktif olduğu gözlemlenir. Asetil ksilan esteraz ve endoksilanaz arasındaki sinerjik etki asetil ksilanın hidrolizinde etkilidir. Asetik asit ksilan omurgasından asetil ksilan esteraz sayesinde ayrılır ve ksilan omurgası endoksilan için etkin hale getirilir. Bu sayede daha hızlı hidroliz meydana gelmektedir. Benzer şekilde, α -arabinofuranozidazların endoksilanazlara eklenmesi arabinoksilanların şekerleştirilmesini artırmaktadır.

α -D-Glukuronidazlar (EC.3.2.1.1): Ksilozun ve D-glukuronik asidin arasındaki α -1,2-glikozidik bağımlı hidrolizleyen enzimlerdir.

β -ksilozidazlar ve Endo- β -1,4 ksilanazlar glikozid hidrolaz (GH) enzim ailesine aittir. Glikozid hidrolazlar sınıflandırmada farklı ailelere ayrılır. Bazı ailedeki protein katlanmalarındaki aminoasit sekansları daha fazla korunduğu için klanlara ayrılmıştır. Endo-ksilanaz ailesini 5,7,8,10,11,23 ve 26 klanları oluşturur. Endoksilanazlar literatürde aile 10 (eskiden F olarak bilinirdi) ve 11 (eskiden G olarak bilinirdi) olarak tanımlanmıştır.

β -ksilozidazlar kendi içinde 3, 39, 43, 52 ve 54 glikozid hidrolazlar olarak beş klanda gruplandırılmışlardır. Aile 43 deki enzimler anomerik konfigürasyonu tersine çevirerek hidrolizi gerçekleştirirken; 3, 39, 52 ve 54 ailesindeki enzimler ksilooligomerlerin hidrolizini katalizler. CAZY veritabanına göre, 3, 39, 52 ve 54 klanları β -ksilozidazları tanımlamaktadır (Yang & Wyman, 2004).

1.20. Aile 39 β -ksilozidaz Yapısı

Thermoanaerobacterium saccharolyticum daki β -D-ksilozidaz yapısı aile 39 glikozid hidrolazı için model olarak kullanılmış ve tanımlanmıştır. β -D-ksilozidaz 3 farklı monomerlerin biraraya gelmeleriyle oluşmuştur. Bunlar; TIM makara katlanması (amino asit rezidü 15-357), 8 (β/α) bir katalitik etki alanı, β - sandviç domain (amino asit 1-14, 358-417, 449-500) ve küçük bir α -sarmal domain (418-448) tetrameridir. Enzimin aktif bölgesi D-ksilooligomerlerin üst tarafına bağlanır. Aktif bölgede Glu323 ve Glu323 aminoasitleri indirgeyici olmayan sırayı tanımak için anahtar rol oynar (Yang & Wyman, 2004).

1.21. Ksilanazların Aile 10 ve Aile 11 Adıyla Sınıflandırılması

Ksilanazın başka tipteki sınıflandırması aile 10 ve aile 11 olarak adlandırılmaktadır. Aile 10 daki ksilanazlar; düşük pH ve izoelektrik noktasına sahip endoksilanazlar olup büyük molekül ağırlığına sahip proteinlerdir (Biely vd., 1997; Derewenda vd.,1994). Bu sınıflandırmadaki ailenin mensubu enzimlerin kısa zincirli ksilo-oligosakkaritlere ve yüksek aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Biely vd., 1997). Ayrıca bu türdeki ksilanazların substrat özgüllüğü sadece ksilana değil selülozik gruplara karşı da aktivite göstermektedir. Aile 11 endoksilanazları ise yüksek pH ve izoelektrik noktasına sahip düşük ağırlıklı proteinlerdir. Bu sınıftaki enzimler gerçek ksilanazlar olarak bilinip uzun zincirli ksilooligosakkaritler üzerinde etkilidirler (Collins vd., 2005). Enzim sınıflandırma numarası EC.3.2.1.8'dir. CAZY gibi bilgi bankalarında yapılan taramalarda aile ;5, 7, 8, 16, 26, 43, 52 ve 62'de de ksilanaz aktivitesi görülebilmektedir. (Collins vd., 2005).

1.22. Aile 10 Endoksilanaz Yapısı

Thermoascus aurantiacus'taki termostabil ksilanazın kristal yapısı aile 10 ksilanazının modeli olarak kullanılmıştır. Bu sekiz büyük alfa heliks silindirin yanyana sekiz temel paralel β şeritlerden oluşan 32,5 kDa polipeptid zindirdir. Altı kısa heliks polipeptid zinciri buna ek olarak protein yapısına dağıtılmışır.

Disülfid bağı ve tuz köprüsüyle proteinin termostabilitesi desteklenir. Aile 10 klanın karakteristik bir özelliği olamamakla birlikte bazı ksilanazlarda sarmalın dördüncü pozisyonundaki prolin rezidülerinin etkili protein ambalajı oluşturdıkları bilinmektedir. Glutamat rezidülerinin aktif bölgesi (Glu 131 ve Glu 237) β 4 ve β 27 C terminal zincirlerine lokalize olmuştur. Molekülün şekli yan taraftan bakınca salata kasesini andırmaktadır. Molekülün alt yüzü esas olarak α - β katlanmalarından oluşmaktadır ve dar bir çapa sahiptir. α - β katlanmalarının olduğu alan büyük substratların bağlanma yarığını oluşturur. Bu enzim ailesinin ksilanı hidroliz etmesinin yanı sıra selüloz ve endoksilanaz aktivitelerine de sahip olduğunu göstermektedir (Natesh vd., 1999).

1.23. Aile 11 Endoksilanaz Yapısı

Thermomyces lanuginosus'un endoksilanazı model olarak aile 11 ksilanazını açıklamak için kullanılmıştır. 25 kD'luk globular proteini 585 bazçiftlik kodlama dizisi ve 17 Å'ü kapsayan iki β -katlansız oluşturur. Dış tabakada bulunan A katlanmasını polar ve yüksüz serin, treonin aminoasitlerini içeren antiparalel β iplikleri oluşturur. B katlanmasını; 9 tane antiparalel β -lif oluşturur. Ön kısmı aktif bölge oluşturucusuna sahipken arka kısmı katlanma A ile bağlanır ve enzimin hidrofobik çekirdeğini oluşturmaktadır. 10 aminoasitlik α -heliks A ve B katlanmalarının birleşme yerini oluşturur. Genel yapısı iki β -katlanma ve α -heliks parmaklara sahip olup avuç içindeki iki loop bölgesi baş parmak şeklinde görüldüğü için sağ ele benzetilmektedir. Yüklü amino asitlerin ve disülfid bağının eşit dağılımı proteinin termostabilitesine katkı sağlamaktadır. Aktif bölge yapısının aminoasitleri Glu 86 (nükleofil) ve Glu 178 (asit/baz) dir (Gruber vd., 1998).

1.24. Ksilanazların Bazı Uygulama Alanları

Biyoteknolojik potansiyeli yüzünden özellikle mikroorganizma kaynaklı ksilanolitik enzimler endüstriyel alanda ilgi odağı olmuştur. Kâğıt, kâğıt hamuru, gıda ve hayvan yemi gibi başlıca endüstri alanında çok büyük öneme sahiptir. Ksilanazlar ekonomik potansiyeli yüksek enzimler olup; şeker şurupları, çözücüler ve sıvı yakıtlarda genel olarak kullanılmaktadır. (Beg vd., 2001).

Ksilanazlar aynı zamanda tarımsal atıkların fermantatif ürünlere parçalanmasında, ligno-selülozik materyallerin dönüşümünde, bira kıvamı gelişiminde, meyve sularının berraklaştırılmasında, hayvan yemlerinin sindirilmesi gibi endüstriyel alanda önemli potansiyele sahiptir. Ksilanazların kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir:

Kâğıt hamurunda beyazlaştırma işleminde klor kullanımını azalmasını sağlar ve lignini kâğıt hamurunda ayırır. Bu yüzden endüstriyel uygulamada tercih edilir. Ksilanaz sayesinde kâğıt hamurunun su tutuşu ve fibrilasyon artarken çözünen hamurda ksilan selektifi giderimini artırır.

Tavuk etinin verimini arttırmada, çavdar temelli yemlere ksilanaz uygulanması sonucunda viskozite düşmüş bunun sonucunda yemden etkin şekilde yararlanılmış ve tavukta kilo artışı sağlanmıştır.

Ekmek kalitesinin arttırımı, ksilanazlarla birlikte amilazların kullanılmasıyla ekmek kalitesinde ve hacminde artış meydana gelmiştir (Maat vd., 1992).

Tarım ve gıda endüstrisinde, ksilan endüstri atıklarında bol bulunur ve ksilanaz bunu ksiloza dönüştürür (Rani & Nand, 1996). Bitki hücre duvarlarında firosterollerin yağ açılasyonunu ve glükolizasyonunu indükler.

Biyoyakıt üretiminde, mannanaz, ligninaz, ksilozidaz, glukanaaz, glukozidaz gibi enzimlerle birlikte ksilanazlar lignoselülozik materyallerin etanol ve ksilitol gibi yakıtlara dönüşümünü sağlar. Etanol üretiminde serbest şekerlerin üretilmesiyle karbonhidrat polimerlerinin depolimerizasyonu gerçekleşir. Bunun sonucunda etanol üretiminde pentoz ve heksoz şekerleri karışım fermantasyonunda kullanılır.

Ksilanolitik enzim sistemleri pektinolitik enzim sistemleriyle birlikte kenevir gibi lifli bitkilerde bulunan reçine benzeri ürünlerin arındırılmasını gerçekleştirir. Odun işlemede ksilanaz-pektinaz kombinasyonu kabuktan arındırma işlemlerinde de kullanılmaktadır (Beg vd., 2001).

1.25. Termofilik Ksilanaz Uygulaması

Özellikle ticari uygulamalarda biyoteknolojik potansiyeli nedeniyle, yaygın olarak mikroorganizmalardan üretilen ksilanazlar kullanılmaktadır. Aşırı sıcak ortamlar, çoğu canlı organizmanın yaşayamayacağı ancak termofilik organizmaların rahat büyüyebileceği şartlardadır. Mikroorganizmalar aşırı düşük ya da yüksek

sıcaklıklara, yüksek tuz konsantrasyonları ve aşırı pH aralığında yaşama kabiliyetine sahiptirler. Ektremofillerden üretilen ksilanazlar benzersiz özellikleriyle aşırı koşullara dayanabilir ve denatüre olmadan endüstriyel işleme tabi tutulabilmektedirler. Ayrıca azaltılmış kontaminasyon riski, iyileştirilmiş transfer hızı, düşük viskozite ve substratların yüksek çözünürlüğü nedeniyle de ekstremofilik mikroorganizma kaynaklı enzimler tercih edilme sebebidir. Endüstriyel termostabilite süreç koşulları altında biyokatalizörlerin etkin kalma sürelerini uzatabilir ve böylece maliyeti düşürür. Biyoteknolojinin yüksek talebi tercihen yeni biyokatalizörlerde protein mühendisliği, metabolomik, gen karıştırma ve genetik gibi yeni tekniklerin hızlı gelişimi ve yeni endüstriyel üretilen biyokatalizörlere dayalı süreçlerde ekstremofillerden yararlanılmaktadır. Termofilik ksilanazların çok çeşitli endüstriyel süreçlerde potansiyel uygulamaları sanayinin tüm sektörlerini kapsamaktadır. Bu nedenle endüstride kullanılan enzimlerin değerini keşfetmeyi amaçlayan araştırma çalışmaları çekici konulardır (Gul-Guven, 2011).

Termofilik ksilanazlar hamur için genellikle yüksek sıcaklık ve alkali pH değerlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyoteknolojik özellikleri nedeniyle biyoyakıt üretiminde de değerlidir. Biyokütlerde yüksek hemiselüloz içeriğini korumak ve maliyetleri azaltmak için etanol endüstrisinde hafif ön işlemler kullanılmaktadır. Yüksek biyoetanol üretimi ile şekerler ksilanazların takviyesi ile sakkarifikasyon sırasında indirgemeyi kullanılabilişliğini artırır (Chakdar vd., 2016). Termofilik ksilanazlar hayvan yemi endüstrisinde de yaygın olarak kullanılır. Tarımsal ön arıtmada ksilanaz içeren ürünler (hayvan yemi) ruminantlarda besin değerini artırır ve sindirime yardımcı olur.

1.26. Protein Mühendisliği

Ksilanazların biyoteknolojik uygulamaları, geniş bir pH ve sıcaklık aralığına sahip ısıl enzim preparatını gerektirir. İdeal enzim preparatının mevcudiyeti sınırlı olduğundan, protein mühendisliği çalışmalarının ksilanazlara uygulanması önem kazanmıştır. Protein mühendisliği aynı zamanda spesifik bir enzimin aktif bölgesini tanımlar ve bölgeye yönelik mutajenez tasarlayarak proteini yeniden yaratacak teknolojiyi sağlar. Enzimin aktif bölgesinin kimyasal modifikasyonu, X-ray kristalografik verileri ve bölgenin mutajenez ile tanımlanması, ksilanazların yapı-

fonksiyon korelasyonu ile ilgili temel bilgileri sağlamıştır (Karakuş, 2021). Yapılan çalışmalar, ksilanaz geninin enzimatik özellikler için spesifik manipülasyonunu ve protein mühendisliğinin temelini oluşturmuştur.

1.27. Enzim Üretiminde Rekombinant DNA Teknolojisi

Doğal olarak bir arada bulunmayan DNA moleküllerinin birleştirilerek oluşturulan yeni kombinasyona rekombinant DNA denir. Virüs ve bakterilerle yapılan çalışmalarla geliştirilen genetik teknikler ve nükleik asit biyokimyası metodunun birleştirilmesiyle rekombinant DNA teknolojisi oluşur (Klug & Cummings, 2003). Gen klonlama süreci rekombinant DNA teknolojisinin temelini oluşturur. Bu sürecin basamaklarını Klug ve Cummings (2003) şöyle sıralamıştır.

- Kaynaktan DNA izolasyonu
- DNA sırasına özgün olup bu diziyi tanıyıp kesen restriksiyon enzimleri küçük DNA fragmentlerini oluşturur.
- Taşıyıcı vektör yada molekül kesilmiş fragmentlerle birleştirilir ve bu yeni oluşan yapıya rekombinant DNA molekülü denir.
- Yeni oluşan rekombinant molekülü konakçının kendi DNA sııyla birlikte binlerce kopyasını oluşturur.
- Kopyalarını taşıyan konakçı hücre topluluğu oluşur.
- Rekombinant DNA konakçı hücrelerden izole edilebilir ve araştırma yapılabilir.
- Klonlanmış DNA transkripsiyondan sonra, mRNA'sı translasyona yönlendirilebilir, gen ürünü izole edilebilir ve araştırma için ya da ticari amaçlarla satılmak için kullanılabilir.

Bir genin klonlanması, büyük miktarda proteinin üretilmesi daha büyük bir tasarımda sadece ilk basamağı oluşturur. Asıl ilgilenilen konu genin kendisinden çok protein ürünüdür. Özellikle proteinin araştırma değeri olan, ticari ve tedavi edici özeliği varsa bu çalışmayı daha çok cazip hale getirir (Nelson & Cox, 2005).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan *Anoxybacillus ayderensis* (NCCB 100050), *Escherichia coli* DH5α ve *E. coli* BL21 (DE3) bakteri suşları, Su Ürünleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndaki bakteri kültürü koleksiyonumuzdan kolaylıkla temin edilebilmektedir. Kimyasal ve cihazlar: Luria Bertani (LB)-Broth, LB-Agar, Bakteriyolojik Agar (BA), D-ksiloz, İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid (IPTG), sığır serum albümini (BSA), glisin, hidroklorik asit (HCl), NaOH , potasyum sodyum tartarat, etil alkol ve dinitrosalisilik asit, Sigma-Aldrich, Almanya'dan temin edildi; lizozim, fosforik asit amonyum sülfat sodyum asetat, Tris, K₂HPO₄, KH₂PO₄, metal iyonları (AlCl₃, AgSO₄, SrCl₂, SnCl₂, MnCl₂, ZnSO₄, SbCl₃, CdCl₂, Co(NO₃)₂, NiCl₂, Pb(NO₃)₂, Bi₅O (Merck, Almanya), CuSO₄, Na₂MoO₄, BaCl₂, HgCl₂, FeCl₃, CrCl₃, CaCl₂, NaCl₂ ve MgSO₄), aseton, borik asit ve p-merkaptotanol; kanamisin, Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250, gliserol, TEMED, üre, dithiothreitol (DTT), Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi, PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (K182002), EcoRV kesim enzimi ve TriTrack Thermo Fisher Scientific, New England Biolabs, İngiltere'den Q5® yüksek kaliteli DNA Polimeraz (M0491S); Serva-ksilan; DEAE-Sepharose, Phenyl Sepharose 6 Sigma, pK11.1R vektörü-Novagen, pET-28a(+); Takara'dan T4 DNA Ligaz ve In-Fusion® HD Klonlama Kiti.

2.2. Ksilanazın Nitel Olarak Belirlenmesi

Ksilanlı Besiyeri: *Anoxybacillus ayderensis*'in ksilanaz aktivite varlığının belirlenmesi ve enzim üretimi amacıyla kullanılmıştır. (Gessesse, 1998).

Bileşimi	g/L
Pepton	5
Maya Özütü	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
K ₂ HPO ₄	1

NaCl	5
Ksilan	5
Agar-agar	15

Kongo Kırmızısı (%0.1) Çözeltisi: Katı besiyerinde ksilanaz aktivitesinin gösterilmesi için % 0.1'lik Kongo kırmızısı 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır (Voget vd., 2006).

NaCl Çözeltisi: Petri kutusunda ksilanaz aktivitesini belirlemek için ve aktivite rengini görünür hale getirmede 1 M NaCl yıkama solüsyonu olarak kullanılmıştır.

Gece Kültür Ekimi: Biyogüvenlik kabini içerisinde *Anoxybacillus ayderensis* stoğundan tek koloni seçilip 10 mL hacimdeki LB besiyerine ekim yapılmıştır. Daha sonra 55°C'de 24 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde çoğalmaya bırakıldı.

İnkübasyon: 24 saat boyunca üreyen ön kültürlerden 20 µl alınıp yeni LB + %1 ksilan eklenerek hazırlanan katı besiyerlerine ekimi yapılmış ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir (55°C).

Boyama: İnkübasyonu tamamlanan kültürlerin üzeri %0,1' lik kongo kırmızı çözeltisi ile kaplanmış ve 15 dak. inkübe edilmiştir.

Yıkama: İnkübasyon sonrasında boyadan sonra petri yüzeylerine 1 M NaCl çözeltisi eklenmiş ve tekrar 15 dak. inkübe edilmiştir. Etraflarında sarı hidroliz zonu bulunan suş ksilanaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Voget vd., 2006).

2.3. Genom Çapında Analiz Yapılarak *A. ayderensis*'te Olası Ksilanaz Genlerinin Belirlenmesi

Ksilanazlar glikozit hidrolazlar olup (GH'ler) ve aminoasit dizilerine göre GH10 veya GH11 ailesine aittir. Bu çalışmada, *A. ayderensis*'te GH10 ve GH11 familyalarına ait ksilanaz genleri araştırılmıştır. İlk adım olarak CAZY veritabanında, anahtar kelimeler olan ksilanaz ailesini belirten GH10 ve GH11 terimleri kullanılarak tarama yapıldı (Drula vd., 2022) (<http://www.cazy.org/>). Tarama sonucunda, *Anoxybacillus* türleri ile yakından ilişkili türler olan *Geobacillus* sp.'nin GH10 (GenBank ABI49937.2) ve GH11 (GenBank AAB72117.1) familyalarına ait ksilanaz genleri CAZY'den tespit edildi (Drula vd., 2022) (<http://www.cazy.org/>). Daha sonra

elde edilen genlerin protein dizileri Fasta formatında indirildi. Aynı zamanda, *A. ayderensis*'in proteomu Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) Genomundan indirildi (<https://usegalaxy.eu/>). GH10 ve GH11 alanlarını içeren proteinleri tanımlamak için, GH10 ve GH11 ailelerine ait *Geobacillus* türlerinden ksilanaz protein dizileri, Galaxy Europe veri tabanı kullanılarak *A. ayderensis*'in tüm proteomuna karşı tarandı (Paysan-Lafosse vd., 2022) (<https://usegalaxy.eu/>). GH10 ve GH11 alanlarının potansiyel genleri, *Anoxybacillus ayderensis*'te tespit edildi ve bu genin varlığı NCBI'da Korunmuş Alan Araştırması (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), InterPro (Paysan-Lafosse vd., 2022) ve Prosite veritabanlarında (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) doğrulandı (Christian, 2013). Bu domain yapısı TBtools yazılımı kullanılarak görselleştirildi (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>). Belirsiz bir dizilime sahip veya GH10 ve GH11 dizilimine olmayan diğer protein ailelerinden gelen protein dizileri elimine edildi. Son olarak, kalan protein dizileri *Anoxybacillus* GH10 ve GH11 ailelerine ait olarak kategorize edildi ve daha sonraki araştırmalar için kullanıldı. Enzimlerin gen dizilerinde sinyal peptid sekansının varlığı; SignalP sürüm 5.0 kullanılarak enzimin hücre içi veya hücre dışı olduğunu belirlemek için kullanıldı (Armenteros vd., 2019). (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>).

2.4. *A. ayderensis xyn* Gen Dizisinin Belirlenmesi ve Enzimin Modellenmesi

Başlangıç ve stop kodonları da dahil olmak üzere *xyn* gen dizisinin primerleri, NCBI Primer3 programı ile tasarlanmıştır (Untergasser vd., 2012). (<https://primer3.ut.ee/>). Primerler forward ve reverse olarak 329aaSekXyn-F (5'-ATGATTCCGTCGTTACGTGAAGTG-3') ve 329aaSekXyn-R (5'-TTAACATGTACAGACTTTCCAAAAAGC-3') olarak tasarlandı. *A. ayderensis*'in genomik DNA'sı, üretici firmanın talimatlarına göre PureLink™ Genomik DNA Mini Kiti (K18200) ile üretici firmanın önerdiği protokol uygulanarak izole edildi. DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu SPECTROstar Nano (BMG Labtech) cihazı kullanılarak belirlendi. PCR (polimeraz zincir reaksiyonu), aşağıdaki bileşenlerle birlikte:

- 1 µL (329aaSeqXyn-F ve 329aaSeqXyn-R) her bir primerden,
- 0.75 µL dNTP (10 mM),

- 0,25 µL 5X Q5 Reaksiyon Tamponu,
- 0.25 µL Q5 High-Fidelity DNA Polimeraz (M0491S, NEB) ve
- 2.5 µL Kalıp DNA (20 ng/µL),
- Toplam 25 µL reaksiyon hacminde olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi.

PCR şartları Karaoglu ve arkadaşlarının (2013) belirlediği inkübasyon şartlarına göre belirlendi. *A. ayderensis*'in *xyn* gen bölgesinin amplifikasyonundan sonra, 3 µL 6x TriTrack DNA yükleme boyası (Thermo, R1161) ile karıştırılmış PCR ürünü, 45 dakika boyunca 90 V boyunca agaroz (%0.8 w/h) jel elektroforezi (BioRad USA) üzerine yüklendi ve GelDoc Go Jel Görüntüleme Sistemi (BioRad, ABD) kullanılarak tespit edildi. Amplifiye edilmiş *xyn* geni, high fidelity enzim nedeniyle küt uçlarla elde edildi. Bu nedenle, üretici firmanın prosedürüne göre, PCR ürünü ve pK11.1R vektörü EcoRV (EcoRV restriksiyon enzimi Thermo Fisher) tarafından kesildi. Kesilmiş ürünler 3 µL 6x TriTrack DNA yükleme boyası (Thermo, R1161) ile karıştırıldı ve agaroz (%0.8) jel elektroforezine yüklendi. 45 dakikalık jel elektroforezi yürütmesinden sonra, gen ürünü ve pK11.1R vektörü, FavorPrep GEL/PCR Saflaştırma Kiti ile agaroz jelden izole edildi. Gen ürünlerinin saflığı ve konsantrasyonları SPECTROstar Nano Mikroplaka Okuyucu (BMG Labtech) ile belirlendi. Daha sonra vektör ve gen ürünü, T4 DNA Ligase 2011A (Takara) kullanılarak gece boyunca 4 °C'de ligasyonla birleştirildi. Ligasyon ürünleri CaCl₂ yöntemi ile *E. coli* DH5α'ya konakçı hücreye ısı şoku yöntemiyle yani 43 derecede 30 saniye ve sonrasında buzda 5 dakika bekletilerek rekombinant aktarıldı ve kanamisinli petride gece boyunca 37 °C'de inkübe edildi. LB ortamı, bakterileri büyütmek için 100 mg/L spektinomisin ile desteklendi. Daha sonra petriden izole edilen plazmitler saflaştırılıp konsantrasyonu belirlendi. Klonlama işleminin performansını değerlendirmek için koloni PCR kullanıldı ve rekombinant plazmit, amplifiye edilmiş *xyn* geninin varlığını doğrulamak için Macrogen (Seul, Kore) tarafından dizilendi.

Elde edilen, *A. ayderensis* ksilanazının amino asit sırası kullanılarak SWISS-MODEL programı kullanılarak enzim modellendi ve olası üç boyutlu yapısı ortaya çıkarıldı (Waterhouse vd., 2018). Üç boyutlu yapısı daha önce karakterize edilmiş ve modellenmiş en yakın tür olan *G. stearothermophilus* ixt6'nın (ABI49937, PDB:1N82) ksilanazı, *A. ayderensis*'in ksilanazını modellemek için bir şablon olarak kullanılmıştır. Modellenen enzim ile substratı olan ksilan molekülü, AutoDock Vina programı

kullanılarak UCSF CHIMERA programı aracılığıyla (Genişletilebilir Moleküler Modelleme Sistemi) (Pettersen vd., 2004) moleküler docking yapılarak enzim substrat ilişkisi açığa çıkarıldı (Eberhardt vd., 2021).

2.5. Enzimin Fiziksel Parametrelerinin Değerlendirilmesi

ExPASy-ProtParam uygulaması; amino asitlerin sayısı ve bileşimi, moleküler ağırlık (MW), teorik izoelektrik nokta (pI), kararsızlık indeksi, alifatik indeks ve hidrofobikliğin genel ortalaması dahil olmak üzere bakteriyel ksilanazın olası fizyokimyasal parametrelerini analiz etmek için kullanıldı (Gasteiger vd., 2005).

2.6. *A. ayderensis* xyn Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

A. ayderensis'in hücre içi ksilanazını kodlayan (329aa modeli) doğrulanmış gen bölgesi, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlandı. Bu çalışmada *xyn* genini pET-28a(+) vektörüne klonlamak için In-Fusion Snap Assembly sistemi kullanıldı. Bu amaçla pET-28a(+) ekspresyon vektörünü liner hale getirmek için primer tasarımı Takara primer tasarım web sitesi olan uygulama kullanılarak tasarlanmıştır (<https://www.takarabio.com/learning-merkezleri/klonlama/primer-design-and-other-tools>). pET-28a(+) vektörünü (5368 bp) PCR ile liner hale getirmek için, 40 kb'ye kadar PCR ürünlerinin amplifikasyonuna izin veren iProof HF Master Mix (1725310, Biorad) kullanıldı. Tasarlanan primerler şu şekildedir; pET28aLrnz-F (5'-GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAA-3') ve pET28aLrnz-R (5'-TAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGA-3'). PCR reaksiyonu: 1 µL her primer (pET28aLrnz-F ve pET28aLrnz-R), 12.5 µL iProof HF Master Mix (1725310, Biorad) ve 2.5 µL kalıp DNA (20 ng/µL) olacak şekilde toplam 25 µL reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. pET-28a(+) ekspresyon vektörü; 30 saniye boyunca 98°C'de ilk denatürasyon; 34 döngü (94°C'de 10 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye annealing, 72°C'de 2,5 dakika uzatma); ve son uzatma 72°C'de 2 dakika bekletilerek PCR ile vektör liner hale getirildi. *Xyn* geninin amplifikasyonu için tasarlanan primerler *XynExsp-F* (5'-TTTCGGGCTTTGTTATTAACATGTACAGACTTCCAAAAA-3') ve *XynExsp-R* (5'-AGAAGGAGATATACCATTCGTCGTTACGTGAAGTGT-3') olarak adlandırılmıştır. PCR, her bir primerden 1 µL (*XynExsp-F* ve *XynExsp-R*), 12.5 µL

iProof HF Master Mix (1725310, Biorad) ve 2.5 µL kalıp DNA (20 ng/µL) kullanılarak toplam 25 µL reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Xyn geni, aşağıdaki program kullanılarak PCR ile amplifiye edildi: 30 saniye boyunca 98 ° C'de ilk denatürasyon; 34 döngü (94 °C'de 10 saniye denatürasyon, 60 °C'de 30 saniye annealing, 72 °C'de 1 dakika uzatma); ve son uzatma 72 °C'de 2 dakika boyunca. PCR'yi takiben, liner vektör ve amplifiye edilmiş xyn geni agaroz jel elektroforezinde (%0.8) yürütüldü. Daha sonra PCR ürünleri, FavorPrep™ GEL/PCR Saflaştırma Kiti (FAGCK 001) kullanılarak agaroz jelden izole edildi. İnsert DNA ve vektör miktarı, ligasyon reaksiyonunda In-Fusion molar oran hesaplayıcısı (<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools/in-fusion-molar-ratio-calculator>) ile hesaplandı. Xyn geni pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmak için üretici firmanın prosedürüne göre Takara Company (In-Fusion Snap Assembly® klonlama kiti, 638948, Takara) tarafından geliştirilen In-Fusion HD Klonlama sistemi kullanıldı. Ligasyon ürünleri (pET-28a(+) + xyn) ilk olarak Sambrook (1989)'dan modifiye edilmiş ısı şoku yöntemi ile *E. coli* DH5α suşuna aktarıldı ve plazmit izole edildikten sonra genin doğru klonlandığını doğrulamak için rekombinant plazmit Sanger ile dizilendi. Daha sonra rekombinant plazmit (pet28a(+) + xyn) *E. coli* DH5α'dan izole edilerek ısı-şok yöntemi ile *E. coli* BL21(DE3)'e aktarıldı. Rekombinant plazmit (pET-28a(+) + xyn) pETAAyXYN olarak adlandırıldı.

2.7. Enzim Üretimi

E. coli BL21/ pETAAyXYN sistemi ile enzim üretilmiştir. Daha sonra enzimin saflaştırılmasında kolon kromatografi yöntemleri kullanılmıştır. Üretilen enzim kaba ekstrakt olarak elde edildikten sonra sıcaklık uygulaması, iyon kolon kromatografisi ve hidrofobik kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmaya çalışılmıştır.

2.8. pETAAyXYN Enziminin Rekombinant Üretimi

Steril Kabin içinde *E. coli* BL21/ pETAAyXYN klonlarından koloni seçildikten sonra 0,5 mM konsantrasyonlu 100 µl kanamisinli besiyerinde 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gece kültürü sonrasında dilüsyon yapılarak (O.D₆₀₀'si 0,1) kültür canlandırılmıştır. Taze kültürle yaklaşık iki saat boyunca O.D₆₀₀'si 0,7-0,8

oluncaya kadar yine 37°C’de inkübe edilmiştir. Bu değere yaklaştığında steril son konsantrasyonu 1 mM olan IPTG eklenip 4 saat indüklenmesi sağlanmıştır.

İnkübasyondan sonra kültür yüksek devirli santrifüj kullanılarak 9000 rpm’de 10 dk boyunca çöktürülmüştür. Süpernatant ortamdan uzaklaştırılıp hücre pelletiyle devam edilmiştir. Pellet pH’sı 7 olan 12 ml 100 mM fosfat tampon içinde çözölmüştür. Sonra bu çözelti içine son konsantrasyonu 1 µg/mL olacak şekilde lizozim eklenip 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında sonikatör cihazıyla (Sonics-Vibra cell) 2 dakikada 1 devir %20 güç ile hücreler patlatılmıştır. Patlatılan hücreler 15 dk 14.800 rpm’de santrifüj edilmiştir. Deneylere süpernatantla devam edilmiştir. Geri kalan hücre özütü aktivite ve saflaştırma işlemleri için kullanılmıştır.

2.9. Isı Dejenerasyonu Uygulaması

Anoxybacillus ayderensis kaynaklı ksilanaz termofilik karakterli bir enzimdir. *E. coli* BL21/ pETAAyXYN sistemi ile üretilen ksilanaz termofilik protein karakterdedir. Ekspresyon sırasında elde edilen proteinler yalnızca rekombinant ksilanazlar olmayıp, *E. coli* /BL21 hücresine ait proteinleri de içermektedir. Bu taşıyıcı kaynaklı proteinlerin büyük çoğunluğu mezofilik karakter taşımaktadır. Ortamda hem termofilik hem de mezofilik kayanıklı proteinler bulunduğu için, konakçı kaynaklı proteini uzaklaştırmada ısı şoku uygulaması yararlı olacaktır. Ayrıca bu ısı uygulamasından termofilik karakterli ksilanaz da çok az miktarda etkilenmektedir. Saflaştırmanın birinci basamağını bu ısı şoku uygulaması oluşturmaktadır. Hücre özütü 65°C’de 10 dakika ısı şokuna maruz bırakılarak mezofilik karakterdeki proteinler denatüre edildi. Denatürasyon sonrasında hücre özütü 14.800 rpm’de 20 dk santrifüj edildi ve ortamdan uzaklaştırıldı. Kalan enzim özütüyle enzim aktivitesi ve SDS-PAGE deneyleri yapıldı. Kalan özüt ile iyon değişim kromatografisi aşamasına geçildi.

2.10. İyon Değişim Kolon Kromatografisi

Bu tekniğin temel prensibi proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrılmasını kapsamaktadır. İyon değişim kolon kromatografisi uygulaması için dikey cam kolon kullanıldı. Kolon matriksi olarak pH’sı 7 fosfat tamponu ile dengelenmiş DEAE-Sepharose fast flow (Sigma) tercih edildi. Bu kolonda negatif yüklü proteinlerin

kolona bağlanması hedeflendi. Tampon çözelti olarak pH'ı 7 olan 100 mM çözelti kullanılmıştır. İyon değişim kromatografisi deneyi için Biologic Lp System (Bio-Rad) cihazı kullanılmıştır. Programda şu şekilde; kolonun tamponla dengeye gelmesi (pH'ı 7 olan 100 mM fosfat), enzim özütünün kolona yüklenmesi, gradient NaCl köprüsü (pH'ı 7 olan 100 mM fosfat) ve son olarak 1 M NaCl ile kolonun temizlenmesi strateji uygulandı.

Isı şoku sonrası enzim özütü ile kolon akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde protein geçişi sağlandı. Proteinler kolona yüklendikten sonra tutunmayan proteinlerin ortamdan uzaklaşması için kolondan tampon çözelti geçirildi. Sonrasında 0-0,6 M NaCl konsantrasyonlu çözelti ile tuz köprüsü oluşturuldu. Ve program sonunda 1 M NaCl kolondan geçirilip temizlendi. Fraksiyondaki her bir tüpte 3 ml olacak şekilde proteinler yük dengesine göre ayrılmış oldu. Bu fraksiyondaki ksilanazlar da ksilanaz aktivitesi yapılarak bulundu. Bulunan ksilanazlar bir tüpte birleştirilerek aktivite ve protein miktarı deneyleri yapıldı ve daha sonraki saflaştırma işlemine geçildi.

2.11. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

Bu yöntemin prensibi matrikse bağlı hidrofobik yan zincirler ile proteinlerin oluşturduğu hidrofobik etkileşime dayanmaktadır. Durgun matriks polimere bağlı ufak yüksüz (non-polar) gruplar içermektedir. Bu yöntemin amacı hidrofobisitelerine göre proteinleri ayırmaktır. Proteinlerin kolonla etkileşim derecesine göre farklı zamanlarda kolondan ayrılmaları gerekmektedir. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi için Biologic Lp System (Bio-Rad) cihazı kullanılmıştır. Yine iyon değişim kolon kromatografisinde kullanılan kolon kullanılmıştır. Kolon malzemesi olarak phenyl sepharose fast flow önceden tamponla birlikte degaze edilmiştir. Kolon pH'sı 7 olan 1,3 M amonyum sülfat içeren 100 mM çözelti ile dengeye getirilmiştir. Daha önce iyon kromatografisinde saflaştırılan enzim 2,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren tampon çözelti ile aynı bire bir oranda karıştırıldı. Enzimin de amonyum sülfat konsantrasyonu 1,3 M'a ayarlanmış oldu. Cihazda; kolonun dengeye gelmesi, enzim özütünün kolona verilmesi, 0-1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradient köprüsü ve kolonun temizlenmesi şeklinde program akışı kullanılarak ilerlendi.

Enzim özütü kolona yüklendiğinde yüksek tuz $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ konsantrasyonlu çözelti ile proteinlerin matrikse bağlanmasını sağlamış oldu. Bu akış

gerçekleştirildikten sonra kademeli olarak kolonun tuz ((NH₄)SO₄) konsantrasyonu 1,3 M 'dan 0 M'a indirildi. Fraksiyondaki tüplerde akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde tampon çözelti toplandı. 280 nm'deki absorbans değerleri alınarak özellikle bu nm'de yüksek pik gösteren örneklerde enzim aktivitesine bakıldı. Ksilanaz aktivitesi bulunan tüpler birleştirilerek protein miktarının belirlenmesi ve diğer biyokimyasal analizlerin yapılması için bir araya toplandı.

2.12. Biyokimyasal Çalışmalar

2.12.1. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarının sayısal olarak belirlenmesinde hassas ve genellikle de çok kullanılan Bradford (1976) yöntemi kullanıldı. Yöntem Coomassie Brilliant Blue G250'nin pozitif yüklü proteinlere bağlanmasına dayanır. Bu boyanın normal absorbans değeri 470 nm olup kırmızı renktedir. Proteinlere bağlandıktan sonra maviye dönüp 595 nm'de absorblanır. Bu yöntemin hassasiyeti 1 ile 100 µg arasındadır (Bradford 1976).

1 Lt Bradford çözeltisi hazırlamak için %95'lik etanolde 100 mg Coomassie Brilliant Blue çözülerek sonrasında %85'lik 50 mL fosforik asit eklenerek son hacim 1000 ml ye tamamlandı. Bu çözelti filtre kağıdından geçirildi. Standart grafik oluşturmak için 1 mg/ml'lik BSA (Sığır Serum Albümin) hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi için 1'den 500 µg'a kadar BSA içerecek şekilde reaksiyonlar hazırlandı. BSA'nın üzerine 5 ml Bradford boyası eklenip 15 oda sıcaklığında bekledikten sonra 595 nm'de ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler Xmark Microplate Spectrophotometer (BioRad) cihazı ile gerçekleştirildi. Standart grafikten protein miktarı µg / µL cinsinden tayini yapıldı.

2.12.2. Ksilanaz Aktivite Deneyi

DNS Metodu: DNS metodu selüloz, alfa-amilaz, ksilanaz gibi enzimlerin katalizi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemede kullanılan yöntemdir (Visvanathan vd., 2016). İndirgen şekerlerde serbest karbonil grupları bulunur. Bütün monosakkaritler ile bazı disakkaritler indirgeyici şekerler olduğu bilinmektedir (Xiao, vd., 2006). İndirgeyici şekerlerle 3,5-DNS reaksiyona girdiğinde turuncu renkte 3-

amino-5 nitrosalisilik asit meydana gelir. Ksilan hidroliz edildiğinde ksiloz monosakkaritinde indirgen şekerler ortamda bulunur. Açığa çıkan ksilozun miktarı da DNS yöntemiyle belirlenmiştir.

DNS çözeltisi hazırlanırken; 1 M Potasyum sodyum tartarate hazırlanıp, 1 g DNS ile birlikte 50 ml distile suda çözündü. 20 ml NaOH ve 30 g Rochelle tuzu eklendi. Son olarak distile su kullanılarak 100 ml ye tamamlanmıştır (Tester R.F. vd. 2006)

Ksilanaz aktivitesi tayini için enzim özütü ile substrat reaksiyon tamponu içerisinde;

- 300 µl (%1'lik ksilan 6 mg/ml'lik konsantrasyonda (beech wood)) substrat,
- 100 µl enzim, (enzim miktarının seyreltik ya da yoğun olmasına göre değişken)
- 100 µl buffer (fosfat tamponu pH: 7) olacak şekilde hazırlanmıştır.

Bu karışım 30 dk 65 °C'de TS-100C (Biosan) termoshaker cihazında 500 rpm'de sallanarak inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon sonrasında örnekler buz üzerine alınarak enzim aktivitesinin durdurulması sağlandı. Reaksiyon sonucunda tüplerin içerisinde hidroliz sonucu açığa çıkan ksiloz miktarını ölçmek için DNS metodu kullanıldı. Reaksiyon sonucu oluşan ürün üzerine 750 µl DNS çözeltisi eklenerek 98 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Xmark Microplate Spectrophotometer (BioRad)' da 550 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Bir dakikada 1 µmol ksiloz üreten enzim miktarı 1 ünite olarak kabul edildi. Açığa çıkan ksiloz miktarı yine aynı cihazda hazırlanan ksiloz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Ksilanaz aktivitesi, ksilanın hidroliziyle açığa çıkan ksiloz miktarına göre µmol/dakika cinsinden hesaplandı.

Ksiloz Standardının Belirlenmesi: Ksilanazın aktivitesini belirlemek için DNS metodu boyama yöntemi kullanılarak kütüphane oluşturulmuştur. Bu kütüphane ksiloz standardının spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. %1'lik ksilan stoğu hazırlanarak farklı konsantrasyonlardaki ksilozun aktivitelerini hesaplamak için standart grafiği oluşturulmuştur. Bu standart grafiği X-Mark mikroplate spektrofotometre (bioRad) cihazına kütüphane olarak yüklenmiştir. Bütün ksilanaz aktivite deneyleri bu standart grafiği üzerinden hesaplanmıştır. DNS metoduna göre 550 nm dalga boyunda ölçümler alınarak standart grafik belirlenmiştir.

2.12.3. pETAAYXYN'nin Optimum Sıcaklığı

pETAAYXYN ile üretilen enzimlerin en iyi çalıştığı sıcaklık aralığını bulmak için %1'lik ksilan konsantrasyonlu substrat olan ve pH'sı 7 olan tampon çözeltide (100 mM fosfat tamponu) reaksiyonlar gerçekleştirildi. Enzimin en yüksek çalıştığı sıcaklığı belirlemek için 5°C'lik farkla 35'ten 100°C'ye kadar olan sıcaklıklarda 30 dakikalık bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası ksilanazın aktivitesi DNS yöntemiyle belirlendi. Bağlı aktivite (%) - sıcaklık grafiği çizilerek enzimin optimum sıcaklık değeri relatif aktivite olarak belirlendi.

2.12.4. pETAAYXYN'nin Optimum pH'sı

pETAAYXYN'nin en iyi aktivite gösterdiği optimum pH değerini bulmak amacıyla farklı pH aralıklarındaki tamponlar hazırlandı. Bu tampon çözelti aralıkları; 100 mM sitrat tamponu pH (3-6), 100 mM fosfat tamponu pH (6- 7,5), 100 mM Tris-HCl tamponu pH (7,5-8,5), 100 mM glisin tamponu pH (8,5-10) olacak şekilde hazırlandı.

Tüm pH aralıkları için enzimin aktivitesinin ortalaması alınarak %1 konsantrasyonlu ksilan ile son hacmi tampon çözeltiyle 500 µl'ye tamamlanmasıyla reaksiyon hazırlanmıştır. Reaksiyon optimum sıcaklıkta 30 dk inkübasyonda gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda reaksiyon buza alınarak durdurulmuştur. DNS metoduyla ulaşılan veriler kullanılarak pH- bağlı aktivite (%) grafiği çizilmiştir ve enzimlerin optimum pH değeri relatif aktivite olarak belirlenmiştir.

2.12.5. pETAAYXYN'nin Kinetik Parametreleri

pETAAYXYN'nin K_m ve V_{max} verilerinin belirlenebilmesi için enzim miktarı sabit tutularak ve substrat konsantrasyonu değiştirilerek bir dizi reaksiyonlar ile aktivite tayinleri yapıldı. Bunun için %2'lik stok çözeltiden 0.5- 16 mg/ml aralığındaki ksilan konsantrasyonları, pH'sı 7 olarak hazırlanan tampon çözelti ile tamamlanarak 65 °C'de aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Ksilanaz aktivitesi için açığa çıkan ksiloz miktarı µmol/dk cinsinden hesaplanarak belirlendi. En yüksek aktivite gösterdiği substrat konsantrasyonu, Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri, katalitik etkinlik değerleri ve turnover sayısının belirlenmesinde OriginPro v. 9.8.2.200 (2021) isimli analiz programı kullanıldı.

2.12.6. pETAAyXYN'nin Isıl Kararlılığı

E. coli BL21 pETAAyXYN'nin ısı kararlılığını tespit etmek için elde edilen enzim özütleri 1 saat boyunca 10'ar derece artışla 30'dan 100°C'ye kadar olan sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Daha sonra inkübe edilen enzim özütlerindeki kalan aktiviteyi belirlemek için belirli miktarda enzim alınarak pH'sı 7 olan tampon çözeltide %1 ksilan varlığında 500 µL nihai hacimde ve 65°C'de 60 dk boyunca reaksiyonlar gerçekleştirildi. Sonrasında ksilanaz aktivitesine bakılıp ve enzimin kalan aktivitesi hesaplanmıştır. Yine aynı koşullarda +4°C de bekletilen ksilanazın aktivitesi %100 kabul edilerek İnkübasyon Zamanı-Kalan aktivite (%) grafiği çizildi.

2.12.7. Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Ksilanaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile AlCl₃, AgSO₄, SrCl₂, SnCl₂, MnCl₂, ZnSO₄, SbCl₃, CdCl₂, Co(NO₃)₂, NiCl₂, Pb(NO₃)₂, Bi₅O(NO₃)₄, CuSO₄, Na₂MoO₄, BaCl₂, HgCl₂, FeCl₃, CrCl₃, CaCl₂, NaCl₂, MgSO₄ gibi iyonların klorür ve sülfat tuzlarıyla reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 1, 5 ve 10 mM olacak şekilde optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı ve bu iyonların enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlendi. Enzim özütünden belirli miktarda enzim alınarak pH'sı 7 olan tampon çözeltide %1 ksilan varlığında ve metal iyonlarıyla 500 µl nihai hacimde olacak şekilde 65°C'de 30 dk reaksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra aktivitesi bittikten sonra reaksiyon durdurulması için buza koyuldu. Hemen takibinde 750 µl DNS eklenerek 100°C'de 10 dk bekletilen ksilanazın spektrofotometrik ölçümüne geçildi. Enzimlerin metal iyonsuz aktivitesi (enzim, buffer, subsrattan oluşan reaksiyon) %100 kabul edilerek metal iyonlarıyla reaksiyon sonucu oluşan konsantrasyonların Metal iyonu-% bağlı aktivite grafiği çizilerek belirlendi.

2.12.8. Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Organik Maddelerin Etkisi

Ksilanaz aktivitesi üzerine bazı organik maddelerin etkisini incelemek amacı ile amonyum sülfat, borik asit, üre, sodyum sitrat, edta, sds, metanol, etanol, gliserol, aseton, twen-80, dtt, b-merkaptotanol gibi maddelerin reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 1, 5, 10 mM ve %1, %5, %10 olacak şekilde optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Enzim özütünden belirli miktarda enzim alınarak pH'sı 7 olan

tampon çözeltide %1 ksilan varlığında ve organik madde 500 µl nihai hacimde olacak şekilde 65°C’de 30 dk reaksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra aktivitesi bittikten sonra reaksiyon durdurulması için buza koyuldu. Hemen takibinde 750 µl DNS eklenerek 100°C’de 10 dk bekletilen ksilanazın spektrofotometrik ölçümüne geçildi. Bu organik maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkileri, enzimlerin organik madde ilavesiz aktivitesi (enzim, buffer, substrattan oluşan reaksiyon) enzim %100 kabul edilerek bağıl aktivite grafiği çizilerek belirlendi.

2.12.9. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Proteinlerin ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE yöntemiyle belirlenmeye çalışılmıştır. Sds-Page jel elektroforezi jeli için %12’lik ayırma ve %5’lik yükleme jeline ihtiyaç duyulmuştur. Bu jeli hazırlarken aşağıdaki protokol göz önüne alınarak yapılmıştır. (Tablo 3)

Tablo 3. SDS-PAGE jeli bileşenleri			
Bileşenler	Ayırma jeli (5 mL %12’lik)	Yükleme jeli (%5’lik)	jeli (2mL)
H ₂ O	1600 µL	1400 µL	
%30 Akrilamid	2000 µL	330 µL	
1.5 M Tris -HCl, pH 8.8	800 µL	-	
1 M Tris -HCl, pH 6.8	-	250 µL	
%10 Amonyum persülfat	50 µL	20 µL	
TEMED	2 µL	2 µL	

SDS-PAGE e uygun hazırlanan jel kaseti için, ayırma jeli olarak %30’luk akrilamid kullanılmıştır. Cam plakların arasına bu jel eklenip üstüne taraklar eklenip polimerize olması için en az 30 dk beklenilmiştir. Bu işlem üst jel içinde yapılmıştır. Daha sonra taraklar çıkarıldıktan sonra protein örnekleri yüklenmiş ve jel kasetinin içinde bulunduğu tankın hem için hem de dışına protein yürütme solüsyonu eklenmiştir. SDS yürütme tamponu için; 7,5 gr glisin, 1,5 gr Tris HCl, 500 ml saf su 5 ml %10 oranında SDS kullanılmıştır. Yürütme boyasında ise ; 400 µl %10’luk SDS, 125 µl 1 M TrisHCl pH 6,8, 200 µl gliserol, 100 µl β-merkaptoetanol, 200 ul gliserol, 50 µl bromofenol blue kullanılarak hazırlanmıştır. Protein örneklerinden 20 ve yürütme boyasında 20 µl olacak şekilde alınıp 100 °C’de dentürasyona bırakılmıştır.

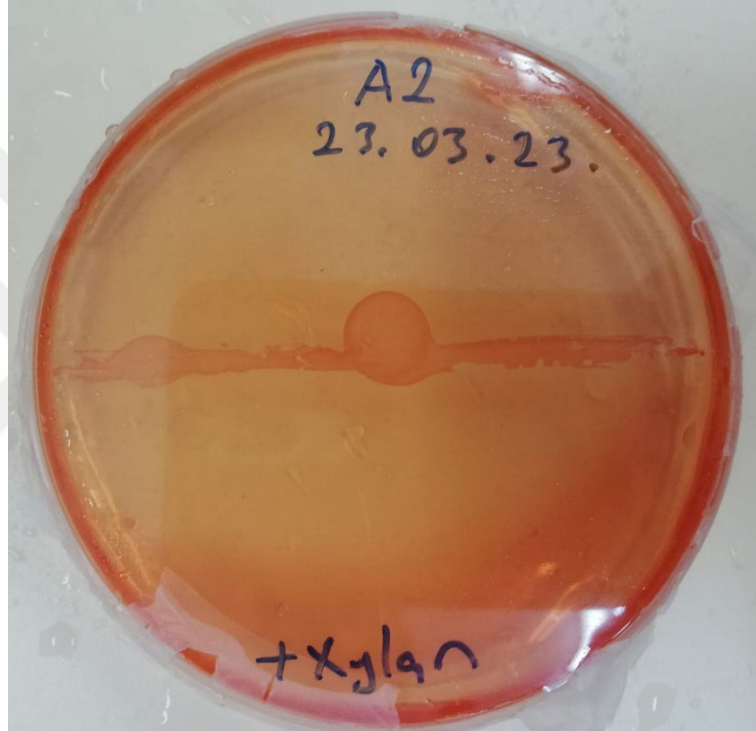
Bu işlem sonrasında reaksiyon alınıp kasette kuyucuklara yüklenmiştir. Daha sonra sistem güç kaynağına bağlanarak 50 Ma, 100 W'da 110V sabit voltaja ayarlanıp 3 saat yürütülmüştür. Yürütme işlemi bittikten sonra jel boyama işlemine geçildi. 0,25 gr Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml distile su içeren boyama çözeltisi içinde 1 saat bekletildi. Bu boyanın jelden uzaklaşması için iki ayrı solüsyonda (yıkama I; 10 ml asetik asit, 50 ml metanol, 40 ml distile su, yıkama II; 10 ml asetik asit, 7,5 ml metanol, 82,5 ml distile su) birer saat bekletildi. Daha sonra karanlık ortamda bırakıldı.



3. BULGULAR

3.1. *A. ayderensis*'in Ksilanolitik Aktivitesi

Petri testi, ksilanlı besiyeri ortamında *A. ayderensis*'in ksilanaz aktivitesini gösteren net bölgeler göstermiştir (Şekil 4). Deney sonucunda, bakteri kültürünün etrafında oluşan sarı zonun varlığı *A. ayderensis*' in ksilanaz üretimine sahip olduğunu nitel olarak göstermiştir.



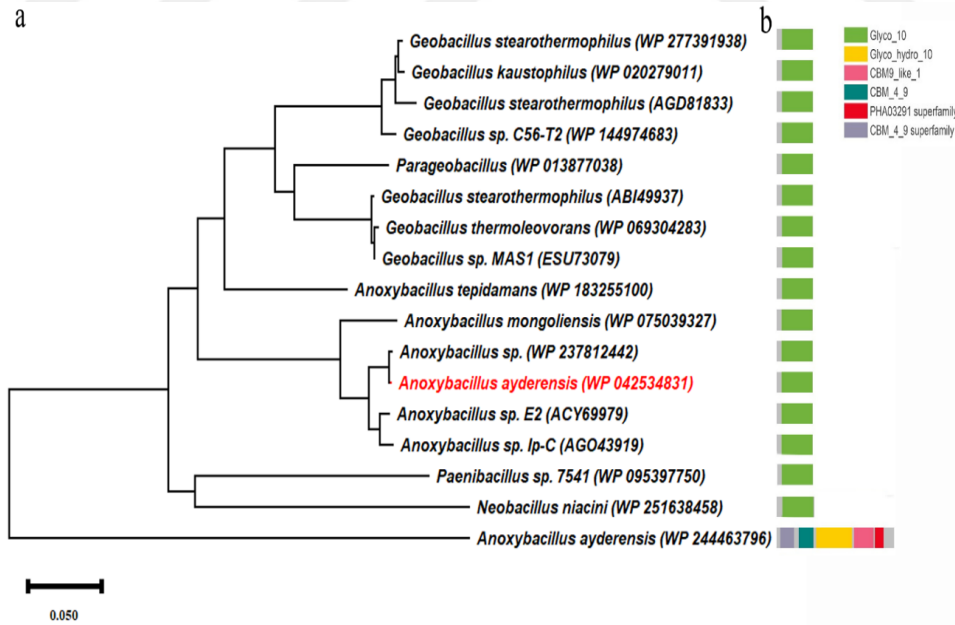
Şekil 4. *Anoxybacillus ayderensis*'in katı besiyerinde ksilanaz aktivitesi (A2: *Anoxybacillus ayderensis*'in laboratuvarındaki kısa kodu)

3.2. İntrasellüler *A. ayderensis* ksilanazın (xyn329) Biyoinformatik Tanımlanması

A. ayderensis'te GH10 ve GH11 ailesi üyelerini tanımlamak için çeşitli biyoinformatik analizler kullanılmıştır. BLAST analizi, *A. ayderensis*'in her ikisi de GH10 ailesine ait iki ksilanaz genini (xyn329 ve xyn1096) içerdiğini göstermiştir. Ancak *A. ayderensis* genomunda GH11 ailesine ait hiçbir ksilanaz geni bulunamamıştır. NCBI'de bulunan verilere göre, Xyn329 geninin (NCBI Erişim Numarası: WP_042534831.1) 329 amino asit (aa) protein uzunluğuna sahip hücre içi

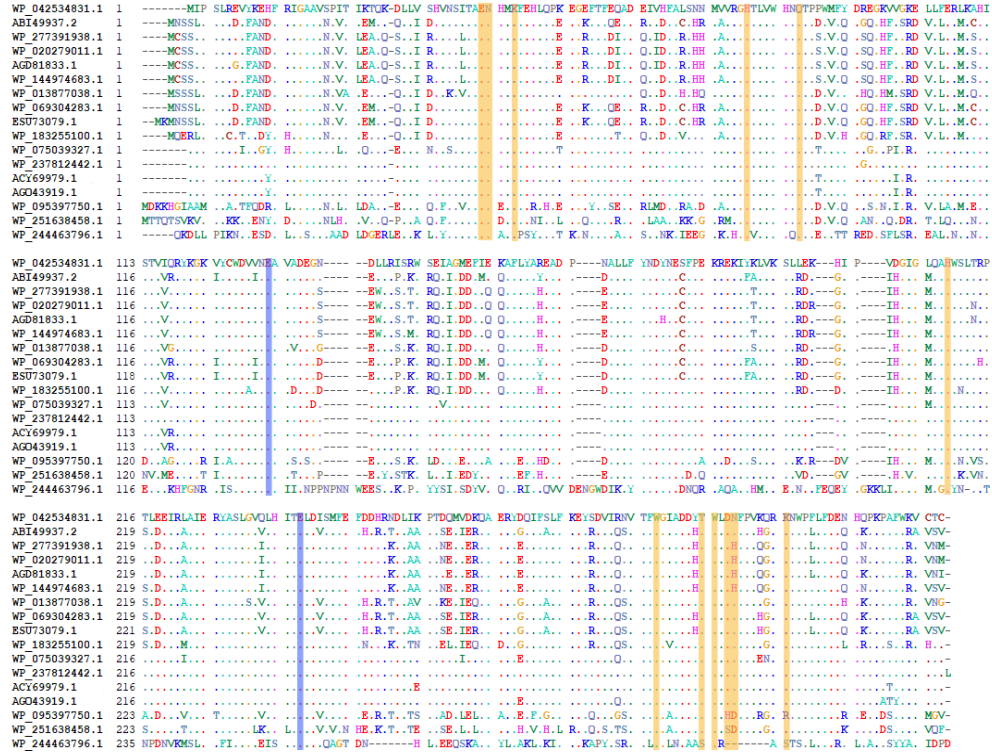
ksilanazı eksprese ettiği tespit edilirken, xyn1096 geninin (NCBI Erişim Numarası: WP_244463796.1) protein uzunluğu 1096 aa olan hücre dışı bir enzimi eksprese ettiği tespit edildi. Bu tez kapsamında GH10 (xyn329 ve xyn1096) ailesine ait *A. ayderensis*'teki ksilanaz genleri arasında sadece 329 amino asitten oluşan xyn329 klonlanmış, eksprese edilmiş ve karakterize edilmiştir.

A. ayderensis'in 987 bp uzunluğundaki ksilanaz kodlayan geni amplifiye edildi, pKI1.1R vektörüne klonlandı, dizilendi ve Gen Bank'a yüklendi (NCBI Erişim Numarası: OR269882). Klonlanan 328 amino asit uzunluğundaki ORF, amino asit homolojisi ile ilgili Gen Bank (NCBI:pBlast) verileriyle karşılaştırıldı (Şekil 6). Analiz sonuçlarına göre *A. ayderensis* (WP_042534831), *Anoxybacillus ayderensis* (WP_237812442), *Anoxybacillus* sp. E2 (ACY69979), *Anoxybacillus* sp. Ip-C (AGO43919), *A. mongoliensis* (WP_075039327), *Geobacillus* sp. C56-T2 (WP_144974683), *G. stearothermophilus* ixt6 (ABI49937) ve *Paenibacillus* sp. 7541 (WP_095397750), türlerindeki ksilanazlarla karşılaştırıldı ve ksilanaz enzimine sırasıyla %100, %99.7, %97.6, %96.7, %92.4, %74, %71.8 ve %65.8 oranında uyum gösterdiği tespit edildi. (Şekil 5)



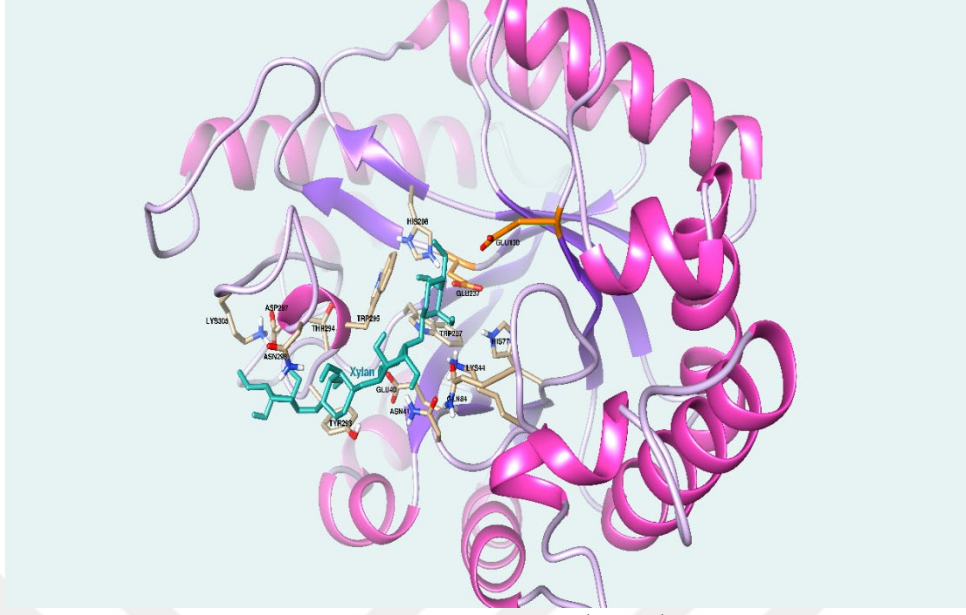
Şekil 5. *A. ayderensis*'in (WP_042534831) filogenetik ağacı

AAyXYN329 ve diğer GH10 ksılanazların amino asit dizileri, CLUSTALW programı (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>) ile karşılaştırılarak benzerlikleri belirlendi (Sievers vd., 2011). Sekans karşılaştırma sonuçları Şekil 6'de gösterilmiştir.



Şekil 6. Çoklu sekans dizilemesi

AAyXYN329, SWISS-MODEL programı kullanılarak modellenmiştir (Şekil 7) (Waterhouse vd., 2018). Şekildeki sarı bölgeler aktif bölgedeki aminoasit sırasının diğer karşılaştırılan ksılanazlarla aynı olduğunu ve mavi bölgeler de diğer ksılanazlardan farklı aminoasit içerdiğini göstermektedir. *G. stearothermophilus* ixt6'nın (ABI49937, PDB:1N82) ksılanazı, üç boyutlu yapısı daha önce karakterize edilmiş ve modellenmiştir. AAYXYN329'e en yakın tür olarak şablon olarak kullanılmıştır. ORF'nin toplam G+C içeriği %38.8 olarak belirlendi. AAYXYN329'nin, SignalP 5.0 tarafından yapılan analize göre, N-Terminus'ta sinyal peptidine sahip olmadığı tespit edildi. (Armenteros, vd., 2019).



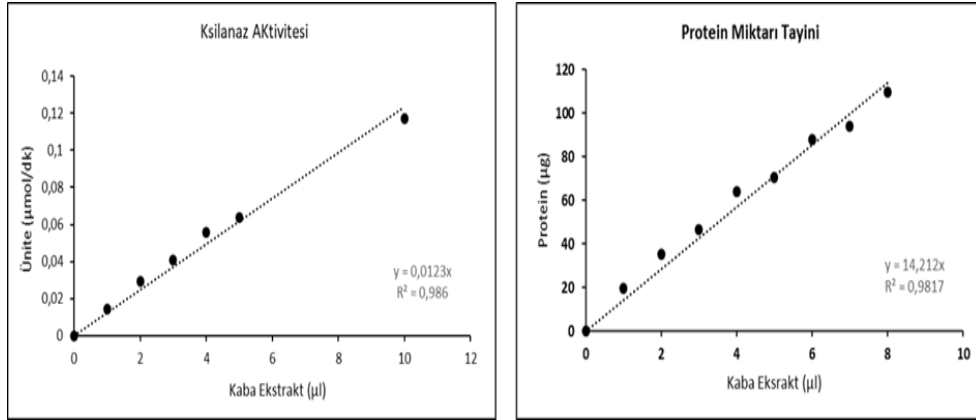
Şekil 7. AAYXYN329'un üç boyutlu yapısı

AAYXYN329'un moleküler ağırlığı ve izoelektrik pI'si ExPASy-ProtParam programı kullanılarak 38,57499 kDa ve 5.65 olarak belirlenmiştir. Proteinin suda çözünme kat sayısı $M^{-1} cm^{-1}$ birimleri kullanılarak 280 nm'de belirlendi. Ek olarak, kararsızlık indeksi 34.88 olarak hesaplandı ve bu değer de proteinin kararlı olarak sınıflandırıldığını göstermiştir. Alifatik indeks ve genel hidropatisite ortalaması (GRAVY) sırasıyla 85.58 ve -0.405 olarak hesaplandı (Gasteiger vd., 2005).

3.3. Rekombinant Olarak Üretilen Yaban Tip AAYXYN329 Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

3.3.1. Kaba Ekstrakt

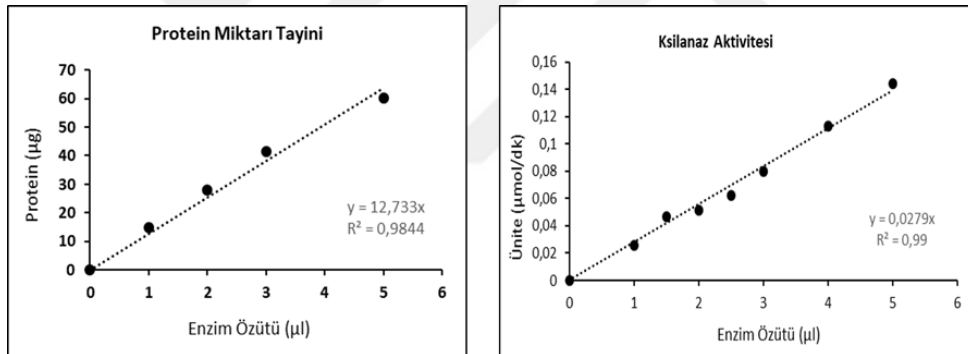
Kaba ekstraktın protein miktarı 14,212 $\mu g/\mu l$ olarak hesaplandı. Ksilanaz aktivitesini hesaplamak için enzim 50 kat sulandırılarak reaksiyon yapılmıştır (Şekil 8). Burada enzim tarafından üretilen ksiloz miktarı çok fazla olduğundan çok fazla renk meydana gelmekte ve spektrofotometrenin okuma aralığını geçmektedir. 50 kat seyreltilen enzimle reaksiyonlar gerçekleştirilip elde edilen değer 50 ile çarpılması ile enzimin 1 μl 'sinin ürettiği ksiloz miktarı hesaplanabilir. Kaba ekstraktın ksilanaz aktivitesi $0,0123 \times 50 = 0,615 \mu mol/dk$ (ünite) olarak hesaplandı.



Şekil 8. AAYXN329'un kaba ekstraktında protein ve ksilanaz aktivitesi tayini

3.3.2. Isı Şoku Uygulaması

Isı şoku uygulaması sonrası enzim özütünün protein miktarı 12,733 µg/µl olarak hesaplandı. 20 kat sulandırılarak yapılan ksilanaz aktivite sonucu ise 0,0279 x 20 = 0,55 U olarak hesaplandı (Şekil 9).

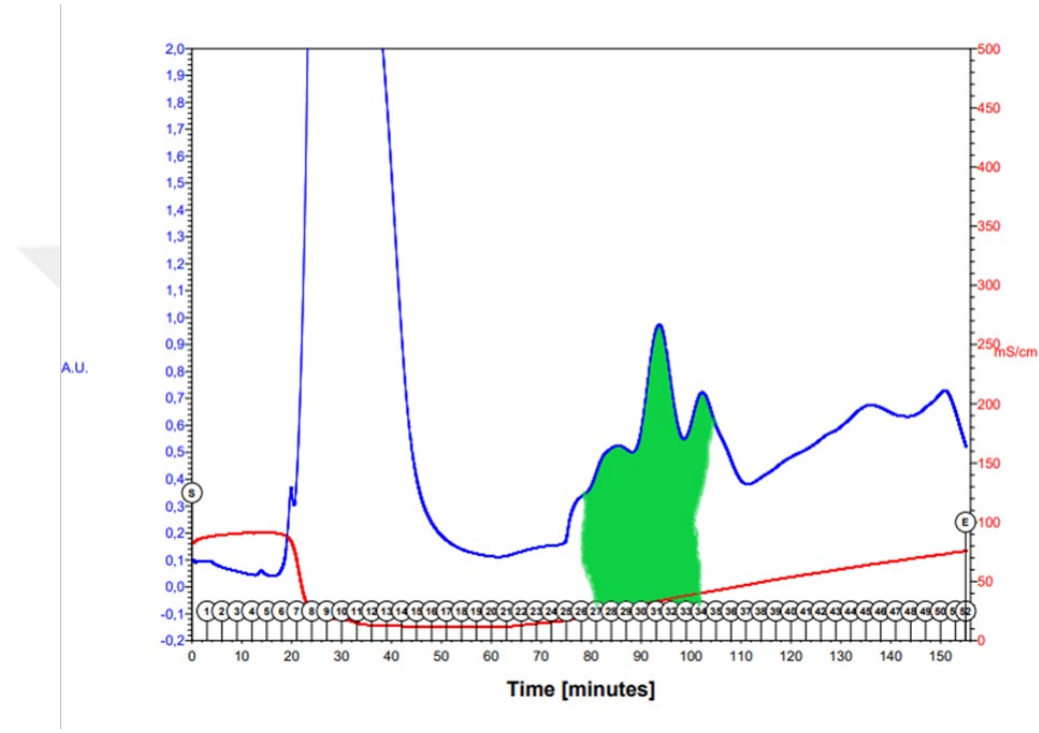


Şekil 9. AAYXN329'da ısı şoku sonrası elde edilen özütte protein ve ksilanaz aktivitesi tayini

3.3.3. İyon Değişim Kromatografisi Uygulaması (İDKK)

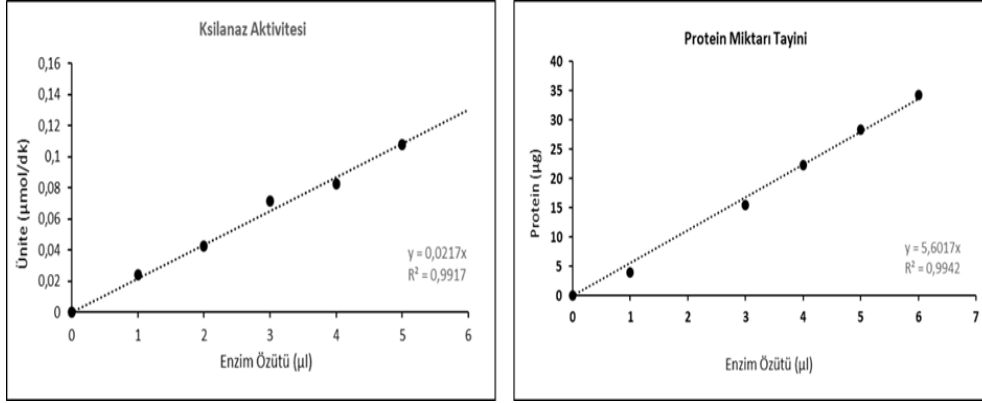
BioLogic LP cihazında DEAE-Sepharose dolgu maddesi kullanılarak gerçekleştirilen saflaştırma işleminin grafiği (İDKK) Şekil 10'de görülmektedir. Grafikte görülen mavi pikler protein miktarını (295 nm'de absorbands değerleri) göstermektedir. Altta yuvarlak içerisinde görülen sayılar ise tüp numaralarını göstermektedir. Kırmızı renkte görülen çizgi ise NaCl konsantrasyonunu göstermektedir. Mavi renk takip edilecek olursa 6-17 tüpler arasında yüksek miktarlarda protein kolondan çıkmıştır. Burada kolondan çıkan proteinler kolona tutunmayan proteinlerdir. Kırmızı çizginin yani NaCl konsantrasyonunun artmaya

başladığı 24 ncü tüpten itibaren farklı güçteki proteinlerin ayrı tüplere ayrıldığı görülmektedir. Tüm tüplerde ksilanaz aktivitesi tarandı ve 27-34 üncü tüpler arasında ksilanaz aktivitesi tespit edildi. Hem 6-17 tüpler arasında hem de ksilanaz enziminin kolondan ayrıldıktan sonra 34-52 nci tüplerde ksilanaz aktivitesi bulunmamaktadır. Ksilanaz aktivitesinin bulunduğu pikler yeşil renkte boyanarak belirtilmiştir.



Şekil 10. AAYXN329'a ait iyon değişim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

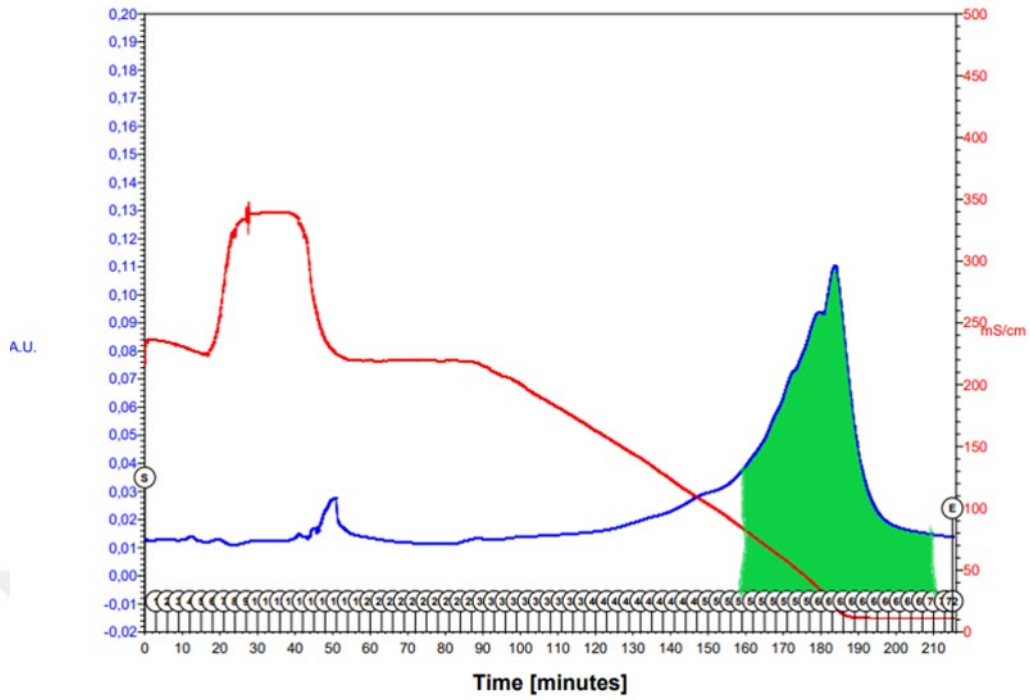
İyon değişim kolon kromatografisi uygulaması sonrası enzim özütünün protein miktarı 5,6017 µg/µl olarak hesaplandı. 10 kat sulandırılarak yapılan ksilanaz aktivite deneyi sonucunda, 1µl enzim özütünde ksilanaz aktivitesi $0,0217 \times 10 = 0,217$ U olarak hesaplandı (Şekil 12).



Şekil 11. AAYXN329'a ait iyon değişim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve ksılanaz aktivitesi tayini

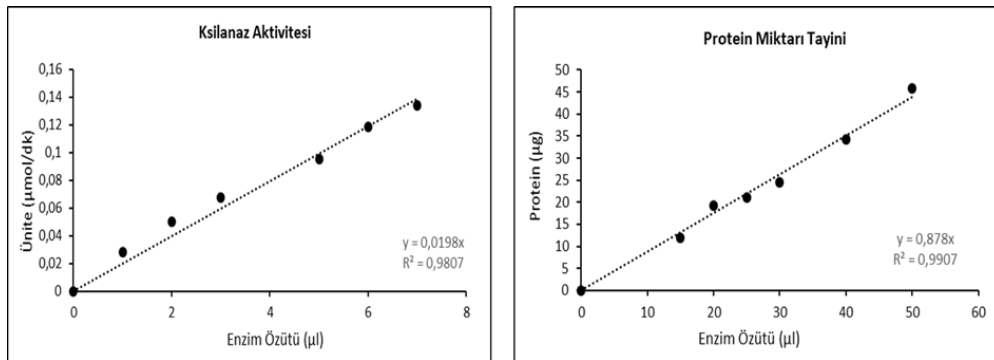
3.3.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi Uygulaması

Dolgu maddesi olarak Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (Sigma)'un kullanıldığı hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (HEKK) grafiği Şekil 13'te görülmektedir. Yine mavi çizgi protein konsantrasyonunu kırmızı ise amonyum sülfat konsantrasyonunu göstermektedir. 16-26 uncu tüpler kolona tutunmayan proteinlerdir. 53-70 nci tüpler arasında ksılanaz enzimi, düşen amonyum sülfat konsantrasyonu ile birlikte kolondan ayrılmıştır. Yapılan ksılanaz aktivite çalışmaları sonrasında sadece 53-70 nolu tüplerde aktiviteye rastlanmıştır.



Şekil 12. AAYXN329'a ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması grafiği

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulaması sonrası enzim özütünün protein miktarı 0,878 µg/µl olarak hesaplandı. 6 kat sulandırılarak yapılan ksilanaz aktivite deneyi sonucunda, 1 µl enzim özütünde ksilanaz aktivitesi $0,0198 \times 6 = 0,1188$ U olarak hesaplandı (Şekil 13).



Şekil 13. AAYXN329'a ait hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası elde edilen özütte protein ve ksilanaz aktivitesi tayini

3.3.5. AAYXN329'nin Saflaştırma Tablosu

Tablo 4'te görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı olmuştur. Toplam protein miktarının 170,54 mg'dan 27,06 mg'a düşmesi ve spesifik aktivitenin

her basamakta artması saflaştırma işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. Saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 41,87'den 133,04 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein'e yükselirken enzim %50,42 verim ile 3,18 kat saflaştırıldı. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasından sonra birleştirilen fraksiyonlar saf enzim özütü olarak kabul edilerek karakterizasyon çalışmalarında kullanıldı.

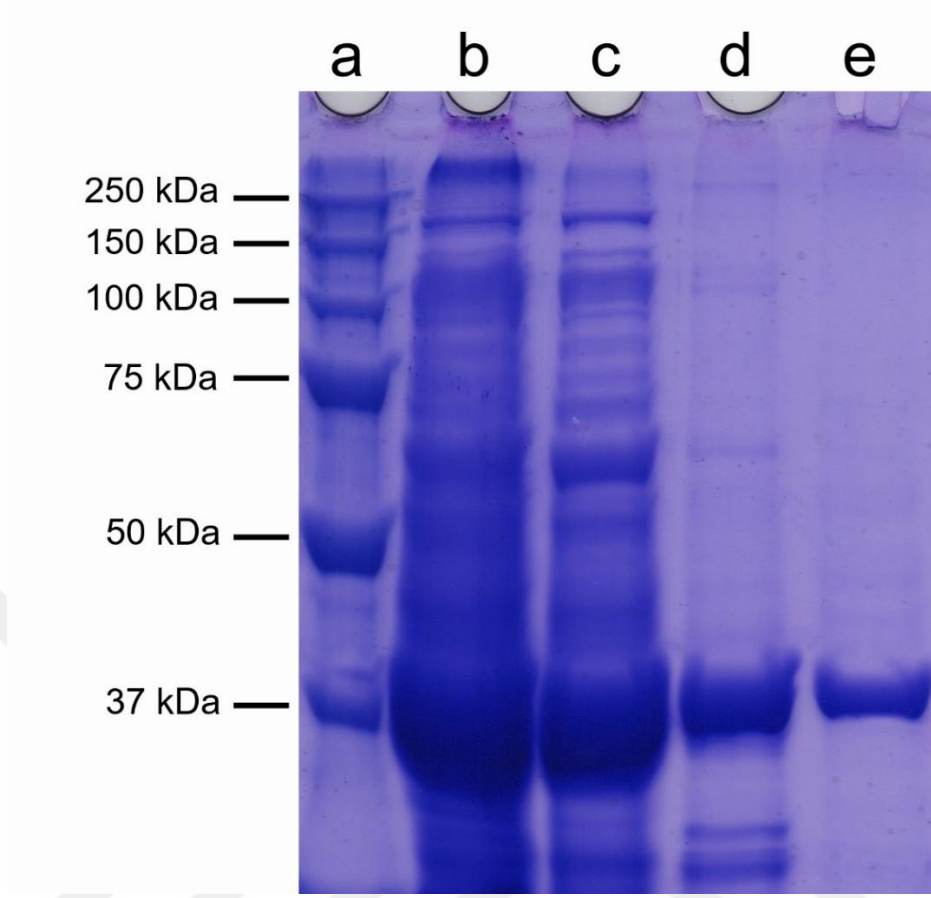
Tablo 4. AAYXYN329'un saflaştırma basamaklarına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	T.Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	T.Protein (mg)	Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\mu\text{l}$)	T.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}$)	S.Aktivite ($\mu\text{mol/dk}/\text{mg protein}$)	Verim (%)	Saflaştırma katı
Kaba Ekstrakt	12,00	14,21	170,54	0,60	7140,0	41,87	100,0	1,00
Isı Şoku Uygulaması	12,00	12,73	84,48	0,55	6600,0	78,13	92,44	1,87
IDKK	18,00	2,44	43,88	0,22	4482,0	102,15	62,77	2,44
HEKK	30,00	0,90	27,06	0,12	3600,0	133,04	50,42	3,18

IDKK: iyon değişim kolon kromatografisi, HEKK: hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi

3.3.6. AAYXYN329'nin Saflaştırılmasına Ait SDS-PAGE Analizi

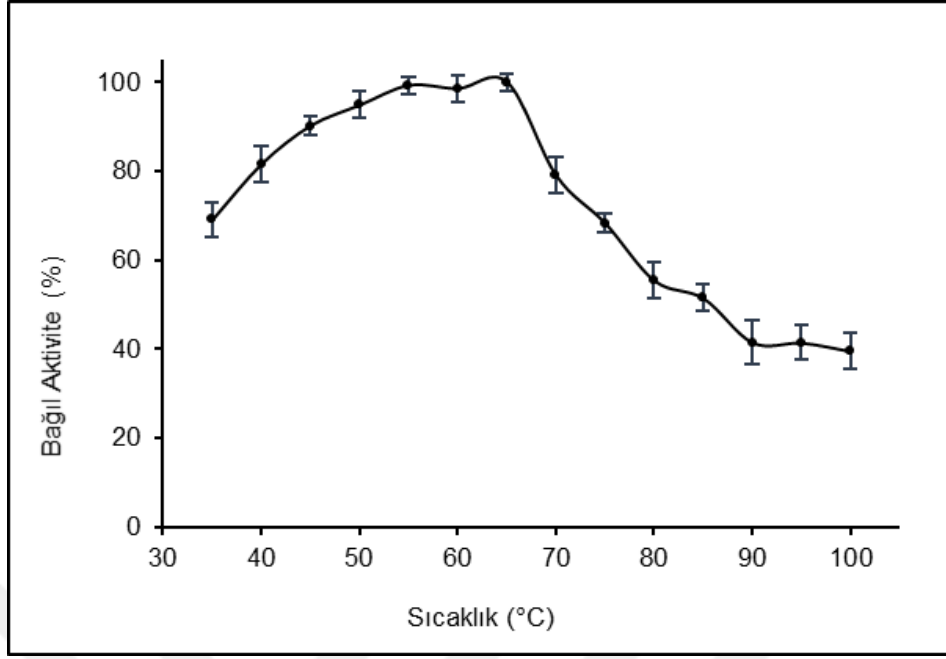
AAYXYN329aa'nın saflaştırılması sonrası, saflaştırma uygulamaları sonrasında elde edilen özütlerin 20 μL SDS-PAGE'e yüklenerek yürütüldü. Şekil 14'te görüleceği üzere saflaştırma sonrası ksilanazın büyük oranda saflaştırıldığı tespit edilmiştir.



Şekil 14. AAYXN329aa'nın saflaştırılmasına ait SDS-PAGE analizi
(a:marker, b:kaba ekstrakt, c:ısı şoku uygulaması sonrası enzim özütü, d:iyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, e:hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü)

3.3.7. Optimum Sıcaklık

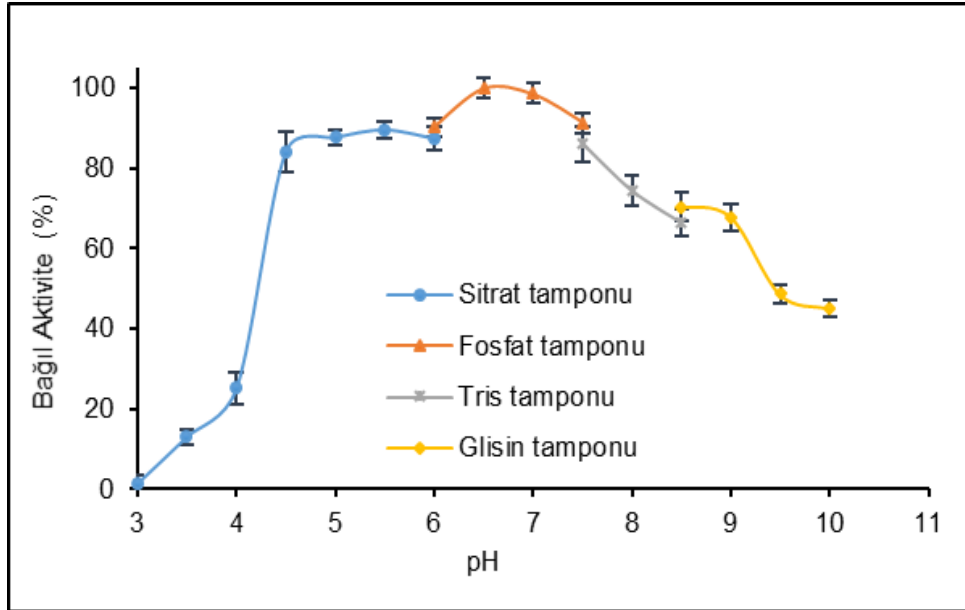
Enzimin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için saf enzim özütü ile farklı sıcaklıklarda bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Şekil 15'te görüleceği üzere enzimin %95'in üzerinde aktivite gösterdiği ve en iyi çalıştığı sıcaklıklar 55-60-65'tir.



Şekil 15. AAyXYN329 'un optimum sıcaklık grafiği

3.3.8. Optimum pH (AAyXYN329)

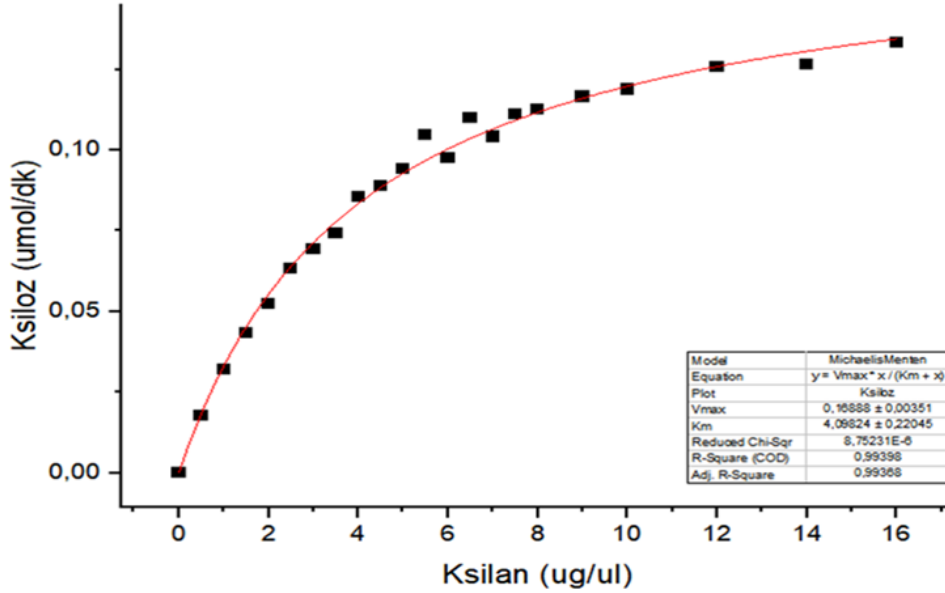
Enzimin optimum çalışma pH değerini belirlemek için saf enzim özütü ile farklı pH değerlerinde bir seri aktivite deneyi gerçekleştirildi. Şekil 16'de görüleceği üzere enzim en iyi çalıştığı ve %80'nin üzerinde aktivite gösterdiği aralık 4,5-7 pH aralığıdır.



Şekil 16. AAyXYN329'un optimum pH grafiği

3.3.9. Kinetik Çalışmalar

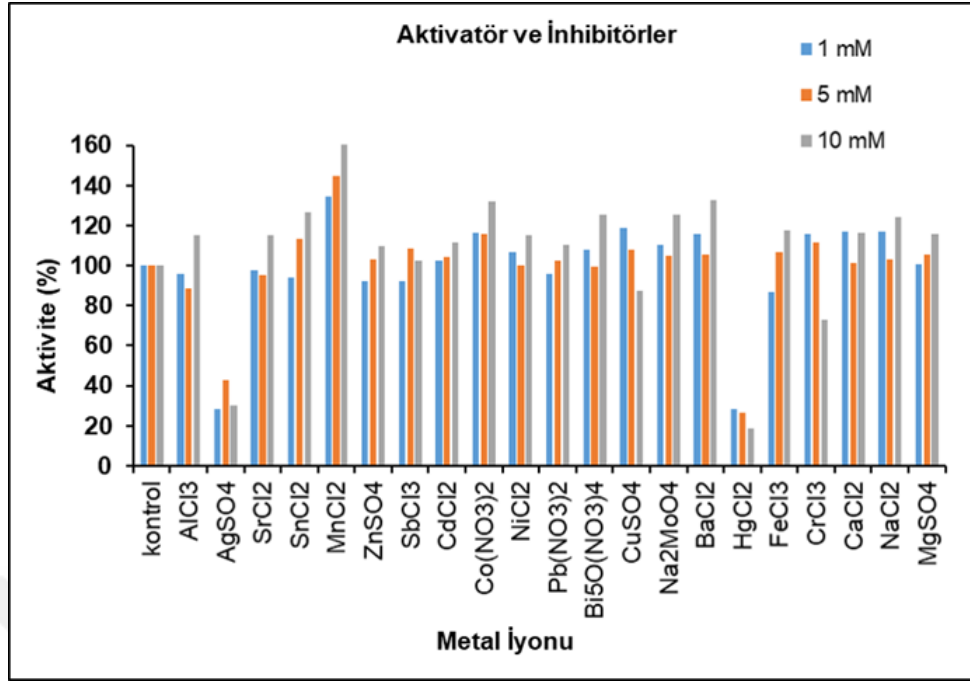
AAyXYN329'un kinetik parametrelerini hesaplamak için 16 mg/ml'ye kadar olan ksilan konsantrasyonuyla bir takım deneyler yapılmıştır (Şekil 17). Açığa çıkan ksiloz miktarıyla ksilanaz aktivitesi hesaplandı. Reaksiyonlar 2,5 µl saf enzim özütü (2,25 µg protein) ile gerçekleştirildi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri; OriginPro 8.1 analiz programı kullanılarak çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi ($r^2=0,99821$). Programda yapılan analiz sonucunda enzimin K_m değeri $4,09824 \pm 0,2245$ µg/µl V_{max} değeri ise $75,05 \pm 0,03$ µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı. k_{cat} değeri ise 96,75 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri ise $23,61$ L/g.s⁻¹ olarak hesaplandı.



Şekil 17. AAYXYN329'a ait Michaelis-Menten eğrisi

3.3.10. Metal İyonlarının Etkisi

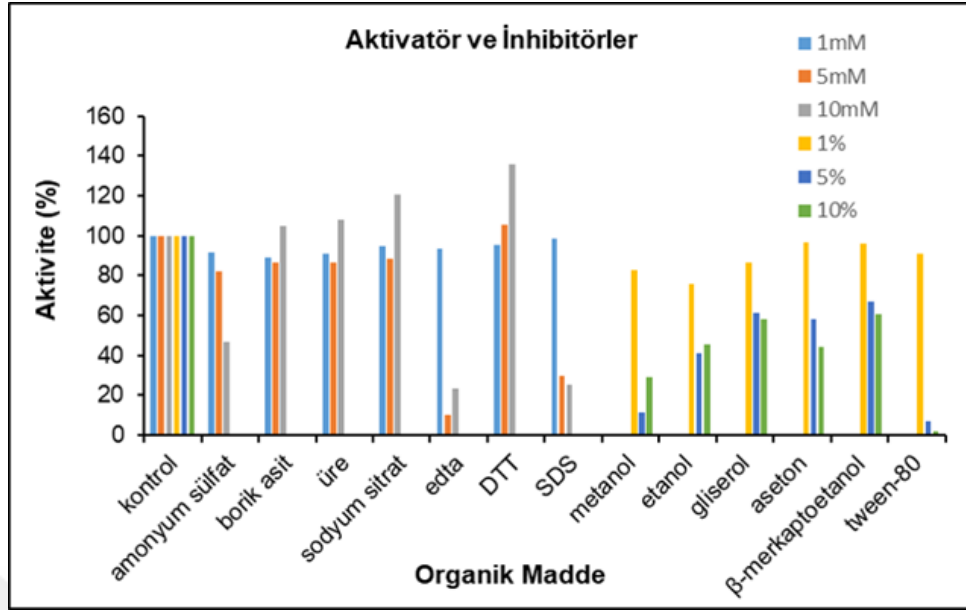
Reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları 1, 5 ve 10 mM olacak şekilde metal iyonu ile gerçekleştirilen deneyler sonucu çizilen % aktivite - metal iyonu grafiğine göre; Mn^{+2} , Co^{+2} , Na^{+2} , Mg^{+2} gibi iyonlar aktivatör etki gösterirken, Hg^{+2} , Ag^{+2} , Cd^{+2} gibi iyonların inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur (Şekil 18).



Şekil 18. AAYXYN329 enzimine ait metal iyonları (aktivatör ve inhibitör) etki grafiği

3.3.11. Organik Maddelerin Etkisi

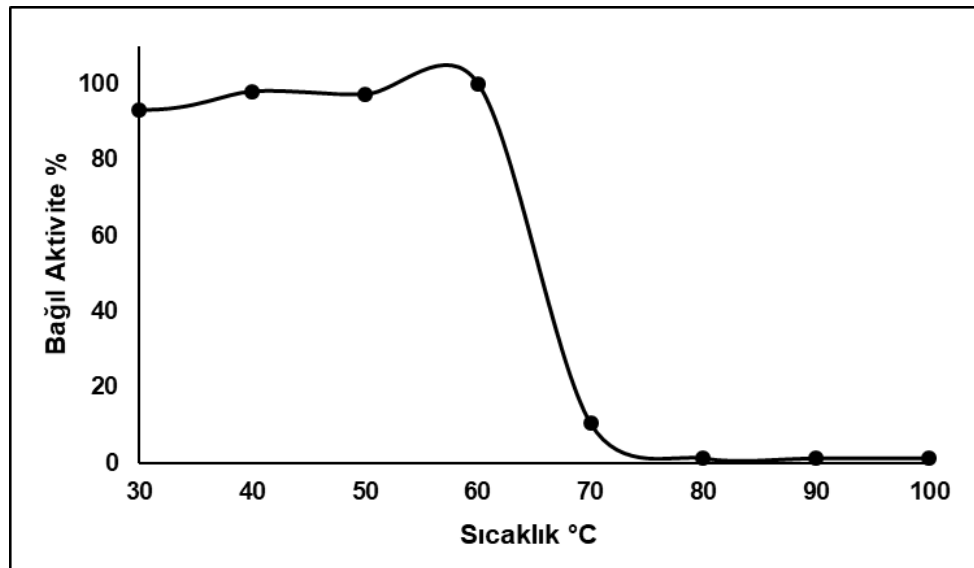
Ksılanaz aktivitesi üzerine bazı organik maddelerin etkisini incelemek amacı ile son konsantrasyonları; 1, 5, 10 mM (DTT, amonyum sülfat, borik asit vb.) ve %1, %5, %10 (gliserol, SDS, aseton vb.) olacak şekilde optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Bu organik maddelerin enzim üzerindeki etkisinin belirlenmesi için çizilen organik madde - % aktivite grafiğine göre dtt ve sodyum sitrat aktivatör etki gösterirken; edta, aseton, gliserol gibi organik maddeler inhibitör etki göstermiştir (Şekil 19).



Şekil 19. AAYXN329 enzimine ait organik madde grafiği

3.3.12. Isıl Kararlılık

AAYXN329 'un ısı kararlılık aktivitesini belirlemek için bir seri deney yapıldı. Bunun sonucunda 1 saat boyunca grafikte de belirtilen sıcaklıklarda inkübe edilerek yapılan deneyin sonucunda enzim 60 dereceden sonra yarılanma ömrüne ulaştığı bilgisine varıldı. Ayrıca 70 derece ve üzerindeki sıcaklıkta enzimin aktivitesinin olmadığı sonucu bulundu (Şekil 20).



Şekil 19. AAYXN329' a ait ısı kararlılık grafiği

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anoxybacillus ayderensis, çubuk şeklinde morfolojiye sahip, termofilik, spor oluşturan, gram pozitif bir bakteri olup fakültatif anaerobik özellikler gösterir. Bu bakteri, D-glukoz, D-ksiloz, D-fruktoz, D-rafinoz, D-sakaroz, L-arabinoz, D-maltoz, D-mannitol ve D-mannoz gibi çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilen çok yönlü bir metabolik kapasite gösterir (Dulger vd., 2004). *Anoxybacillus ayderensis*'in hem nicel olarak hem de biyokimyasal analizlere dayanarak ksilanı hidroliz etme yeteneğine sahip olduğu bu çalışmada tespit edilip açığa çıkarılmıştır.

GenBank'taki bilgilere göre, *A. ayderensis*'in kapsamlı genom çapının analizine dayanarak yapılan araştırmada bakterinin tüm genomunda (2.832.347 bp) iki farklı ksilanaz geninin varlığı tespit edilmiştir (Belduz vd., 2015). Bu ksilanazlardan biri 987 bp'den (NCBI Erişim Numarası: WP_042534831.1) oluşan hücre içi, diğeri ise 3.207 bp'den (NCBI Erişim Numarası: WP_244463796.1) oluşan hücre dışı olan enzimlerdir. Bu çalışmada sadece *A. ayderensis*'in hücre içi ksilanazı klonlanıp, eksprese edilip, saflaştırılıp ve biyokimyasal olarak karakterize edilmesi sağlanmıştır. Bu çalışmada ilk kez *A. ayderensis*'e ait bir ksilanaz geninin varlığı tespit edilmiş ve açığa çıkarılmıştır. Amplifiye edilmiş PCR ürününün (AAyXYN329'un 987 bp geni) DNA dizi analizinin sonucunda varsayımsal bir 329 amino asit hücre içi ksilanazı kodlayan gene sahip olduğu (ORF) ortaya çıkmıştır.

Ksilanazlar, amino asit dizisi benzerliklerine ve katalitik alanların hidrofobik küme analizine dayalı olarak yaygın olarak GH10 ve GH11 olmak üzere iki aileye ayrılır (Verma & Satyanarayana, 2012). AAYXYN329 amino asit dizisinin PFAM' la yapılan (Mistry vd., 2021) analizine göre, AAYXYN329'un glikozit hidrolaz ailesi 10 sınıfı enzimlerine ait olduğunu gösteren bir GH10 alanının varlığı ve enzimde karbonhidrat bağlama alanlarının bulunmadığı tespit edildi.

AAyXYN329'un çoklu dizi hizalaması için kullanılan CLUSTALW programı (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>) (Sievers vd., 2011) ve AAYXYN329'un dendrogram yapımı, filogenetik analizi için MEGA X (düzeltilmemiş p-mesafe modeline göre komşu birleştirme yöntemiyle) kullanılmıştır (Kumar vd., 2018). *A. ayderensis* ksilanazının, *Anoxybacillus* türüne ait ksilanazlara göre daha yakın olduğu görülmüştür. Bu analizde AAYXYN329'un endo-1,4-beta-ksilanazlara (EC 3.2.1.8)

belirgin benzerliği, AAYXYN329'un bir endo-ksilanaz olduğunun kanıtıdır. Ayrıca, SignalP 5.0 (Armenteros vd., 2019) ile yapılan analiz sonucunda AAYXYN329'un N-terminalinde herhangi bir sinyal peptidi tespit edilmediğinden, enzimin hücre içi olduğunu doğrulamıştır. AAYXYN329, SWISS-MODEL programı tarafından modellenip enzimin moleküler yapısını analiz etmiştir (Waterhouse vd., 2018). Modelleme için şablon olarak, *G. stearothermophilus*'un ksilanazının üç boyutlu kristal yapısı (PDB dosyası: 1N82, NCBI dosyası: ABI49937.2) kullanılmıştır. Bilinen üç boyutlu kristal yapılara sahip enzimler arasında *G. stearothermophilus*'un ksilanazı, AAYXYN329'un amino asit dizisine en yüksek benzerliği sergilemesi nedeniyle onu bu çalışma için en uygun model haline getirmiştir. Bu modele göre (1N82) enzimin aynı alt birimlerden oluşan homodimer ve kuaterner enzim olduğu belirlenmiştir (Gat vd., 1994). Bu nedenle AAYXYN329, 1N82'nin tek bir alt birimi (1N82.1.A) ile modellenmiştir. Glikozit hidrolazlar (EC 3.2.1.), iki veya daha fazla karbonhidrat arasındaki glikozidik bağı hidrolize edebilen yaygın bir enzim grubu olarak tanımlanmıştır (Davies & Henrissat., 1995). Glikozit hidrolazların tipik bir temsilcisi olan GH10 Ailesi enzimleri, klasik (α/β)₈ TIM kıvrımına sahiptir (Henrissat vd., 1995).

Enzimin aktif bölge yarık amino asitleri, modellenen enzimin ksilan ile kenetlenmesiyle belirlendi. Aktif bölge yarık monomerlerinde bulunan on dört amino asidin tümünün, *G. stearothermophilus*'taki ksilanazlarla aynı olduğu tespit edildi (PDB file: 1N82, NCBI file: ABI49937.2). Ayrıca Glu130 ve Glu237, enzim reaksiyonunda aktif rol oynayan katalitik amino asitlerdir. Han ve arkadaşları (2013), bu amino asitlere (Glu130 ve Glu237) karşılık gelen amino asitler (Glu146 ve Glu 251) üzerinde mutasyonlar gerçekleştirmiş ve mutant enzimin hiçbir aktivite göstermediğini bildirmiştir.

Bhardwaj vd. (2019)'ye göre, ksilanazlar moleküler ağırlıklarına göre düşük moleküler ağırlıklı ve yüksek moleküler ağırlıklı olanlar şeklinde sınıflandırılabilir. Endo-1,4-beta ksilanazlar dahil olmak üzere GH10 Ailesinin ksilanazları, düşük moleküler ağırlıklı enzimlerdir. (Verma & Satyanarayana 2012; Bhardwaj vd., 2019). Farklı *Anoxybacillus* türlerine ait çeşitli ksilanazların moleküler ağırlıkları genellikle 38 ila 92 kDa arasında değişmektedir; *A. pushchinoensis* A8 için 83 kDa, *Anoxybacillus* sp. Ip C için 45 kDa, *Anoxybacillus* sp. 3M için 400-500 kDa olduğu

bildirilmiştir (Goh vd., 2013; Yadav vd., 2018). Bu çalışmada, filogenetik analizlerde sunulan GH10 alanları (Şekil 6) aynı dizi boyutuna sahip olduğu ancak GH10 alanları dizilerinin, *Anoxybacillus ayderensis*'in hücre dışı ksilanazından farklı olduğu tespit edilmiştir (WP_244463796).

AAyXYN329'un moleküler ağırlığı, SDS-PAGE analizi ile doğrulanarak 38.6 kDa olarak hesaplandı. Bu sonuç aynı zamanda AAYXYN329'un düşük moleküler ağırlığa sahip GH10 ailesi ksilanazlarından biri olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, Wang vd. (2010), sp E2'den elde edilen ksilanazın moleküler ağırlığının 38.8 kDa olduğunu ve Yadav vd. (2018), *A. kamchatkensis* NASTPD13'ten ksilanazın moleküler ağırlığının 37 kDa olduğunu bildirmiştir. Yukarıda bahsedildiği gibi, *G. stearothermophilus* ksilanazı (PDB dosyası:1N82), aynı amino asit dizisine sahip iki alt birimden oluşan homodimer yapıya sahip bir enzimdir. AAYXYN329'un da benzer bir kuaterner yapıya sahip olabileceği gözlemlenmiştir. Bu dördüncül yapıyı SDS-PAGE analizi ile gözlemlemek, alt birimler aynı olduğu için imkansızdır.

E. coli'de aşırı üretilen heterolog proteinler genellikle çözünmeyen inklüzyon cisimcikleri şeklinde üretilmiştir (Karaoglu vd., 2013; Dekker vd., 1991). Bu çalışma, AAYXYN329 ekspresyonunda inklüzyon cisimciği oluşumunun meydana gelmediğini ortaya koymuştur.

Farklı optimal sıcaklık aralıklarına sahip çeşitli ksilanazlar daha önce izole edilmiş, saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu ksilanazlardan bazıları; *Bacillus* sp. optimum sıcaklığı 40 °C (Safitri vd., 2021), *Bacillus* sp. optimum sıcaklığı 50 °C (Nakamura vd., 1993), *Bacillus subtilis* AKM1 optimum sıcaklığı 50 °C olduğu bildirilmiştir (Mahmoud vd., 2023). Ayrıca, optimum sıcaklığı 55°C olan *Paenibacillus barengoltzii* (Liu vd., 2019), optimum sıcaklığı 60 °C olan *Bacillus licheniformis* (Liu vd., 2008), optimum sıcaklığı 60 °C olan *Paenibacillus campinasensis* (Ko vd., 2010) ve *Paenibacillus* sp. NF1 optimum sıcaklığı 60 °C olan (Zheng vd., 2014) ksilanazlar karakterize edilmiştir. *Paenibacillus barengoltzii* (optimum sıcaklık: 60 °C), *Streptomyces griseorubens* (optimum sıcaklık: 60 °C) (Wu vd., 2018), *Caldicellulosirupor bescii* (optimum sıcaklık: 70 °C) (An vd., 2015), *Actinomadura* sp. suşu Cpt20 (optimum sıcaklık: 80 °C) (Taibi vd., 2012) ve *Caldicoprobacter algeriensis* (optimum sıcaklık: 80 °C) (Mhiri vd., 2020) de karakterize edilen ksilanazlar arasındadır. Bu optimum sıcaklıktaki çeşitlilik,

ksilanazların çeşitli ortamlarda çok yönlülüğünü ve potansiyel endüstriyel uygulamalarını vurgulamaktadır.

Diğer *Anoxybacillus* türlerinden izole edilen ksilanazların optimum sıcaklık değerleri 55-70 °C arasında değişmiştir. Literatüre göre bazı *Anoxybacillus* türlerindeki ksilanazlarda optimum sıcaklıklar; *A. pushchinoensis* A8 için 55 °C (Kacagan vd., 2008), *Anoxybacillus* sp. Ip C için 70 °C (Hauli vd., 2013) ve *Anoxybacillus* sp. 3M için 60 °C (Alves vd., 2016) olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, *Anoxybacillus* türlerine (*Anoxybacillus* sp. E2, *A. flavithermus* TWXYL3 ve *A. kamchatkensis* NASTPD13) ait ksilanazların çoğu, AAyXYN329'a benzer şekilde 65 °C'de optimum aktivite sergilemiştir (Wang vd., 2010; Ellis & Magnuson 2012; Yadav vd., 2018).

AAyXYN329, 65 °C'de optimal aktivite göstermesine rağmen, enzimin geniş bir çalışma sıcaklığı aralığına sahip olduğu gözlemlenmiştir. AAyXYN329, 35-75 °C arasında %70 veya %70'in üzerinde bir nispi aktiviteye sahiptir. Ayrıca 80-100 °C arasındaki sıcaklıklarda yaklaşık %40-55 bağıl aktivite göstermiştir. AAyXYN329'un aktivite gösterdiği geniş sıcaklık aralığı, onu çok çeşitli endüstriyel uygulamalar için uygun hale getirir. Birçok endüstriyel uygulama, geniş sıcaklık aralığında çalışabilen yüksek sıcaklık kararlılığı değerlerine sahip enzimlere ihtiyaç duyar.

Literatür farklı bakteri kaynaklarından elde edilen ksilanazlar için çeşitli termal stabilite profillerini ortaya koymaktadır. Örneğin, *Bacillus* sp.'den elde edilen ksilanazın, 80 dakikalık süre boyunca 30°C ile 40°C arasında stabilite gösterdiği ve başlangıç aktivitesinin %50'sinden fazlasını koruduğu bildirilmiştir (Safitri, 2021). Buna karşılık, başka bir *Bacillus* sp.'den elde edilen ksilanaz, pH 9.0'da 30 dakikalık bir inkübasyon sırasında 55°C'ye kadar koşullara dayanarak daha yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermediği bildirilmiştir (Nakamura vd., 1993). Bazı çalışmalarda farklı bakterilerden elde edilen ksilanazların ısı kararlılıklarının çok çeşitlilik gösterdiği tespit edilmiştir. *Bacillus subtilis* AKM1'den elde edilen ksilanazın, 30°C ile 50°C sıcaklık aralığında kararlılık göstermiştir. Bununla birlikte, 30 dakika boyunca 80°C'ye maruz kaldıktan sonra aktivitesi tamamen inhibe olmuştur (Mahmoud vd., 2023). *Bacillus licheniformis*'in 70°C'ye kadar kararlı olduğu, ancak bu sıcaklığın üzerinde aktivitesini hızla kaybettiği ve sadece 2 dakika sonra tamamen inaktif hale geldiği bulunmuştur (Liu & Liu 2008). *Caldicellulosirupor bescii*'nin ksilanazının,

60°C'de yaklaşık 7.7 saat ve 65°C'de 3 saat termostabiliteye sahip olduğu bulunmuştur (An vd., 2015). *Caldicoprobacter algeriensis* ksilanazının, 70°C'de 4 saat sonra bile herhangi bir kayıp olmadan tam aktiviteyi koruyarak olağanüstü bir stabilite sergilediği gözlemlenmiştir (Mhiri vd., 2020).

Anoxybacillus cinsinden elde edilen ksilanazların termostabilitesi çeşitli çalışmalara konu olmuştur. Bu araştırmalar, bu ksilanazların 60 °C'lik bir sıcaklıkta stabil kalma eğiliminde olduğunu ortaya koymuştur (Kacagan vd., 2008; Wang vd., 2010; Ellis & Magnuson, 2012; Alves vd., 2016; Yadav vd., 2018). Bununla birlikte, çalışmamızın odak noktası olan *Anoxybacillus ayderensis*'ten elde edilen ksilanaz AAYXYN329, diğer ksilanazların çoğuyla karşılaştırıldığında olağanüstü bir termozabilite göstermiştir. 65°C'de 72 saatlik bir yarı ömür sergilediği bulunmuştur. Bu bulgular, yazınbilimde incelenen diğer birçok *Anoxybacillus* ksilanazlarında gözlemlenen termostabilite modelleriyle uyumludur.

AAYXYN329'un, 4.5-9.0 pH aralığında (minimum %70 aktivite) yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur. Enzim en yüksek aktiviteyi pH 6.5-7.0 arasında göstermiştir (% 100 aktivite). pH 8.5-10.0 gibi yüksek alkali pH değerlerinde bile enzim aktivite göstermiştir (minimum %50 aktivite). Çeşitli mikroorganizmaların, 4.0 ila 10.0 arasında geniş bir aralığa yayılan oldukça çeşitli optimal pH değerlerine sahip ksilanazlar ürettiği belgelenmiştir. Bu optimum pH'lar; *Streptomyces griseorubens* için pH 5.0 (Wu vd., 2018), *Bacillus* sp. için pH 5.5 (Safitri vd., 2021), *Bacillus licheniformis* için pH 6.0 (Liu & Liu 2008) ve *Paenibacillus* sp. NF1 (Zheng vd., 2014), *Paenibacillus barengoltzii* (Liu vd., 2018) ve *Caldicoprobacter algeriensis* (Mhiri vd., 2020) için pH 6.5, *Paenibacillus campinasensis* (Ko vd., 2010), *Bacillus subtilis* AKM1 (Mahmoud vd., 2023) için pH 7.0, *Caldicellulosirupor bescii* için pH 7.2 (An vd., 2015), *Bacillus* sp. için pH 9.0 (Nakamura vd., 1993) ve *Actinomadura* sp. suşu Cpt20 için pH 10 olduğu bildirilmiştir (Taibi vd., 2012). Bununla birlikte, bu ksilanazların çoğu, geniş pH aralıklarında sınırlı aktivite sergiler (Jalal vd., 2009; An vd., 2015; Mhiri vd., 2020; Safitri vd., 2021). Bu bulgular ışığında, incelediğimiz ksilanaz AAYXYN329, pH 4.5'ten pH 9'a kadar uzanan önemli bir pH aralığında %70'i aşan aktivite sergilemesi dikkate değer bir yönlülüğe sahip olduğunu göstermiştir. Bu ayırt edici özellik, enzimi çeşitli pH koşullarında çeşitli endüstriyel uygulamalar için

güçlü bir aday olarak konumlandırır ve çeşitli süreçlerde değerini ve potansiyelini artırır (Bhardwaj et al. 2019).

Farklı çalışmalarda *Anoxybacillus* cinsinden elde edilen ksilanazların pH 5.3 ile 9.0 aralığını kapsayan çeşitli optimal pH değerleri sergilediği bulunmuştur. Bu optimal pH'lar arasında *Anoxybacillus* sp. E2 için pH 7.8 (Wang vd., 2010), *A. flavithermus* TWXYL3 için pH 6.0 (Ellis & Magnuson, 2012), *Anoxybacillus* sp. için pH 9.0 olduğu bulunmuştur. Yine AAyXYN329'a benzer şekilde, *Anoxybacillus* sp. E2, *Anoxybacillus* sp. 3M ve *A. kamchatkensis*'in NASTPD13 suşlarındaki ksilanazlarda yapılan araştırmalarda sırasıyla pH 6.6-8.6, pH 7.0-10.5 ve pH 7.0-9.0 dahil olmak üzere geniş pH aralıklarında önemli aktivite sergilediği bildirilmiştir (Wang vd., 2010; Alves vd., 2016; Yadav vd., 2018). Bununla birlikte, AAyXYN329, pH 4.5 ile 9.0 arasında değişen daha geniş bir pH aralığında enzimatik aktivite sergilemesi onu öne çıkarmakta ve daha önce incelenen diğer *Anoxybacillus* ksilanazların pH uyarlanabilirliğini aşmaktadır. Bu bulgular ışığında geniş bir pH spektrumunda etkili şekilde işlev gören AAyXYN329, olağanüstü kapasitesiyle desteklenen çeşitli endüstriyel uygulamalar için önemli bir umut vaat etmektedir.

Birçok metal iyonu ve organik bileşik, enzimlerin aktivitesi üzerinde aktivatör veya inhibitör etkisi gösterir (Hernick & Fierke, 2010). Bu çalışmada, çeşitli metal iyonları ve organik bileşiklerin AAyXYN329'un aktivitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; Sn^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} ve Na^{+} AAyXYN329'un aktivitesini artırarak aktivatör etki göstermiştir. *G. stearothermophilus* ksilanazında (PDB dosyası:1N82) enzim yapısına iki farklı ligandın (Na^{+} ve gliserol) katıldığı görülmektedir (Gat vd., 1994). Na^{+} , AAyXYN329'un olası aktivatör etkisinin de Na^{+} 'yı bir ligand olarak kullanması muhtemeldir. Öte yandan, Ag^{2+} ve Hg^{2+} 'nın AAyXYN329'un aktivitesi üzerinde yoğun bir inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Çünkü Hg^{2+} indol halkalarını oksitleme yeteneğine sahiptir, böylece enzimin triptofan kalıntıları ile reaksiyona girerek enzim aktivitesini bloke etmiştir (Zhang vd., 2007). Ayrıca EDTA, SDS, metanol, etanol, gliserol, aseton ve β -merkaptetanölün enzim aktivitesini yüksek oranlarda inhibe ettiği görülmüştür.

Substrat olarak ksilanı kullanılarak yapılan kinetik çalışmalar sonucunda AAyXYN329'un K_m , V_{max} , k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla $4.09824 \pm 0.2245 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,

75.05 $\pm$ 0.03 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein, 96.75 1/sn ve 23.61 1/ L/g.s ⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde, *Anoxybacillus* sp E2 ksilanazı ile yapılan kinetik çalışmalarda, substrat olarak beech wood ksilanı kullanan enziminin K_m ve k_{cat} değerleri sırasıyla 0.61 mg/mL ve 1.602 1/sn bulunmuştur (Wang vd., 2010). Substrat olarak oat spelt ksilan kullanan başka bir çalışmada, *A. pushchinoensis* A8'den elde edilen ksilanazın K_m 'si 0.909 mg/mL olduğu bulunmuştur (Kacagan vd., 2008). Beech wood ksilanı için *Anoxybacillus kamchatkensis* ksilanazının K_m 'si 0.7 mg/mL olarak bulunmuştur (Yadav vd., 2018). Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi, *Anoxybacillus* türüne ait ksilanazların düşük K_m değerleri, bu enzimlerin endüstriyel uygulamalar için tercih edilirliliğini artırmaktadır.

Selüloz liflerinin hidrolizini önlemek için kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrilerinde kullanılacak ksilanazın selülaz aktivitesine sahip olmaması beklenmektedir. Bu çalışmada, substrat olarak karboksimetil selüloz kullanılarak yapılan aktivite deneylerinde, AAYXYN329'un selülaz aktivitesine sahip olmadığını ortaya koymuştur.

5. GENEL DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

Uygun maliyetli mikrobiyal ksilanazlara olan talep son zamanlarda geniş endüstriyel uygulama yelpazesine sahip olmalarından dolayı artmaktadır. Bu nedenle endüstriyel uygulamalarda çeşitli avantajlar sağlayan birçok mikroorganizmanın ksilanaz enzimleri araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bu çalışmada, termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus ayderensis*'in hücre içi ksilanaz enzimini kodlayan gen belirlenerek Gen Bankası'nda (NCBI Erişim Numarası: OR269882) aktarıldı. Daha sonra ilk kez (AAyXYN329) enzimi rekombinant yöntemle üretildi, saflaştırıldı ve biyokimyasal olarak karakterize edildi. Sonuçlara göre AAYXYN329, 65 °C ve pH 6,5'ta optimum aktivite sergiledi. Aynı zamanda AAYXYN329, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında önemli aktivite gösterdi. Enzimin yarı ömrü 65 °C'de 72 saat olarak hesaplandığından, enzimin endüstriyel uygulamalar için avantajlı bir şekilde yüksek derecede termostabil olduğu sonucuna varılabilir. AAYXYN329'un K_m , V_{max} , k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri sırasıyla $4,09824 \pm 0,2245 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $75,05 \pm 0,03 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, $96,75 \text{ l}/\text{sn}$ ve $23,61 \text{ l}/\text{L}/\text{g.s-1}$ olarak hesaplandı. Bu değerler, enzimin termofilik karakteri ve üstün biyokimyasal özelliklerinin yanı sıra kayın ağacı için oldukça yüksek bir V_{max} ve katalitik aktivite değerine sahip olduğunu gösterdi. Ayrıca enzimin selülaz aktivitesi göstermediği belirlendi. Bu bulgular göz önüne alındığında, AAYXYN329'un sayısız avantajı onu çeşitli endüstriyel uygulamalar için tercih edilen bir aday haline getirmektedir.

KAYNAKÇA

- Abdel-Tawwab, M., & Hamed, H.S. (2018). Effect of bisphenol A toxicity on growth performance, biochemical variables, and oxidative stress biomarkers of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 34(5), 1117–1125. <https://doi.org/10.1111/JAI.13763>
- Adiguzel, G., Faiz, O., Sisecioglu, M., Sari, B., Baltaci, O., Akbulut, S., Genc, B., & Adiguzel, A. (2019). A novel endo-beta-1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25, purification, characterization and application in clarification of fruit juices. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 571-578. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.054
- Adsul, M.G., Bastawde, K.B., & Gokhale, D.V. (2009). Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides. *Bioresource Technology*, 100, 6488-6495. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.064>
- Aehle, W. (2007). *Enzymes in Industry: Production and Applications*. Wiley-VCH/Verlag GmbH and Co, Weinheim.
- Aimen, Saleem., Saboor, Waris., Toheed, Ahmed., & Romana, Tabassum. (2020). Biochemical characterization and molecular docking of cloned xylanase gene from *Bacillus subtilis* RTS expressed in *E. coli*; *International Journal of Biological Macromolecules* amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 1-18.
- Almagro, Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., Heinje, G.V., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37: 420-423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Alves, L.A., Ladeira, S., & Paixao, S. (2016). Characterization of thermophile xylanase produced by *Anoxybacillus* sp. strain 3M in submerged fermentation using brewers' spent grain. *Current Biochemical Engineering*, 3, 74-81. <https://doi.org/10.2174/2212711902666150519233412>
- An, J., Xie, Y., Zhang, Y., Tian, D., Wang, S., Yang, G., & Feng, Y. (2015). Characterization of a thermostable, specific GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii* with high catalytic activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 117, 13-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.04.003>
- Annamalai, N., Thavasi, R., Jayalakshmi, S., & Balasubramanian, T. (2009). Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated from marine environment. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 291–297.

- Annu, S.A. (2021). Advanced green materials: An overview. In *Advanced Green Materials, Fabrication, Characterization and Applications of Biopolymers and Biocomposites*, Shakeel, A., Ed.; *Elsevier*, 137, 541-547.
- Archana, A., & Satyanarayana, T. (1997). Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A 99 in solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 12-17.
- Aspinal, G.O. (1970). Polysaccharides, Pergamon Press Headington Hill Hall, Oxford, 431-438.
- Aspinall, G.O. (1959). Structural chemistry of the hemicelluloses. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 14, 429-468.
- Atkins, E.D.T. (1992). Three dimensional structure, interactions and properties of xylans. In: *Xylan and Xylanases* (Visser, J., Beldman, G., Someren, M.A.K., & Voragen, A.G.J., Eds), *Elsevier*, 21-39, Amsterdam.
- Baba, T., Shinke, R., & Nanmori, T. (1994). Identification and characterization of clustered genes for thermostable xylan-degrading enzymes, L-xylosidase and xylanase of *Bacillus stearothermophilus* 21. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2252-2258. DOI: 10.1128/aem.60.7.2252-2258.1994
- Bai, Y., Wang, J., Zhang, Z., Yang, P., Shi, P., Luo, H., Meng, K., Huang, H., & Yao, B. (2009). A new xylanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with broad-range pH activity and pH stability. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 187–194. DOI: 10.1007/s10295-009-0662-4
- Ball, A.S., & McCarthy, A.J. (1989). Production and purification of xylanase from actinomycetes. *Journal Of Applied Bacteriology*, 66, 439–444.
- Barabote, R.D., Parales, J.V., & Guo, Y.Y., (2010). Xyn10A, a thermostable endoxylanase from *Acidothermus cellulolyticus* 11B. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7363–7366. DOI: 10.1128/AEM.01326-10
- Basaran, P., & Ozcan, M. (2008). Characterization of beta-xylosidase enzyme from a *Pichia stipitis* mutant. *Bioresource Technology*, 99, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.056>
- Bastawde, K.B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 353-368. <https://doi.org/10.1007/bf01198746>
- Bataillon, M., Cardinali, A.P.N., & Duchiron, F. (1998). Production of xylanases from a newly
- Batista-Garc_1a, R.A., Sutton, T., & Jackson, S.A. (2017). Characterization of lignocellulolytic activities from fungi isolated from the deep-sea sponge *Stelletta normani*. *PLoS One* 12:e0173750.

- Bavinck, M. (2018). Enhancing the Wellbeing of Tamil Fishing Communities (and Government Bureaucrats too): The role of ur panchayats along the Coromandel Coast, India. In Johnson D., Acott T., Stacey N., & Urquhart J. (Eds.), *Social Wellbeing and the Values of Small-scale Fisheries*, 17, 175–194. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60750-4_8
- Bedford, M.R., & Classen, H.L. (1992). The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chick. In: Visser J, Beldman G, vanSomerem MAK, Voragen AGJ (eds) *Xylans and xylanases*, Elsevier, 361–370.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G.S., (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 326-338. <https://doi.org/10.1007/s002530100704>
- Beg, QK., Bhushan, B., Kapoor, M., & Hoondal, G.S. (2000). Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 396–402. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000010>
- Belduz, A.O., Colak, D.N., Bektas, K., & Canakcı, S. (2015). Screening of Xylanase and Glucose Isomerase Producing Bacteria Isolated from Hot Springs in Turkey. *Sakarya University Journal of Science*, 22 (6), 1804-1811. <https://doi.org/10.16984/saufenbilder.356720>
- Belkin, S., & Jannasch, H. W. (1985). A new extremely thermophilic, sulfur-reducing heterotrophic, marine bacterium. *Archives of Microbiology*, 141, 181–186. <https://doi.org/10.1007/BF00408055>
- Berenger, J., Frixon, C., Creuzet, N., & Bigliardi, J. (1985). Production, purification and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stercorarium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 31, 635-643.
- Berens, S., Kaspari, H., & Klemme, J. (1996). Purification and characterization of two different xylanases from the thermophilic actinomycete *Microtetraspora flexuosa* SIIX. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 235-241. DOI: 10.1007/BF00399612
- Bhalerao, J., Patki, A.H., Bhave, M., Khurana, I., & Deobagkar, D.N. (1990). Molecular cloning and expression of a xylanase gene from *Cellulomonas* sp. into *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 71-76.
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, 6:40. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>
- Bhat, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355–383. DOI: 10.1016/s0734-9750(00)00041-0

- Bhattacharyya, S., Khowala, S., Kumar, A., & Sengupta, S. (1997). Purification and characterization of an extracellular beta-xylosidase of *Termitomyces clypeatus*. *Biotechnology Progress*, 13, 822-827.
- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnology*, 3, 288-290.
- Biely, P. (1991). Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases. *ACS Symposium Series*, 460, 408-416.
- Biely, P. (1993). Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: *Hemicellulose and Hemicellulases*, Coughlan, M.P. & Hazlewood, G.P., (Eds.), pp. 29-51. Portland Press, Cambridge.
- Biely, P., & Petrakova, E. (1984). Novel inducers of the xylan-degrading enzyme system of *Cryptococcus albidus*. *Journal of Bacteriology*, 160, 408-412.
- Biely, P., (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, 3 (11), 286-2903.
- Biely, P., Kratky, Z., Vrsanska, M., & Urmanicova, D. (1980). Induction and inducers of endo-1,4-L-xylanase in the yeast *Cryptococcus albidus*. *European Journal of Biochemistry*, 108, 323-329.
- Biely, P., Vrsanska, M., Tenkanen, M., & Kluepfel, D., (1997). Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology*, 57 (1-3), 151-166. DOI: 10.1016/s0168-1656(97)00096-5
- Biswas, S.R., Jana, S.C., Mishra, A.K., & Nanda, G. (1990). Production, purification and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*. *Biotechnology Engineering*, 35, 244-251.
- Blanco, A., Vidal, T., Colom, J. F., & Pastor, F.I.J. (1995). Purification and Properties of Xylanase A from Alkali-Tolerant *Bacillus* sp. Strain BP-23. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (12), 4468-4470.
- Borchardt, J.(2013). Cloning and Functional Expression of Three Xylanase Genes from *Aspergillus fumigatus* in *Saccharomyces cerevisiae*, MSc Thesis, Faculty of Science at Stellenbosch University Faculty of Science at Stellenbosch University, 79
- Bradford, M.M., (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brillouet, J.M., & Joseleau, J.P. (1987). Investigation of the structure of a heteroxylan from the outer pericarp (beeswing bran) of wheat kernel. *Carbohydrate Research*, 159, 109-126.
- Chakdar, H., Kumar, M., & Pandiyan, K. (2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*, 6, 150. doi: 10.1007/s13205-016-0457-z

- Chauthaiwale, J., & Rao, M. (1994) Production and purification of extracellular D-xylose isomerase from an alkaliphilic, thermophilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4495-4499.
- Chen, J., Kim, S., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, & S., Zhang. (2018). Biomass-derived porous carbon materials with different dimensions for supercapacitor electrodes: a review. *Nucleic Acids Research*, 47, 1102–1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>
- Chen, Z., Zaky, A.A., Liu, Y., Chen, Y., Liu, L., Li, S., & Jia, Y. (2019). Purification and characterization of a new xylanase with excellent stability from *Aspergillus flavus* and its application in hydrolyzing pretreated corncobs. *Protein Expression and Purification*, 154, 91-97. DOI: 10.1016/j.pep.2018.10.006
- Choengpanya, K., Arthornthurasuk, S., Wattana-amorn, P., Huang, W.T., Plengmuankhae, W., Li, Y.K., & Kongsaree, P.T. (2015). Cloning, expression and characterization of beta-xylosidase from *Aspergillus niger* ASKU28. *Protein Expression and Purification*, 115, 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.07.004>
- Christian, N.J., Courcoulas, A.P., & Belle, S.H., (2013). Weight Change and Health Outcomes at 3 Years After Bariatric Surgery Among Individuals with Severe Obesity. *JAMA*, 310(22),2416–2425. doi:10.1001/jama.2013.280928
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G., (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanase. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 3-23. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.06.005
- Coughlan, M.P. (1992). Towards an understanding of the mechanism of action of main chain hydrolyzing xylanases. In: *Xylans and Xylanases* (Visser, J., Beldman, G., Someren, M.A.K. and Voragen, A.G.J., Eds.), syf. 111-141. Elsevier, Amsterdam.
- Courtin, C.M., Roelants, A., & Delcour, J.A. (1999). Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1870–1877.
- Damiano, V.B., Ward, R., Gomes, E., Alves-Prado, H.F., & Da Silva, R. (2006). Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129-132, 289-302. DOI: 10.1385/abab:129:1:289
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 15(9), 853-9. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00220-9. PMID: 8535779.
- de Camargo, B.R., Claassens, N.J., Quirino, B.F., Noronha, E.F., & Kengen, S.W.M. (2018) . Heterologous expression and characterization of a putative glycoside hydrolase family 43 arabinofuranosidase from *Clostridium thermocellum* B8.

Enzyme and Microbial Technology, 109, 74-83. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2017.09.014

- De Graaj, L.H., Van den Broeck, H.C., Van Ooijen, A.J.J., & Visser, J. (1994). Regulation of the xylanase encoding xlnA gene of *Aspergillus tubigenesis*. *Molecular Microbiology*, 12, 479-490. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01036.x
- Deesukon, W., Nishimurab, Y., Haradab, N., Sakamotob, T., & Wasana, S. (2011). Purification, characterization and gene cloning of two forms of a thermostable endo-xylanase from *Streptomyces* sp. SWU10. *Process Biochemistry*, 46, 2255–2262. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.004>
- Defaye, J., Driguez, H., John, M., Schmidt, J. and Ohleyer, E. (1985). Induction of D-xylan-degrading enzymes in *Trichoderma lignonum* by non metabolizable inducers. A synthesis of 4-thioxylobiose. *Carbohydrate Research*, 139, 123-132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407>.
- Dekker, M.D., Baha, M., & Sibai, M.D. (1991). Early detection of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 165(1), 160-172. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(91\)90245-M](https://doi.org/10.1016/0002-9378(91)90245-M)
- Dekker, R.F., & Richards, G.N. (1976). Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32, 277–352.
- Dekker, R.F.H., & Richards, G.N. (1975). Purification, properties and mode of action of hemicellulase-produced by *Ceratocystis paradoxa*. *Carbohydrate Research*, 39, 97-114. DOI: 10.1016/s0008-6215(00)82642-7
- Demain, A.L., & Solomon, N.A. (1981). In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*. *Scientific American, Freeman & Comp*, 3-14, San Francisco.
- Demirjian, dc., Moris-Vara, F., & Sassidy, Cs. (2001). Enzymes from Extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5,144–51. DOI: 10.1016/s1367-5931(00)00183-6
- Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D., & Derewenda, Z.S., (1994) . Crystal structure, at 2.6-Å° resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 20811-20814. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31892-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31892-6)
- Deshpande, V., Lachke, A., Mishra, C., Keskar, S., & Rao, M. (1986). Mode of action and properties of xylanase and L-xylosidase from *Neurospora crassa*. *Biotechnology Engineering*, 26,1832-1837.

- Dey, D., Hinge, J., Shendye, A., & Rao, M. (1992). Purification and properties of extracellular endoxylanases from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 436-442.
- Drula, E., Garron, M. Line., Dogan S., Lombard, V., Henrissat, B., & Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Research*, 50, 571–577. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>
- Dulger, S., Demirbag, Z., & Belduz, A.O. (2004). *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1499-1503. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02863-0>
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A.F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61 (8), 3891-3898. DOI: 10.1021/acs.jcim.1c00203
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z., & Heinze, T. (2005). —Hemicellulose. Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use Advances in Polymer Science 186, 1- 67. Eveleigh DE (1987) Cellulase: a perspective. Philosophical Transactions of the Royal Society London, 321, 435-437.
- Eda, S., Ohnishi, A., & Kato, K. (1976). Xylan isolated from the stalk of *Nicotiana tabacum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40, 359-364.
- Ekinci, Y.L., Balkaya C., Göktürkler G., & Turan, S., (2016). Model parameter estimations from residual gravity anomalies due to simple-shaped sources using Differential Evolution Algorithm. *Journal of Applied Geophysics*, 129, 133-147.
- Ellis, J.T., & Magnuson, T.S. (2012). Thermostable and alkalistable xylanases produced by the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* TWXYL3. *International Scholarly Research Notices*, 2012, 517524. <https://doi.org/10.5402/2012/517524>
- Esteban, R., Villanueva, J.R., & Villa, T.G. (1992). L-D-Xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. *Canadian Journal of Microbiology*, 28, 733-793. <https://doi.org/10.1139/m82-112>
- Fan, G., Yang, S., & Yan, Q., (2014). Characterization of a highly thermostable glycoside hydrolase family 10 xylanase from *Malbranchea cinnamomea*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 482–489. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.025
- Ferreira-Filho, E.X. (1994). The xylan degrading enzyme system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27, 1093-1109.
- Funaguma, T., Naito, S., Morita, M., Okumara, M., Sugiura, M., & Hara, A. (1991). Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei* Banier

- and Sartory. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 1163-1165. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870715>
- Gallardo, O., Diaz, P., & Pastor, F.I.J. (2003). Cloning and Characterization of Xylanase A from the Strain *Bacillus* sp.BP-7: Comparison with Alkaline pI-Low Molecular Weight Xylanases of Family 11. *Current Microbiology*, 48, 276-279.
- Gangadhar, B. N., Hariprasad, V. R., Sivakumar, P. T., Koparde, V., Varambally, S., Thirthalli, J., Varghese, M., & Basavaraddi, I. V. (2013). Effects of yoga intervention on sleep and quality-of-life in elderly A randomized controlled trial. *Indian Journal of Psychiatry* 55 364-368. DOI: 10.4103/0019-5545.116310
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker, J.M. (eds) The Proteomics Protocols Handbook. *Springer Protocols Handbooks*. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Gat, O., Lapidot, A., Alchana, T.I., Regueros, C., & Shoham, Y. (1994). Cloning and DNA sequence of the gene coding for *Bacillus stearothermophilus* T-6 xylanase. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1889-1896. DOI: 10.1128/aem.60.6.1889-1896.1994
- Gessesse, A. (1998). Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 3533-3535. doi: 10.1128/aem.64.9.3533-3535.1998
- Ghangas, G.S., Hu, J., & Wilson, D.B. (1989). Cloning of a *Thermonospora fusca* xylanase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 171, 2963-2969. doi: 10.1128/jb.171.6.2963-2969.1989
- Ghosh, A., Sutradhar, S., & Baishya, D. (2019). Delineating thermophilic xylanase from *Bacillus licheniformis* DM5 towards its potential application in xylooligosaccharides production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 34. DOI: 10.1007/s11274-019-2605-1
- Gibbs, M.D., Reeves, R.A., & Bergquist, P.K. (1995). Cloning, sequencing and expression of a xylanase gene from the extreme thermophilic *Dictyoglomus thermophilum* Rt 46B.1 and activity of the enzyme on fiber-bound substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4403-4408. DOI: 10.1128/aem.61.12.4403-4408.1995
- Gilbert, H.J., & Hazlewood, G.P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases. *The Journal of General Microbiology*, 139, 187-194. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-2-187>

- Gilbert, M., Breuil, C., & Saddler, J.N. (1992). Characterization of the enzymes present in the cellulase system of *Thielavia terrestris* 255B. *Bioresource Technology*, 39, 147-154.
- Goh, K.M., Kahar, U.M., Chai, Y.Y., Chong, C.S., Cha, K.P., & Ranjani, V. (2013). Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97:1475-1488. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4663-2>
- Goheen, D.W. (1981). Chemicals from wood and other biomass. Part I : Future supply of organic chemicals. *Journal of Chemical Education*, 58, 465-468.
- Goluguri, B.R., Thulluri, C., Cherupally, M., Nidadavolu, N., Achuthananda, D., Mangamuri, L.N., & Addepally, U. (2012). Potential of thermo and alkali stable xylanases from *Thielaviopsis basicola* (MTCC-1467) in biobleaching of wood Kraft pulp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 2369–2380. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9765-x>
- Gomes, J., & Steiner, W., (2004). The biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4), 223-235.
- Gosalves, M.J., Perez-Gonzalez, J.A., Gonzalez, R., & Navarro, A. (1991). Two L-glycanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: Molecular cloning expression and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo-L-(1,3)-(1,4)-glucanase. *Journal of Bacteriology*, 173, 7705-7710. doi: 10.1128/jb.173.23.7705-7710.1991
- Gosselin, M.D., Loonis, M., Samain, E., & Debeire, P. (1992). Purification and properties of a 22kDa endoxylanase excreted by a new strain of thermophilic *Bacillus*. In: Xylans and Xylanases (Visser, J., Beldman, G., Someren, M.A.K. and Voragen, A.G.J., Eds.). *Elsevier*, 463-466,
- Grajek, W. (1987). Production of D-xylanases by thermophilic fungi using different methods of culture. *Biotechnology Letters*, 9, 353-356.
- Gruber, K., Klintschar, G., Hayn, M., Schlacher, A., Steiner, A., & Kratky, C., (1988). Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: High-resolution x-ray structure and modeling studies. *Biochemistry*, 37 (39), 13475-13485.
- Gruninger, H., & Fiechter, A. (1986). A novel, highly thermostable D-xylanase. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 309-314. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90028-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90028-1)
- Guerfali, M., Maalej, I., Gargouri, A., & Belghith, H. (2009). Catalytic properties of the immobilized *Talaromyces thermophilus* beta-xylosidase and its use for xylose and xylooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57, 242-249. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.09.011>

- Gul-Guven, R. (2007). Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri izolasyonu, Tanımlanması ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmanii*'nin β -galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır (196).
- Gul-Guven, R. (2011). Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9, 1-10. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702110101.pdf
- Haapala, R., Linko, S., Parkkinen, E., & Suominen, P.(1994) Production of endo-1,4-L-glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam. *Biotechnology Techniques*, 8, 401-406.
- Haki, G.D., & Rakshit, Sk. (2003). Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review. *Bioresource Technology*, 89,17–34. DOI: 10.1016/s0960-8524(03)00033-6
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W., & Zupancic, S. (1996). Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*, 58, 137-161.
- Haltrich, D., Prenner, E., Prieb, M., & Steiner, W. (1992). Production of extremely high values of xylanase activity by *Schizophyllum commune*. In: *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, 123-128.
- Han, Y., & Chen, H. (2010). A beta-xylosidase from cell wall of maize: Purification, properties and its use in hydrolysis of plant cell wall. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63, 135-140. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.004>
- Han, Y.W., & Wang, X.(2013) Mobile Microbiome: Oral Bacteria in Extra-oral Infections and Inflammation. *Journal of Dental Research*, 92(6), 485-491. doi:10.1177/0022034513487559
- Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez L., & Bakker R. (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic. *Biomass*,1-49.
- Hatanaka, K. (2012). Incorporation of fluoruous glycosides to cell membrane and saccharide chain elongation by cellular enzymes. *Topics in Current Chemistry*, 308, 291–306. DOI: 10.1007/128_2011_276
- Hauli, I., Sarkar, B., Mukherjee, T., Chattopadhyay, A., Mukhopadhyay, S. (2013). Alkaline extraction of xylan from agricultural waste, for the cost effective production of xylooligosaccharides, using thermoalkaline xylanase of thermophilic *Anoxybacillus* sp. Ip-C. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 1, 126-131. <https://doi.org/10.18782/2320-7051>
- Hazlewood, G.P., & Gilbert, H.J. (1993). Molecular biology of hemicellulases. In: *Hemicellulose and Hemicallulases* (Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P., Eds.), syf. 103-106. Portland Press, London.

- Henrissat, B., & Coutinho, P.M. (2001). Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles. *Methods in Enzymology*, 330, 183–201. DOI: 10.1016/s0076-6879(01)30375-0
- Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J.P., & Davies, G. (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Progress and Promise for Science in Indonesia*, 92(15), 7090-7094. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.7090>
- Henrissat, B., Claeyssens, M., Tomme, P., Lemesle, L., & Mornon, J.P. (1989). Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene*, 81, 83–95.
- Herna'ndez, A., Lo'pez, J.C., Arenas, M., Santamar'ia, R., Di'az, M., Ferna'ndez-Abalos, J.M., Copa-Patin'õ, J.L., & Soliveri, J. (2008). Xylan-binding xylanase Xyl30 from *Streptomyces avermitilis*: cloning, characterization, and overproduction in solid-state fermentation. *Microbiology Intern Jobs, Employment*, 11, 133–141.
- Hernick, M., & Fierke, C.A. (2010). Active Site Metal Ion in UDP-3-O-((R)-3-Hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine Deacetylase (LpxC) Switches between Fe(II) and Zn(II) Depending on Cellular Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 285(44), 33788-33796. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.147173>
- Hodgson, J. (1994). The changing bulk biocatalyst market. *Biotechnology Sciences*, 12, 789-790. DOI: 10.1038/nbt0894-789
- Honda, H., Kudo, T., & Horikoshi, K. (1985). Molecular cloning and expression of the xylanase gene from alkalophilic Bacillus strain C-125 in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 161, 784-785. DOI: 10.1128/jb.161.2.784-785.1985
- Hrmova, M., Beily, P., & Vrsanka, M. (1989). Cellulose and xylan degrading enzymes of Aspergillus terreus. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 610-616.
- Hrmova, M., Biely, P., & Vrsanska, M. (1986) Specificity of cellulase and L-xylanase induction in Trichoderma reesei QM9414. *Archives of Microbiology*, 144, 307-311.
- Hrmova, M., Biely, P., Vrsanska, M. and Petrakova, E. (1984). Induction of cellulose and xylanase-degrading enzyme complex in the yeast Trichosporon cutaneum. *Archives of Microbiology*, 138, 371-376.
- Hrmova, M., & Fincher, G.B. (2001). Structure-function relationships of β - D-glucan endo- and exohydrolases from higher plants. *Plant Molecular Biology*, 47, 73–91. <https://doi.org/10.1023/A:1010619128894>
- Hu, Y.J., Smith, D.C., Cheng, K.J., & Forsberg, C.W. (1991). Cloning of a xylanase gene from Fibrobacter succinogenes 135 and its expression in Escherichia coli. *Canadian Journal of Microbiology*, 37, 554-561. <https://doi.org/10.1139/m91-093>

- Huang, J., Wang, G., & Xiao, L. (2005). Cloning, Sequencing and Expression of the xylanase gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 97, 802-808. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.04.011
- Hyun, Y.J., Kim, B., & Kim, D.H. (2012). Cloning and characterization of ginsenoside Ra1-hydrolyzing beta-D-xylosidase from *Bifidobacterium breve* K-110. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 535-540. DOI: 10.4014/jmb.1110.10001
- Ishaque, M., & Kluepfel, K.D. (1981). Production of xylanolytic enzymes by *Streptomyces favogriseus*. *Biotechnology Letters*, 3, 481-486.
- Ito, K., Ogassawara, J., Sugimoto, T. and Ishikawa, T. (1992). Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 547-550. DOI: 10.1271/bbb.56.547
- Jalal, K.C.A., Alam, Z., & Mansor, M.F. (2009). Optimization of decolorization of methylene blue by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2-3), 708-715. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.085>
- Jalal, A., Rashid, N., Rasool, N., & Akhtar, M. (2008). Gene Cloning and Characterization of a xylanase from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain R5. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107 (4), 360-365. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2008.12.005
- Jordan, D., Mertens, J., & Braker, J. (2009). Aminoalcohols as probes of the two-subsite active site of beta-D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794, 144-158. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.09.015>
- Joseleau, J.P., Cartier, N., Chambat, G., Faik, A., & Ruel, K. (1992). Structural features and biological activity of xyloglucans from suspension-cultured plant cells. *Biochimie*, 72, 81-88. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90187-J](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90187-J)
- Kacagan, M., Canakci, S., Sandalli, C. (2008). Characterization of a xylanase from a thermophilic strain of *Anoxybacillus pushchinoensis* A8. *Biologia*, 63:599-606. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0134-8>
- Kapoor, M., Beg, Q.K., Bhushan, B., Singh, K., Dadhich, K.S., & Hoondal, G.S. (2001). Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibers. *Process Biochem*, 36, 803-807. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00282-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00282-X)
- Karakuş, Y. Y. (2021). Enzim ve Protein Mühendisliği. *Food Biotechnology*, 1, 39-47.
- Karaoglu, H., Yanmis, D., Sal, F.A., Celik, A., Canakci, S., & Belduz, A.O. (2013). Biochemical characterization of a novel glucose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2T that displays a high level of activity and thermal stability.

- Kazuya, H., Youchi, N., Taksuro, M., Nachiro, M., Tai, U., Heido, S., Kazuo, K., & Michio, K. (1997). Purification and properties of a low temperature active enzyme degrading both cellulose and xylan from *Acremonium alcalophilum* JCM 7366. *Seibutsu Kogaku Kaishi* 75, 9-14. DOI:10.5958/2230-732X.2014.00257.5
- Kellett, L.E., Poole, D.M., Ferreira, L.M.A., Durrant, A.J., Hazlewood, G.P., & Gilbert, H.J. (1990). Xylanase B and anarabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contain identical cellulose binding domains and are encoded by adjacent genes. *Biochemical Journal*, 272, 369-376. DOI: 10.1042/bj2720369
- Khasin, A., Alchanti, I., & Shoham, Y. (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Applied and Environmental Microbiology*, 59,1725-1730. DOI: 10.1128/aem.59.6.1725-1730.1993
- Kim, D., Han, M., Oh, H., Park, D., Kim, S., Lee, S., Shin, D., Son, K., Bae, K., & Park, H. (2010). Catalytic properties of a GH10 endo-beta-1,4-xylanase from *Streptomyces thermocarboxydus* HY-15 isolated from the gut of *Eisenia fetida*. *Journal of Molecular Catalysis*, 62, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.08.015>
- Kim, D., Lim, H., Lee, K., & Hwang, I. (2018). Identification of a new 1,4-beta-D-xylosidase Pae1263 from the whole genome sequence of *Paenibacillus terrae* HPL-003. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23, 168-175.
- Kluepfel, D., Vets-Menta, S., Aujmont, F., Sharek, F., & Morosoli, R. (1990). Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B). *Biochemical Journal*, 267, 45-50.
- Klug, W., & Cummings, M., (2003). Genetik Kavramlar. Palme yayıncılık, 500, Türkiye.
- Ko, C., Tsai, C., Tu, J., Lee, H., Ku, L., Kuo, P., & Lai, Y. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Process Biochemistry*, 45,1638-1644. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.06.015>
- Kocabas, A., Gümüştas, N., & Gönek, S. (2017). Topraktan Ksilanaz Üreten Mikroorganizmaların Taranması ve Ksilanazın Kısmi Karakterizasyonu. *Karaelmas Science and Engineering Journal* ,7(2), 503-508.
- Koo, B.J., Oh, H.G., Chu, K.H., Yung, C.K., Jung, K.H., & Ryu, D.Y. (1996). Purification and characterization of *Clostridium thermocellum* xylanase from

- recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6, 414-419.
- Kormelink, F.J.M., Searle-van Leeuwen, M.J.F., Wood, T.M., & Voragen, A.G.J. (1991). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 231-232. DOI:10.1046/j.1432-1327.2000.01758.x
- Kosciow, K., Domin, C., Schweiger, P., & Deppenmeier, U. (2016). Extracellular targeting of an active endoxylanase by a TolB negative mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43, 989-999. DOI: 10.1007/s10295-016-1770-6
- Krishnamurthy, S., & Vithayathil, P.J. (1989). Purification and characterization of endo-1,4-L-xylanase from *Paecilomyces varioti* banier. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 67, 77-82. [http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X\(89\)90183-9](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X(89)90183-9)
- Kristjansson, M.M., & Asgeirsson, B. (2002). Properties of Extremophilic Enzymes and Their Importance in Food Science and Technology. *Handbook of Food Enzymology*, 77-99.
- Kudo, J., Ohkoshi, A., & Horikoshi, K. (1985). Molecular cloning and expression of a xylanase gene of alkalophilic *Aeromonas* sp. No. 212 in *Escherichia coli*. *The Journal of General Microbiology*, 13, 2825-2830. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-10-2825>
- Kuhad, R.C., & Singh, A. (1993). Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 13, 115-121. <https://doi.org/10.3109/07388559309040630>
- Kulkarni, N., Chauthaiwale, J., & Rao, M. (1995). Characterization of the recombinant xylanases in *Escherichia coli* from an alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 972-976. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00144-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00144-8)
- Kumar, H.D., & Nussinov, R., (2001). How Do Thermophilic Proteins Deal with Heat? A review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 1216-1233. DOI: 10.1007/PL00000935
- Kumar, B., Leese, R., Leese, J.P., Rodrigues, S.J., & Abraham, K. M. (2009). A Solid-State, Rechargeable, Long Cycle Life Lithium–Air Battery. *Journal of The Electrochemical Society*, 1, 157. DOI:10.1149/1.3256129
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., & Stroeve, P. (2018). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8):3713-3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>

- Leathers, T.D., Kurtzman, C.P., & Detroy, R.W. (1984). Overproduction and regulation of xylanase in *Aureobasidium pullulans* and *Cryptococcus albidus*. *Biotechnology and Bioengineering*, *14*, 225-250.
- Li, T., Wu, Y., & He, J. (2018). Heterologous expression, characterization and application of a new beta-xylosidase identified in solventogenic *Clostridium* sp. strain BOH3. *Process Biochemistry*, *67*, 99-104.
- Liu, M.Q., & Liu, G.F. (2008). Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. *Protein Expression and Purification Journal*, *57*, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.10.020>
- Liu, X., Jiang, Z., Liu, Y., You, X., Yang, S., & Yan, Q. (2019). Biochemical characterization of a novel exo-oligoxylanase from *Paenibacillus barengoltzii* suitable for monosaccharification from corncobs. *Biotechnol Biofuels*, *12*(190), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1532-6>
- Liebl, W., Winterhalter, C., Baumeister, W., Armbrrecht, M., & Valdez, M. (2008). Xylanase attachment to the cell wall of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology*, *190*, 1350-1358. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.01149-07>
- Linares-Pasten, J.A., Aronsson, A., & Karlsson, E.N., (2018). Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass, *Current Protein and Peptide Science*, *19*, 48-67. doi: 10.2174/1389203717666160923155209
- Liu, W., Lu, Y., Ma, G. (1999). Induction and glucose repression of endo- β -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL 409. *Process Biochemistry*, *34*, 67-72.
- Liu, W., Zhu, W., Lu, Y., Kong, Y., & Ma, G. (1998). Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. *Process Biochemistry*, *33*, 331-326. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00071-X)
- Lopez, C., Blanco, A., & Pastor, F I.J. (1998). Xylanase production by a new alkalitolerant isolate of *Bacillus*. *Biotechnology Letters*, *20* (3), 243-246.
- Luo, H., Li, J., & Yang, J., (2009). A thermophilic and acid stable family-10 xylanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. *Extremophiles*, *13*, 849-857. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0272-0>
- Luthi, E., Love, D.R., Anulty, J.Mc., Wallace, C., Caughey, P.A., Saul, D., & Bergquist, P.L. (1990). Cloning, sequence analysis and expression of genes encoding xylan-degrading enzymes from the thermophile *Caldocellum saccharolyticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*, 1017-1024. doi: 10.1128/aem.56.4.1017-1024.1990
- Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Dasilra, M.J.S., Egmond, M.R., Hagemans, M.L.D., Vangarcom, R.F.M., Hessing, J.G.M., Vanderhondel, C.A.M.J.J., &

- Vanrptterdam, C., (1992). Xylanases and their application in bakery. *Elsevier*, 349-360.
- Mach, R.L., Strauss, J., Zeilinger, S., Schindler, M., & Kubicek, C.P. (1996). Carbon catabolite repression of xylanase I(xyn I) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology*, 21, 1273-1281. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1996.00094.x
- Mahmoud, A.M., Kostrzewa, M., Marolda, V., Cerasuolo, M., Maccarinelli, F., Coltrini, D., Rezzola, S., Giacomini, A., Mollica, M.P., Motta, A., Paris, D., Zorzano, A., Marzo, V.D., Ronca, R., & Ligresti, A. (2023). Cannabidiol alters mitochondrial bioenergetics via VDAC1 and triggers cell death in hormone-refractory prostate cancer. *Pharmacological Research*, 34-37. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106683>
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning. *Cold Spring Harbor, Newyork*.
- Marcolongo, L., La Cara, F., Del Monaco, G., Paixao, S.M., Alves, L., Marques, I.P., & Ionata, E. (2019). A novel beta-xylosidase from *Anoxybacillus* sp. 3M towards an improved agro-industrial residues saccharification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 1224-1234. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.075
- Marui, M., Nakanishi, K., & Tsueneo, Y. (1985). Immunological properties and constituent amino acids of three xylanases produced inductively from *Streptomyces* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 3409-3413. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867284>
- Mathrani, I.M., & Ahring, B.K. (1991). Isolation and characterization of a strictly xylan-degrading *Dictyoglomus* from a man-made thermophilic anaerobic environment. *Microbiology Journal*, 157, 13-17. <https://doi.org/10.1007/BF00245328>
- Mathrani, I.M., & Ahring, B.K. (1992). Thermophilic and alkalophilic xylanases from several *Dictyoglomus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 23-27. <https://doi.org/10.1007/BF00169413>
- Maurelli, L., Giovane, A., & Esposito, A. (2008). Evidence that the xylanase activity from *Sulfolobus solfataricus* Oalpha is encoded by the endoglucanase precursor gene (ssol1354) and characterization of the associated cellulase activity. *Extremophiles*, 12, 689–700. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0175-5>
- McCarthy, A.J., Peace, E., & Broda, P. (1985). Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21, 238-244. <https://doi.org/10.1007/BF00295129>

- Mendicuti, C., Laura, P., Trejo-Aguilar, B.A., & Aguilar, O.G. (1997). Thermostable xylanases produced at 37°C and 45°C by a thermotolerant *Aspergillus* strain. *FEMS Microbiology Letters*, 146, 97-102. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10177.x>
- Merivuori, H., Sands, J.A., & Montencourt, B.S. (1985). Effects of tunicamycin on secretion and enzymatic activities of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 60-66. <https://doi.org/10.1007/BF02660119>
- Mhetras, N., Liddell, S., & Gokhale, D. (2016). Purification and characterization of an extracellular beta-xylosidase from *Pseudozyma hubeiensis* NCIM 3574 (PhXyl), an unexplored yeast. *AMB Express*, 6, 73. doi: 10.1186/s13568-016-0243-7
- Mhetras, N., Liddell, S., & Gokhale, D. (2016). Purification and characterization of an extracellular beta-xylosidase from *Pseudozyma hubeiensis* NCIM 3574 (PhXyl), an unexplored yeast. *AMB Express*, 6, 73. DOI: 10.1186/s13568-016-0243-7
- Mhiri, S., Bouanane-Darenfed, A., Jemli, S., Neifar, S., Ameri, R., Mezghani, M., Bouacem, K., Jaouadi, B., & Bejar, S. (2020). A thermophilic and thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis*: Recombinant expression, characterization and application in paper biobleaching. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 808-817. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.162>
- Miller, G.L. (1951). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 426-428.
- Minami, K., Sakamoto, T., Hasegawa, T., & Inamori, Y. (1992). Purification, properties and partial amino acid sequences of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 371-375. DOI: 10.1128/aem.58.1.371-375.1992
- Mishra, C., Keskar, S., & Rao, M. (1984). Production and properties of extracellular endoxylanases from *Neurospora crassa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 224-228. DOI: 10.1128/aem.48.1.224-228.1984
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G.A., Sonnhammer, E.L.L., Tosatto, S.C.E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L.J., Finn, R.D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(41):412-419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
- Morales, P., Madrarro, A., Flors, A., Sendra, J.M., & Gonzalez, J.A.P. (1995). Purification and characterization of a xylanase and arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 424-429. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00062-V](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00062-V)

- Moriyama, S., Fukusaki, E., Cabrera, J.C., Shinmyo, A., & Okada, H. (1987). Structure and expression of genes coding for xylan-degrading enzymes of *Bacillus pumilus*. *European Journal of Biochemistry*, 166, 539-545. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1987.tb13547.x
- Morosoli, R., Dorand, S., & Boucher, F. (1989). Stimulation of xylanases synthesis in *Cryptococcus albidus* by cyclic AMP. *FEMS Microbiology Letters*, 57, 57-60. DOI: 10.1016/0378-1097(89)90146-8
- Morosoli, R.J., Bertrand, J.L., Mondou, F., Shareck, F., & Klupfel, D. (1986). Purification and properties of a xylanases from *Streptomyces lividans*. *Biochemistry Journal*, 239, 587-592.
- Morris, D.D., Gibbs, M.D., & Chin, C.W. (1998). Cloning of the xynB gene from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 and action of the gene product on kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1759-1765. DOI: 10.1128/AEM.64.5.1759-1765.1998
- Murugan, S., Arnold, D., & Pongiya, U.D. (2011). Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. *Enzyme Research*, 12, 20-25. <https://doi.org/10.4061/2011/696942>
- Muzard, M., Aubry, N., Plantier-Royon, R., ODonohue, M., & Remond, C. (2009). Evaluation of the transglycosylation activities of a GH 39 beta-D-xylosidase for the synthesis of xylose-based glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.10.004>
- Nakanishi, K., & Yasui, T. (1980). Production of xylanase by *Streptomyces* sp. using non-metabolizable inducer. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 2729-2730.
- Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R., & Horikoshi, K. (1993). Production of alkaline xylanase by a newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(2), 221-4. <https://doi.org/10.1007/BF00327842>
- Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A., & Kawamura, Y. (1990). Purification and properties of thermostable xylanase and L-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *Journal of Bacteriology*, 172, 6669-6672. DOI: 10.1128/jb.172.12.6669-6672.1990
- Natesh, R., Bhanumoorthy, P., Vithayathil, P.J., Sekar, K., Ramakumar, S., & Viswamitra, M.A. (1999). Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of a tehermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Molecular Biology*, 288 (5): 999-1012. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2727>

- Nelson D.L., & Cox, M.M. (2005). Dry and heat stress affects H₂S production of *Salmonella* on selective plating media. *Journal of Environmental Science and Health*, 1, 313-316.
- Nevalainen, K. M., & Palva, E.T. (1978). Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *trichoderma viride* unable to hydrolyze cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 963. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.35.1.11-16.1978>
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., & Antranikian, G. (1999). Extremophiles As a Source of Novel Enzymes For Industrial Application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 711-729. DOI: 10.1007/s002530051456
- Nieto-Dominguez, M., de Eugenio, L.I., Barriuso, J., Prieto, A., Fernandez de Toro, B., Canales-Mayordomo, A., & Martinez, M.J. (2015). Novel pH-stable glycoside hydrolase family 3 beta-xylosidase from *Talaromyces amestolkiae* an enzyme displaying regioselective transxylosylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 6380-6392. DOI: 10.1128/AEM.01744-15
- Okazaki, W., Akiba, T., Horikoshi, K., & Akahoshi, E. (1984). Production and properties of two types of xylanases 446 N. Kulkarni et al. / FEMS Microbiology Reviews 23 411-456 from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 19, 335-340.
- Outturup, C., & Jørgensen, M. (2002) Discourse Analysis as Theory and Method. *SAGE Publications*, 1-23. <https://doi.org/10.4135/9781849208871>
- Ozdemir, Z.O., & Kayı, Z. (2019). Buğdayın Biyoetanol üretimindeki önemi. *BEU Journal of Science*, 8 (2), 725-730.
- Pal, A., & Khanum, F. (2011). Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. *Process Biochemistry*, 46, 879–887. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.12.009>
- Panbangred, W.A., Shinmyo, S., Kinoshita, S., & Okada, H. (1983). Molecular cloning of a xylanase from *Bacillus pumilus* in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*, 192, 335-341. DOI: 10.1007/BF00392172
- Park, C., Choi, J., Kyung, M., Seo, S., Jo, S., Lee, K., Kim, P., Wang, N., Jung, S., & Mun, S. (2017). Application of *Bacillus pumilus* beta-xylosidase reaction and simulated moving bed purification to efficient production of high-purity xylobiose from xylose. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 47, 431-438. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.12.015>
- Patel, H., Kumar, A.K., & Shah, A. (2018). Purification and characterization of novel bi-functional GH3 family beta-xylosidase/beta-glucosidase from *Aspergillus*

- niger ADH-11. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1260-1269. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.132>
- Paul, J. and Varma, A.K. (1990). Influence of sugars on endoglucanase and L-xylanase activities of a *Bacillus* strain. *Biotechnology Letters*, 12, 61-64.
- Paysan-Lafosse, T., Monzon, V., Wood, V., Bateman, A. (2022). Reciprocal best structure hits: using AlphaFold models to discover distant homologues. *Bioinformatics Advances*, 2(1), vbac072 <https://doi.org/10.1093/bioadv/vbac072>
- Penbroke, J.T., Sweeny, B., & Whelan, R.A. (1992). Reduction in xylanase activity in *Pseudomonas flavigena* extracts is a result of protease activity. In: Xylans and Xylanases. *Elsevier*, 479-482.
- Pettersen, J., Kim, M.H., & Bullard, C.W. (2004). Fundamental process and system design issues in CO₂ vapor compression systems. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2(30), 119-174. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2003.09.002>
- Perez-Avalos, O.P., Teresa, P., Ignacio, M., & Mayra, D. (1996) Induction of xylanase and L-xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 405-409.
- Persidis, A. (1998). Extremophiles. *Nature Biotechnology*, 16, 593-594.
- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., & Amorim, D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67 (5), 577-591. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- Prade, R.A. (1995). Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13, 101-131.
- Puchart, V., Katapodis, P., Biely, P., Kremnický, L., Christakopoulos, P., Vrsanska, M., Kekos, D., Marcis, B.J., & Bhat, M.K. (1999). Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 355–361. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00132-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00132-X)
- Puls, J., & Schuseil, J. (1991). Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics. *Journal of Biotechnology*, 18, 69-83. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(91\)90236-O](https://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90236-O)
- Rahmani, N., Kahar, P., Lisdiyanti, P., Lee, J., Yopi, J., Prasetya, B., Ogino, C., & Kondo, A. (2019). GH-10 and GH-11 endo-1,4-beta-xylanase enzymes from *Kitasatospora* sp. produce xylose and xylooligosaccharides from sugarcane bagasse with no xylose inhibition. *Bioresource Technology*, 272, 315-325. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.007>

- Rajaram, S., & Varma, A. (1990). Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 141-144. <https://doi.org/10.1007/BF00170939>
- Ramos, C., Morais, H., Forgacs, E., Cserhati, T., Matos, N., & Oliveira, J.S. (2000). Biochemical characterization of xylanases of four strains of *Lentinus edodes*.
- Rani, S., & Nand, K., (1996). Development of cellulase-free xylanase producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 23-28. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(96\)00061-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(96)00061-0)
- Raquel, A., Carolina, A., Emilia, C., Elisa, E., Fontana, J.D., Madalen, B., Advionie, M.F., & Duran, N. (1997). Stability and chemical modification of xylanase from *Aspergillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 25, 19-27.
- Rasmussen, L.E., Soerensen, J.F., & Meyer, A.S. (2010). Kinetics and substrate selectivity of a *Triticum aestivum* xylanase inhibitor (TAXI) resistant D11F/R122D variant of *Bacillus subtilis* XynA xylanase. *Journal of Biotechnology*, 146, 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.02.012>
- Rasmussen, L.E., Sorensen, H.R., Vind, J., & Vikso-Nielsen, A. (2006). Mode of action and properties of the beta-xylosidases from *Talaromyces emersonii* and *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Engineering*, 94, 869-876. <https://doi.org/10.1002/bit.20908>
- Ratankhanokchai, K., Kyu, K.L., & Tantichareon, M. (1999). Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 694-697. DOI: 10.1128/AEM.65.2.694-697.1999
- Rattiya, W., Pason, P., Kyu, K. L., Sakka, K., Kosugi, A., Mori, Y., & Ratanakhanokchai, K. (2009). Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Encoding a Multidomain Endo- β -1,4 Xylanase from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6, and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 277-285.
- Reily, P.J. (1981). Xylanases: Structure and function. *Basic Life Sciences*, 18, 111-129. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3980-9_8
- Safitri, VAD., & Nani, D.A. (2021). Exploring the relationship between formal management control systems, organisational performance and innovation: The role of leadership characteristics. *Asian Journal of Business and Accounting*, 14, 1.
- Sakka, K., Maeda, Y., Hakamada, Y., Takahashi, N., & Shimada, K. (1991). Purification and some properties of xylanase from *Clostridium stercorarium* strain HX-1. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 247-248. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870570>

- Sandhu, J.F., & Kennedy, J.S. (1984). Molecular cloning of *Bacillus polymyxa* (1-4) L-D-xylanase gene in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 6, 271-274. doi: 10.1128/aem.54.4.1023-1029.1988
- Schulze, E. (1891). Information regarding chemical composition of plant cell membrane. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 24, 2277–2287.
- Shallom, D., & Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 219-228. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00056-0)
- Sharma, H.S.S. (1987). Enzymatic degradation of residual non-cellulosic polysaccharides present on dew-retted flax fibers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26, 358–362.
- Sharma, K., Antunes, I., Rajulapati, V., & Goyal, A. (2018). Molecular characterization of a first endo-acting beta-1,4-xylanase of family 10 glycoside hydrolase (PsGH10A) from *Pseudopedobacter saltans* comb. nov. *Process Biochemistry*, 70, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.025>
- Shendye, A., & Rao, M. (1993). Cloning and extracellular expression in *Escherichia coli* of xylanases from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59. *FEMS Microbiology Letters*, 108, 297-302. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb06119.x
- Shrinivas, D., Savitha, G., Raviranjana, K., & Naik, G.R. (2010). A highly thermostable alkaline cellulase-free xylanase from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99 suitable for paper and pulp industry: purification and characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 2049-2057. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8980-6>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., & Higgins, D.G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using. *The Clustal Omega Multiple Alignment Package*, 7:539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Simpson, H.D., Haußer, U.R., & Daniel, R.M. (1991). An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. *Biochemical Journal*, 277, 413-417. DOI: 10.1042/bj2770413
- Singh, V., Pandey, V.C., & Agrawal, S. (2013). Potential of *Laceyella sacchari* strain B42 crude xylanase in biobleaching of kraft pulp. *African Journal of Biotechnology*, 12(6), 570–579.
- Srivastava, R., & Srivastava, A.K. (1993). Characterization of a bacterial xylanase resistant to repression by glucose and xylose. *Biotechnology Letters*, 15, 847-852.
- Steiner, W., LaJerty, R.M., Gomes, I., & Esterbauer, H. (1987). Studies on a wild type strain of *Schizophyllum commune*: Cellulase and xylanase production and

- formation of the extracellular polysaccharide schizophyllan. *Biotechnology Bioengineering*, 30, 169-178.
- Stutzenberger, F.J., & Bodine, A.B. (1992). Xylanase production by *Thermomonospora curvata*. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 504-511.
- Sung, W.L., Luk, C.K., & Zahab, D.M. (1993). Overexpression and purification of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* xylanases in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 4, 200-206. DOI: 10.1006/prep.1993.1026
- Sunna, A., & Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17, 39-67. DOI: 10.3109/07388559709146606
- Suzuki, S., Fukuoka, M., Ookuchi, H., Sano, M., Ozeki, K., Nagayoshi, E., Takii, Y., Matsushita, M. Tada, S., Kusumoto, K., & Kashiwagi, Y. (2010). Characterization of *Aspergillus oryzae* glycoside hydrolase family 43 beta-xylosidase expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 115-117. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.07.018
- Taibi, Z., Saoudi, B., Boudelaa, M., Trigui, H., Belghith, H., Gargouri, A., & Ladjama, A. (2012). Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(3), 663-79. doi: 10.1007/s12010-011-9457-y
- Takenishi, S., & Tsujisaka, Y. (1973). Structure of the oligosaccharides from the enzymic hydrolyzate of rice straw arabinoxylan by a xylanase of *Aspergillus niger*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37, 1385-1391. DOI:10.1080/00021369.1973.10860840
- Teeravivattanakit, T., Baramée, S., Phitsuwan, P., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Sakka, K., & Ratanakhanokchai, K. (2016). Novel trifunctional xylanolytic enzyme Axy43A from *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 exhibiting endo-xylanase, beta-D-xylosidase, and arabinoxylan arabinofuranohydrolase activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 6942-6951. DOI: 10.1128/AEM.02256-16
- Tester, R.F., Qi, X., & Karkalas, J. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, 130, (1-2), 39-54. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.01.016>
- Thomson, J.A. (1993). Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiology Reviews*. 104, 65-82.
- Timell, T.E. (1965). Wood hemicelluloses: Part II. *Carbohydrate Chemistry*, 20, 409-483.
- Timell, T.E. (1967). Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Science. Technology*, 1, 45-70.

- Tomme, P., Gilkes, N.R., Robert, C.M.Jr., Warren, A.J., & Kilburn, D.G. (1994). An internal cellulose-binding domain mediates adsorption of an engineered bifunctional xylanase/ cellulase. *Protein Engineering*, 7, 117-123. DOI: 10.1093/protein/7.1.117
- Törrönen, A., & Rouvinen, J., (1997). Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- β -xylanases. *Journal of Biotechnology*, 57 (1-3): 137-149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00095-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00095-3)
- Turker, S., Erten, O., & Ozer, Y. (2004). Nasal route and drug delivery systems. *Pharmacy World and Science*, 26, 137-142.
- Uchino, F., & Fukuda, O. (1983). Taxonomic characteristics of a acidophilic strain of *Bacillus* producing thermophilic acidophilic amylase and thermostable xylanase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 965-967. <https://doi.org/10.1080/00021369.1983.10865774>
- Uday, U.S.P., Choudhury, P., Bandopadhyay, T.K., & Bhunia, B. (2016). Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 1041-1054. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.086>
- Ul Haq, I., Hussain, Z., Khan, M., Muneer, B., Afzal, S., Majeed, S., & Akram, F. (2012). Kinetic and thermodynamic study of cloned thermostable endo-1,4-beta-xylanase from *Thermotoga petrophila* in mesophilic host. *Molecular Biology Reports*, 39, 7251-7261. DOI: 10.1007/s11033-012-1555-6
- Ul Haq, I., Hussain, Z., Khan, M., Muneer, B., Afzal, S., Majeed, S., & Akram, F. (2012). Kinetic and thermodynamic study of cloned thermostable endo-1,4-beta-xylanase from *Thermotoga petrophila* in mesophilic host. *Molecular Biology Reports*, 39, 7251-7261. DOI: 10.1007/s11033-012-1555-6
- Umemoto, H., Ihsanawati, H., Inami, M., Yatsunami, R., Fukui, T., Kumasaka, T., Tanaka, N., & Nakamura, S. (2009). Improvement of alkaliphily of *Bacillus alkaline* xylanase by introducing amino acid substitutions both on catalytic cleft and protein surface. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 965-967. DOI: 10.1271/bbb.80869
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40, (15),115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Utt, E.A., Eddy, C.K., Keshav, K.F., & Ingram, L.O. (1991). Sequences and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* xyl B gene encoding a novel bifunctional protein with L-D-xylosidase and -L-arabinofuranosidase activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1227-1234.

- Ü., Çakmak. (2015). Termofilik *Geobacillus* sp. Tf16'dan Ksilanazın Klonlanması, Ekspresyonu, İmmobilizasyonu, Karakterizasyonu Ve Endüstriyel Uygulamalarının İncelenmesi.115 syf
- Verma, D., & Satyanarayana, T. (2012). Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. *Bioresource Technology*, 117,360-367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.034>
- Viikari, L., Ranva, M., Kantelinen, A., Sandquist, J., & Linko, M. (1986). Bleaching with enzymes. Third international conference in biotechnology in pulp and paper industry. 16–19 June, Stockholm,
- Visvanathan, R., Veeravasarp, V.S.R., Rothkopf, C. (2016). Model-driven Simulations for Deep Convolutional Neural Networks. *Computer Vision and Pattern Recognition*, 30, 40. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1605.09582>
- Voget S., Steele, H.L., & Streit W.R. (2006). Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulose. *Journal of Biotechnology*, 126(1), 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.011>
- Waino, M., & Ingvorsen, K. (2003). Production of b- xylanase and bxylosidaseby the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles*, 7, 87–93. <https://doi.org/10.1007/s00792-002-0299-y>
- Walia, A., Mehta, P., Chauhan, A., & Shirkot, C.K. (2013). Optimization of cellulase-free xylanase production by alkalophilic *Cellulosimicrobium* sp. CKMX1 in solid-state fermentation of apple pomace using central composite design and response surface methodology. *Annals of Microbiology*, 63, 187–198. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0460-5>
- Walia, A., Mehta, P., Chauhan, A., Kulshrestha, S., Shirkot, C.K. (2014). Purification and characterization of cellulase-free low molecular weight endo b-1, 4 xylanase from an alkalophilic *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 isolated from mushroom compost. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 2597–2608. DOI: 10.1007/s11274-014-1683-3
- Wang, J., Bai, Y., Yang, P., Shi, P., Luo, H., & Meng, K. (2010). A new xylanase from thermoalkaline *Anoxybacillus* sp. E2 with high activity and stability over a broad pH range. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26:917-924. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0254-5>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Researc*, 46(1):296-303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

- Weng, X.Y., & Sun, J.Y. (2005). Construction, expression, and characterization of a thermostable xylanase. *Current Microbiology*, 51, 188-192. DOI: 10.1007/s00284-005-4543-4
- Whistler, R.L., & Richards, E.L. (1970). Hemicelluloses. In: Pigman W, Horton D (eds) The carbohydrates. *Academic Press*, 447–469.
- Whitehead, T.R., & Hespell, R.B. (1989). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a xylanase gene from *Bacteroides ruminicola* 23. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 893-896. doi: 10.1128/aem.55.4.893-896.1989
- Winterhalter, C., & Liebl, W. (1995). Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1810-1815. DOI: 10.1128/aem.61.5.1810-1815.1995
- Wiseman, A. (1987). Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. *The Application of Enzymes in Industry*, 274-373.
- Wong, K.K.Y., & Saddler, J.N. (1992). *Trichoderma* xylanases, their properties and purification. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12, 413–435. <https://doi.org/10.3109/07388559209114234>
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. & Saddler, J.N. (1988). Multiplicity of beta-1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbiology Journal*, 52, 305–317.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., Saddler, J.N., & Yaguchi, M. (1986). Purification of a third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 32, 570-574. DOI:10.1139/m86-106
- Wu, H., Cheng, X., Zhu, Y., Zeng, W., Chen, G., & Liang, Z. (2018). Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable endo-xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 and its use in biobleaching on eucalyptus kraft pulp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(1), 46-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.08.006>
- Xiong, J.S., Balland-Vanney, M., Xie, Z.P., Schultze, M., Kondorosi, A., Kondorosi, E., & Staehelin, C. (2007). Molecular cloning of a bifunctional beta-xylosidase/alpha-L-arabinosidase from alfalfa roots: heterologous expression in *Medicago truncatula* and substrate specificity of the purified enzyme. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2799-2810. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm133>
- Yadav. P., Maharjan, J., Korpole, S., Prasad, G.S., Sahni, G., Bhattarai, T., & Sreerama, L. (2018). Production, Purification, and Characterization of Thermostable Alkaline Xylanase from *Anoxybacillus kamchatkensis*

- NASTPD13. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6:65. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00065>
- Yang, B., & Wyman, C.E., (2004). Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 86 (1), 88-98. DOI: 10.1002/bit.20043
- Yang, R.C.A., MacKenzie, C.R., Billows, D., & Nearing, S.A. (1989). Identification of two distinct *Bacillus circularis* xylanases by molecular cloning of the genes and expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 568-574. doi: 10.1128/aem.55.3.568-572.1989
- Yang, R.C.A., MacKenzie, C.R., Bilous, D., Seligy, V.L., & Narang, S.A. (1988). Molecular cloning and expression of a xylanase gene from *Bacillus polymyxa* in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1023-1029. DOI: 10.1128/aem.54.4.1023-1029.1988
- Yasui, T., Nguyen, B.T., & Nakanishi, K. (1984). Inducers for xylanase production by *Cryptococcus lavus*. *Journal of Fermentation Technology*, 62, 353-359. DOI: 10.1016/0378-1097(89)90146-8
- Ye, Y., Li, X., & Zhao, J. (2017). Production and characteristics of a novel xylose- and alkali-tolerant GH 43 beta-xylosidase from *Penicillium oxalicum* for promoting hemicellulose degradation. *Scientific Reports*, 7, 11600. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11573-7>
- Yeğin, S., & Büyükkilleci, A. O. (2015). Mikrobiyal Ksilanazlar ve Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları. *Akademik Gıda*, 13, 317-326.
- Yin, L.J., Lin, H.H., Chiang, Y.I., & Jiang, S.T. (2010). Bioproperties and purification of xylanase from *Bacillus* sp. YJ6. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 557-562. <https://doi.org/10.1021/jf902777r>
- Yin, Y.R., Xian, W.D., Han, M.X., Zhou, E.M., Liu, L., Alkhalifah, D.H.M., Hozzein, W.N., Xiao, M., & Li, W.J. (2019). Expression and characterisation of a pH and salt tolerant, thermostable and xylose tolerant recombinant GH43 beta-xylosidase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T for promoting hemicellulose degradation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 112, 339-350. DOI: 10.1007/s10482-018-1161-2
- Yoshika, H., Chavanich, S., Nilubol, N., & Hayashida, S. (1981). Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 579-586. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864586>
- Yu, E.K.C., Tan, L.U.L., Chan, M.H.K., Deschatelets, L., & Saddler, J.N. (1987). Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus, *Thermoascus*

- aurantiacus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 9, 16-25. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90044-5)
- Yuan, Y., Hu, Y., Zhang, H., Leng, J., Li, F., Zhao, X., Gao, J., & Zhou, Y. (2016). Characterization of a recombinant multifunctional glycoside hydrolase family 3 beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase/beta-glucosidase from *Cellulosimicrobium cellulans* sp. 21. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 131, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.06.002>
- Zeikus, J.G. (1979). Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology*, 4, 243-252. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(79\)90043-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(79)90043-7)
- Zheng, H.C., Sun, M.Z., Meng, L.C., Pei, H.S., Zhang, X.Q., Yan, Z., Zeng, W.H., Zhang, J.S., Hu, J.R., Lu, F.P., & Sun, J.S. (2014). Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from *Paenibacillus* sp. NF1 and its Application in Xylooligosaccharides Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 489-496. <https://doi.org/10.4014/jmb.1312.12072>
- Zhang, S., Xie, J., Zhao, L., Pei, J., Su, E., Xiao, W., & Wang, Z. (2019). Cloning, overexpression and characterization of a thermostable beta-xylosidase from *Thermotoga petrophila* and cooperated transformation of ginsenoside extract to ginsenoside 20(S)-Rg3 with a beta-glucosidase. *Bioorganic Chemistry*, 85, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.12.026>
- Zhang, X., Shyyand W., & Sastry A.M. (2007). Numerical Simulation of Intercalation-Induced Stress in Li-Ion Battery Electrode Particles. *Journal of The Electrochemical Society*, 6, 25-32. DOI 10.1149/1.2759840
- Zhao, L., Geng, J., Guo, Y., Liao, X., Liu, X., Wu, R., Zheng, Z., & Zhang, R. (2015). Expression of the *Thermobifida fusca* xylanase Xyn11A in *Pichia pastoris* and its characterization. *BMC Biotechnology*, 15, 18. doi: 10.1186/s12896-015-0135-y
- Zhou, J., Huang, H., Meng, K., Shi, P., Wang, Y., Luo, H., Yang, P., Bai, Y., Zhou, Z. & Yao, B. (2009). Molecular and biochemical characterization of a novel xylanase from the symbiotic *Sphingobacterium* sp. TN19. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 323-333. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2081-x>
- Zhou, J., Huang, H., Meng, K., Shi, P., Wang, Y., Luo, H., Yang, P., Bai, Y., & Yao, B. (2010). Cloning of a new xylanase gene from *Streptomyces* sp. TN119 using a modified thermal asymmetric interlaced-PCR specific for GC-rich genes and biochemical characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 1277-1292. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8642-8>