



İntraselüler *Anoxybacillus amylolyticus* Ksilanaz'ının Klonlanması, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Hakan KARAOĞLU* Züleyha AKPINAR

Department of Basic Sciences, Faculty of Fisheries and Aquatic Sciences, Recep Tayyip Erdoğan University, 53100 Rize, Turkey

Geliş Tarihi: 16.06.2023

Kabul Tarihi: 26.08.2023

Basım Tarihi: 30.09.2023

Atıf yapmak için: Karaoğlu, H. & Akpınar, Z. (2023). İntraselüler *Anoxybacillus amylolyticus* ksilanaz'ının klonlanması, saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 8(3), 367-373. <https://doi.org/10.35229/jaes.1315724>

How to cite: Karaoğlu, H. & Akpınar, Z. (2023). Cloning, Purification, and Characterization of Intracellular *Anoxybacillus amylolyticus* Xylanase. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 8(3), 367-373. <https://doi.org/10.35229/jaes.1315724>

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4615-1157>

ID: <https://orcid.org/0000-0003-0102-6651>

*Sorumlu yazarın:

Hakan KARAOĞLU
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri ve Su Bilimleri Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, 53100 Rize, Türkiye
✉: hakan.karaoglu@erdogan.edu.tr

Öz: Ksilanazlar [endo-1,4-β-D-ksilanaz (E.C. 3.2.1.8)] ksilanın çevre dostu bir yöntemle işlenmesine ihtiyaç duyulan endüstriyel birçok uygulamada kullanılan son derece önemli enzimlerdir. Bu çalışmada *Anoxybacillus amylolyticus* bakterisine ait intraselüler ksilanaz geni pET-28a(+) vektörüne klonlanarak üretildi. Daha sonra enzim (*AnaXYN329*) saflaştırılarak enzimin sahip olduğu biyokimyasal ve kinetik özellikler açığa çıkarıldı. Elde edilen sonuçlara göre, *AnaXYN329* en yüksek aktiviteyi pH 6.5'da, 60 ve 65 °C'de, gösterdi. *AnaXYN329* enziminin ısı kararlılık deneyleri yaklaşık 120 dk sürdü ve enzim yarılanma ömrünü 40. dk'da tamamladı. Ayrıca enzimin *K_m* değeri $3.631 \pm 0.162 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, *V_{max}* değeri $100.05 \pm 0.00292 \mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg}$ protein, *k_{cat}* değeri 128.978 1/sn, *k_{cat}/K_m* değeri ise $35.514 \text{ l}/\text{mMs}^{-1}$ olarak hesaplandı. Sonuç olarak *AnaXYN329*, endüstriyel uygulamalarda kullanıma potansiyeline sahiptir.

Anahtar kelimeler: *Anoxybacillus amylolyticus*, ekspresyon, ksilanaz, termofilik.

Cloning, Purification, and Characterization of Intracellular *Anoxybacillus amylolyticus* Xylanase

Abstract: Xylanases [endo-1,4-β-D-ksilanaz (E.C. 3.2.1.8)] are extremely important enzymes used in many industrial applications where xylan needs to be processed with an environmentally friendly method. In this study, the gene of the *Anoxybacillus amylolyticus*' intracellular xylanase was expressed by cloning into the pET-28a(+) vector. Then, the enzyme (*AnaXYN329*) was purified, and its biochemical and kinetic properties were revealed. According to the obtained results, *AnaXYN329* exhibited the optimum activity at pH 6.5, and 60 and 65 °C. Thermal stability experiments of *AnaXYN329* maintained approximately 120 min and the enzyme activity was halved at the end of the 40th min. In addition, values of *K_m*, *V_{max}*, *k_{cat}*, *k_{cat}/K_m* were determined as $3.631 \pm 0.162 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $100.05 \pm 0.00292 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, 128.978 1/sec, and $35.514 \text{ l}/\text{mMs}^{-1}$, respectively. Consequently, *AnaXYN329* has potential to be used in industrial applications.

Keywords: *Anoxybacillus amylolyticus*, expression, thermophilic, xylanase.

*Corresponding author:

Hakan KARAOĞLU
Department of Basic Sciences, Faculty of Fisheries and Aquatic Sciences, Recep Tayyip Erdoğan University, 53100 Rize, Türkiye
✉: hakan.karaoglu@erdogan.edu.tr

GİRİŞ

Hemiselüloz büyük oranda bitkilerin hücre duvarında bulunan bir polimerik karbohidrat kompleksidir. Yeryüzünde bulunan biyokütlenin büyük kısmını oluşturan hemiselülozun temel bileşeni ksilandır (Girio vd., 2010; Motta vd., 2013). Ksilan temel olarak β-1,4-bağlı ksilopiranoz birimlerinden oluşsa da yapısında bulunan çeşitli bileşikler ve yapısının yapısal karmaşıklığı nedeniyle

hidrolizi için birçok ksilanolitik enzimin birlikte aktivite göstermesi ile mümkündür (Swain vd., 2017). Ksilanolitik enzimler içerisinde ksilanın hidrolizi için en gerekli olan enzimler ksilan omurgasının β-1,4-glikosidik bağlarını rastgele hidrolize ederek, ürün olarak açığa ksiloz ve ksilooligosakkaritleri çıkaran endo-1,4-β-D-ksilanazlardır (E.C. 3.2.1.8) (Kumar vd., 2009). Ksilanazlar kağıt, meyve suyu, fırıncılık, hayvan yemi, biyoetanol üretimi gibi ksilanın işlenmesine ihtiyaç duyulan birçok endüstriyel

alandaki yaygın olarak kullanılmaktadır (Yadav vd., 2018). Ksilanazların kullanıldığı endüstriyel süreçlere sağladığı birçok avantaj bulunmaktadır. Örneğin, kağıt endüstrisinde ksilanaz kullanımı hemiselülozdaki ksilanları parçalayarak ağartma maddelerinin (hidrojen peroksit, ozon, klor) etkinliğini artırır, böylece ihtiyaç duyulan ağartma maddesi miktarı azalarak maliyet ve çevreye verilecek hasar düşer (Walia vd., 2017). Ksilanazların uygulamaları çok iyi çalışılmıştır ve sonuç olarak yaygın ticari kullanımında bir takım sınırlamalar olduğu tespit edilmiştir. İlk olarak, ksilan dallarının karmaşık yapısı ve kimyasal çeşitliliği, polisakkarit substrata erişimi engeller ve hidrolizi sınırlar. Ayrıca enzimin maliyeti, enzimin termal olarak kararlı olmaması, son ürün inhibisyonuna uğraması, dar pH ve sıcaklık aralığında aktivite gösterebilmesi ksilanazların ticari kullanımını sınırlayan diğer faktörlerdir (El Enshasy vd., 2016). Ksilanazlar birçok organizma tarafından üretilmekle beraber, endüstriyel uygulamalarda çoğunlukla bakteriler, mantarlar ve mayalardan olmak üzere mikrobiyal kaynaklar tercih edilir. Günümüze kadar birçok mikrobiyal ksilanaz keşfedilmiştir ve endüstriyel kullanıma kazandırılmıştır (El Enshasy vd., 2016). Ancak ticari uygulamalar için daha üstün özelliklere sahip yeni ksilanazlar keşfetmek için hala yeni çalışmalar yapılmaktadır (Chakdar vd., 2016). Bu bağlamda termofilik bakteriler termal ve pH kararlılığı daha yüksek, endüstriyel uygulamaların uygun olmayan ortamına daha dayanıklı, yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite gösteren enzimler bakteriler keşfedilmesi için oldukça değerli kaynaklardır (Turner vd., 2007). Endüstriyel olarak değerli birçok değerli enzime sahip olan *Anoxybacillus* cinsine sahip olan bakterilerin daha önce yapılmış aktivite testleriyle ksilanaz aktivitesine de sahip olduğu gösterilmiş ve bu cinse ait bazı türlerin ksilanaz enzimi biyokimyasal ve kinetik parametreler açısından test edilmiştir. Ancak, literatür incelendiğinde *Anoxybacillus amylolyticus* bakterisine ait herhangi bir ksilanaz enziminin daha önce çalışılmadığı görülmektedir (Colak vd., 2018; İnan vd., 2011; Jaf vd., 2022).

Bu çalışma kapsamında *Anoxybacillus amylolyticus* bakterisine ait intraselüler ksilanaz enzimine (329 aa) ait gen bölgesi açığa çıkarıldı ve PCR ile çoğaltılarak pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlandı. Daha sonra ekspres edilen enzim ısı şoku ve kolon kromatografisi uygulamaları ile saflaştırılarak biyokimyasal ve kinetik olarak karakterize edildi.

MATERYAL VE METOT

Katı Besiyerinde Ksilanaz aktivitesinin Gösterilmesi: *Anoxybacillus amylolyticus* bakterisi % 1 ksilan (Xylan-Serva) içeren Luria Bertani-Agar (pH 7.00) üzerine çizgi ekim yapılarak 55 °C'de 2-3 gün inkübe edildi. Daha sonra besiyerinin üzerine Congo kırmızısı (% 0.1 w/v)

boyası dökülerek oda sıcaklığında 15 dk eklendi. Süre sonunda plaktan boya uzaklaştırılarak üzerine NaCl (1 M) dökülerek 15 dk daha beklendi. Bakterinin gelişim gösterdiği hattın etrafında gözlenen şeffaf zon bakterinin ksilanaz aktivitesini gösterdi.

Ksilanaz Geninin (329 aa) PCR ile Çoğaltılması: *Anoxybacillus amylolyticus* bakterisine ait genomik DNA, genomik DNA izolasyon kiti PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (K182002, ThermoFisher Scientific) kullanılarak, firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirildi. Genomik DNA izolasyonu sonrasında elde edilen DNA'nın saflığı ve miktarı SPECTROstar Nano (BMG Labtech) cihazı kullanılarak ölçüldü. Çalışma kapsamında klonlanarak rekombinant protein olarak üretilecek ksilanaz geninin çeşitli *Anoxybacillus* türlerinin genomunda belirlenmesi, belirlenen aday genin diğer organizmalardaki genler ile benzerliklerinin ortaya konması, *E. coli*'de protein ekspresyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla yapılan klonlama çalışmalarında kullanılacak primer ve DNA dizilerinin belirlenebilmesi için NCBI GenBank, BRENDA, CAZY, PDB, ve Uniprot gibi çeşitli temel veri tabanlarından yararlanıldı. CAZY veri tabanı karbonhidratlar ile ilişki enzim verilerin toplandığı evrensel kapsamlı bir veri tabanıdır. Bu veri tabanı ve diğer veri tabanları incelendiğinde *Anoxybacillus* türüne ait sadece bir adet 329 amino asit uzunluğunda gen tanımlanmış ve ksilanaz aktivitesi gösterdiği bildirildi. 329aa model ksilanaz genini çoğaltmak için kurulan reaksiyonun bileşenleri 25 µL son hacimde şu şekilde oluşturuldu; F(5'-ATGATTCGTCGTTACGTGAAGTG-3') ve R-(5'-TTAACATGTACAGACTTTCCAAAAGC-3') primerleri (1µL), Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, M0491S, NEB) (0.25 µL), 10 mM dNTPs (0.75 µL), 5X Q5 Reaction Buffer (5 µL), kalıp DNA (20 ng/µL) (2 µL), nükleazsız su (15 µL). PCR programı: 98 °C'de (30 sn) 1 döngü; 98 °C'de 10 sn, 50 °C'de 30 sn, 72 °C'de 5 dk 1 (34 döngü) olacak şekilde kuruldu. PCR işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerine 3µL 6x TriTrack DNA loading dye (Thermo, R1161) eklenerek % 0.8'lik agaroz jelde Biorad jel elektroforez cihazında 45 dk yürütüldü (Karaoğlu vd., 2013).

Ksilanaz geninin Ekspresyonu: PCR ile çoğaltılan ksilanaz geninin pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanma işlemi In-Fusion® Snap Assembly Master Mix (638948 Takara) kiti kullanılarak yapıldı ve ligasyon koşulları firmanın önermiş olduğu protokol takip edildi. Oluşturulan ligasyon ürünleri önce 30 µg/mL kanamisin LB-Agar kullanılarak sonra *E.coli* BL21(DE3) suşuna ısı şoku yöntemi ile transforme edildi. Transformasyon işlemlerinin başarısı koloni PCR yöntemi ile test edildi. Daha sonra pET-28a(+) vektörüne klonlanmış olan ksilanaz enzimi IPTG ile indüklenerek yüksek miktarda üretilmesi sağlandı. IPTG ile yapılan indükleme işlemi *Anoxybacillus amylolyticus* kültürü OD₆₀₀ 0.4-0.6 değerine geldiğinde son

konsantrasyonda 1mM IPTG olacak şekilde gerçekleştirildi ve 5 saat boyunca inkübasyon devam ettirildi. 5 saat sonunda bakteri kültürü 4 °C'de, 11.000 g'de 15 dk çöktürüldü ve elde edilen pellet 5 mL LEW tamponunda (pH 8.0) [Üre (8 mM), NaH₂PO₄ (50 mM), NaCl (300 mM)] çözüldü. Daha sonra çözeltiye 10 µL β-mercaptoetanol ilave edilerek 5 sn aralıklarla 8 kez sonike edildi (%70 amplitude) (Sonics Vibra Cell). Sonike edilen örnekler, 15000 g'de, 4 °C'de, 15 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant protein saflaştırma işlemleri için kullanıldı (Yanmis vd., 2014).

Protein Ölçümü ve Ksilanaz Enziminin Aktivite Tayini: Protein konsantrasyonu Bradford (1976) yöntemine göre 595 nm'de gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler ile belirlendi. Standart grafik Bovin Serum Albümin (BSA) kullanılarak yapıldı. Ksilanaz aktivitesi; substrat olarak % 1'lik ksilan (beech wood xylan, Serva), 10 µL enzim kullanılarak 40 mM fosfat tamponu (pH 7.00) içinde, 65 °C'de 30 dk inkübasyon ile ölçüldü. 30 dk sonunda reaksiyon buz üzerine alınarak reaksiyon sonlandırıldı. Enzimsiz reaksiyon karışımı kontrol olarak kullanıldı (Miao vd., 2015). Açığa çıkan ksiloz miktarı hazırlanmış olan standart ksiloz grafiğine göre hesaplandı. Ksilanaz aktivitesi 3,5-dinitro salisilik asit (DNS) metodu kullanılarak, açığa çıkan ksilozun 550 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile belirlendi (Miller, 1959). Bir ünite ksilanaz aktivitesi yukarıda tanımlanmış şartlar altında 1 dk'da açığa çıkan ksiloza eşdeğer indirgenmiş şeker (µmoL) olarak tanımlandı.

Ekspresyon Ürününün Saflaştırılması:

Ekspresyon sonucu elde edilen süpernatant 70 °C'de 15 dk süre bekletilerek ısı şokuna maruz bırakıldı. Süre sonunda elde edilen kaba ekstrakt 15000 g'de, 4 °C'de, 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, DEAE-Sepharose kullanılarak BioLogic LP cihazında iyon değişimi kromatografisine tabi tutuldu (Karaoglu vd., 2013). Elde edilen kısmi saflaştırılmış enzim Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (Sigma) kullanılarak BioLogic LP cihazında hidrofobik etkileşim kolon kromatografisine tabi tutuldu (Karaoglu vd., 2013).

Ksilanaz Enziminin Biyokimyasal ve Kinetik Karakterizasyonu:

İlk olarak *Anoxybacillus amylolyticus* bakterisine ait intraselüler ksilanaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklık ve pH etkisi araştırıldı. Bunun için 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ve 100 °C' de gerçekleştirilen enzim aktivite deneyleri ile enzimin optimum aktivite sıcaklığı tespit edildi. Termal stabilite deneyi enzimin, optimum sıcaklığı olarak belirlenen 65 °C'de inkübe edilerek test edildi. İnkübasyon sonunda, inkübe edilmiş enzimin inkübe edilmemiş enzime kıyasla residüel ksilanaz aktivitesinin yüzdesi (%) belirlendi. Enzimin optimum çalışma pH'sı sitrat tamponu (pH 3.00-5.50), potasyum fosfat tamponu (pH 6.00-7.50), Tris-HCl (pH 7.50-8.50), ve glisin-NaOH tamponu (pH 8.50-10.00) kullanılarak belirlendi.

Kinetik parametreler [V_{max} (µmoL/dk/mg), K_m (Michaelis-Menten sabiti, mM), kcat (1/s) OriginLab Data Analysis and Graphing Software programı kullanılarak hesaplandı. Bu amaçla, % 2'lik ksilandan, 0.5-16 mg/mL konsantrasyon aralığında ksilan, substrat olarak alınarak optimum şartlarda enzim aktivitesi ölçüldü. Ksilanaz aktivitesi serbest kalan ksiloz miktarı (µmoL/dk) hesaplanarak belirlendi.

Enzim üzerine inhibitör veya aktivatör etki gösteren metal iyonlarının etkisini ölçmek için bir dizi deney gerçekleştirildi. Bu amaçla, farklı metal iyonlarının (AlCl₃, MgSO₄, AgSO₄, SnCl₂, SrCl₂, MnCl₂, FeCl₃) farklı konsantrasyonları (1 mM, 5 mM, 10 mM) kullanılarak ksilanaz aktivite deneyi (65 °C, 30 dk) gerçekleştirildi. Daha sonra kalan aktivite ölçüldü. Kontrol numunesinin aktivitesi (herhangi bir metal iyonu içermeyen reaksiyon karışımı) % 100 kabul edildi. Her bir deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Anoxybacillus amylolyticus, Antarktika'daki Rittmann Dağı'nda bulunan jeotermal topraktan izole edilmiş, bakterisi Gram-pozitif, çubuk şeklinde, genellikle filamentli bir bakteridir. Büyüme sıcaklığı 45-65 °C olmakla birlikte optimum büyüme sıcaklığı 60 °C'dir (Kalemci, 2020). Bu çalışmada *Anoxybacillus amylolyticus* bakterisine sahip intraselüler ksilanaz geni (*AnaXYN329*) PCR ile çoğaltıldı, ekspresyon vektörüne klonlanarak üretildi. Üretilen enzim saflaştırılarak biyokimyasal ve kinetik olarak karakterize edildi. Bu çalışma *Anoxybacillus amylolyticus* ksilanazına ait ilk çalışmadır. *AnaXYN329* geni 987 bp uzunluktadır ve PFAM ile yapılan DNA sekans analizi sonuçlarına göre Glikozid Hidrolaz 10 sınıfına aittir (Verma & Satyanarayana 2012). Ayrıca, SignalP 5.0 programı ile yapılan analiz sonuçlarına göre N-Terminus ucunda sinyal peptide olmadığı tespit edildi, bu sonuca göre enzim intraselüler bir enzimdir. *AnaXYN329* enzimi pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlandı ve *E.coli* BL21(DE3) bakterisinde başarıyla ekspres edildi.

Bu çalışmada rekombinant olarak üretilmiş olan *Anoxybacillus amylolyticus* bakterisine ait ksilanaz enzimi önce ısı şoku uygulamasına daha sonra sırasıyla iyon değişimi ve hidrofobik etkileşim kolon kromatografilerine tabi tutularak saflaştırıldı ve saflaştırma tablosu oluşturuldu (Tablo 1). Saflaştırma tablosunda görüleceği üzere tüm saflaştırma uygulamaları başarılı oldu. Saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesi 71.17 (µmoL/dk/mg protein'den 243.58 µmoL/dk/mg protein'e yükseldi ve enzim % 58.63 verim ile 3.42 kat saflaştırıldı. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi uygulamasından sonra birleştirilen fraksiyonlar saf enzim özütü olarak kabul edilerek karakterizasyon çalışmalarında kullanıldı. Enzimin sonraki çalışmalar için yeterli saflıkta olup olmadığı SDS-Page

uygulaması ile test edildi (Şekil 1). Yapılan SDS-Page analizine göre enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 38 kDa'dur.

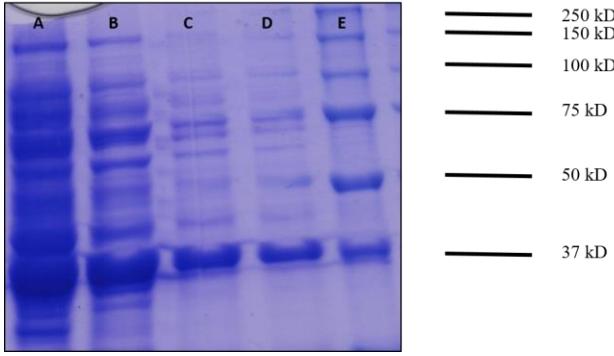
Saflaştırılan enzimin optimum çalışma sıcaklığını belirlemek için yapılan deney sonuçlarına göre enzim en yüksek aktiviteyi 60-65 °C'de göstermektedir (Şekil 2). Yapılan literatür taramalarına göre, GH10 sınıfına ait birçok ksilanaz enzimin farklı optimum çalışma sıcaklıklarına ve ısıl kararlılığa sahip olduğu gözlenmiştir. *Bacillus* sp.,

Bacillus licheniformis, *Thermothelomyces thermophilus* bakterilerine ait ksilanazların optimum çalışma sıcaklığı 60 °C olarak belirlenmiştir (Marques vd., 1998; Liu & Liu, 2008; Basit vd., 2018). Daha önce çalışılmış *Anoxybacillus* cinsine ait ksilanazların optimum çalışma sıcaklığı 65 °C olarak belirlenmiştir. *AnaXYN329* enzimi hem 60 hem de 65 °C'de yüksek aktivite göstermesi nedeniyle diğer enzimlere göre endüstriyel kullanım açısından avantajlıdır.

Tablo 1. *AnaXYN329* enziminin saflaştırılması
Table 1. Purification of the *AnaXYN329* enzyme

Saflaştırma Basamakları	Toplam Hacim (mL)	Protein (µg/mL)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (µmol/dk/µL)	Toplam Aktivite (µmol/dk)	Spesifik Aktivite (µmol/dk/mg protein)	Verim	Saflaştırma Katı
KE	12.00	4.60	55.22	0.3275	3930.00	71.17	100	1.00
IŞU	10.00	3.29	32.86	0.2540	2540.00	77.29	64.63	1.09
İDKK	25.00	0.54	13.45	0.0980	2450.00	182.16	62.34	2.56
HEKK	30.00	0.32	9.46	0.0768	2304.00	243.58	58.63	3.42

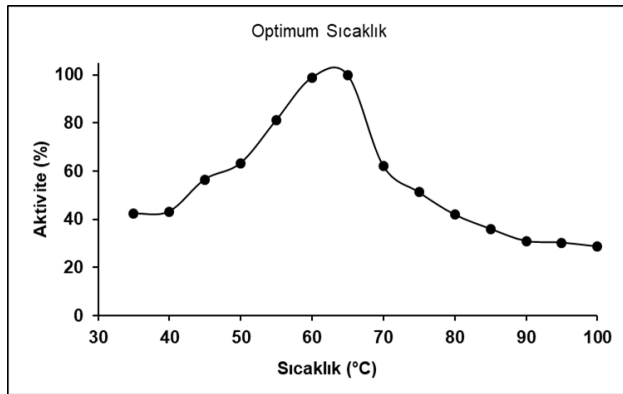
*KE; Kaba Ekstrakt, IŞU; Isı Şoku Uygulaması, İDKK; İyon Değişimi Kolon Kromatografisi, HEKK; Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi



Şekil 1. SDS-Page analizi.

Figure 1. SDS-Page analysis.

(A: Kaba ekstrakt, B: Isı Şoku uygulaması sonrası enzim özütü, C: İyon değişim kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, D: Hidrofobik kolon kromatografisi sonrası enzim özütü, E: Marker.)

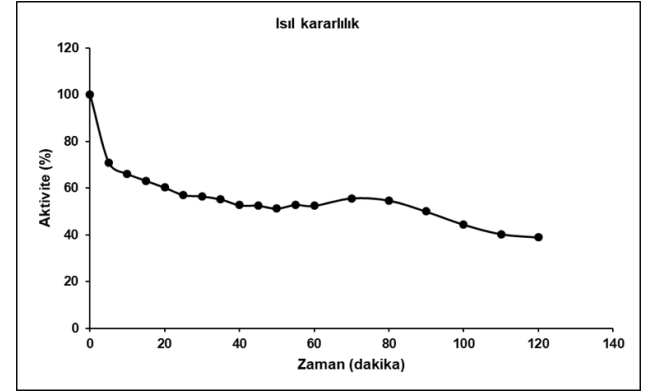


Şekil 2. *AnaXYN329* enzimine Sıcaklığın Etkisi.

Figure 2. The Temperature Effect on *AnaXYN329*.

Ayrıca, *AnaXYN329* enziminin ısıl kararlılık deneyleri yaklaşık 120 dk sürdü. Enzim yarılanma ömrünü 40'ncı dk'da tamamladı (Şekil 3). Literatürde çalışılmış diğer termofilik ksilanaz enzimleri incelendiğinde *Geobacillus stearothermophilus* ksilanazının 65 °C'de 20 dk'da yarılanma ömrünü tamamlarken (Garg vd., 2010); *Anoxybacillus* sp.'ye ait ksilanazın aktivitesini 70 °C'de 15 dk'da kaybettiği rapor edilmiştir (Wang vd., 2010).

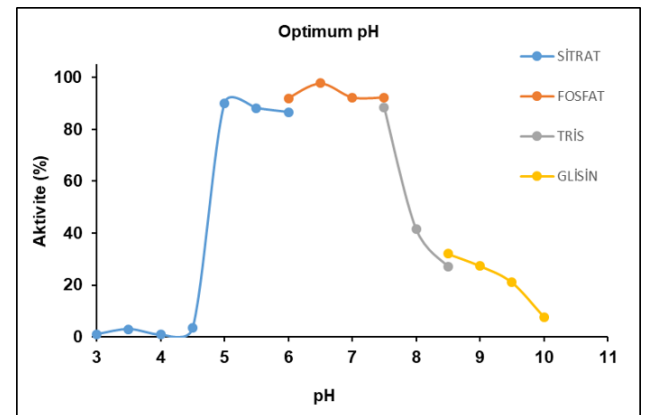
AnaXYN329 gösterdiği ısıl kararlılık özelliği ile literatürdeki diğer enzimlere benzerlik göstermektedir.



Şekil 3. *AnaXYN329* enziminin ısıl kararlılığı.

Figure 3. Thermal stability of *AnaXYN329* enzyme.

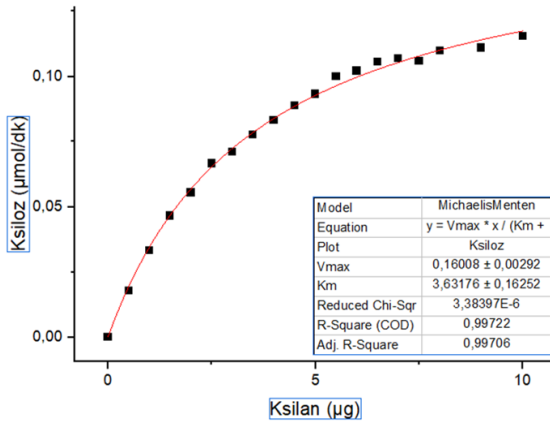
AnaXYN329 enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek için farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre, enzimin en yüksek aktiviteyi pH 6.5'te gösterdiği tespit edildi. Ancak pH 5.0-7.5 gibi geniş bir pH aralığında optimum aktiviteye son derece yakın aktivite gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4).



Şekil 4. *AnaXYN329* üzerine pH etkisi.

Figure 4. The pH effect on *AnaXYN329*.

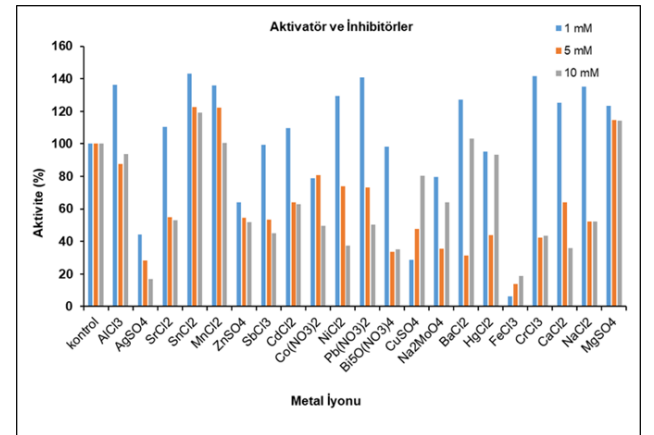
Ksilanaz enziminin geniş pH aralığında yüksek aktivite göstermesi, aynı enzimin enzim fırıncılık, kağıt endüstrisi gibi birbirinden çok farklı endüstri alanlarında kullanımına olanak tanır. Bu bağlamda *AnaXYN329* enziminin pH 5.0-7.5 gibi geniş bir pH aralığında yüksek aktivite göstermesi enzimi endüstriyel üretimi açısından diğer birçok ksilanaz enzimine göre avantajlı kılmaktadır (Georis vd., 2000). Farklı mikroorganizmalardan elde edilmiş ksilanazların farklı pH (pH 4.0-10.0) değerlerinde optimum aktivite gösterdiğine dair bir çok rapor bulunmaktadır. *Anoxybacillus* cinsine ait bakteriler geniş bir pH aralığında aktivite göstermektedir (pH 5.3-9.0). *A. pushchinoensis* A8 ksilanazı pH 6.5'da (Kacagan vd., 2008), *Anoxybacillus* sp. E2 ksilanazı pH 7.8'de (Wang vd., 2010), *A. flavithermus* TWXYL3 ksilanazı pH 6.0'da (Ellis & Magnuson, 2012), *Anoxybacillus* sp. ve *A. kamchatkensis* ksilanazları pH 9.0'da (Hauli vd., 2013; Yadav vd., 2018) optimum aktivite göstermektedir. *AnaXYN329* enzimi literatürde bulunan diğer *Anoxybacillus* ksilanazlarından daha asidik bir ortamda yüksek aktivite gösterme kabiliyetiyle ayrılmaktadır. Enzimin düşük pH'larda yüksek aktivite göstermesi; diğer bir deyişle enzimin asidik karakterde olması enzimin kağıt endüstrisi ve hayvan yemi endüstrilerinde kullanımını avantajlı kılmaktadır (Aygan, 2008; Alokika vd., 2018). Aktivite gösterdiği asidik pH'ya rağmen daha yüksek pH'larda da aktivite göstermesi enzimin farklı endüstriyel alanlarda kullanımına olanak sunmaktadır.



Şekil 5. *AnaXYN329* enzimine ait Michaelis-Menten grafiği.
Figure 5. Michaelis-Menten graphic of *AnaXYN329*.

AnaXYN329 enzimine ait kinetik parametreleri hesaplayabilmek için 16 mg/mL'ye kadar arttırılan ksilan konsantrasyonları ile bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Ksilanaz aktivitesi açığa çıkan ksiloz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında ksilandan kaynaklanan interferans sorunu; aynı derişimde ksilan içeren körler kullanılarak ortadan kaldırıldı. Reaksiyonlar 5 µL saf enzim özütü (1.6 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), (Şekil 5). Programda yapılan analiz sonucunda enzimin K_m değeri $3.631 \pm 0.162 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ V_{max} değeri ise $100.05 \pm 0.00292 \mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg}$ protein olarak hesaplandı. Bu veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda k_{cat} değeri ise 128.978 1/sn olarak hesaplandı. Katalitik etkinlik değeri olan k_{cat}/K_m değeri ise $35.514 \text{ 1/mMs}^{-1}$ olarak hesaplandı. *Anoxybacillus* sp E2 ksilanazı ile yapılan bir çalışmada, enzimin ksilan için K_m , V_{max} ve k_{cat} değerleri sırasıyla 0.61 mg/mL , $2.478 \mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg}$ ve 1.602 1/sn bulunmuştur. (Wang vd., 2010). *A. pushchinoensis* A8 ksilanazı ile yapılan başka bir çalışmada ise K_m ve V_{max} 0.909 mg/mL ve $59.88 \text{ U/mg/protein}$ iken *Anoxybacillus kamchatkensis* ksilanazı için 0.7 mg/mL ve $66.64 \mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg}$ olarak rapor edilmiştir (Kacagan vd., 2008; Yadav vd., 2018). Diğer *Anoxybacillus* türlerine ait ksilanazlarla karşılaştırıldığında *AnaXYN329* enziminin K_m değeri yüksektir. K_m değerinin yüksek olması endüstriyel uygulamalar için dezavantaj olduğundan gelecekte yapılacak yönlendirilmiş mutasyonlarla enzimin K_m değerinin düşürülmesi, *AnaXYN329* enzimi daha talep edilen bir enzim haline getirecektir. Birçok metal iyonunun birçok enzim üzerine kofaktör etkisi göstererek katalitik aktiviteyi arttırdığı bilinmektedir. Bu çalışmada birçok metal iyonunun farklı konsantrasyonları ile gerçekleştirilen aktivite deneyleri sonuçlarına göre, *AnaXYN329* enzimi üzerine Hg^{+2} , Ag^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} iyonları dikkate değer inhibitör etki gösterirken, Sn^{+2} ve Mg^{+2} iyonları aktivatör etki göstermiştir (Kulkarni vd., 1999), (Şekil 6).



Şekil 6. *AnaXYN329* üzerine metal iyonları (aktivatör ve inhibitör) etkisi.
Figure 6. The effect of metal ions (activator and inhibitor) on *AnaXYN329*.

SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada ekspresyon vektöründe ifade edilerek çok miktarda üretilen, saflaştırılarak biyokimyasal ve kinetik olarak karakterize edilen *AnaXYN329* enzimi geniş sıcaklık ve pH aralığında

aktivite yüksek aktivite gösteren farklı endüstriyel uygulamalarda kullanılabilme potansiyeline sahip değerli bir enzimdir. Ayrıca, enzimin ksilanaz aktivitesi varken selülaz aktivitesi göstermemesi endüstriyel kullanım açısından enzimi avantajlı hale getirmektedir.

TEŞEKKÜR

Erkan AYDIN ve Zafer SECGİN başta olmak üzere ETKA Biyoteknoloji ve Danışmanlık Limited Şirketi çalışanlarına destekleri için teşekkür ederiz.

Bu çalışma ETKA Biyoteknoloji ve Danışmanlık Limited Şirketi ve TÜBİTAK Sanayi Ar-Ge Projelerini Destekleme Programı (TEYDEB- Proje No:3210520) tarafından finanse edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aygan, A. (2008).** *Haloalkalofil Bacillus sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanabilirliği.* Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Adana, Türkiye.
- Basit, A., Liu, J., Miao, T., Zheng, F., Rahim, K., Lou, H. & Jiang, W. (2018).** Characterization of two endo-beta-1, 4-xylanases from *Myceliophthora thermophila* and their saccharification efficiencies, synergistic with commercial cellulose. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 233. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00233.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **7**(72), 248-54. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L. & Srivastava, A.K. (2016).** Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*, **6**, 150. DOI: 10.1007/s13205-016-0457-z
- Colak, D.N., Bektas, K.I., Tokgoz, M., Canakci, S. & Belduz, A. (2018).** Screening of Xylanase and Glucose Isomerase Producing Bacteria Isolated from Hot Springs in Turkey. *Sakarya University Journal of Science*, **22**(6), 1804-1811.
- El Enshasy, H.A., Kandiyil, S.K., Malek, R. & Othman, N.Z. (2016).** Microbial xylanases: sources, types, and their applications. *Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass.* Springer, Picassoplatz 4, CH-4052 Basel, Switzerland, 151-213.
- Ellis, J.T. & Magnuson, T.S. (2012).** Thermostable and alkalistable xylanases produced by the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* TWXYL3. *ISRN microbiology*, 517-524. DOI: 10.5402/2012/517524
- Garg, N., Kumar, A. & Mahatman, K.K. (2010).** Xylanase: applications and biotechnological aspects: biotechnological aspects of xylanase. *LAP LAMBERT Academic Publ*, Lambert.
- Georis, J., Giannotta, F., De-Buyt, E., Granier, B. & Frere, J.M. (2000).** Purification and properties of three endo-beta-1, 4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 178-186. DOI: 10.1016/s0141-0229(99)00141-6
- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S. & Bogel-Lukasik, R. (2010).** Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, **101**, 4775-4800.
- 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. DOI: 10.18782/2320-7051.
- Inan, K., Canakci, S. & Belduz, A.O. (2011).** Isolation and characterization of xylanolytic new strains of *Anoxybacillus* from some hot springs in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, **35**(5),1. DOI: 10.3906/biy-1003-75
- Jaf, Y., Hassan, W., Erez, M.E. & Ertas, M. (2022).** Determination of extracellular hydrolytic enzyme capabilities of some *Anoxybacillus* isolated from hot spring environments. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, **3** (2) , 56-61. DOI: 10.51753/flsrt.1094629
- Kacagan, M., Canakci, S. & Sandalli, C. (2008).** Characterization of a xylanase from a thermophilic strain of *Anoxybacillus pushchinoensis* A8. *Biologia*, **63**,599-606 DOI: 10.2478/s11756-008-0134-8
- Kalemci, M. (2020).** *Termofilik Anoxybacillus amylolyticus* bakterisinin gch1 geninin klonlanması ve enzimin biyokimyasal karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Rize, Türkiye.
- 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* G2^T that displays a high level of activity and thermal stability. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, **97**, 215-224. DOI: [10.1016/j.molcatb.2013.08.019](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.08.019).
- Kulkarni, N., Shendye, A. & Mala, R. (1999).** Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, **23**, 411-456.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. & Stroeve, P. (2009).** Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **48**(8), 3713-3729.
- 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*, **57**, 101-107. DOI: [10.1016/j.pep.2007.10.020](https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.10.020)
- Marques, S., Alves, L., Ribeiro, S., Girio, F.M. & Amaral-Collaco, M.T. (1998).** Characterization of a thermotolerant and alkalotolerant xylanase from a *Bacillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **73**, 159-172.
- Miao, Y., Li, J., Xiao, Z., Shen, Q. & Miao, R. (2015).** Characterization and identification of the xylanolytic enzymes from *Aspergillus fumigatus* Z5. *BMC Microbiology* **15**, 126. DOI: [10.1186/s12866-015-0463-z](https://doi.org/10.1186/s12866-015-0463-z)
- Miller, G.L. (1951).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 426-428.
- Motta, F., Andrade, C. & Santana, M. (2013).** *A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications, Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization, InTechOpen, Headquarters, IntechOpen Limited, 7th floor, 10 Lower Thames Street, London, EC3R 6AF, UK.*
- Singh, A.D. & Singh, B. (2018).** Utility of acidic xylanase of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* JJBS250 in improving the nutritional value of poultry feed. *3 Biotech*, **8**(503), 1-7. DOI: [10.1007/s13205-018-1526-2](https://doi.org/10.1007/s13205-018-1526-2)
- Swain, M., Natarajan, V. & Krishnan C. (2017).** Marine enzymes and microorganisms for bioethanol production. *Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier, United States*, 181-197.
- Turner, P., Mamo, G. & Karlsson, E.N. (2007).** Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial cell factories*, **15**, 6-9. DOI: [10.1186/1475-2859-6-9](https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-9)
- Verma, D. & Satyanarayana, T. (2012).** Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. *Bioresource Technology*, **117**, 360-367. DOI: [10.1016/j.biortech.2012.04.034](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.034)
- Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A. & Parkash, J. (2017).** Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review, *3 Biotech*, **7**, 11.
- Wang, G.O., Lapidot, A., Alchanati, 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**(6), 1889-96. DOI: [10.1128/aem.60.6.1889-1896.1994](https://doi.org/10.1128/aem.60.6.1889-1896.1994)
- 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. DOI: [10.1007/s11274-009-0254-5](https://doi.org/10.1007/s11274-009-0254-5)
- 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. DOI: [10.3389/fbioe.2018.00065](https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00065)
- Yanmis, D., Karaoglu, H., Colak, D.N., Sal, F.A., Canakci, S. & Belduz, A.O. (2014).** Characterization of a novel xylose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2^T. *Turkish Journal of Biology*, **38**(5), 5. DOI: [10.3906/biy-1403-76](https://doi.org/10.3906/biy-1403-76)