

Atıf İçin: Toprak, A.. 2026. *Aspergillus oryzae* Kaynaklı Ksilanazın ReliZyme EA403 Desteği Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 16(3), 1101-1114.

To Cite: Toprak, A.. 2026. Covalent Immobilization and Characterization of Xylanase from *Aspergillus oryzae* on ReliZyme EA403 Support. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 16(3), 1101-1114.

***Aspergillus oryzae* Kaynaklı Ksilanazın ReliZyme EA403 Desteği Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu**

Ali TOPRAK¹

Öne Çıkanlar:

- Ksilan
- Kovalent immobilizasyon
- Tekrar kullanım

Anahtar Kelimeler:

- Ksilanaz
- ReliZyme EA403
- Glutaraldehit
- *Aspergillus oryzae*
- İmmobilizasyon

ÖZET:

Bu çalışmanın amacı, *Aspergillus oryzae* kaynaklı ksilanaz enzimini ReliZyme EA403 desteği üzerine kovalent olarak immobilize etmek ve immobilize enzimin biyokimyasal özelliklerini karakterize etmektir. Enzim immobilizasyonu, glutaraldehit ile aktive edilmiş ReliZyme EA403 desteği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimum immobilizasyon koşulları belirlenmiş ve serbest ile immobilize enzimin optimum sıcaklık, optimum pH, kinetik parametreler, termal kararlılık ve tekrar kullanım kararlılığı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. İmmobilizasyon işlemi sonucunda hem serbest hem de immobilize enzimin optimum pH değerinin 6 olduğu tespit edilmiştir. Kinetik parametrelerden *K_m* değerleri serbest ksilanaz için 10.66 mg/mL ve immobilize ksilanaz için 17.21 mg/mL olarak bulunurken, *V_{max}* değerleri sırasıyla 1660.5 U/mg protein ve 112.5 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. İmmobilize enzimin termal kararlılığında önemli bir artış gözlemlenmiştir. İmmobilize enzimin 80°C'deki yarılanma ömrü serbest enzime kıyasla yaklaşık 12.5 kat artmıştır. Ayrıca, immobilize ksilanazın kesikli bir reaktör sisteminde 12 kullanım döngüsünden sonra başlangıç aktivitesinin %82'sini koruduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular, ReliZyme EA403 üzerine kovalent olarak immobilize edilen ksilanazın, yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel uygulamalarda ve tekrarlı kullanımda etkin bir biyokatalizör olarak potansiyelini ortaya koymaktadır.

Covalent Immobilization and Characterization of Xylanase from *Aspergillus oryzae* on ReliZyme EA403 Support

Highlights:

- Xylan
- Covalent immobilization
- Reuse stability

Keywords:

- Xylanase
- ReliZyme EA403
- Glutaraldehyde
- *Aspergillus oryzae*
- Immobilization

ABSTRACT:

This research focused on developing a stabilized biocatalyst by fixing xylanase, derived from *Aspergillus oryzae*, onto a ReliZyme EA403 carrier through covalent bonds. The support was first activated with glutaraldehyde to facilitate the binding of the enzyme. A comprehensive evaluation was then conducted to compare the operational properties of the enzyme before and after immobilization, including its optimal working conditions, kinetic behavior, heat tolerance, and performance over multiple reaction cycles. As a result of the immobilization process, the optimum pH value for both the free and immobilized enzyme was determined to be maintained at pH 6.0. According to kinetic analysis, the *K_m* values were found to be 10.66 mg/mL for the free xylanase and 17.21 mg/mL for the immobilized xylanase, while the *V_{max}* values were calculated as 1660.5 U/mg protein and 112.5 U/mg protein, respectively. Furthermore, a significant enhancement in the thermal stability of the immobilized enzyme was observed as a consequence of the immobilization. The half-life of the immobilized xylanase at 80°C was approximately 12.5-fold higher compared to its free counterpart. Operational stability tests further revealed that the immobilized biocatalyst maintained 82% of its initial catalytic efficiency after being reused twelve times in a batch system. These outcomes highlight the suitability of the prepared immobilized xylanase for repeated utilization in industrial processes that operate under high-temperature conditions.

¹ Ali TOPRAK ([Orcid ID: 0000-0002-6520-3226](https://orcid.org/0000-0002-6520-3226)) Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Acıgöl Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Laboratuvar Teknolojisi Programı Nevşehir, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ali TOPRAK, e-mail: alitoprak@nevsehir.edu.tr

GİRİŞ

Ksilan, doğada selülozdan sonra en yaygın bulunan ikinci doğal biyokütledir. Ksilan, D-ksiloz birimlerinin beta-1,4-glikozidik bağlarla birleşmesinden oluşan düz zincirli bir polimerdir (dos Santos ve ark., 2018). Bu biyokütlenin endüstriyel kullanımı için onu daha küçük şeker birimlerine parçalayacak enzimlere ihtiyaç duyulur (Gao ve ark., 2025). Bu enzimlerin içinde, "endo-1,4-ksilanaz" (EC 3.2.1.8) adı verilen türü temel bir rol oynar. Bu enzim, ksilan polimerinin ana iskeletindeki bağları hidroliz yoluyla keserek onu küçük fragmanlara ayırır (Sarangi ve Thatoi, 2024). Ksilanaz enzimlerinin endüstride birçok kullanım alanı vardır. Bu uygulamalar arasında meyve sularının berraklaştırılması (Ristović ve ark., 2025), tarımsal atıkların değerli ürünlere dönüştürülmesi (Chaiyates ve ark., 2025), ekmek kalitesinin iyileştirilmesi (Cetiner ve Koksel, 2024) bitkilerden yağ çıkarma verimliliğinin artırılması, (Dent ve ark., 2023) biyoetanol üretim sürecinin iyileştirmesi (Saharan ve ark., 2024) ve hayvan yemlerinin sindirilebilirliğinin artırılması (Anwar ve ark., 2023) sayılabilir. Ancak ksilanaz enziminin endüstriyel kullanımı; kısa dayanım süresi, ortam koşullarına aşırı duyarlılık, düşük termal kararlılık ve aynı zamanda geri kazanım ile tekrar kullanımdaki güçlüklerden kaynaklanan yüksek üretim maliyetleri nedeniyle sınırlı kalmaktadır (Shahrestani ve ark., 2016). Bu nedenle, ksilanaz enzimlerin katı taşıyıcılar üzerine immobilize edilerek, yeniden kullanılabilirliği artırılması ve toplam üretim maliyetini düşürülmesi bu sorunları çözebilir (Aslam ve ark., 2025). Bunun yanı sıra endüstriyel proses koşulları, genellikle yüksek sıcaklık, pH değişimleri ve inhibitör varlığı gibi faktörler bakımından oldukça zorlayıcıdır. Bu tür proseslerde kullanılacak enzimler, bu zorlu koşullara dayanabilecek kadar güçlü yapıda olmalıdır. Bahsi geçen sınırlamaların aşılması için, enzimlerin çeşitli destek materyalleri üzerine sabitlenmesi etkili ve ekonomik bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Enzim immobilizasyonu, işlevsel kararlılığı artırmakta ve biyokatalizörü reaksiyon ortamından kolayca ayrılabilmeyi sağlamakta, böylece büyük ölçekli uygulamalarda enzim kullanım maliyetini düşürmektedir (dos Santos ve ark., 2018; Ariaeenejad ve ark., 2020; Bilal ve ark., 2021; Qamar ve ark., 2021).

Çeşitli biyokimyasal özellikleri ve substrat özgüllükleri ksilanaz enzimlerini hem önemli bir araştırma hem de pek çok endüstri için vazgeçilmez bir uygulama alanı haline getirmiştir (Bhardwaj ve ark., 2019). Bu nedenle literatürde ksilanaz immobilizasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmıştır (Ashikin ve ark., 2022; Rezayat ve ark. 2023; Yang ve ark., 2024; Abd Rahman ve ark., 2025). Bu yöntemlerden ksilanazın kovalent immobilizasyonu, reaksiyon sırasında enzimlerin taşıyıcıdan ayrılmasını önleyebildiği için genellikle tercih edilmektedir. Bu yöntem, enzimlerin yeniden kullanılabilirliğini ve kararlılığını geliştirebilmektedir (Soozanipour ve ark., 2015; Royvaran ve ark., 2016). Glutaraldehit ile önceden aktifleştirilmiş, primer amino grupları içeren taşıyıcılar, enzimlerin kovalent immobilizasyonu için yaygın şekilde kullanılmaktadır (Alagöz ve ark., 2016; Özdemir ve ark., 2024). Araştırmalar, glutaraldehit ile önceden aktifleştirilmiş taşıyıcılar üzerindeki enzim immobilizasyon mekanizmasının iki aşamada gerçekleştiğini göstermektedir. İlk aşamada, enzimin taşıyıcı üzerinde iyonik adsorpsiyonu meydana gelir. İkinci aşamada ise glutaraldehitin aldehit grupları ile enzimin terminal primer amino grupları arasında Schiff bazı oluşumu yoluyla kovalent bağlar teşekkül eder (Barbosa ve ark., 2014; Melo ve ark., 2017). ReliZyme taşıyıcılar, düşük şişme eğilimine sahip, oldukça gözenekli ve rijit bir metakrilik polimer matristen oluşur ve immobilizasyon için çeşitli fonksiyonel gruplar (epoksi, amino veya hidrofobik) içerir (Mateo ve ark., 2002; Kahar ve ark., 2016). Bu taşıyıcıların üretiminde kullanılan hammaddeler, gıda maddelerinin işlenmesine yönelik AB kayıt listelerinde yer almaktadır (Martínez ve ark., 2024). Söz konusu taşıyıcılar, glutaraldehit kimyası kullanılarak çeşitli enzimlerin hem adsorpsiyon hem de kovalent bağlama yöntemleriyle

immobilizasyonunda kullanım alanı bulmuştur (Neto ve ark., 2015; Bilgin ve ark., 2016; Özdemir ve ark., 2024). Bu desteklerden ReliZyme EA403 (etilediamino) primer amino grupları içermektedir ve kovalent immobilizasyon için uygun bir destek türüdür. Bu çalışmada, *Aspergillus oryzae* kaynaklı bir rekombine ksilanaz enzimi glutaraldehit ile aktive edilmiş ReliZyme EA403 destek üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. İmmobilize ksilanaz örneklerinin enstrümental analizleri ile serbest ve immobilize ksilanazların biyokimyasal karakterizasyonları (optimum pH sıcaklık, kinetik parametreler, termal kararlılık ve tekrar kullanım) gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Bu çalışmada kullanılan ksilanaz (2500 U/g; rekombine; *Aspergillus oryzae*) ve ksilan (Birchwood) Sigma (ABD) firmasından satın alınmıştır. ReliZyme EA403 (fonksiyonel grup: Etilamino, partikül büyüklüğü: 200–500 µm) desteği Resindion (Milan, Italy) firmasından temin edilmiştir. Glutaraldehit (%50, a/a), sodyum hidroksit, Folin-Ciocalteu reaktifi, bakır (II) sülfat, sodyum karbonat, sıgır serum albümini, glasiyel asetik asit, fosforik asit (%85, h/h), hidroklorik asit (%37, h/h) ve diğer kimyasallar Sigma firmasından temin edilmiştir.

Ksilanazın ReliZyme EA403 desteğe kovalent immobilizasyonu

Ksilanazın glutaraldehit ile aktifleştirilmiş ReliZyme EA403 desteğe kovalent immobilizasyonu Tülek ve ark. (2023) tarafından önerilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ReliZyme EA403 taşıyıcı desteğin aktivasyonu için 1 gram destek % 2.5 (h/h) glutaraldehit içeren 25 mL sodyum fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) ile oda sıcaklığında ve sürekli karıştırarak 2 saat boyunca inkübe edildi. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş destek daha sonra süzüntüde serbest glutaraldehit varlığını tespit edilmeyince kadar saf su ile iyice yıkandı ve immobilizasyona hazır hale getirmek için 50°C'de 2 saat süreyle kurutuldu. Enzim immobilizasyonu için, 0.5 g aktifleştirilmiş ReliZyme EA403 desteğe 1 mL ksilanaz çözeltisi (0.1 M pH 7.0 sodyum fosfat tamponunda hazırlanmış 0.25 mg/mL protein içeren) ilave edildi. İmmobilizasyon işlemi, çalkalayıcı bir inkübatörde 20°C ve hafif çalkalama koşullarında (125 rpm) 2 saat bekletilerek gerçekleştirildi. Süre sonunda elde edilen immobilize ksilanazlar süzüntüde protein tespit edilmeyene dek saf su ile ardışık olarak yıkandı ve immobilize enzim preparatı 4°C'de bir gece süreyle inkübatörde kurumaya bırakıldı. Serbest enzimin ve süzüntüdeki protein miktarlarının tayini, Lowry ve ark. (1951) tarafından önerilen yöntemle uygun şekilde gerçekleştirildi.

Ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize ksilanazın aktiviteleri Alagöz ve ark. (2022) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek belirlenmiştir. Yöntemde, ksilanın hidrolizi sırasında açığa çıkan indirgen şeker miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi esastan yararlanılmıştır. 50 µL ksilanaz çözeltisi (0.25 mg/mL protein) veya 5 mg immobilize enzim ile 250 µL % 0.5 (a/h)'lik ksilan çözeltisi (50 mM pH sodyum asetat, pH 5.0) 50 °C'de kapalı bir cam tüpte karıştırılmıştır. Reaksiyon 10 dakika sonra 300 µL DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) reaktifi eklenerek durdurulmuştur. Ardından, karışım kaynar suda 10 dakika bekletilmiş ve oda sıcaklığında soğutulmuştur. Soğutulan örnekler 3.4 mL saf su ilavesinden sonra, elde edilen çözeltinin absorbansı 530 nm'de ölçülmüştür. Aynı yöntemle ksilanaz enzimi kullanılmadan bir kör hazırlanmıştır. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan indirgen şeker miktarı üretilen ksiloza eşdeğer miktarda olacak şekilde ksiloz standart eğrisi referans alınarak hesaplanmıştır. Bir ksilanaz aktivite birimi (IU), belirtilen deneysel koşullarında dakikada 1 µmol ksiloza eşdeğer indirgen şeker üretimini katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Ksilanaz immobilizasyonu için optimum enzim derişiminin belirlenmesi

Farklı derişimlerde (10.0, 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 ve 0.156 mg protein/mL) ksilanaz çözeltileri hazırlanıp immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı desteğe bağlanan enzim proteini miktarı, süzüntüde gerçekleştirilen bir protein tayini ile belirlenmiştir. Ardından spesifik aktivite (U/mg protein) hesaplanmış ve en yüksek spesifik aktiviteyi sağlayan enzim protein konsantrasyonu tespit edilmiş ve daha sonraki deneysel çalışmalarda belirlenen bu optimum enzim derişimi kullanılmıştır.

İmmobilize ksilanaz örneklerinin karakterizasyonu

Desteğin immobilizasyon öncesi ve sonrası yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM, Quanta 650 Alan Emisyon SEM) ile incelendi. Örneklerinin termogravimetrik analizi (TGA), TGA analizörü (TGA/DSC 3+, Mettler Toledo) kullanılarak gerçekleştirildi. TGA analizi, 100 mL/dakika argon gazı akışı altında, 25 °C ile 600 °C arasında, 10 °C/dakika hızda gerçekleştirildi. Ayrıca immobilize örnekler Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi incelenerek karakterize edildi.

Opimum sıcaklık ve pH belirlenmesi

Serbest ve immobilize ksilanaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla, reaksiyon karışımı için farklı pH değerlerinde 50 mM tampon çözeltiler hazırlandı. Aktivite ölçümleri sodyum asetat (pH 4.0-5.5) sodyum fosfat (pH 6.0-8.0) ve sodyum karbonat tamponları (pH 9.0-10.0) kullanılarak gerçekleştirildi ve en yüksek aktivitenin gözlendiği pH değerleri tespit edildi. Katalitik aktiviteler 30-85 °C sıcaklık aralığında değerlendirilerek her bir preparat için maksimum aktiviteye karşılık gelen sıcaklık belirlendi.

Kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize edilmiş ksilanaz enzimlerinin kinetik parametreleri, 1.0 ila 25.0 mg/mL konsantrasyon aralığında huş ağacı (Birchwood) kaynaklı ksilan kullanılarak, enzim için belirlenmiş optimum pH ve sıcaklık koşullarında incelenmiştir. Reaksiyon hızları ölçülmüş ve elde edilen veriler Lineweaver-Burk grafiği aracılığıyla lineerleştirilerek Michaelis-Menten sabiti (K_m) ile maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) değerleri tayin edilmiştir.

Termal kararlılığın belirlenmesi

Serbest ve immobilize ksilanazların termal kararlılıklarını belirlemek amacıyla, enzimler 70 °C ve 80 °C'de 15 saat süreyle inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında (1, 3, 5, 7 ve 15 saat) kalan aktiviteleri ölçülerek başlangıç aktivitelerine göre bağıl aktivite şeklinde hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize ksilanaz türevlerinin inaktivasyon sabitleri (k_d) ve yarılanma ömürleri ($t_{1/2}$) Alagöz ve ark. (2022) tarafından önerilen yöntemle göre hesaplanmıştır.

İmmobilize ksilanazın tekrar kullanım kararlılığının belirlenmesi

Kesikli reaktörde immobilize ksilanazın yeni tekrar kullanılabilirlik çalışmaları için, 1.5 cm çapında ve 8 cm uzunluğunda bir reaktör kullanılmıştır. Kolon içerisine 50 mg immobilize ksilanaz ilave edilmiş ve 300 µL % 0.5'lik ksilan içeren asetat tampon (50 mM, pH 6.0) eklenmiştir. 70 °C'de 10 dakika bekledikten sonra kolondaki çözelti hızla uzaklaştırılmıştır. Her bir tekrar işleminden sonar immobilize enzim örneği pH 6.0 asetat tampon ile yıkanmıştır. Aktivitenin belirlenmesi için DNS yöntemi kullanılmıştır. Tekrar kullanıma bağıl aktivite değişimini hesaplamak için işlem 12 kez tekrarlanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Optimum Enzim derişimi

Ksilanaz enziminin immobilizasyonu için optimum enzim konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, 10.0, 5.0 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, ve 0.156 mg/mL protein konsantrasyonlarına sahip ksilanaz çözeltileri test edilmiştir. Başlangıçta eklenen ksilanaz protein miktarı, immobilize olan protein miktarı ve immobilize enzimlerin spesifik aktivitelerinin bağıl oranları Tablo 1'de gösterilmiştir. İmmobilizasyon ortamında toplam protein miktarı 0.312 mg olan enzim çözeltisi kullanıldığında en yüksek bağıl spesifik aktivite elde edilmiştir.

Tablo 1. EA 403 desteğe immobilizasyon için optimum enzim konsantrasyonunun belirlenmesi

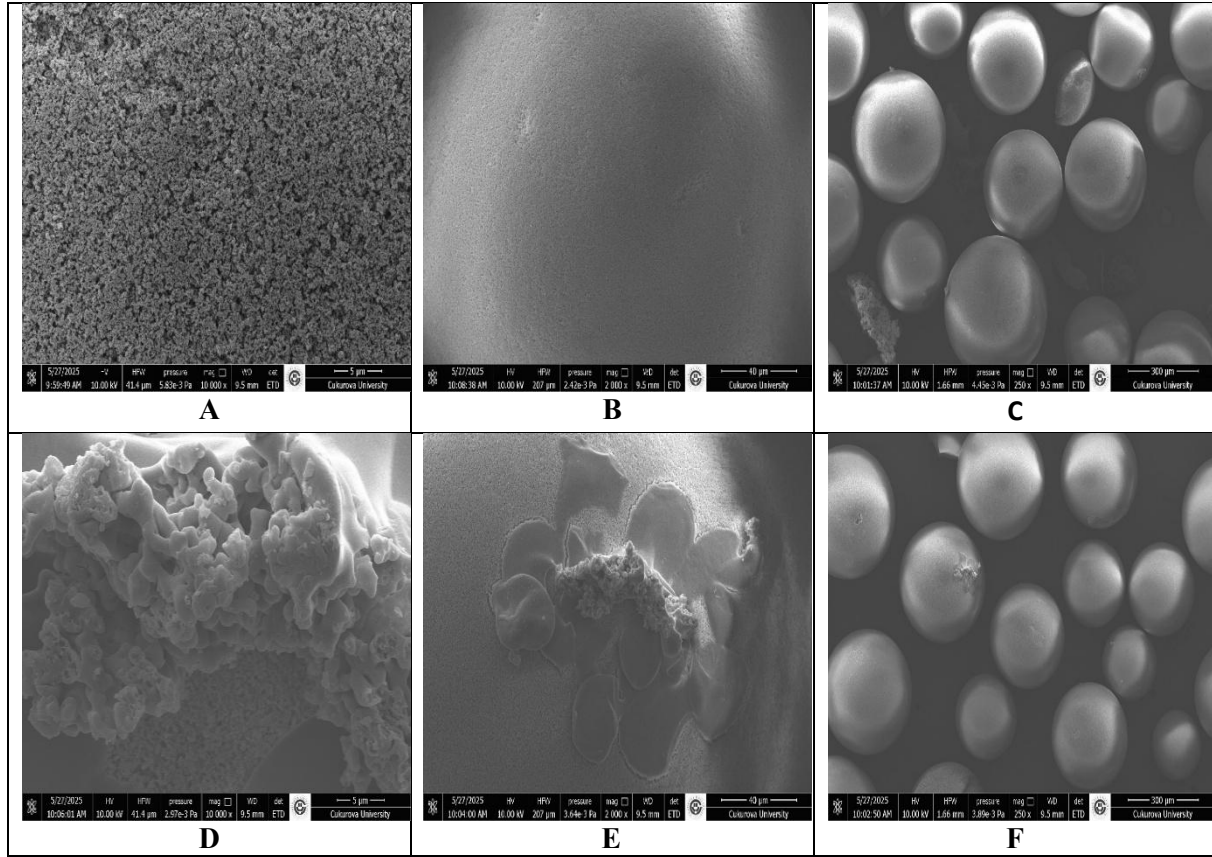
Başlangıçta eklenen protein (mg protein/g destek)	İmmobilize olan protein miktarı (mg protein/g destek)	Bağıl Aktivite (%)
10.0	8.5	11
5.0	4.5	19
2.5	2.5	28
1.25	1.25	45
0.625	0.625	57
0.312	0.312	100
0.156	0.156	85

Ksilanaz immobilizasyonu için optimum enzim konsantrasyonunun belirlenmesinde enzimin spesifik aktivite değeri ve bağlanan protein miktarı dikkate alınmıştır. Elde edilen bulgular, düşük protein eklemelerinde immobilizasyon verimliliğinin yüksek olduğunu ve enzimatik aktivitenin arttığını göstermiştir. Özellikle 0.312 mg/g destek noktasında maksimum bağıl aktiviteye ulaşılması, bu konsantrasyonda destek yüzeyinin optimal şekilde doygunluğa ulaştığını ve enzim molekülleri arasındaki sterik engellemelerin veya konformasyonel kısıtlamaların minimize edildiğini düşündürmektedir. Yüksek protein konsantrasyonlarında (örneğin 10 mg/g destek) gözlemlenen düşük bağıl aktivite (%11), muhtemelen aşırı yüklemeye bağlı olarak enzim molekülleri arasında oluşan agregasyon, çok katmanlı adsorpsiyon veya aktif bölgelerin engellenmesi gibi faktörlere bağlanabilir. Bu durum, destek yüzeyinin aşırı doygunluğa ulaşması ve enzimlerin serbestçe hareket edememesi veya substratla etkileşimde fiziksel sınırlamalarla karşılaşması sonucunu doğurmuştur. Optimum noktanın altındaki konsantrasyonlarda (0.156 mg/g destek) aktivitedeki hafif düşüş ise, yetersiz protein yüklemesi nedeniyle destek yüzeyinin tam olarak verimli kullanılamaması veya enzimlerin stabilizasyonu için yeterli moleküler etkileşimlerin sağlanamaması ile açıklanabilir. Sonuç olarak, immobilizasyon verimliliği ve enzim performansı açısından başlangıç protein konsantrasyonunun kritik bir parametre olduğu ortaya konmuştur. Optimizasyon çalışmalarında, hem yüksek aktivite hem de ekonomik verimlilik dikkate alınarak optimum protein yükünün belirlenmesi önerilmektedir (Zhang ve ark., 2022; Parandi ve ark., 2023; Sasi ve ark., 2024). Alagöz ve ark. (2022) immobilizasyon ortamına farklı miktarlarda ksilanaz proteini (0.25, 0.5, 1.0 2.0 ve 4.0 mg) ekleyerek, *Thermomyces lanuginosus* ksilanazını farklı yöntemlerle karbon nanotüplere immobilizasyonunu rapor etmişlerdir. Her bir immobilizasyon yönteminde immobilizasyon ortamındaki protein miktarı 0.5 mg/g destek olduğunda en yüksek aktivitenin elde edildiğini hesaplamışlardır. Substratın oldukça büyük olması nedeniyle, yüksek enzim yüklemelerindeki (1.0 2.0 ve 4.0 mg/g destek) spesifik aktivitenin difüzyonla ilgili problemlerden dolayı azaldığını bildirmişlerdir.

İmmobilize ksilanaz örneklerinin karakterizasyonu

Şekil 1'de ReliZyme EA403 desteğinin ksilanaz immobilizasyonu öncesi ve sonrası SEM görüntüleri sunulmaktadır. Enzim immobilizasyonu öncesinde destek yüzeyi pürüzsüz bir yapı

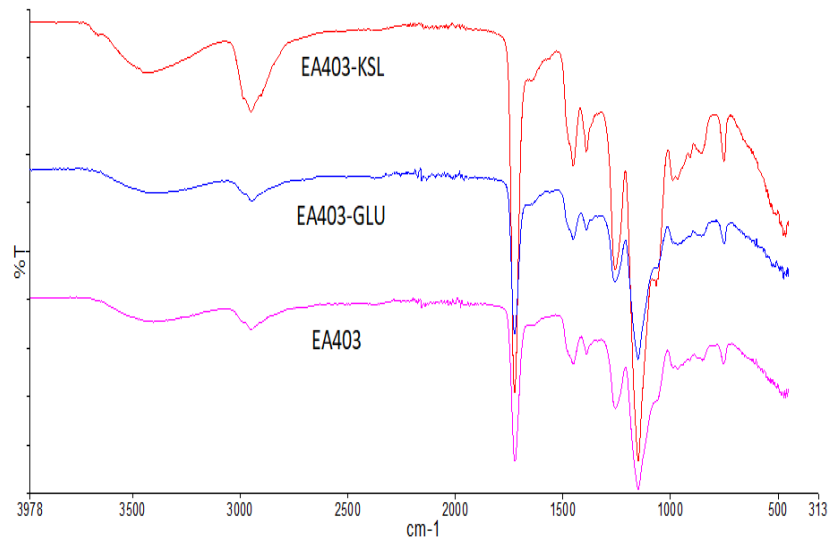
sergilemiştir (Şekil 1 A, B ve C). Öte yandan, ksilanaz immobilizasyonu sonrasında yüzey pürüzlülüğünün arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 1. D, E ve F) ve bu durum ksilanaz moleküllerinin başarılı bir şekilde immobilize olduğunu doğrulamıştır.



Şekil 1. Destek materyalin SEM görüntüleri: ReliZyme EA403; A (10000x), B (500x) ve C (250x) ; ksilanaz immobilize edilmiş ReliZyme EA403; D (10000x), E (500x) ve F (250x)

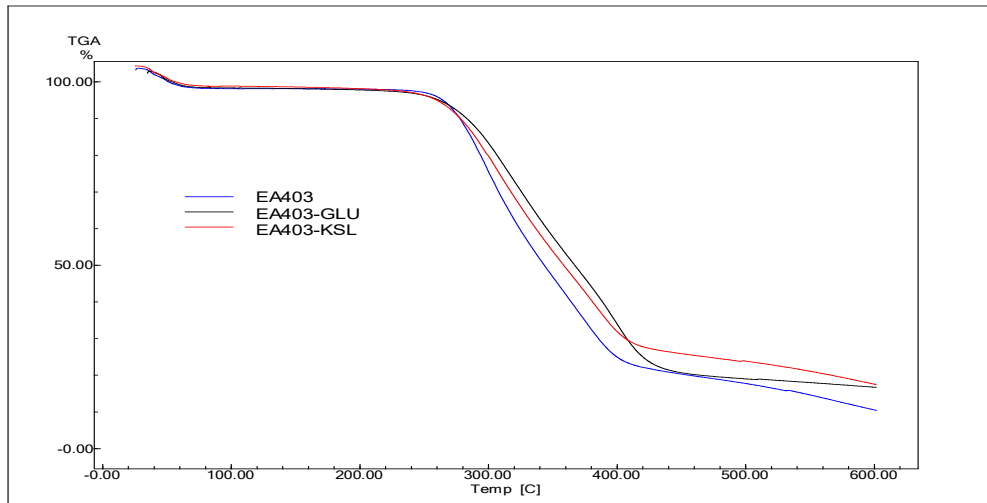
Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, destek materyalin yüzeyinde gerçekleşen kimyasal değişimleri ve enzim immobilizasyonunun doğrulanmasını sağlayan önemli bir tekniktir. Bu yöntem, destek yüzeyinde yer alan fonksiyonel grupların titreşimsel bantlarını tespit ederek glutaraldehit aktivasyonu ve enzim bağlanması sonrası oluşan yeni bağ türlerinin belirlenmesine olanak tanır. EA403 desteği, glutaraldehit ile aktifleştirilmiş formu (EA403-GLU) ve ksilanaz immobilizasyonu sonrası formu (EA403-KSL) için alınan FT-IR spektrumları karşılaştırılarak kovalent bağlanmanın gerçekleştiği doğrulanmıştır (Şekil 2).

EA403 desteğine ait FT-IR spektrumunda 2925 cm^{-1} civarında görülen C–H gerilme titreşimleri ile $3300\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde yer alan N–H gerilme titreşimi tipik olarak etilamino gruplarına ait karakteristik bantları göstermiştir. Desteğin yapısında bulunan karbonil pikinin (1720 cm^{-1}) yanında, EA403-GLU örneğinde 1650 cm^{-1} civarında yeni bir C=O (amit karbonil) gerilme bandının ortaya çıkması, glutaraldehitin yüzeye başarıyla bağlandığını göstermektedir. Ksilanaz immobilizasyonundan sonra (EA403-KSL) bu karbonil bandının şiddetinde artış, enzim molekülündeki amino gruplarının glutaraldehitin aldehit uçları ile kovalent bağlanmanın gerçekleştiğini doğrulamaktadır. Ayrıca 1540 cm^{-1} civarındaki band, immobilize enzimin proteik yapısına ait tipik titreşimleri yansıtmaktadır. Bu sonuçlar, ksilanazın EA403 desteğine glutaraldehit aracılığıyla başarılı şekilde kovalent olarak immobilize edildiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 2. EA403 desteği, glutaraldehit ile aktifleştirilmiş formu (EA403-GLU) ve ksilanaz immobilizasyonu sonrası (EA403-KSL) yapılarının FT-IR spektrumu

Termogravimetrik analiz (TGA), immobilizasyon sürecinde desteğe bağlanan organik grupların ve enzim moleküllerinin termal davranışlarını belirlemek için kullanılan tamamlayıcı bir karakterizasyon yöntemidir. Bu analiz, destek materyalin ısı kararlılığını değerlendirmede ve immobilizasyonun ardından yapısal değişiklikleri nicel olarak gözlemlemede önemlidir. EA403, EA403-GLU ve EA403-KSL örneklerinin 25–900 °C aralığında azot atmosferi altında elde edilen TGA eğrileri karşılaştırılarak, her bir aşamadaki kütle kayıpları analiz edilmiştir. Numunelerin TGA analizleri oda sıcaklığından 600 °C'ye kadar 10 °C/dk ısıtma hızında argon atmosferinde gerçekleştirildi. Karşılaştırmalı TGA eğrileri Şekil 3'te gösterilmiştir.



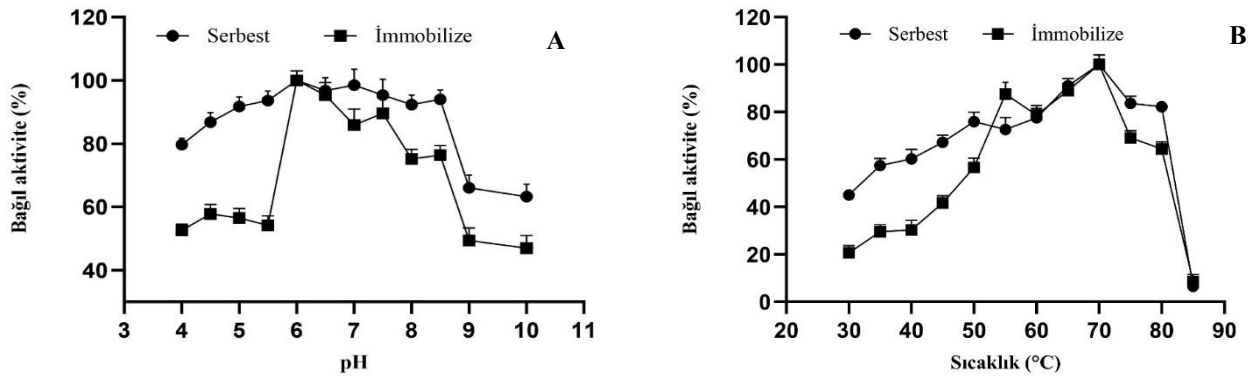
Şekil 3. EA403 desteği, glutaraldehit ile aktifleştirilmiş formu (EA403-GLU) ve ksilanaz immobilizasyonu sonrası (EA403-KSL) yapılarının TGA eğrileri

EA403 desteğinde 100 °C'ye kadar gözlenen yaklaşık %2–3'lük kütle kaybı, yüzeydeki adsorbe suyun uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır. 200–400 °C aralığında belirlenen küçük kütle kaybı ise organik etilamino gruplarının ayrışmasıyla ilişkilendirilmiştir. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş destek (EA403-GLU) örneğinde bu sıcaklık aralığında daha belirgin bir kütle kaybı gözlenmiş, bu da yüzeye eklenen aldehit gruplarının termal bozunmasına işaret etmiştir. Ksilanaz immobilizasyonundan sonra elde edilen EA403-KSL örneğinde 250–500 °C arasında daha yüksek bir kütle kaybı (%8–12)

saptanmış, bu kayıp immobilize enzimin protein yapısına ait termal bozunmadan kaynaklanmaktadır. 600 °C'deki artık kütle miktarı EA403 > EA403-GLU > EA403-KSL sırasını göstermiştir. Bu durum, immobilizasyon sonrası yüzeydeki organik yükün artışı ve ksilanazın desteğe başarıyla bağlandığını nicel olarak desteklemektedir.

Optimum sıcaklık ve pH belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek üzere, sodium asetat (pH 4.0-5.5) sodium fosfat (pH 6.0-8.0) ve sodium karbonat tamponları (pH 9.0-10.0) dahil olmak üzere bir dizi 50 mM tampon çözelti hazırlanmış ve bunların aktiviteleri 50°C'de ölçülmüştür. Serbest ve immobilize ksilanaz için optimum pH değeri 6.0 olarak bulunmuştur (Şekil 4A). Bu durum immobilizasyon işleminin enzimin aktif bölgesinin elektrostatik yapısını ve dolayısıyla optimum pH'sını kritik düzeyde değiştirmedikten kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Literatürde benzer şekilde optimum pH'nın immobilizasyonun ardından değişmediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Soozanipour ve ark. (2015) manyetik nanopartiküle kovalent olarak immobilize ettikleri ksilanazın her iki enzim formu için optimum pH'yı 6.5 olarak bildirmişlerdir. Tanwar ve ark. (2024) glutaraldehitte aktifleştirilmiş alüminyum oksit peletlerine ksilanazı immobilize etmişler ve immobilizasyonun ardından optimum pH'nın (7.0) değişmediğini rapor etmişlerdir.



Şekil 4. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi (A) ve sıcaklığa bağlı değişimi (B)

Şekil 4B'de gösterildiği gibi, serbest ksilanaz ve immobilize ksilanazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 70°C olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzimin sıcaklık profili benzer özellikler göstermiştir. Optimum sıcaklığa kadar benzer oranlarda artış gözlenmiş 80°C'den sonra ise her iki enzimin aktivitesinde hızlı bir düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün nedeni enzimin yapısı ve çevresel koşulların değişmesinden kaynaklanmaktadır. Bakar ve ark. (2024) aynı enzim kaynağı kullanılarak yapılan immobilizasyon çalışmasında serbest ve Mn/ZIF-67 desteğe immobilize edilmiş ksilanazın optimum sıcaklık değerini 70°C olarak rapor etmişlerdir. Rezayat ve ark. (2023) *Thermomyces lanuginosus* ksilanazını β -siklodekstrin ile fonksiyonlaştırılmış manyetik nanopartiküle immobilize etmişler ve optimum sıcaklığı her iki enzim için 70°C olarak bildirmişlerdir.

Kinetik parametreler

Tablo 2'de verildiği üzere, K_m değerleri serbest ksilanaz için 10.66 mg/mL ve immobilize ksilanaz için 17.21 mg/mL olarak bulunurken, V_{max} değerleri sırasıyla 1660.5 U/mg protein ve 112.5 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Enzimatik performansın standart bir göstergesi olan katalitik etkinlik (V_{max}/K_m) değerleri, serbest enzim için 155.76 iken immobilize enzim için 6.53 olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyonun ardından katalitik etkinlikteki düşüşün nedeni; substratın molekül ağırlığının yüksek olması, desteğin gözenekli yapısı, immobilizasyonun enzimin substrata erişimini

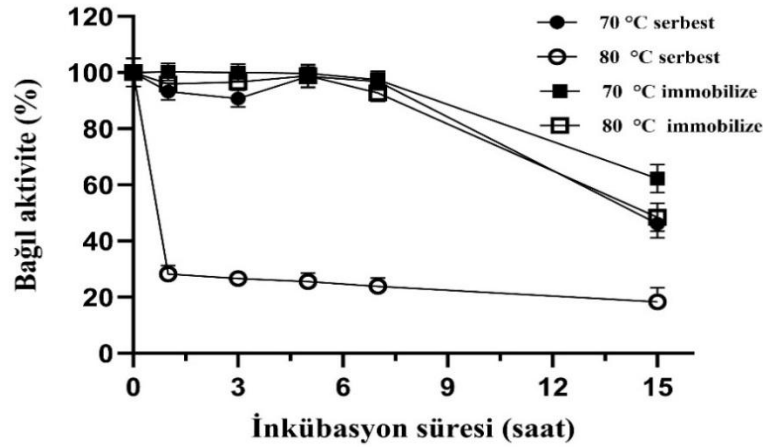
kısmen kısıtlaması ve difüzyonel sınırlamalar getirmesinden kaynaklanıyor olabilir. Özdemir ve ark. (2024) Relizyme EA403 desteğine immobilize ettikleri L-asparajinaz eziminin V_{max} değerinin 243.9 U/mg protein iken immobilizasyondan sonra 44.6 U/mg protein'e düştüğünü rapor etmişlerdir. Irfan ve ark. (2020) β -1,4-ksilanaz'nın kalsiyum alginata immobilizasyonundan sonra K_m değerinin 8.6 mg/ml'den 10.97 mg/ml'ye yükseldiğini aynı zamanda V_{max} değerinde 43.71 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{dk}^{-1}$ 'den 6.18 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{dk}^{-1}$ düştüğünü rapor etmişlerdir.

Tablo 2. Serbest ve immobilize ksilanazın kinetik parametreleri

Enzyme	K_m (mg/mL)	V_{max} (U/mgprotein)	V_{max}/K_m
Serbest ksilanaz	10.66	1660.5	155.76
İmmobilize ksilanaz	17.21	112.5	6.53

Termal kararlılık

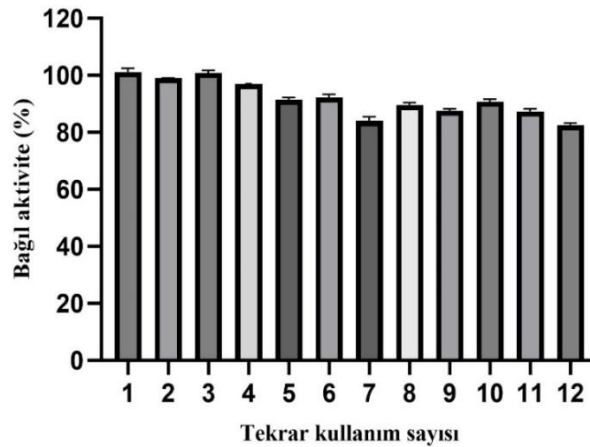
İmmobilizasyonun sağladığı kararlılık artışını belirlemek üzere, serbest ve immobilize ksilanazın termal kararlılığı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Enzimlerin, 70°C ve 80°C'de değişen sürelerle maruz bırakılmalarının ardından kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular, immobilize ksilanazın her iki sıcaklıkta da serbest enzime kıyasla anlamlı ve yüksek bir ısı direnci sergilediği saptanmıştır (Şekil 5). Özellikle 80°C'de serbest enzim ilk 1 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesinin %70'ini kaybederken, immobilize enzimin %96 oranında aktivitesini koruması, kovalent bağlanmanın sağladığı stabilizasyonun bir göstergesidir. Serbest ve immobilize ksilanazın belirlenen sıcaklıklardaki yarılanma ömürleri ($t_{1/2}$) karşılaştırıldığında, 70°C'deki yarılanma ömürleri sırasıyla 11.63 ve 16.23 saat olarak hesaplanmıştır. 80°C gibi daha zorlu sıcaklık koşullarında ise serbest enzimin yarılanma ömrü 1 saatin altına düşerken, immobilize enzimin bu süreyi 12.47 saate çıkararak termal direncini yaklaşık 12.5 kat artırdığı nicel olarak saptanmıştır. Wahba ve ark. (2024) glutaraldehit ile aktifleştirilmiş gellan sakızı-agar boncuk desteğe immobilize ettikleri *Aspergillus flavus* AW1 ksilanazının termal kararlılığını 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda test etmişlerdir. Enzimin bu sıcaklıklardaki yarılanma ömürlerini sırasıyla 3.85, 2.31 ve 1.65 saat olarak bildirmişlerdir. Teng ve ark. (2021) *Streptomyces rochei* ksilanazını adsorpsiyon yöntemiyle Eudragit S-100 desteğine immobilize etmişler. 70°C'deki termal kararlılık çalışmasında yarılanma ömürleri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 1.38 ve 3.26 saat belirlemiştir. Enzimin 80°C'deki termal kararlılığı ise yine sırasıyla 18.3 ve 31.6 dakika olarak hesaplanmıştır. İmmobilize edilmiş enzimlerde termal dayanıklılıktaki farklılıkların temel sebebi, taşıyıcı sistemin yapısal ve kimyasal özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Enzimle taşıyıcı yüzey arasında kurulan bağlar, moleküler düzeyde bir sertlik oluşturarak enzimin üç boyutlu yapısının korunmasına katkı sağlamıştır. Bu kararlılık mekanizması, yüksek sıcaklık koşullarında enzimin doğal yapısını kaybetmesini (denatürasyon) engelleyerek, termal kararlılık parametrelerinde belirgin bir iyileşmeye yol açmıştır (Pekdemir ve ark., 2024).



Şekil 5. Serbest ve immobilize ksilanazın 70 °C ve 80 °C'deki inkübasyon süresine bağlı olarak aktivitesindeki değişim

İmmobilize ksilanazın tekrar kullanım kararlılığın belirlenmesi

İmmobilize ksilanazın kesikli reaktördeki yeniden kullanım kararlılığı Şekil 6'da gösterilmektedir. İmmobilize enzim, 12 kullanım döngüsünden sonra başlangıç aktivitesini % 82 oranında korumuştur. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlarla güçlü bir şekilde tutunması, kataliz sürecinde sızıntıyı minimize ederek aktivite kaybını düşürmekte ve bu durum immobilize enzimlerin yeniden kullanılabilirliği açısından genel bir avantaj sağlamaktadır (Teng ve ark., 2021). Pekdemir ve ark. (2024) *Aspergillus oryzae* ksilanazı ZnO nanopartiküllere fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilize etmişler ve 6 tekrar kullanımdan sonra immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %50'sini koruduğu bildirilmiştir. Yine *Aspergillus oryzae* ksilanaz kaynağı kullanılarak yapılan diğer çalışmada ise; Bakar ve ark. (2024) ZIF-67 ve Mn/ZIF-67 desteklere ksilanazı immobilize etmişler ve 8 tekrar kullanımdan sonra her iki immobilize enzimin başlangıç aktivitelerini %70 oranında koruduklarını rapor etmişlerdir.



Şekil 6. İmmobilize enzimin kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim

SONUÇ

Bu çalışmada, *Aspergillus oryzae*'den elde edilen ksilanaz enzimi, ReliZyme EA403 desteği üzerine glutaraldehit kullanılarak başarıyla immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon işlemi, enzimin yapısal kararlılığını ve dayanıklılığını önemli ölçüde artırmıştır. Elde edilen immobilize enzim, serbest forma kıyasla çok daha yüksek bir termal kararlılık sergilemiştir. Özellikle 80°C gibi yüksek bir

sıcaklıkta dahi aktivitesini uzun süre koruyabilmesi, enzimin pratik uygulamalar için önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, kesikli bir reaktör sisteminde 12 kullanım döngüsünün sonunda başlangıç aktivitesinin %82'sini koruması, immobilize enzimin yeniden kullanılabilirlik potansiyelini ve ekonomik verimliliğini açıkça ortaya koymuştur. Tüm bu bulgular, geliştirilen immobilize ksilanazın, yüksek sıcaklık gerektiren ve tekrarlanan proseslerin yürütüldüğü endüstriyel alanlarda (gıda işleme, biyoyakıt üretimi vb.) güvenle kullanılabilirlik etkin ve dayanıklı bir sistem olduğunu göstermektedir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarı herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Yazar Katkısı

Yazar, makalenin tüm aşamalarında tek başına görev almıştır.

KAYNAKLAR

- Abd Rahman, N. H., Rahman, R. A., & Md Illias, R. (2025). Investigating glutaraldehyde cross-linked starch as a hybrid support for immobilizing pectinase and xylanase for pectic-oligosaccharides production. *Food Bioscience*, 63, 105713. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105713>
- Alagöz, D., Tükel, S. S., & Yildirim, D. (2016). Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 426-432. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.007>
- Alagöz, D., Varan, N. E., Yildirim, D., & Fernández-Lafuente, R. (2022). Optimization of the immobilization of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* to produce xylooligosaccharides in a batch type reactor. *Molecular Catalysis*, 531, 112647. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112647>
- Anwar, U., Riaz, M., Farooq, K. M., Mustafa, R., Farooq, U., Ashraf, Mu., . . . & Rahman, M. A. (2023). Impact of Exogenous Xylanase and Phytase, Individually or in Combination, on Performance, Digesta Viscosity and Carcass Characteristics in Broiler Birds Fed Wheat-Based Diets. *Animals*, 13(2), 278. doi:[10.3390/ani13020278](https://doi.org/10.3390/ani13020278)
- Ariaeenejad, S., Jokar, F., Hadian, P., Ma'mani, L., Gharaghani, S., Fereidoonzehad, M., & Salekdeh, G. H. (2020). An efficient nano-biocatalyst for lignocellulosic biomass hydrolysis: Xylanase immobilization on organically modified biogenic mesoporous silica nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3462-3473. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.211>
- Ashikin, N. A. L. N., Fuzy, S. F. Z. M., Manaf, S. A. A., Manas, N. H. A., Nawi, S. M. S. M., & Illias, R. M. (2022). Optimization and characterization of immobilized *E. coli* for engineered thermostable xylanase excretion and cell viability. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(6), 103803. doi:[10.1016/j.arabjc.2022.103803](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103803)
- Aslam, S., Rukhma, Liaqat, I., Ali, S., Ikram ul, Haq., Jahangeer, M., & Aftab, M. N. (2025). Covalent immobilization of thermotolerant recombinant nano-coupled xylanase for improved stability and reusability in the saccharification process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 308 (1), 142169. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.142169>
- Bakar, B., Dik, G., Ulu, A., & Ateş, B. (2024). Immobilization of Xylanase into Zeolitic Imidazolate Framework-67 (ZIF-67) and Manganese-Doped ZIF-67 (Mn/ZIF-67): A Comparison Study. *Topics in Catalysis*, 67(9), 698-713. doi:[10.1007/s11244-023-01898-1](https://doi.org/10.1007/s11244-023-01898-1)
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*, 4(4), 1583-1600. doi:[10.1039/C3RA45991H](https://doi.org/10.1039/C3RA45991H)

- Bhardwaj, N., Kumar, B., & Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1), 40. doi:[10.1186/s40643-019-0276-2](https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2)
- Bilal, M., Qamar, S. A., Ashraf, S. S., Rodríguez-Couto, S., & Iqbal, H. M. N. (2021). Robust nanocarriers to engineer nanobiocatalysts for bioprocessing applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 293, 102438. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102438>
- Bilgin, R., Yalcin, M. S., & Yildirim, D. (2016). Optimization of covalent immobilization of *Trichoderma reesei* cellulase onto modified ReliZyme HA403 and Sepabeads EC-EP supports for cellulose hydrolysis, in buffer and ionic liquids/buffer media. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(5), 1276-1284. doi:[10.3109/21691401.2015.1024842](https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1024842)
- Cetiner, B., & Koksel, H. (2024). Comparison of quality, dietary fiber and glycemic index of whole wheat breads using various modern and old wheats and investigate the effect of xylanase. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18(6), 4484-4495. doi:[10.1007/s11694-024-02509-7](https://doi.org/10.1007/s11694-024-02509-7)
- Chaiyates, R., Sawaengkaew, J., & Mahakhan, P. (2025). Production of xylo-oligosaccharides from corn cob using high efficiency xylanase from *Trichoderma harzianum* 4FR8. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(12), 19175-19187. doi:[10.1007/s13399-025-06617-2](https://doi.org/10.1007/s13399-025-06617-2)
- Dent, M., Vujović, T., Miljanović, A., Jerković, I., Marijanović, Z., Grbin, D., & Rezić, T. (2023). Effect of xylanase addition and ultrasonic pretreatment on the yield and volatile profile of bay laurel and sage essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 26(4), 970-986. doi:[10.1080/0972060X.2023.2258935](https://doi.org/10.1080/0972060X.2023.2258935)
- dos Santos, J. P., Zavareze, E. da R., Dias, A. R. G., & Vanier, N. L. (2018). Immobilization of xylanase and xylanase- β -cyclodextrin complex in polyvinyl alcohol via electrospinning improves enzyme activity at a wide pH and temperature range. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1676-1684. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.014>
- Gao, P., Ma, J., Basit, R. A., Lou, X., Zhang, W., Song, H., Fu, Z., Sun, Q., Liu, X., Wang, J., & Fan, G. (2025). Investigation of the enzymatic characteristics of thermotolerant xylanase McXyn0243 derived from *Malbranchea cinnamomea*, and its application in the degradation of three agricultural residues for the production of xylooligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 313, 143973. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143973>
- Irfan, M., Kiran, J., Ayubi, S., Ullah, A., Rana, Q. U. A., Khan, S., . . . & Shah, A. A. (2020). Immobilization of β -1,4-xylanase isolated from *Bacillus licheniformis* S3. *Journal of Basic Microbiology*, 60(7), 600-612. doi:<https://doi.org/10.1002/jobm.202000077>
- Kahar, U. M., Sani, M. H., Chan, K., & Goh, K. M. (2016). Immobilization of α -Amylase from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 on ReliZyme and Immobead Supports. *Molecules*, 21(9), 1196. doi:[10.3390/molecules21091196](https://doi.org/10.3390/molecules21091196)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Martínez, D., Sobrino, A., Aguiar, A., González-Bacerio, J., Hernández, L., Pérez, E. R., & Monte-Martínez, A. D. (2024). Rational design and immobilization of a recombinant sucrose: Sucrose 1-fructosyltransferase on Sepabeads® and ReliZyme™ supports for short-chain fructooligosaccharides production. *Process Biochemistry*, 137, 71-84. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.12.015>
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pedroche, J., Fernández-Lafuente, R., & Guisan, J. M. (2002). Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment. *Biotechnology Progress*, 18(3), 629-634. doi:<https://doi.org/10.1021/bp010171n>

- Melo, R. R. d., Alnoch, R. C., Vilela, A. F. L., Souza, E. M. d., Krieger, N., Ruller, R., . . . & Mateo, C.. (2017). New Heterofunctional Supports Based on Glutaraldehyde-Activation: A Tool for Enzyme Immobilization at Neutral pH. *Molecules*, 22(7), 1088. doi:[10.3390/molecules22071088](https://doi.org/10.3390/molecules22071088)
- Neto, W., Schürmann, M., Panella, L., Vogel, A., & Woodley, J. M. (2015). Immobilisation of ω -transaminase for industrial application: Screening and characterisation of commercial ready to use enzyme carriers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 117, 54-61. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.04.005>
- Özdemir, F. İ., Karaaslan, B., Tülek, A., & Yildirim, D. (2024). Covalent immobilization of recombinant L-asparaginase from *Geobacillus kaustophilus* on ReliZyme supports for mitigation of acrylamide. *Biocatalysis and Biotransformation*, 42(3), 426-439. doi:[10.1080/10242422.2023.2257351](https://doi.org/10.1080/10242422.2023.2257351)
- Özdemir, F.İ. Tülek, A., Karaaslan, B., & Yildirim, D. (2024). Evaluation of multi-walled carbon nanotubes bearing aldehyde groups of different lengths for the immobilization of *Geobacillus kaustophilus* l-asparaginase. *Molecular Catalysis*, 555, 113903. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2024.113903>
- Parandi, E., Safaripour, M., Mosleh, N., Saidi, M., Nodeh, H. R., Oryani, B., & Rezaia, S. (2023). Lipase enzyme immobilized over magnetic titanium graphene oxide as catalyst for biodiesel synthesis from waste cooking oil. *Biomass and Bioenergy*, 173, 106794. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106794>
- Qamar, S. A., Qamar, M., Bilal, M., Bharagava, R. N., Ferreira, L. F. R., Sher, F., & Iqbal, H. M. N. (2021). Cellulose-deconstruction potential of nano-biocatalytic systems: A strategic drive from designing to sustainable applications of immobilized cellulases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 185, 1-19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.079>
- Rezayat, A., Kakanejadifard, A., Taheri-Kafrani, A., & Trotta, F. (2023). Xylanase immobilized on β -cyclodextrin functionalized magnetic nanoparticles: Implications for antioxidant component extraction and fruit juice quality improvement. *Journal of Molecular Liquids*, 387, 122660. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122660>
- Ristović, M., Stojanović, S., Pavlović, M., Margetić, A., Slavić, M. Š., Dojnov, B., & Vujčić, Z. (2025). Enhancing functional properties of fruit juices with highly active xylanase from *Aspergillus tubingensis* FAT35. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n/a(n/a). doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.70208>
- Royvaran, M., Taheri-Kafrani, A., Isfahani, A. L., & Mohammadi, S. (2016). Functionalized superparamagnetic graphene oxide nanosheet in enzyme engineering: A highly dispersive, stable and robust biocatalyst. *Chemical Engineering Journal*, 288, 414-422. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.12.034>
- Saharan, V., Tushir, S., Singh, J., Kumar, N., Chhabra, D., & Kapoor, R. K. (2024). Application of MOGA-ANN tool for the production of cellulase and xylanase using de-oiled rice bran (DORB) for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(11), 11987-11999. doi:[10.1007/s13399-023-04022-1](https://doi.org/10.1007/s13399-023-04022-1)
- Sarangi, A., & Thatoi, H. (2024). Xylanase as a Promising Biocatalyst: A Review on Its Production, Purification and Biotechnological Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. doi:[10.1007/s40011-024-01567-7](https://doi.org/10.1007/s40011-024-01567-7)
- Sasi, A., Mustafa, A. H., Sikder, M. B. H., Rashid, S. S., & Ab Rahim, M. H. (2024). Elucidation of enhanced cellulase immobilization onto synthetic magnetic nickel nanomaterials for lignocellulosic biomass hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 57, 103126. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103126>
- Pekdemir, S. S., Bakar, B., Taş, R., Ulu, A., Pekdemir, M. E., & Ateş, B. (2024). Immobilization of Xylanase on ZnO nanoparticles obtained by green synthesis from *Eupatorium cannabinum* L. and its application in enrichment of fruit juices. *Molecular Catalysis*, 562, 114232. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2024.114232>
- Shahrestani, H., Taheri-Kafrani, A., Soozanipour, A., & Tavakoli, O. (2016). Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1,3,5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic

nanoparticles. Biochemical Engineering Journal, 109, 51-58.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.013>

- Soozanipour, A., Taheri-Kafrani, A., & Isfahani, A. L. (2015). Covalent attachment of xylanase on functionalized magnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. Chemical Engineering Journal, 270, 235-243. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.02.032>
- Tanwar, E., Nagar, S., Kumari, K., Mallesh, G., Goyal, S., & Sonu. (2024). Enrichment of papaya juice using covalently immobilized xylanase from *Bacillus pumilus* SV-85S. Biomass Conversion and Biorefinery, 14(22), 28187-28203. doi:[10.1007/s13399-022-03521-x](https://doi.org/10.1007/s13399-022-03521-x)
- Teng, C., Tang, H., Li, X., Zhu, Y., Fan, G., & Yang, R. (2021). Production of xylo-oligosaccharides using a *Streptomyces rochei* xylanase immobilized on Eudragit S-100. Biocatalysis and Biotransformation, 39(6), 408-417. doi:[10.1080/10242422.2021.1964483](https://doi.org/10.1080/10242422.2021.1964483)
- Tülek, A., Günay, E., Servili, B., Essiz, S., Binay, B., & Yildirim, D. (2023). Sustainable production of formic acid from CO₂ by a novel immobilized mutant formate dehydrogenase. Separation and Purification Technology, 309, 123090. doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.123090>
- Wahba, M. I., Ismail, S. A., Hassan, A. A., Abdel-Aziem, S. H., Hassan, A. M., & Nour, S. A. (2024). Xylanase immobilization using activated carrier of gellan gum-agar beads: Improved stability and catalytic activity for the production of antioxidant and anti-proliferative xylooligosaccharides. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 56, 103013. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.103013>
- Yang, S., Feng, M., Xu, J., Deng, Z., & Zhang, H.. (2024). Encapsulation, characterization and in vitro releasing of xylanase and glucose oxidase (GOD) into cellulose nanocrystals stabilized three-layer microcapsules. International Journal of Biological Macromolecules, 280, 135515. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135515>
- Zhang, F., Lian, M., Alhadhrami, A., Huang, M., Li, B., Mersal, G. A. M., . . . & Xu, M. (2022). Laccase immobilized on functionalized cellulose nanofiber/alginate composite hydrogel for efficient bisphenol A degradation from polluted water. Advanced Composites and Hybrid Materials, 5(3), 1852-1864. doi:[10.1007/s42114-022-00476-5](https://doi.org/10.1007/s42114-022-00476-5)