

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Mikrobiologijos studijų programos magistrantė

Raimonda Petkauskaitė

Magistrinis darbas

**Termostabilūs pektiną degraduojantys fermentai:  
*Geobacillus* genties bakterijų pektinolizinio aktyvumo tyrimai**

Darbo vadovė:

dr. Nomedą Kuisienė

Vilnius 2011

**Termostabilūs pektiną degraduojantys fermentai:  
*Geobacillus* genties bakterijų pektinolizinio aktyvumo tyrimai**

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje

Darbo vadovė:

## TURINYS

|   |      |
|---|------|
| Santrumpos  | / 5  |
| ĮVADAS  | / 6  |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA   | / 8  |
| 1.1. Pirminės augalų ląstelių sienelės cheminė struktūra  | / 8  |
| 1.1.1. Pektininiai polisacharidai   | / 8  |
| 1.1.1.1. Homogalakturonas   | / 9  |
| 1.1.1.2. Ramnogalakturonas-I  | / 10 |
| 1.1.1.3. Ramnogalakturonas-II   | / 11 |
| 1.1.1.4. Arabinogalaktanai  | / 13 |
| 1.1.1.5. Pektino funkcijos  | / 13 |
| 1.2. Pektinoliziniai fermentai  | / 15 |
| 1.2.1. Eukariotų pektinoliziniai fermentai  | / 16 |
| 1.2.2. Bakterijų pektinoliziniai fermentai  | / 17 |
| 1.2.3. Pektinolizinių fermentų nomenklatūra   | / 22 |
| 1.3. Pektinoliziniai fermentai biotechnologijoje  | / 23 |
| 2. MEDŽIAGOS IR METODAI   | / 27 |
| 2.1. Medžiagos  | / 27 |
| 2.1.1. Medžiagos baltymų tyrimams   | / 27 |
| 2.1.2. Komerciniai rinkiniai  | / 27 |
| 2.1.3. Medžiagos PGR ir PGR produktų vizualizavimui   | / 27 |
| 2.1.4. Kitos medžiagos  | / 27 |
| 2.1.5. Medžiagos terpių gamybai   | / 28 |
| 2.2. Metodai  | / 29 |
| 2.2.1. Mikroorganizmų kultivavimas  | / 29 |
| 2.2.2. Vizualus kultūros grynumo nustatymas vertinant mikroorganizmų morfologiją  | / 29 |
| 2.2.3. Termofilinių endosporas formuojančių bakterijų kamienų, pasižyminčių pektinoliziniu aktyvumu, išskyrimas iš komposto pavyzdžių | / 29 |
| 2.2.4. Kokybinis efektyviausių pektinolizinių izoliatų atrinkimas   | / 30 |
| 2.2.5. Genominės DNR išskyrimas   | / 30 |
| 2.2.6. Polimerazės grandininė reakcija  | / 30 |
| 2.2.7. DNR elektroforezė agarozės gelyje  | / 32 |
| 2.2.8. PGR produkto valymas iš agarozės gelio   | / 32 |
| 2.2.9. PGR pagausintų DNR fragmentų klonavimas  | / 32 |
| 2.2.10. Nukleotidinių sekų analizė  | / 33 |
| 2.2.11. Bakterijų endosporų dažymas Šefer-Fulton'o metodu   | / 33 |
| 2.2.12. Izoliatų augimo intensyvumo skystoje terpėje su specifiniu anglies šaltiniu įvertinimas sudarant augimo kreives               | / 33 |
| 2.2.13. Baltymų išsodinimas amonio sulfatu  | / 34 |
| 2.2.14. Baltymų dializė   | / 35 |

|   |      |
|---|------|
| 2.2.15. Baltymų koncentracijos matavimas Bradford'o metodu  | / 35 |
| 2.2.16. Pektino liazių substratinio specifiškumo ir termostabilumo nustatymas                                 | / 36 |
| 2.2.17. Hidrolazių nustatymas DNS reagentu  | / 37 |
| 2.2.18. Baltymų nustatymas gelio elektroforezės metodu  | / 39 |
| 2.2.19. Baltymų aktyvumo nustatymas gelyje  | / 41 |
| 3. REZULTATAI   | / 43 |
| 3.1. Termofilinių endosporas formuojančių bakterijų kamienų, pasižyminčių pektinoliziniu aktyvumu, atrinkimas | / 43 |
| 3.2. Pektinoliziniu aktyvumu pasižyminčių kamienų augimo kreivių sudarymas ir 16S rRNR filogenetinė analizė   | / 45 |
| 3.3. Pektino liazių substratinio specifiškumo ir termostabilumo nustatymas                                    | / 51 |
| 3.4. Hidrolazių nustatymas  | / 53 |
| 3.5. Elektroforetinė pektinolizinių fermentų charakteristika  | / 54 |
| 4. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS   | / 58 |
| IŠVADOS   | / 61 |
| SUMMARY   | / 62 |
| PADĖKA  | / 63 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS   | / 64 |

## Santrumpos

APS – (*angl.* ammonium persulphate) – amonio persulfatas

BSA – (*angl.* bovine serum albumine) – jaučio serumo albuminas

CAZy – *angl.* Carbohydrate-Active enZYMes Database

dist. – distiliuotas

DNS reagentas – reagentas, į kurio sudėtį įeina dinitrosalicilo rūgštis.

EDTA – (*angl.* ethylenediaminetetraacetic acid) – etilendiaminotetraacto rūgštis

EGTA – (*angl.* ethylene glycol tetraacetic acid) – etileno glikolio tetraacto rūgštis

KDO – *angl.* 2-keto-3-deoxy-D-manno-oktulosonic acid

IUB – *angl.* International Union of Biochemistry

IUBMB – *angl.* International Union of Biochemistry and Molecular Biology

OT – optinis tankis

PGA – (*angl.* polygalacturonic acid) – poligalakturono rūgštis

PGR – polimerazės grandininė reakcija

SDS – (*angl.* sodium dodecyl sulfate) – natrio dodecyl-sulfatas

TEMED – (*angl.* tetrametilendiamine) – tetrametilendiaminas

UDP – (*angl.* uridine diphosphate) – uridino difosfatas

## IVADAS

Pektinas sudaro didžiausią makromolekulių masę, kuri randama pirminės augalų ląstelių sienelės bei tarpinės plokštelės, atsakingos už tarpląstelinę adheziją, sudėtyje. Pektininė matrica sukuria pagrindą celiuliozės-glikanų tinklui, lemia jo tūsumą, taip pat atsako už porų susidarymą bei yra pagrindinė adhezinė medžiaga tarp ląstelių (Willats, McCartney et al. 2001). Šio polisacharido pagrindą sudaro  $\alpha$ -(1-4)-glikozidiniai ryšiais sujungtos D-galakturono rūgšties liekanos (GalpA) ir mažesnė dalis kitų sacharidų, tokių kaip L-ramnozė, arabinozė, galaktozė ir ksilozė. GalpA karboksigrupės yra iš dalies esterintos metoksigrupių ir iš dalies arba visiškai neutralizuotos natrio, kalio ar amonio jonų.

Pektiną degraduojantys fermentai, trumpiau vadinami pektinazėmis, sintetinami pačių augalų, taip pat fitopatogeninių bakterijų ir grybų (<http://pec.biodbs.info/listofMicroorganisms.html>). Šie fermentai yra klasifikuojami pagal tris kriterijus: a) specifiškumą tam tikram polisacharidui (substratui) arba keliems; b) substrato grandinės skėlimo reakcijos mechanizmą; c) skėlimo vietą substrato grandinėje.

Netrukus po šių fermentų atradimo, susidomėta jų pramoniniu pritaikomumu, kuris pasirodė besąs ganėtinais platus: sulčių, kavos, arbatos, augalinio aliejaus, popieriaus ir gyvūnų ėdalo gamyboje, tekstilės pramonėje ir net nuotekų valyme (Kashyap, Vohra et al. 2001). Šiuo metu dar didesnis dėmesys skiriamas termostabiliems pektiną degraduojantiems fermentams, kurie pramonėje gali būti naudojami esant aukštomis temperatūroms. Tokiu būdu yra sumažinama kontaminacijos (kryžminio užteršimo) rizika, taip pat padidinamas polimerinių substratų tirpumas bei pagreitinama jų degradacija (Kozianowski, Canganella et al. 1997).

**Darbo tikslas:** Atlikti termostabilių pektiną degraduojančių fermentų aktyvumo tyrimus.

**Uždaviniai:**

1. Atrinkti termofilinių endosporas formuojančių bakterijų kamienus, pasižyminčius pektinoliziniu aktyvumu. Sugrupuoti šiuos mikroorganizmus BOX-PGR genotipavimo metodu.
2. Įvertinti atrinktų kamienų augimo intensyvumą skystoje terpėje su pektinu, kaip anglies šaltiniu, sudarant augimo kreives. Atlikti didžiausią pektinolizinį aktyvumą turinčių kamienų 16S rRNR genų filogenetinę analizę.

3. Iš efektyviausiai augančio kamieno kultūrinio skysčio išskirti suminiame fermentiniame tirpale pektinolizinius fermentus. Nustatyti pektino liazių ir hidrolazių substratinį specifiškumą.
4. Taikant baltymų nustatymo gelio elektroforezės ir baltymų aktyvumo nustatymo gelyje metodus, įvertinti fermentiniame tirpale pektinazių skaičių, molekulinę masę bei pektinolizinio aktyvumo priklausomybę nuo pH ir temperatūros.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Pirminės augalų ląstelių sienelės cheminė struktūra

Augalų forma bei struktūrinės ypatybės daugiausiai priklauso nuo pirminės augalų ląstelių sienelės. Ląstelei dalijantis susidaranti sienelė vadinama pirmine sienele. Vėliau ji storėja ir virsta antrine sienele. Dalis augalinių ląstelių (pvz., lapo minkštimo ląstelės) visą gyvenimą turi tik pirminę sienelę. Yra žinoma, jog pirminės sienelės yra sudarytos iš celiuliozės mikrofibrilinių pluoštų, kuriuos tarpusavyje sujungia glikanai (Carpita and Gibeaut 1993; Cosgrove 1999). Dviskilčiuose šias skersines sąsajas sudaro daugiausiai ksilogliukanai, tuo tarpu *Poaceae* ir kituose vienaskilčiuose dominuoja glukuroarabinoksilanai (Carpita and Gibeaut 1993; Carpita 1996). Apskritai sienelės apibūdinamos kaip celiuliozės ir glikanų tinklas, į kurio sudėtį įeina ir daugiau kitų tirpių polisacharidų, glikoproteinų, proteoglikanų, mažos molekulinės masės junginių ir jonų.

Pektinas sudaro didžiausią makromolekulių masę, kuri randama pirminės augalų ląstelių sienelės bei tarpinės plokštelės, atsakingos už tarpląstelinę adheziją, sudėtyje. Mažesnę dalis pektino aptinkama tam tikrų augalų šeimų (pavyzdžiui, *Poaceae*) pirminių ląstelių sudėtyje. Pektininė matrica sukuria pagrindą celiuliozės-glikanų tinklui, lemia jo tįsumą, taip pat atsako už porų susidarymą bei yra pagrindinė adhezinė medžiaga tarp ląstelių (Willats, McCartney et al. 2001).

### 1.1.1. Pektininiai polisacharidai

Pektinu vadinama pagrindinių augalų ląstelių pirminės sienelės sudarančių polisacharidų grupė, kurios pagrindą sudaro  $\alpha$ -(1-4)-glikozidiniais ryšiais sujungtos D-galakturono rūgšties liekanos (GalpA) ir mažesnę dalis kitų sacharidų, tokių kaip L-ramnozė, arabinozė, galaktozė ir ksilozė. GalpA karboksigrupės yra iš dalies esterintos metoksigrupių ir iš dalies arba visiškai neutralizuotos natrio, kalio ar amonio jonų. Atsižvelgiant į pagrindinės polisacharido grandinės jungčių bei funkcinių grupių modifikacijas, išskiriami: pektinas, protopektinas, pektatas ir pektinatas.



Protopektinas – tai augalų tarpinėse plokštelėse randama vandenyje netirpi pektininė medžiaga. Šios tarpinės plokštelės tarnauja tarsi klijai, surišantys ląstelių sienelės viena su kita. Kai kurios iš protopektino netirpumo priežasčių yra: a) didelė jo molekulinė masė; b) esterinių jungčių sudarymas tarp karboksilinių pektino rūgščių grupių ir hidroksilinių kitų ląstelės sienelės komponentų grupių; c) druskos sudarymas tarp baltymų ir karboksilinių pektininės medžiagos grupių (Yoshitake, Numata et al. 1994). Pektatai – neesterintų metoksigrupėmis GalpA neutralios ar šarminės druskos. Pektinatai – polimetilgalakturono rūgšties neutralios arba šarminės druskos (Kashyap, Vohra et al. 2001). Paprastumo dėlei toliau ši pektininių polisacharidų grupė bendrai bus įvardijama kaip pektinas.

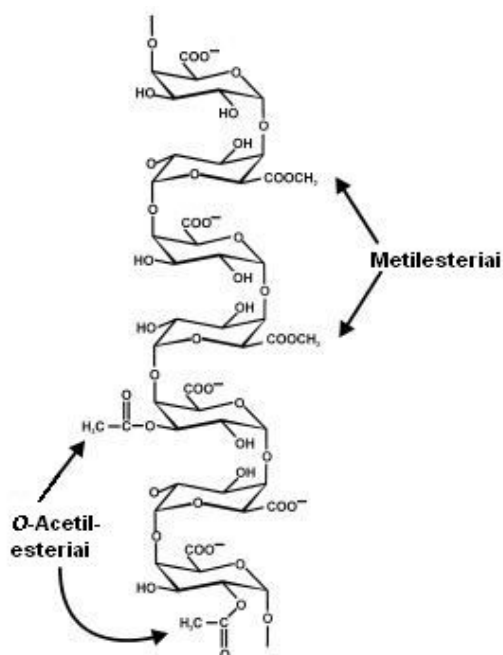
Biochemiškai pektinas apibūdinamas kaip polisacharidų grupė, kurią sudaro  $\alpha$ -(1-4)glikozidiniais ryšiais sujungtos D-galakturono rūgšties liekanos (GalpA). Ši rūgštis yra sutinkama dvejose pagrindinėse struktūrose, formuojančiose pagrindą trijų polisacharidų grupių: homogalakturono, ramnogalakturono-I ir ramnogalakturono-II. Šios grupės yra randamos visose pektino rūšyse. Yra žinoma, jog šioms trimis grupėms priklausantys junginiai jungiasi tarpusavyje kovalentiškai ir pirminėse augalų ląstelių sienelėse bei tarpinėje plokštelėje formuoja pektino tinklą. Šio tinklo struktūrą moduliuoja kiti įvairūs ląstelių sienelių fermentai (Willats, McCartney et al. 2001).

#### 1.1.1.1. Homogalakturonas

**Homogalakturonas** (HGA) yra linijinis polisacharidas, kuriame  $\alpha$ -(1-4)-glikozidiniais ryšiais sujungti D-galakturono rūgšties žiedai (GalpA). Šio polisacharido sintezę vykdo trys fermentai: HGA acetiltransferazė, HGA galakturonoziltransferazė ir HGA metilesterazė. Manoma, jog HGA GalpA liekanų gali būti maždaug 100-200 (Zhan, Janssen et al. 1998). HGA sudaro didelę dalį pektino, yra sintetinamas Goldžio aparate iš UDP-D-galakturono rūgšties (Sakai, Sakamoto et al. 1993). Šis į sienelę įterpiamas polisacharidas būna 70-80 % esterintas (prie C6 atomo karboksigrupės prijungta metoksigrupė) (*1 pav.*). Prie neesterintų HGA karboksigrupių prisijungus kalcio jonams susiformuoja gelio konsistencijos makromolekulinis junginys. Galimos ir kitos HGA modifikacijos, tačiau jos nėra tokios dažnos kaip metoksi-

esterifikacija. Pavyzdžiui, GalpA liekanų C3, kartais ir C2 atomų hidroksigrupės gali būti *O*-acetilintos (per deguoninį ryšį). Acetilintas HGA yra ypač paplitęs cukrinių runkelių šaknyse ir

bulvių stiebagumbiuose (Ishii 1997; Edashige and Ishii 1998; Pauly and Scheller 2000).



1 pav. Pirminė homogalakturono struktūra (Ridley, O'Neill et al. 2001).

HGA GalpA C3 atomas gali būti pakeistas  $\beta$ -D-ksilozės (Xylp) liekana. Šis junginys vadinamas **ksilogalakturonu** (XGA), kuris yra gana plačiai paplitęs. XGA išskiriamas iš kai kurių reprodukinių ir vegetatyvinių augalo organų audinių sienelių (žirnio sėklų luobelė, obuolių, arbūzo ir morkų minkštimo) (Renard, Weightman et al. 1997).

Taip pat prie HGA pagrindą sudarančių GalpA C2 arba C3 atomų gali būti prijungta  $\beta$ -D-apiofuranozės (Apif) liekanų. Gali būti viena Apif liekana arba kaip disacharidas [ $\beta$ -D-Apif-(1-3')- $\beta$ -D-Apif-(1 $\rightarrow$ )]. Šis junginys vadinamas **apiogalakturonu**,

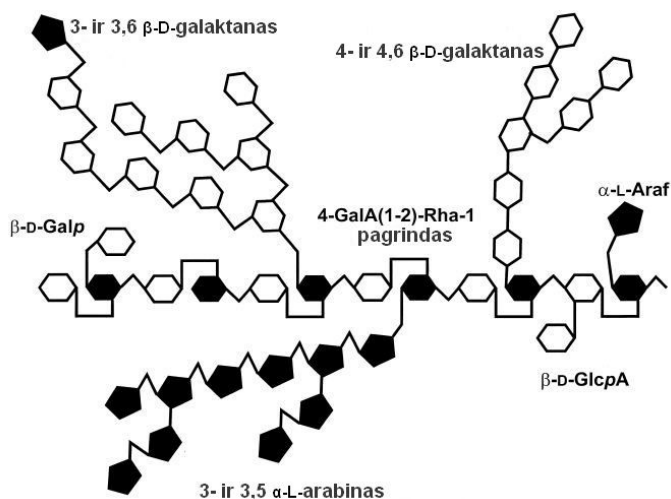
aptinkamas kai kurių vandens vienaskilčių augalų sienelėse (pavyzdžiui, *Lemna*, *Spirodela*, *Zostera*) (Longland, Fry et al. 1989; Ridley, O'Neill et al. 2001).

### 1.1.1.2. Ramnogalakturonas-I

Augalų sienelių sudėtyje gausiai sutinkamas heteropolimerinis junginys, vadinamas **ramnogalakturonu-I** (RG-I), susidedantis iš dviejų pasikartojančių disacharidų: [ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA-(1-2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ )] (galakturono rūgšties ir ramnozės) (2 pav.). Polisacharido pagrindą sudarančios GalpA liekanos gali būti *O*-acetilintos prie C2 ir/ar C3 atomų. Ar RG-I GalA liekanos gali būti metilintos, nėra tiksliai nustatyta. Tam tikruose augaluose nedidelis skaičius RG-I GalpA liekanų gali būti pakeistos glukurono rūgšties liekanomis (Renard, Crepeau et al. 1999). Dažniausiai RG-I yra glikozidiniu ryšiu sujungtas su HGA. Tai rodo, jog biosintezės metu

pagrindiniai galakturonai modifikuojami į kitus junginius. RG-I sintezėje dalyvauja daugiau nei 10 glikoziltransferazių.

Žinoma, jog prie GalpA liekanų šoninių grupių nėra prijungta mono- arba oligosacharidų grandinių. Tuo tarpu daugeliu atvejų RG-I 20-80 % ramnozės liekanų C4 atomai yra pakeisti šoninėmis grandinėmis, kurių ilgis gali varijuoti nuo vieno iki penkiasdešimt ar daugiau



2 pav. Ramnogalakturonano-I struktūrinės ypatybės (Ridley, O'Neill et al. 2001).

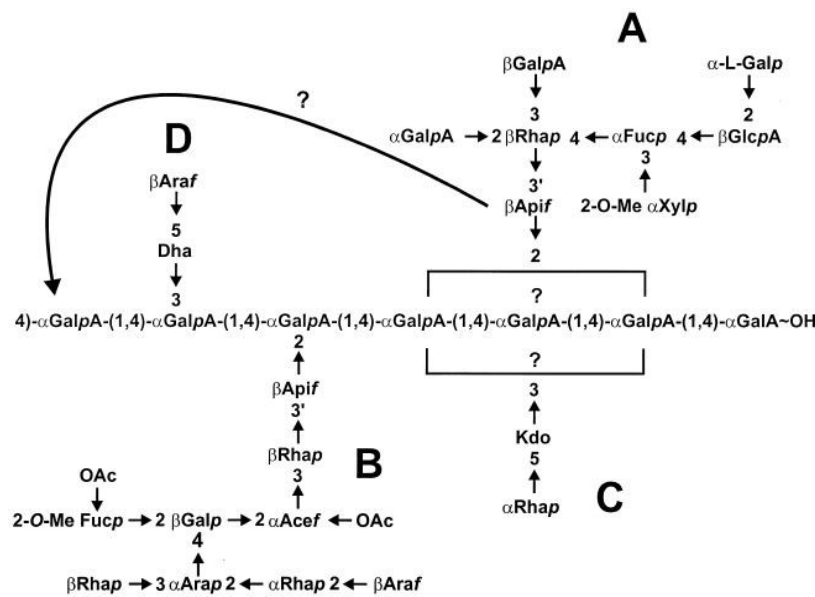
glikozidinių liekanų. Pektino sritis iš gausiai šakoto RG-I įvardijama kaip “plaukuotasis” regionas, o tuo tarpu pektino sritis iš HGA vadinama vienalyte, lygiąja sritimi (Schols and Voragen 1996). Bendra dominuojančių šoninių grandinių struktūra yra:  $\beta$ -(1-4)-D-galaktozės (Galp) ir/arba  $\alpha$ -(1-5)-L-arabinozės (Araf) liekanos (2 pav.). Tačiau šių junginių proporcijos ir grandinių ilgiai gali skirtis priklausomai nuo augalo, kuriame sutinkami.

Taip pat gali būti aptinkama ir  $\alpha$ -L-fukozės (Fucp),  $\beta$ -D-glukurono rūgšties (Glc pA) ir 4-O-metil  $\beta$ -D-glukurono rūgšties (4-O-Me Glc pA) liekanų bei ferulino ir kumarino rūgščių liekanų. Tokie skirtumai nulemia labai didelę šių polisacharidų įvairovę (Ridley, O'Neill et al. 2001).

### 1.1.1.3. Ramnogalakturonas-II

Kaip jau buvo minėta, RG-I yra sudarytas iš pasikartojančių disacharidų [ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA  $\alpha$ -(1-2)-L-Rhap-(1 $\rightarrow$ ], turinčių daug šoninių grandinių. **Ramnogalakturonano-II** (RG-II) polisacharidas yra ganėtinai konservatyvus ir sutinkamas visuose aukštesniuose augaluose, iš kurių sienelių išskiriamas veikiant fermentais *endopoligalakturonazėmis*. Tai rodo kovalentinius ryšius tarp HGA. RG-II biosintezėje dalyvauja mažiausiai 20 glikoziltransferazių. Šio

polisacharido pagrindą sudaro apie devynios  $\alpha$ -D-GalpA liekanos, sujungtos (1-4)-glikozidiniais ryšiais.

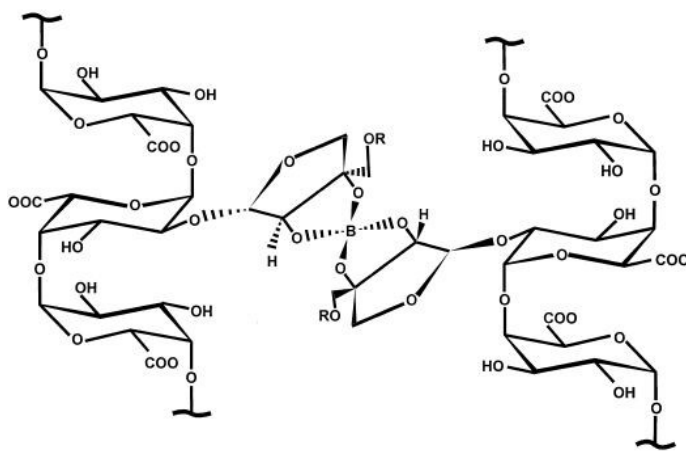


3 pav. Pirminė ramnogalakturono-II struktūra (Ridley, O'Neill et al. 2001).

Prie GalpA liekanų būna prijungtos keturios vienodo ilgio, heteropolimerinės šoninės grandinės. Šiose šoninėse grandinėse aptinkama iki vienuolikos skirtingų cukrų, įskaitant, apiozę, bei tokių junginių kaip acto rūgštis ir KDO (O'Neill, Warrenfeltz et al. 1996; Vidal, Doco et al. 2000). Nesacharidinė (šoninė grandinė B) ir oktasacharidinė (šoninė grandinė A) grandinės yra prijungtos prie kelių

pagrindą sudarančių GalpA (C2 atomų) ir dvi struktūriškai skirtingos polisacharidų grandinės (šoninės grandinės C ir D) yra jungiamos prie GalpA C3 atomo (3 pav.) (Ridley, O'Neill et al. 2001).

Svarbi RG-II savybė yra ta, jog jis gali dimerizuotis per apiozės liekanų OH-2 ir OH-3 grupes su boratu sudarydamas esterį (4 pav.) (Kobayashi, Matoh et al. 1996; Ishii, Matsunaga et al. 1999). *In vitro* tyrimais įrodyta, jog RG-II dimerų susidarymo reakcijos nekatalizuoja jokie



4 pav. RG-II dimerizacija (Ridley, O'Neill et al. 2001). (R žymi oligogliukozės liekanas)

fermentai. Tai savaiminis procesas. RG-II dimerų sudarymą pagreitina dvi- ar trivalenčių katijonų, kurių spindulys  $>1.0 \text{ \AA}$ , buvimas aplinkoje. Maža kalcio koncentracija (1 mM) yra mažiau efektyvi nei kitų didesnių katijonų (Ishii, Matsunaga et al. 1999). Tačiau didesnės kalcio ir boro rūgšties koncentracijos (10 mM) žymiai paspartina RG-II dimerizaciją *in vitro*

(Matoh and Kobayashi 1998).  $\text{Ca}^{2+}$  jonų vaidmuo dimerų susidaryme tiksliai nėra ištirtas, bet yra žinoma, jog šie jonai didina RG-II dimerų stabilumą (Fleischer, O'Neill et al. 1999; Kobayashi, Koike et al. 1999).

RG-II struktūra labiau susidomėta sužinojus, jog jis geba surišti sunkiuosius metalus ir turi net imunomoduliuojantį (imuninį atsaką keičiantį) poveikį (Tahiri, Pellerin et al. 2000). Žinant tai, jog vynuogių ir kitų vaisių sultyse RG-II randamas dideliais kiekiais (20–150 mg/L) (Doco, Williams et al. 1997), imta tirti šio maiste esančio polisacharido įtaką žmogaus sveikatai.

#### 1.1.1.4. Arabinogalaktanai

Kitas pektine aptinkamas polisacharidas –  $\beta$ -(1-4)-D-galaktanas su neredukuota terminaline arabinoze (*t*-Ara), prijungta prie paskutinės Gal liekanos O3 atomo – vadinamas **arabinogalaktanu-I** (Carpita and Gibeaut 1993). Prie arabino O2 ir O3 atomų gali būti prijungiamos įvairios šoninės grandinės. **Arabinogalaktanu-II** vadinamas junginys, sudarytas iš  $\beta$ -(1-3)- ir  $\beta$ -(1-6)-D-galaktozės liekanų, taip pat įeina į pektino sudėtį. Antrojo tipo arabinogalaktanas sutinkamas ir sudėtingoje sudėtinėje proteoglikanų šeimoje (Nothnagel 1997).

#### 1.1.1.5. Pektino funkcijos

Akivaizdu, jog augalų ląstelių sienelėse esantis pektinas atlieka ne vieną funkciją. Nėra paprasta fizines ypatybes priskirti specifinėms pektino tinklo struktūrinėms sritims ir susieti jas su platesnėmis biologinėmis ypatybėmis ląstelių augime ir vystymesi. Be to, įvairūs papildomi veiksniai (kalcis, boratas, poliaminas, fenoliniai junginiai) bei oligosacharidų sąveika su jais tam tikrais ryšiais per tam tikrus atomus sukuria daugiafunkcinę makromolekulinę sistemą. Pektinas turi svarbią reikšmę celiuliozės mikrofibrilių susirinkimui ir kartu lemia sienelės mechanines savybes (Chanliaud and Gidley 1999).

Ląstelių sienelių matrikso pH ir joninę jėgą nulemia pektino tinklas, kuris atsakingas už gelinės matrikso konsistencijos susidarymą bei už mechanines ir poringumo savybes. Šios

savybės turi įtakos ląstelių tarpląstelinėms jungtims ir hidratacijos laipsniui, taip pat judėjimui ir ląstelių sienelių matricą modifikuojančių baltymų priėjimui. Nėra ištirti mechanizmai, reguliuojantys specifiską makromolekulių judėjimą per pirminę ląstelių sienelę. Pektino tinklas tarpinėje plokštelėje turi svarbią reikšmę tarpląstelinėje adhezijoje: tarpinės plokštelės pektinas jungiasi su pektinu, esančiu pirminių ląstelių sienelių viduje. Vystantis augalui, šitų sąsajų jungtys kontroliuotai išardomos, susidaro parenchiminiai audiniai. Be to, HGA veikia kaip signalų perdavėjas tarp oligosacharidų, kurie svarbūs koordinuojant augalo vystymąsi ir palaikant apsaugines funkcijas (Willats, McCartney et al. 2001).

Specifinės augalų vystymosi metu vykstančios modifikacijos – šaknies šalmelio ląstelių diferenciacija, sienelių pabrinkimas ir minkštėjimas nokstant vaisiams, ląstelių atsiskyrimas nukrentant lapams ar vaisiams, savaiminis ankščių atsidarymas joms subrendus (Wen, Zhu et al. 1999) – yra tiesiogiai susijusios su pektino tinklu.

Dažnai keliami klausimai yra susiję su polisacharidų tipais (ypatingai pektinu), jų paplitimu augalų rūšyse, organuose, audiniuose ir jų konkretų išsidėstymą ląstelių sienelėse. Daugeliu tyrimų patvirtinta, jog HGA, RG-I ir RG-II įeina į pirminių augalų ląstelių sudėtį (Albersheim, Darvill et al. 1996). Tačiau visgi šių polisacharidų bei jų modifikuotų formų užimama vieta sienelėje tiksliai nėra žinoma. Atliekant augalų ląstelių sienelių polisacharidų analizę, homogenizuojant organus, kažkuri dalis polisacharidų yra prarandama. Vienas iš efektyviausių būdų tirti pektiną jo fiziologiniame ir vystymosi kontekstuose yra antikūnų pektino polisacharidams naudojimas (Willats, McCartney et al. 2001).

Geriausiai struktūriškai ir funkciškai ištirtas pektino polisacharidas yra HGA, kuris nulemia gelio susiformavimą, dalyvaujant kalciumui. Šis gelio susiformavimas yra svarbus sienelių vientisumo palaikymui ir viduje, ir tarp ląstelių sluoksnių, ir tarpinėje plokštelėje. Nors daugeliu atvejų kalcis yra reikalingas ir paties pektino tinklo suformavimui per skersines jungtis (Willats, McCartney et al. 2001).

HGA gebėjimas suformuoti gelį ir suteikti augalų sienelėms standumo daugiausiai yra reguliuojamas pektino metilesterazių (PMEs). Nors nėra daug žinoma apie HGA biosintezę, tačiau manoma, jog jos metu šie fermentai nulemia skirtingo laipsnio HGA metilesterifikaciją. PMEs pašalina metilo grupes nuo HGA, laisvos karboksigrupės gali sąveikauti su kitomis HGA grandinėmis ir per kalcio atomus suformuoti skersines jungtis. Atrodo, jog HGA deesterifikacija yra kompleksiškai reguliuojamas procesas, kuris vyksta nevienodai skirtinguose audiniuose ir ląstelių sienelėse (Lieberman, Mutaftschiev et al. 1999). Pirmieji HGA metilesterifikacijos

pakitimai buvo nustatyti naudojant monokloninius antikūnus (Knox 1997; Willats, Limberg et al. 2000a).

Reiktų paminėti, jog nepaisant svarbaus vaidmens ląstelės fiziologijoje ir vystymesi, pektinas atlieka ir apsauginę funkciją prieš augalų patogenus, kurie turi skirtingo specifškumo pektinazes. Pektino tinklas yra pagrindinis bakterinių ir grybinių fermentų taikiny, ir pektiną degraduojantys fermentai gali būti virulentiškumą nulemiantys veiksniai (Rogers, Kim et al. 2000). Pektiną sudarančių polisacharidų struktūros sudėtingumas gali turėti įtakos apsaugant šiuos junginius nuo degradacijos. Be to, degradacijos metu atpalaiduojami oligosacharidai gali veikti kaip signalinės molekulės gynybiniame atsake. Skaidant HGA, susidarantys oligogalakturonidai veikia kaip endogeniniai veiksniai, indukuojantys genų, koduojančių proteinazių inhibitorius, su patogenezė susijusius baltymus arba fermentus (pavyzdžiui, fitoaleksinus), ekspresiją. Nėra daug žinoma apie transdukcijos kelius bei efektyviausią oligogalakturonidų ilgį, varijuojantį tarp signalinių sistemų. Šių sistemų biologija yra sudėtinga, ir tam tikrais atvejais oligogalakturonidai gali veikti kaip endogeniniai augalo gynybinio atsako slopikliai (Simpson, Ashford et al. 1998).

## 1.2. Pektinoliziniai fermentai

Pektiną ardantys fermentai, trumpiau vadinami pektinazėmis, klasifikuojami pagal tris kriterijus: a) specifškumą tam tikram polisacharidui (substratui) arba keliems; b) substrato grandinės skėlimo reakcijos mechanizmą; c) skėlimo vietą substrato grandinėje.

Pagal *substrato grandinės skėlimo reakcijos mechanizmus* išskiriamos dvi didelės šių fermentų grupės:

- **Metilesterazės** (polimetilgalakturonato (pektino) hidrolazės), kurios nuo substrato atskelia metilo grupes. Šios deesterinimo reakcijos metu susidaro pektatai ir metanolis. Metilesterazės yra aptinkamos augaluose, augalų patogeninėse bakterijose ir grybuose (Yadav, Singh et al. 2009).
- Antrąją grupę sudaro **depolimerazės** (hidrolazės ir liazės), kurios skelia pagrindinę pektininio polisacharido grandinę.

- Hidrolazės katalizuoja reakcijas, kurių metu vyksta polisacharido  $\alpha$ -(1-4)-glikozidinių ryšių hidrolizinis skėlimas.
- Liazių katalizuojamų reakcijų metu, pašalinant chemines grupes, susidaro dvigubas ryšys. Pavyzdžiui, pektato liazė skelia  $\alpha$ -(1-4)-glikozidinį ryšį tarp GalpA molekulių  $\beta$ -eliminacijos būdu, ir susidaro oligogalakturonidas, tarp paskutinės GalA 4 ir 5 anglies atomų turintis dvigubą ryšį.

Depolimerazės taip pat skirstomos pagal *skėlimo vietą polisacharido grandinėje* (endo- ir egzo-) bei pagal *specifiškumą substratui*:

- Hidrolazės: PMG – polimetilgalakturonato (pektino), PG – poligalakturonato (pektato). PGs yra plačiai paplitusios grybuose, bakterijose ir daugelyje mieliagybių. Jos taip pat aptinkamos aukštesniuose augaluose ir keliuose augalus parazituojančiuose nematoduose (Yadav, Singh et al. 2009);
- Liazės: PGML (PNL) – polimetilgalakturonato (pektino), PGL (PL) – poligalakturonato (pektato). PL dažniausiai yra produkuojamos alkalofilinių (pH 8-10) bakterijų (*Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas* ir *Streptomyces* gentys) ir keletu maistą gadinančių grybų genčių, bei yra labai priklausomos nuo  $\text{Ca}^{2+}$  (Whitaker 1991). Yra žinoma keletas pirmuonių, produkuojančių šiuos fermentus. PNL daugiausiai yra sintetamos grybų (išskirtos iš *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ir *Glomerella cingulata* (Yadav, Singh et al. 2009)). Kaip jau buvo minėta, pektato liazėms kalcis yra reikalingas skaidant GalpA, o tuo tarpu pektino liazės ardo pektiną ir nesant aplinkoje  $\text{Ca}^{2+}$  jonų (Soriano, Diaz et al. 2005). Reiktų paminėti, jog, pavyzdžiui, *Erwinia chrysanthemi* pektato liazių poreikis kalcio jonams šiek tiek priklauso ir nuo terpės pH. Optimali  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracija, kai pH 7.8 ir 8.5, yra 0,1 mM, o 0,025 mM koncentracija didžiausią aktyvumą lemia esant pH 9.2 (Tardy, Nasser et al. 1997).

### 1.2.1. Eukariotų pektinoliniai fermentai

Pektiną degraduojantys fermentai aptinkami eukariotiniuose mikroorganizmuose, kurių gyvenamojoje aplinkoje yra pektininės medžiagos ir ji šių mikroorganizmų metabolizme naudojama kaip anglies šaltinis. Dažniausiai tai fitopatogeniniai arba simbiozėje su augalais



gyvenantys grybiniai mikroorganizmai. Literatūroje minimos šios rūšys: *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* (Yadav, Singh et al. 2009), *Aspergillus nidulans* (Zhao, Yuan et al. 2007), *Chondrostereum purpureum*, *Claviceps purpurea*, *Colletotrichum gloeosporioides* (<http://pec.biodbs.info/listofMicroorganisms.html>), *Colletotrichum gloeosporioides* (Wattad, Dinoor et al. 1994), *Fusarium moniliformae* (Rao, Kembhavi et al. 1996), *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Crawford and Kolattukudy 1987), *Kluyveromyces wickerhamii* (Yoshitake, Numata et al. 1994), *Neosartorya fischeri* (Yadav, Singh et al. 2009), *Penicillium griseoroseum* (Minussi, Baracat-Pereira et al. 1997), *Penicillium italicum*, *Penicillium veridicatum* (Alana, Alkorta et al. 1990), *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium occitanis* (Yadav, Singh et al. 2009), *Trichoderma reesei* (Olsson, Christensen et al. 2003).

Augalai taip pat produkuoja pektinolizinius fermentus, kurie svarbūs vystymesi (pavyzdžiui, vaisių minkštėjimas jiems nokstant, augalo lapų numetimas prieš ramybės laikotarpį ir pan. (Wen, Zhu et al. 1999). Aprašyti pektinoliziniu aktyvumu pasižymintys augalai: bananmedis *Musa acuminata* (Payasi, Misra et al. 2006), puikioji gvaizdūnė *Zinnia elegans* (Domingo, Roberts et al. 1998), kiviai (kininės aktinidijos) *Actinidia chinensis*, baltažiedis vairesnis *Arabidopsis thaliana*, paprastasis arunkas *Aruncus dioicus*, pupinis kekeras *Botrytis fabae*, miškinė strugė *Brachypodium sylvaticum*, daugelis bastutinių *Brassicaceae* šeimos augalų rūšių, vienmetė paprika *Capsicum annuum*, papaja *Carica papaya*, amerikinis kaštainis *Castanea dentata*, kininis svarainis *Chaenomeles speciosa*, gausialapė povingė *Chamaebatia foliolosa*, sėjamasis avinžirnis *Cicer arietinum*, laimas *Citrus aurantifolia*, citrinmedis *Citrus* sp., vienapiestė gudobelė *Crataegus monogyna*, kriptomerjos *Cryptomeria* sp., paprastasis melionas *Cucumis melo* ir daugelis kitų (<http://pec.biodbs.info/listofMicroorganisms.html>).

### 1.2.2. Bakterijų pektinoliziniai fermentai

Pirmą kartą pektinolizinis aktyvumas buvo nustatytas 1962 metais *Erwinia carotovora* ir *Bacillus polymyxa* bakterijose (Starr and Moran 1962). Pektiną degraduojančius fermentus sintetinančios bakterijos išskiriamos iš dirvožemio, vandens telkinių, augalų, aptinkami kai kurių žuvų virškinamajame trakte, atrajotojų skrandyje bei žmonių žarnyne.

Literatūroje aprašytos mezofilinių bakterijų rūšys, pasižyminčios pektinoliziniu aktyvumu: *Amycolata* sp. (Bruhlmann 1995), *Azospirillum irankense* (Bekri, Desair et al. 1999), *Bacillus alcalophilus* (Zhai, Cao et al. 2003), *Bacillus licheniformis* (Berensmeier, Singh et al. 2004), *Bacillus polymyxa* (Starr and Moran 1962), *Bacillus pumilus* (Klug-Santner, Schnitzhofer et al. 2006), *Bacillus subtilis* (Nasser, Chalet et al. 1990), *Cytophaga johansonae* (Liao and Wells 1986), *Clostridium cellulovorans* (Tamaru and Doi 2001), *Clostridium multifementas* (Macmillan and Vaughn 1964), *Clostridium stercorarium* (Si Si, Kikuta et al. 2006), *Erwinia aroideae*, *Erwinia atroseptica* (Quantick ir kt., 1983), *Erwinia carotovora* (Starr and Moran 1962), *Erwinia chrysanthemi* (Van Gijsegem 1986), *Erwinia rubrifaciens* (Gardner and Kado 1976), *Yersinia enterocolitica* (Chatterjee, Buchanan et al. 1979), *Klebsiella oxytoca* (Walker and Pemberton 1987), *Pseudomonas cellulosa* (Brown, Mallen et al. 2001), *Pseudomonas fluorescens* (Zucker and Hankin 1970), *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas syringae* (Liao, Fett et al. 2006), *Pseudomonas viridiflava* (Liao, Hung et al. 1988), *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces nitrosporeus* (Sato and Kaji 1975), *Treponema pectinovorum* (Walker and Ryan 2003), *Xanthomonas compestris* (Nasuno and Starr 1967)

Nepaisant didelio susidomėjimo mikroorganizmų pritaikymu pektino degradacijoje, ganėtinai mažas dėmesys iki šiol buvo skirtas termofilinių bakterijų pektinoliziniams fermentams, kurie yra daug stabilesni negu mezofiliniai (Antranikian, Konings et al. 1996). Tačiau yra žinoma ir mezofilinių bakterijų, kurių fermentai nėra jautrūs aukštai temperatūrai, priešingai, pasižymi didesniu aktyvumu aukštesnėje temperatūroje (**1 lentelė**). Termofilinių bakterijų bei jų produkuojamų pektiną degraduojančių fermentų tam tikros ypatybės išsamiau aptartos **2 lentelėje**.

1 lentelė. Mezofilinės bakterijos bei jų produkuojami termostabilūs pektinoliniai fermentai.

| Bakterija                          | Fermentas                            | MM, kDa  | Substratas → R-jos produktai                          | Opt. T, °C | Opt. pH        | Kofaktoriai / Inhibitoriai   | Kitos ypatybės | Literatūra                               |
|------------------------------------|--------------------------------------|----------|---|------------|----------------|--|----------------|--|
| <i>Amycolata</i> sp.               | Ekstraląstelinė endoliazė            | 31       | Pektatas → 4,5 nesotūs di-, tri-galakturonidai        | 70         | 10.25          | Kof. Ca <sup>2+</sup> (min. konc. 0,2 mM)  | ND             | (Bruhlmann 1995)                         |
| <i>Bacillus</i> GK-8               | Trys ekstraląstelinės egzopektinazės | ND       | PGA, Pektinas   | 60         | 5.4, 7.0, 10.4 | Kof. Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> ir Mn <sup>2+</sup>                           | ND             | (Dosanjh and Hoondal 1996)               |
| <i>Bacillus</i> sp. KSM-P7         | Pektato liazė                        | 33       | PGA   | 60-65      | 10.5           | Kof. Ca <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup><br>Inh. Fe <sup>3+</sup>   | EC 4.2.2.2     | (Kobayashi, Hatada et al. 1999a)         |
| <i>Bacillus</i> sp. KSM-P15        | Pektato liazė                        | 20       | PGA → 4,5-nesotūs oligogalakturonidai                 | 50-55      | 10.5           | Kof. 0,6 mM Ca   | EC 4.2.2.2     | (Kobayashi, Koike et al. 1999)           |
| <i>Bacillus</i> sp. KSM-P103       | Pektato liazė                        | 33       | PGA   | 60-65      | 10.5           | Kof. 0,2 mM CaCl <sub>2</sub>  | ND             | (Hatada, Higaki et al. 1999)             |
| <i>Bacillus</i> sp. BP-23          | Pektato liazė                        | 25       | PGA, pektinas (89 %)                                  | 50         | 10             | Kof. Ca <sup>2+</sup><br>Inh. Ba <sup>2+</sup>   | ND             | (Soriano, Blanco et al. 2000)            |
| <i>Bacillus</i> sp. DT-7           | Ekstraląstelinė pektino liazė        | 106      | Pektinas  | 60         | 8.0            | Kof. 100 mM CaCl <sub>2</sub><br>Inh. HgCl <sub>2</sub> , EDTA, FeCl <sub>3</sub>  | ND             | (Kashyap, Chandra et al. 2000)           |
| <i>Bacillus</i> sp. MG-cp-2        | Poligalakturonazė                    | ND       | PGA   | 60         | 10             | ND   | ND             | (Kapoor, Beg et al. 2001)                |
| <i>Bacillus</i> sp. RNI            | Pektato liazė                        | 33       | PGA   | 90         | 10.0           | Kof. 0,5 mM Ca <sup>2+</sup>   | ND             | (Sukhumsirchart, Kawanishi et al. 2009)  |
| <i>Bacillus alcalophilus</i> NTT33 | Pektato liazė                        | 35       | PGA, Pektinas   | 45         | 9-10           | Kof. Ca <sup>2+</sup> : be CaCl <sub>2</sub> – 100 %, 0,2 mM – 571 % aktyvumas.<br>Inh. Ba <sup>2+</sup> ir Mn <sup>2+</sup> | ND             | (Zhai, Cao et al. 2003)                  |
| <i>Bacillus pumilus</i>            | Ekstraląstelinė endoliazė            | ND       | PGA, pektinas (68 %) → nesotūs oligogalakturonidai    | 60         | 8.0-8.5        | Kof. Ca <sup>2+</sup><br>Inh. Cu <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>  | ND             | (Dave and Vaughn 1971)                   |
| <i>B. pumilus</i> BK2              | Ekstraląstelinė endoliazė            | 37,3±4,8 | Pektinas (29,5 %), PGA → nesočios tetragalakturono r. | 70         | 8.5            | Inh.: 50 % - 0,09 mM EDTA; 0,38 mM Co <sup>2+</sup> ; 2,8 mM Zn <sup>2+</sup>  | EC 4.2.2.2     | (Klug-Santner, Schnitzhofer et al. 2006) |
| <i>Bacillus subtilis</i> 168       | Pektato endoliazė                    | 23       | PGA, pektinas → oligogalakturonų mišinys              | 65         | 10.0           | Kof. 2.0 mM Ca <sup>2+</sup> = 1 mM Hg <sup>2+</sup> ;<br>Inh. EDTA  | ND             | (Soriano, Diaz et al. 2006)              |

|   |                            |      |   |   |     |   |  |                                 |                                |
|---|----------------------------|------|---|---|-----|---|--|---------------------------------|--------------------------------|
| <i>B. subtilis</i><br>WSHB04-02               | Pektato liazė              | 44   | PGA → 4,5 nesočios di-,<br>tri-galakturono r. | 50  | 9.4 | ND  | ND   | (Zhuge, Du et al.<br>2007)      |                                |
| <i>Clostridium</i><br><i>stercorarium</i>     | Pektato liazė              | ND   | PGA, pektinas                                 | 60  | 7.0 | Kof. 0,05 mM Ca <sup>2+</sup> ;<br>Inh. 0,2 mM EDTA | ND   | (Si Si, Kikuta et al.<br>2006)  |                                |
| <i>Erwinia</i><br><i>chrysanthemi</i><br>3937 | Ekstraląstelinės<br>liazės | PelA | 42,5  | PGA, pektinas →<br>- nuo dimerų iki dekamerų<br>(PelA);<br>- trimerai (PelB, PelC);<br>- dimerai (PelE) | 55  | 8.5   | Kof. 0,1 mM Ca <sup>2+</sup> ;<br>Inh.: - 1 mM dauguma divalenčių<br>katijonų (Ba <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> );<br>- 0,2 mM epikatechinas ir salicilo<br>r.;<br>- >0,5-1 g/L substrato konc. | ND                              | (Tardy, Nasser et<br>al. 1997) |
|   |                            | PelB | 39,5  |   | 60  | 9.3   |  |                                 |                                |
|   |                            | PelC | 39,5  |   | 60  | 9.2   |  |                                 |                                |
|   |                            | PelD | 42  |   | 50  | 8.8   |  |                                 |                                |
|   |                            | PelE | 42,5  |   | 50  | 8.0   |  |                                 |                                |
| <i>Xanthomonas</i><br><i>campestris</i>       | Pektato liazė              | 35   | PGA   | 65-90   | 8.5 | Kof. 0,5 mM CaCl <sub>2</sub>                       | ND   | (Xiao, Bergeron et<br>al. 2008) |                                |

2 lentelė. Termofilinės bakterijos bei jų produkuojami termostabilūs pektinoliziniai fermentai.

| Bakterija   | Fermentas                    | MM, kDa             | Substratas →<br>R-jos produktai             | Opt. T,<br>°C | Opt. pH   | Kofaktoriai / Inhibitoriai   | Kitos ypatybės | Literatūra  |
|---|------------------------------|---------------------|---|---------------|-----------|--|----------------|---|
| <i>Bacillus</i> sp.<br>BP-7                                 | Pektino ir pektato<br>liazės | 28, 42, 56<br>ir 63 | PGA<br>Pektinas                             | 50            | 8.0, 10.0 | Kof. 1 mM CaCl <sub>2</sub><br>Inh. 3 mM EDTA<br>Kof. 2 mM Ca <sup>2+</sup> (nebūtini);<br>3 mM EDTA neinhibuoja | ND             | (Soriano, Diaz et<br>al. 2005)                                      |
| <i>Bacillus</i> sp.<br>P-4-N                                | Pektato liazė                | 35                  | PGA, Pektinas<br>(esterifikacija 31 ir > %) | 70            | 11.5      | Kof. CaCl <sub>2</sub> ;<br>Inh. 1 mM EDTA   | ND             | (Hatada,<br>Kobayashi et al.<br>2001)                               |
| <i>Bacillus</i> sp.<br>TS 47                                | Endoliazė                    | 50                  | PGA, Protopektinas                          | 70            | 8.0       | Kof. 0,5-1 mM Ca <sup>2+</sup> ;<br>Inh. 100 mM EDTA, Ag <sup>2+</sup> ,<br>Ba <sup>2+</sup> ir Zn <sup>2+</sup> | EC 4.2.2.1     | (Takao, Nakaniwa<br>et al. 2000; Takao,<br>Nakaniwa et al.<br>2001) |
| <i>Bacillus</i><br><i>licheniformis</i><br>14A              | Pektato liazė                | 33,4                | PGA → 4,5 nesotūs<br>trigalakturonatai      | 65            | 8.5       | Kof. 0,6 mM Ca <sup>2+</sup>   | ND             | (Berensmeier,<br>Singh et al. 2004)                                 |
| <i>Geobacillus</i><br><i>stearothermo-</i><br><i>philus</i> | Ekstraląstelinė<br>endoliazė | 24                  | Pektinas                                    | 70            | 9.0       | ND   | ND             | (Karbassi and<br>Vaughn 1980)                                       |
| <i>Clostridium</i>  | Pektino liazė,               | ND                  | Poligalakturono r. →                        | 60            | 5.5       | ND   | ND             | (Spinnler, Lavigne  |

|  |  |                                     |  |       |         |  |   |   |
|--|--|-------------------------------------|--|-------|---------|--|---|---|
| <i>thermocellum</i><br>ATCC 27 405                             | Galakturonazė  |                                     | acto r.;<br>Pektinas → metanolis ir<br>acto r. |       |         |  |   | et al. 1986)                                |
| <i>Clostridium</i><br><i>thermohydrosulfu</i><br><i>-ricum</i> | ND   | ND                                  | Pektinas                                       | 70    | ND      | ND   | ND  | (Wiegel,<br>Ljungdahl et al.<br>1979)       |
| <i>Clostridium</i><br><i>thermosulfuro</i><br><i>genes</i>     | Poligalakturonato<br>hidrolazė ir liazė,<br>pektino<br>metilesterazė | 32                                  | PGA, Pektinas                                  | 70-75 | 5.5-6.5 | ND   | EC 3.2.1.15 ir EC<br>3.1.1.11   | (Shink and Zeikus<br>1983)                  |
| <i>Paenibacillus</i> sp.<br>BP-23                              | Pektino ir pektato<br>liazės   | 25, 32, 38,<br>44 ir 53             | Pektinas, PGA                                  | 65    | 10.0    | Kof. 0,5 mM CaCl <sub>2</sub>  | ND  | (Soriano, Diaz et<br>al. 2005)              |
| <i>Pseudomonas</i><br><i>cellulosa</i>                         | Pektato liazė  | 68,5                                | PGA  | 62    | 10.0    | Kof. 2.0-4.0 mM Ca   | ND  | (Brown, Mallen et<br>al. 2001)              |
| <i>Streptomyces</i><br><i>thermocarboxydu</i><br><i>s</i>      | Pektato endoliazė  | 28                                  | → 4,5 nesočios di- ir tri-<br>galakturonono r. | 50    | 9.0     | Kof. 0,6 mM Ca <sup>2+</sup>   | ND  | (Miyairi,<br>Ogasawara et al.<br>2004)      |
| <i>Streptomyces</i><br><i>thermovulgaris</i><br>CR42           | Pektato liazė  | ND                                  | PGA, Pektinas                                  | 55    | 7.6     | ND   | ND  | (Niranjan and<br>Dhala 1981)                |
| <i>Thermoanaero</i><br><i>bacter italicus</i>                  | Liazė-a  | 135                                 | PGA → mono-, di- ir tri-<br>galakturonatai     | 80    | 9.0     | Kof. 1 mM CaCl <sub>2</sub> ; Mn <sup>2+</sup> ;<br>Inh. 1 mM EDTA     | Kt. substratai:<br>ksilanas (70-75 °C),<br>krakmolas ir<br>glikogenas (80-85<br>°C) | (Kozianowski,<br>Canganella et al.<br>1997) |
|  | Liazė-b  | 2 subvnt. -<br>93 ir 158            |  |       |         |  |   |   |
| <i>Thermomonospo</i><br><i>ra fusca</i>                        | Poligalakturonato<br>liazė,<br>pektinesterazė,<br>poligalakturonazė  | 56                                  | PGA, Pektinas                                  | 60    | 10.45   | Kof. Ca <sup>2+</sup>  | EC 4.2.2.2, EC<br>3.1.1.11 ir<br>EC 3.2.1.15  | (Stutzenberger<br>1987)                     |
| <i>Thermotoga</i><br><i>maritima</i>                           | Ekstralastelinė<br>pektato liazė                                     | 152 (tetra-)<br>40 (mono-<br>meras) | <b>PGA</b> , Pektinas                          | 90    | 9.0     | Kof. Ca <sup>2+</sup> (opt.konc. 0,6<br>mM); 200 mM NaCl;<br>Inh. EGTA | ND  | (Kluskens, van<br>Alebeek et al.<br>2003)   |
| <i>Thermotoga</i><br><i>maritima</i>                           | Egzopoligalakturo<br>nazė  | 50                                  | PGA  | 80    | 6.4     | -  | EC 3.2.1.67   | (Kluskens, van<br>Alebeek et al.<br>2005)   |

\*Lentelių santrumpos: Inh. – Inhibitorius; Kof. – Kofaktorius; Konc. – koncentracija; Kt. – kitas; ND – nėra duomenų; Opt. pH – optimalus pH; Opt. T. – optimali temperatūra; R. – rūgštis; Subvnt. – subvienetas.

Apibendrinant **1** ir **2 lentelėse** pateiktus duomenis, galima teigti, jog bakterinių pektinazių molekulinė masė yra nuo 20 iki 100 kDa. Optimalus pH svyruoja nuo rūgštinio iki stipriai šarminio (pH 5.5-11.5). Termostabilių pektinazių aktyvumui optimali temperatūra dažniausiai varijuoja nuo 50 iki net 90 °C. Kaip substratus šie fermentai gali naudoti tiek PGA, tiek esterintus pektinus, bet maksimalus afiniškumas stebimas vidutiniškai esterintiems pektinams.

### 1.2.3. Pektinolinazių fermentų nomenklatura

Literatūroje dažnai sutinkami darbiniai (trivialieji) fermentų pavadinimai, kurie sudaromi prie substrato ar katalizuojamos reakcijos pavadinimo pridant galūnę *-azė* (pavyzdžiui, *alkoholdehidrogenazė*, *DNR polimerazė*). Tačiau vis daugėjant mokslinių duomenų (tame tarpe ir fermentų skaičiui) dėl netikslaus fermentų skirstymo ir įvardijimo kildavo vis daugiau nesusipratimų. Pavyzdžiui, daugeliu atveju tie patys fermentai atskirų tyrėjų grupių buvo įvardijami skirtingais pavadinimais arba, priešingai, tas pats pavadinimas būdavo duodamas skirtingiems fermentams. Taip pat daugelis fermentų pavadinimų neteikė jokios informacijos apie katalizuojamą reakciją ar veikiamą substratą. Ne išimtis buvo ir pektinazės. Pirmą kartą ši problema buvo aptarta 1955 metais Trečiajame Biochemijos Kongrese Briuselyje. IUB, dabar IUBMB, paskyrė Tarptautinę Komisiją, atsakingą už fermentų nomenklaturą sudarymą. Naujausias šeštasis *Enzyme Nomenclature* leidimas išleistas 1992 metais, dar papildytas 1993, 1994, 1995 ir 1997 metais (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>).

IUBMB sukurtoje fermentų nomenklaturą sistemoje kiekvienas fermentas yra žymimas keturių skaičių sekos EC (*angl.* Enzyme Commission) numeriu. Fermento katalizuojamos reakcijos mechanizmą nusako pirmasis skaičius, kurių iš viso yra šeši, t.y., fermentai suskirstyti į šešias pagrindines klases: EC 1. *Oksidoreduktazės*; EC 2. *Transferazės*; EC 3. *Hidrolazės*; EC 4. *Liazės*; EC 5. *Izomerazės*; EC 6. *Ligazės*.

CAZy duomenų bazė pateikia susietą su IUBMB nomenklaturą fermentų, naudojančių angliavandenius kaip substratus. Pektinolinazių fermentai priskiriami trečiajai ir ketvirtajai klasei. Detalesnė pagrindinių fermentų nomenklatura pateikiama žemiau (<http://www.cazy.org/>):

- EC 3.           **Hidrolazės** (skaido substratus hidrolizės mechanizmu)
- EC 3.1.       Atakuoja substratų esterinius ryšius
- EC 3.1.1.     Karboksilesterių hidrolazės
  - Pavyzdžiui, EC 3.1.1.6.   Acetilesterazė
  - EC 3.1.1.11. Pektinmetilesterazė
- EC 3.2.       Glikozilazės
- EC 3.2.1.     Glikozidazės, hidrolizuojančios *O*- ir *S*-glikozidinius ryšius
  - Pavyzdžiui, EC 3.2.1.15   Endopoligalakturonazė
  - EC 3.2.1.40    $\alpha$ -L-ramnozidazė
  - EC 3.2.1.67   Egzopoligalakturonazė
  - EC 3.2.1.82   Egzopoli- $\alpha$ -galakturonozidazė
- EC 4.           **Liazės** (vykdo nehidrolizinį grupių prijungimą/skėlimą prie/nuo substratų)
- EC 4.2.       C-O ryšio liazės
- EC 4.2.2.     Veikiančios polisacharidus
  - Pavyzdžiui, EC 4.2.2.2    Endopoligalakturonato (pektato) liazė
  - EC 4.2.2.6    Oligogalakturonato liazė
  - EC 4.2.2.9.   Egzopoligalakturonato (pektato) liazė
  - EC 4.2.2.10. Polimetilgalakturonato (pektino) liazė

### 1.3. Pektinoliniai fermentai biotechnologijoje

Pektinolinį fermentų tyrimai prasidėjo 1930 metais. Po kelių dešimtmečių buvo išsamiau ištirta augalų ląstelių sienelių sudėtis, ir taikant šias žinias, pektinazės pradėtos naudoti pramonėje (Kashyap, Vohra et al. 2001). 1995 metais Jungtinėse Amerikos Valstijose buvo apskaičiuota, jog visų pramoninių fermentų pardavimų vertė siekė 1 milijardą JAV dolerių, iš kurių 75 milijonais buvo įvertintos pektinazės (Godfrey and West 1996), ir kurios iki šiol yra vieni perspektyviausių komercinio sektoriaus fermentų.

Augalų audinių ląstelių sienelės ardantys fermentai labai plačiai naudojami įvairiose pramonės šakose.

**Sulčių gamyboje** dažniausiai naudojamos pektinazės, kurių aktyvumas yra didžiausias rūgštinėje terpėje. Jos išgaunamos iš *Aspergillus niger*. Šie fermentai naudojami visų pirma dėl to, jog padidinama žaliavos vertė, gaunama didesnė produktų išeiga.

Pavyzdžiui, spaudžiant sultis iš žalių, termiškai neapdorotų obuolių, juose lieka daug netirpios pektininės medžiagos, ir tai lemia sulčių klampumą, susidrumstimą. Vaisiaus minkštyme teigiamą krūvį turintys baltymai yra apsupami neigiamai įkrautų pektino molekulių. Tokie susidarę baltymų-pektino kompleksai stumia vienas kitą. Pektinazės, skaidydamos pektiną, mažina elektrostatinį pasipriešinimą tarp susidariusių dalelių, ir priverčia agreguoti į didesnes nuosėdas, kurios vėliau lengvai pašalinamos filtruojant.

Pektinazės, galinčios depolimerizuoti esterifikuotą pektiną, yra ne vieninteliai fermentai, naudojami sulčių išgavimui. Yra žinoma, jog naudojant minėtus fermentus kartu su celiuliazėmis, išeiga padidėja net iki 100 %. Kitas veiksnys, lemiantis sulčių drumstumą, yra krakmolai, kurio neprinokę obuoliai turi iki 15 %. Jis suardomas naudojant amilazes (tiksliau, amilogliukozidazes) ir pridedant pektinazių.

Iš mechaniškai susmulkintų vaisių taip pat gaminamos tyrelės, nektarai. Po atskiedimo vandeniui, cukraus bei citrinos rūgšties pridėjimo vaisiaus minkštimo dalelės yra linkusios nusėsti ir sudaryti atskirą sluoksnį. Tačiau svarbiausias šių produktų kokybę patvirtinantis veiksnys yra būtent konsistencijos vienalytiškumas. Kai kurių kompanijų siūlomi fermentai, turintys aukštus PG ir PL, bei celiuliazės ir hemiceliuliazės aktyvumus, sumažina produkto klampumą, išlaiko jį tolygų ir teigiamai veikia produkto koncentravimą.

Pektinazės ypatingai sudomino sidro bei raudonojo vyno gamintojus dėl to, jog naudojant šiuos fermentus iš vaisių gaunamos aukštos kokybės bei sodrios spalvos sultys.

Ir visgi būtina paminėti, jog sulčių pramonėje fermentai plačiai naudojami ne tik dėl gaunamos didesnės produktų išeigos. Kiti šių fermentų teigiami aspektai yra trumpesnis gamybos laikas, mažesnis kaštų (mažiau įrangos, mažiau darbo jėgos) eikvojimas. Taip pat gaunama didesnė produktų įvairovė, o to paties proceso metu gali būti apdirbami skirtingų rūšių vaisiai (Kashyap, Vohra et al. 2001).

**Kavos ir arbatos gamyba.** Pektinoliziniai fermentai naudojami siekiant pašalinti nuo kavos pupelių likusius augalinius audinius, kurie didžiąja dalimi sudaryti iš pektininių medžiagų. Į fermentinio preparato sudėtį taip pat įeina celiuliazės ir hemiceliuliazės. Skiestas komercinis fermentinis preparatas yra pridedamas ant pupelių (2-10 g tonai pupelių), palaikant 15-20 °C



reakcijos temperatūrą. Kavos pupelių apdirbime fermentacijos procesas, naudojant fermentus, sutrumpėja nuo 40-80 iki 20 valandų. Bet visgi tai brangiai atsiekiantis procesas, todėl kaip pektinazių šaltinis dažniausiai yra naudojamos atliekinės augalinės gleivės (Godfrey 1985).

Arbatos fermentacija dažnai pagreitinama dėka grybinių pektinazių, tačiau reikia tiksliai parinkti fermentų kiekį, jog nebūtų pažeisti arbatos lapeliai. Pektinazių naudojimas taip pat padidina putų formavimąsi greitai paruošiamose, tirpiose arbatose.

**Augalinio aliejaus gamyba.** Aliejus iš rapsų sėklų, riešutų gemalų, saulėgrąžų ir alyvuogių tradiciškai yra išgaunamas naudojant organinius tirpiklius, pavyzdžiui, tirpiklį heksaną, kuris pasižymi potencialiu kancerogeniniu poveikiu. Pektinazės, ardančios augalinių ląstelių sienelių struktūrinius komponentus, pridedamos mechaniškai smulkinant aliejingus augalus, todėl aliejus iš ląstelių išeina dar separacijos proceso metu. Toks fermentinis augalų apdirbimas vandeninėje terpėje, nenaudojant jokių cheminių medžiagų, duoda didesnę ekologiškesnio produkto gamybos išėigą (West 1996).

Fermento preparatas, išgaunamas iš *Aspergillus aculeatus*, pasižymi pektinoliziniu, hemiceliuliaziniu ir celiuliaziniu aktyvumais. Buvo parodyta, jog šio preparato poveikis lėmė didesnę aliejaus gavybos išėigą ir ilgesnį realizacijos laiką.

**Tekstilės pramonė.** Bakterinės (*Bacillus*, *Clostridium* genčių) ir grybinės (*Aspergillus*, *Penicillium* genčių) šarminės pektinazės yra naudojamos augalų (kanapės, pluoštinės bėmerijos, kokoso palmės ir kt.) žievės pektino ardymui, augalinio pluošto skaidulų atskyrimui, jų lipnumo ir glitumo pašalinimui (Bruhlmann, Kim et al. 1994).

Iš pluoštinės bėmerijos yra gaunama natūrali geros kokybės tekstilė. Tačiau nužievinti šio augalo pluoštai turi savyje 20-35 % sakų, kurie daugiausia sudaryti iš pektino ir hemiceliulozės, ir kuriuos būtina pašalinti. Klasikiniame sakų pašalinimo procese yra naudojamas karštas šarminis tirpalas (12-20 % NaOH) (Cao, Zheng et al. 1992). Negana to, jog šiam procesui sunaudojama daug energijos, jo metu taip pat yra teršiama aplinka. Šias problemas galėtų išspręsti mikroorganizmų naudojimas.

**Popieriaus gamyba.** Medienos plaušų masės balinimas veikiant šarmais ir peroksidu tirpina polisacharidus, kurie dažnai užkemša filtravimo sistemą (Holbom, Ekman et al. 1991; Horn and Linhart 1996). Būdingiausi polisacharidai yra pektinai ir PGA. Didelio polimerizacijos laipsnio PGA yra linkusios sudaryti su katijonais kompleksus (Thornton, Ekman et al. 1994).

Dalyvaujant pektinazėms, PGA polimerai yra suskaidomi ir pektino tirpale bei filtrate balinimo metu yra sumažinamas susidariusių agregatų kiekis (Reid and Ricard 2000).

*Bacillus* sp. ir *Erwinia carotovora* šarminės pektinazės naudojamos *Edgeworthia chrysantha* (žinomo kaip popieriaus medis) plaušų skaidymui (Tanabe, Yoshihara et al. 1987). Šie plaušai toliau yra naudojami japoniško popieriaus gamyboje. Augalo audinių apdirbimo bakterijomis laipsnis buvo aukštesnis, lyginant su tradiciniais apdirbimo metodais. Popieriaus lapai, paruošti iš šių mikroorganizmų skaidytų plaušų, gaunami vienodi bei lygūs (Horikoshi 1990).

**Nuotekų valymas.** Į vaisius apdirbančių pramonės įmonių nuotekas yra išmetama daug pektininių medžiagų. 1987 metais pirmą kartą Tanabe vadovaujama mokslininkų grupė išbandė naują efektyvų nuotekų valymo būdą, naudojant alkalofilinį mikroorganizmą, išskirtą iš dirvožemio – *Bacillus* sp. (GIR 621). Ši bakterija gamina ekstraląstelinę pektato endoliazė, aktyvią šarminėje aplinkoje (pH 10.0).

**Gyvūnų ėdalo gamyba.** Pektinazės įeina į sudėtį fermentų mišinio, dedamo į gyvūnų maistą. Dėka fermentų poveikio yra sumažinamas maisto kietumas, maistingosios medžiagos išlaisvinamos hidrolizuojant biodegraduojančias skaidulas, dėl to padidėja maistingųjų medžiagų absorbcija, taipogi sumažinamas fekalijų kiekis (<http://pec.biodbs.info/Applications.htm>).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

**2.1.1. Medžiagos baltymų tyrimams.** Akrilamidas, N,N-metilenbisakrilamidas, TEMED [Bio-Rad, JAV]; Triton X-100 [Fekar, Vokietija]; PageBlue Protein Staining Solution, Prestained Protein Molecular Weight Marker, Unstained Protein Molecular Weight Marker [Thermo Fisher Scientific, Lietuva]; 95 % Etanolis [Vilniaus degtinė, Lietuva]; 2-izopropanolis, 3,5-dinitrosalicilo rūgštis, ortofosforo rūgštis [Merck, Vokietija]; PGA [Alfa Aesar, Vokietija]; Sacharozė [Peaxum, Rusija]; Bromfenolio mėlynasis, Kumasi mėlynasis G-250 [Bio-Rad, JAV]; CaCl<sub>2</sub>; Ruthenium red [AppliChem, Vokietija]; Amonio sulfatas, APS, Glicinas, Natrio-kalio tartratas, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, SDS [Roth, Vokietija]; Galakturono rūgštis, Jaučio albuminas, Pektinas [Sigma-Aldrich, Vokietija]; Natrio šarmas [Lachema, Čekija]; Dializės maišeliai [Spectrum Laboratories, JAV]; Merkptoetanolis [Fekar, Vokietija].

**2.1.2. Komerciniai rinkiniai.** DNA Extraction Kit, Genomic DNA Purification Kit, InsTAclone PCR Cloning Kit, Silica Bead DNA Gel Extraction Kit [Thermo Fisher Scientific, Lietuva]; NucleoSpin Plasmid Kit [Macherey-Nagel, JAV].

**2.1.3. Medžiagos PGR ir PGR produktų vizualizavimui.** Agarozė [Lonza, Šveicarija]; 6x DNA Loading Dye, 10x Taq Buffer su amonio sulfatu, 50x TAE elektroforezės buferis, dNTP Mix (2 mM), GeneRuler 100 bp DNA Ladder, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Magnio chlorido 25 mM tirpalas, MassRuler DNA Ladder Mix, TaqDNA rekombinantinė polimerazė [Thermo Fisher Scientific, Lietuva]; pradmenys (F ir R) polimerazės grandinei reakcijai [Metabion, Vokietija]; DMSO, Etidžio bromidas [Roth, Vokietija].

**2.1.4. Kitos medžiagos.** Agar-agaras, mielių ekstraktas [Merck, Vokietija]; MES, PIPES, TRIS [AppliChem, Vokietija]; HCl [BPH Laboratory Supplies, Didžioji Britanija]; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, malachito žaliasis [Peaxum, Rusija]; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Roth, Vokietija]; maitinamasis buljonas, mitybinis agaras [Biokar Diagnostics, Prancūzija]; Safraninas [Loba Feinchemie, Austrija].

## 2.1.5. Medžiagos terpių gamybai.

### 2.1.5.1. Terpės termofilinių pektiną skaidančių bakterijų išskyrimui bei vėliau atrinktų izoliatų augimo tyrimui (Takao, Nakaniwa et al. 2000)

Terpė-A: pektinas (0,5 %), amonio sulfatas (0,2 %),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,6 %),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,4 %) ir mielių ekstraktas (0,02 %). Terpės pH 7.0 (60 °C).

Terpė-A su  $\text{CaCl}_2$  (galutinė koncentracija terpėje – 1mM).

Agarizuota Terpė-A: terpė-A ir agar-agaras (2 %).

### 2.1.5.2. Terpės termofilinių pektiną skaidančių bakterijų kultūrų grynumo patikrinimui ir biomasės priaugiu

Mitybinio agarų terpė: mitybinis agaras (40 g / L).

Maitinamojo buljono terpė: maitinamasis buljonas (2 %), agar-agaras (2 %).

#### Pastabos:

- procentai prie terpių sudėtinųjų dalių nurodo jų svorio ir tirpiklio tūrio santykį.
- terpių sudėtinės dalys tirpintos dist.  $\text{H}_2\text{O}$ .
- terpės autoklavuotos 30 min., 1.0 atm (esant 121 °C temperatūrai).

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Mikroorganizmų kultivavimas

Termofilinės pektinolizinės bakterijos mikrobiologine kilpele užsėjamos ant agarizuotos terpės Petri lėkštelėse ir kultivuojamos aerobinėmis sąlygomis termostate esant 60 °C temperatūrai.

### 2.2.2. Vizualus kultūros grynumo nustatymas vertinant mikroorganizmų morfologiją

Norint įvertinti bakterijų kultūrų grynumą, jos buvo klonuojamos ant standartinės agarizuotos maitinamojo buljono terpės ir augintos 8 val. aerobinėmis sąlygomis termostate esant 60 °C temperatūrai. Grynumas vizualiai vertintas pagal bakterijų kultūrų morfologiją.

### 2.2.3. Termofilinių endosporas formuojančių bakterijų kamienų, pasižyminčių pektinoliziniu aktyvumu, išskyrimas iš komposto pavyzdžių

Termofilinių pektiną skaidančių bakterijų išskyrimui buvo naudotos dvi terpės: Terpė-A ir Terpė-A su CaCl<sub>2</sub>.

Į dvi 250 mL kolbas po 100 mL įpilta pirmosios, į dar dvi – antrosios terpės. Į kiekvieną iš jų įdėta po 1 g komposto.

Skirtingų terpių kolbos 12 val. aerobinėmis sąlygomis inkubuotos purtyklėje (280 rpm) ir termostate (kartais pamaišant) esant 60°C temperatūrai.

Po 12 val. kiekvienos kolbos turinys atskiestas 10 kartų steriliu fiziologiniu (0,9 % NaCl) tirpalu ir po 100 µL iššpateliuota į Petri lėkšteles ant agarizuotų, identiškų skystoms, terpių. Inkubuota termostate 60°C temperatūros sąlygomis iki 12 val.

Siekiant patikrinti kultūrų grynumą, buvo atliekamas iš komposto išskirtų termofilinių pektiną skaidančių mikroorganizmų klonavimas mikrobiologiniu būdu (ant tos pačios Terpės-A). Įvertinus morfologiją, atrinkti aštuoni klonai buvo pažymėti kaip izoliatai Nr.: 1, 2, ..., 8.

#### 2.2.4. Kokybinis efektyviausių pektinolizinių izoliatų atrinkimas

Į vieną Petri lėkštelę su agarizuota Terpe-A mikrobiologine kilpele buvo užsėjama po 4 pektinolizinių aktyvumą turinčius izoliatų. Po 8 val. inkubavimo aerobinėmis sąlygomis termostate esant 60 °C temperatūrai vizualiai įvertintas kiekvieno izoliato užaugusių kolonijų dydis. Tolimesniems tyrimams atrinkti efektyviausiai augę izoliatai.

#### 2.2.5. Genominės DNR išskyrimas

Atrinkti izoliatai buvo pakartotinai išklonuoti ant agarizuotos maitinamojo buljono terpės Petri lėkštelėse. Norint gauti grynas, pavienes bakterijų kolonijas, kultivuota aerobinėmis sąlygomis termostate esant 60 °C temperatūrai ne ilgiau kaip 8 val. Vėliau kiekvieno izoliato grynos kolonijos persėtos ant mitybinio agarų terpės į Petri lėkšteles. Kadangi DNR gali būti skiriama tik iš nesporuliuotųjų kultūrų, todėl kultivuota aerobinėmis sąlygomis termostate esant 60 °C temperatūrai iki 8 val. Šis kultivavimo laikas pasirinktas prieš tai nustatytus kiekvieno izoliato sporuliacijos pradžios laiką. Bakterijų endosporos dažytos Šefer-Fultono metodu (žr. 2.2.10. skyrelį).

Iš kultūrų biomasės išskirta kiekvieno atrinkto izoliato genominė DNR, naudojant komercinį DNR skyrimo rinkinį (Genomic DNA Purification Kit). Vėliau DNR buvo saugoma atšaldžiant į rinkinio protokole pateiktus gamintojo nurodymus.

#### 2.2.6. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

BOX-PGR genotipavimas.

BOXA1R pradmuo: 5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'.

**3 lentelė.** BOX-PGR mišinio sudėtis.

| PGR reagentai  | R-jos tūris, µL |
|--|-----------------|
| Sterilus dist. H <sub>2</sub> O                                    | 33,75           |
| 10x PGR buferis su (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 5,00            |
| DMSO   | 5,00            |
| MgCl <sub>2</sub> (konc. 25 mM)                                    | 4,00            |
| dNTP (konc. 2 mM)  | 4,00            |

|  |              |
|--|--------------|
| BOXAR1R pradmuo<br>(konc. 20 pmol / mL)              | 2,00         |
| Rekomb. <i>Taq</i> DNR pol.<br>(konc. 5 U / $\mu$ L) | 0,25         |
| Mėginio DNR<br>(10 ng / $\mu$ L)                     | 1,00         |
|  | <b>55,00</b> |

Supilama po 1 kiekvienos tiriamos DNR mėginį ir vieną kontrolinį (be DNR).

BOX-PGR r-jos sąlygos:

Pradinė denatūracija                    95 °C, 2 min.;  
Galutinė elongacija                    72 °C, 7 min.

29 ciklai:

Denatūracija                    95 °C, 1 min.;  
Pradmenų prilydymas                    53 °C, 2 min.;  
Fragmento ilginimas                    72 °C, 3 min.

PGR vykdyta MasterCycler „Eppendorf“ termocikleryje.

#### 16S rDNR PGR.

27(F) pradmuo:                    5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3';

1495(R) pradmuo:                    5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'.

**4 lentelė.** 16S rDNR PGR mišinio sudėtis.

| PGR reagentai   | R-jos tūris, $\mu$ L |
|---|----------------------|
| Sterilus dist. H <sub>2</sub> O                                       | 33,75                |
| 10x PGR buferis su<br>(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 5,00                 |
| DMSO  | 5,00                 |
| MgCl <sub>2</sub> (konc. 25 mM)                                       | 4,00                 |
| dNTP (konc. 2 mM)   | 4,00                 |
| 27S (F) pradmuo<br>(konc. 20 pmol / mL)                               | 1,00                 |
| 1495 (R) pradmuo<br>(konc. 20 pmol / mL)                              | 1,00                 |
| Rekomb. <i>Taq</i> DNR pol.<br>(konc. 5 U / $\mu$ L)                  | 0,25                 |

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| Mėginio DNR<br>(10 ng / $\mu$ L) | 1,00  |
|                                  | 55,00 |

Supilama po 1 kiekvienos tiriamos DNR mėginį ir vieną kontrolinį (be DNR).

16S rDNR PGR r-jos sąlygos:

Pradinė denatūracija                    95 °C, 2 min.;  
Galutinė elongacija                    72 °C, 7 min.

29 ciklai:

Denatūracija                    95 °C, 1 min.;  
Pradmenų prilydymas                    50 °C, 2 min.;  
Fragmento ilginimas                    72 °C, 3 min.

PGR vykdyta MasterCycler „Eppendorf“ termocikleryje.

### 2.2.7. DNR elektroforezė agarozės gelyje

PGR produktai analizuojami horizontalios elektroforezės būdu (Sambrook, Fritsch et al. 1989). Elektroforezei naudojamas 1 % agarozės gelis (agarozės svoris / TAE buferio tūris), į kurio sudėtį įeina etidžio bromido tirpalas (jo galutinė koncentracija gelyje 10  $\mu$ g / mL). PGR produktai į gelio šulinėlius užnešami su 6x DNA Loading Dye. Naudotas DNR molekulinio svorio žymuo – GeneRuler 1 kb DNA Ladder arba GeneRuler 100 bp DNA Ladder (pasirenkamas atsižvelgiant į PGR produktų dydį). Po elektroforezės pagausinti DNR fragmentai analizuoti transiliumatoriumi apšvietus gelį UV.

### 2.2.8. PGR produkto valymas iš agarozės gelio

DNR valymui naudotas komercinis rinkinys (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit). Išvalyto PGR produkto koncentracija pakartotinai vizualiai įvertinta agarozės gelyje naudojant MassRuler DNA Ladder Mix žymenį.

### 2.2.9. PGR pagausintų DNR fragmentų klonavimas

16S rRNR genų fragmentai klonuoti į pTZ57R/T vektorių, o pastarasis transformuotas (naudojant PGR produkto klonavimo rinkinį (InsTAclone PCR Cloning Kit)) į *E.coli* DH5 $\alpha$



ląsteles. Plazmidžių skyrimui naudotas komercinis plazmidžių skyrimo rinkinys (NucleoSpin Plasmid Kit). Išskirtos plazmidės buvo išsiųstos į Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centrą.

#### **2.2.10. Nukleotidinių sekų analizė**

16S rRNR genų sekų palyginimas atliktas naudojant Lasergene DNASTAR MegAlign BLAST paiešką.

Filogenetinio evoliucinio medžio konstravimas atliktas naudojant MEGA programą pagal ClustalW algoritmą, taikant Neighbour-Joining metodą.

#### **2.2.11. Bakterijų endosporų dažymas Šefer-Fulton'o metodu**

Laboratorine kilpele bakterijų kultūra, augusi žinomą laiko tarpą ant maitinamojo agaro, užnešama ant objekcinio stiklelio, išdžiovinama ir fiksuojama karščiu. Uždedamas gabalėlis filtrinio popieriaus. Užlašinama 0,5 % vandeninio malachito žaliojo tirpalo ir 5 min. laikoma virš verdančio vandens vonelės neleidžiant išdžiūti. Filtrinis popierius nuimamas, stikliukas gerai nuplaunamas distiliuoto vandens srove. 1 min. dažoma safranino tirpalu. Vėl nuplaunama vandeniui, nusausinama filtriniu popieriumi, užlašinus ant stiklelio imersinio aliejaus mikroskopu vertinamas gautas preparatas. Endosporos matomos ryškiai žalios spalvos, o vegetatyvinės ląstelės – raudonai rudos (Harley, Prescott et al. 2002).

#### **2.2.12. Izoliatų augimo intensyvumo skystoje terpėje su specifiniu anglies šaltiniu įvertinimas sudarant augimo kreives**

Atlikus visų izoliatų kultūrų gryninimą mikrobiologiniu klonavimo būdu, jie buvo persėjami į Petri lėkšteles ant agarizuotos Terpės-A, kultivuojami aerobinėmis sąlygomis termostate esant 60 °C temperatūrai 8 val.

Paruoštas inokuliatas – užaugusių bakterijų biomasė suspenduota 0,9 % NaCl tirpale – kurio optinis tankis (OT) siekė 1,2 ( $\lambda = 595$  nm).

Kiekvieno izoliato augimo kreivės sudarymui reikalingos 4 kolbos: I ir II – Terpė-A, III ir IV – Terpė-A be pektino (terpės po 100 mL 250 mL tūrio kolbose). Terpė be pektino naudota kaip papildoma kontrolė, norint stebėti, kiek palaikomas kultūros augimas

metabolizuojant kitas terpės sudėtyje esančias mitybines medžiagas, t.y., mielių ekstraktą kaip galimą anglies šaltinį.

Į I ir III kolbas inokuluota po 1 mL paruoštos žinomo optinio tankio bakterijų suspensijos, į II ir IV kontrolines kolbas įpilta po 1 mL sterilaus NaCl tirpalo. Kultivavimas vykdytas iki 12 val. aerobinėmis sąlygomis purtyklėje (180 rpm), esant 60 °C temperatūrai.

Optinio tankio matavimai atlikti kas 2 val. iš kiekvienos bandinių kolbos paimant po 2 mL kultūros skysčio.

Remiantis gautomis OT matavimų vertėmis, sudarytos kiekvieno izoliato augimo kreivės. Didžiausiu pektinolininiu aktyvumu pasižymėjusių izoliatų augimo kreivės sudarytos apskaičiuavus OT verčių vidurkius. Apskaičiuavus standartinį nuokrypį ( $S_y$ ), augimo kreivėse pažymėti pasikliauties intervalai.

Terpėje-A kaip pagrindinis anglies šaltinis buvo pektinas ir PGA.

Tiriant augimo intensyvumo priklausomybę nuo pH, terpių gamybai buvo naudojami buferiai: MES ir PIPES pH 6.5, TRIS-HCl pH 7.0, 7.5 ir 8.0.

### **2.2.13. Baltymų išsodinimas amonio sulfatu**

Šis metodas vertinamas kaip labai pigus baltymų nusodinimo būdas. Nusodinant baltymus iš kultūrinio skysčio ar ląstelių lizato gaunamas gryninimo poveikis – gaunami 2-10 kartų daugiau išotinti tiksliniu baltymu ekstraktai.

*Geobacillus* sp. kamienas Nr. 3 kultivuotas Terpėje-A 4 val. (kultivavimo sąlygos identiškos nurodytosioms 2.2.11. skyrelyje). Ląstelės išsodintos kultūrinį skystį centrifuguojant 7000 x g, 15 min., esant 4 °C temperatūrai. Pamatavus gauto supernatanto tūrį, jame ištirpintas toks amonio sulfato kiekis, jog tirpale minėtos druskos koncentracija būtų 50 % (arba išotinimo laipsnis 0,5) (Rosenberg 2004). Tirpalas laikytas 12 val. 4 °C temperatūros sąlygomis. Baltymai išsodinti centrifuguojant 12000 x g, 20 min., esant 4 °C temperatūrai. Supernatantas pašalintas, gautos nuosėdos ištirpintos 1 mL 50 mM Tris-HCl pH 7.0 buferio (pH matuotas buferį pakaitinus iki 60 °C). Fermentinis tirpalas dializuotas (žr. 2.2.13.) ir toliau naudotas baltymų koncentracijos matavimui (žr. 2.2.14.), fermento substratinio specifškumo įvertinimui (žr. 2.2.15.), redukuojančių cukrų nustatymui (žr. 2.2.16.), baltymų nustatymui gelyje (žr. 2.2.17.), baltymų aktyvumo nustatymui gelyje (žr. 2.2.18.).

#### 2.2.14. Baltymų dializė

Po nusodinimo amonio sulfatu ir baltymų nuosėdų ištirpinimo buferyje (žr. 2.2.12.) gautas fermentinis tirpalas supiltas į dializės maišelį (poros pralaidžios 8-10 kDa molekulėms) ir dializuotas 16-20 val. prieš 1 L tūrio tokio pat buferio, t.y. 50 mM Tris-HCl pH 7.0, maišant magnetine maišykle. Gautas dializatas perkeltas į sterilius centrifuginius mėgintuvėlius ir saugotas esant -20 °C temperatūrai.

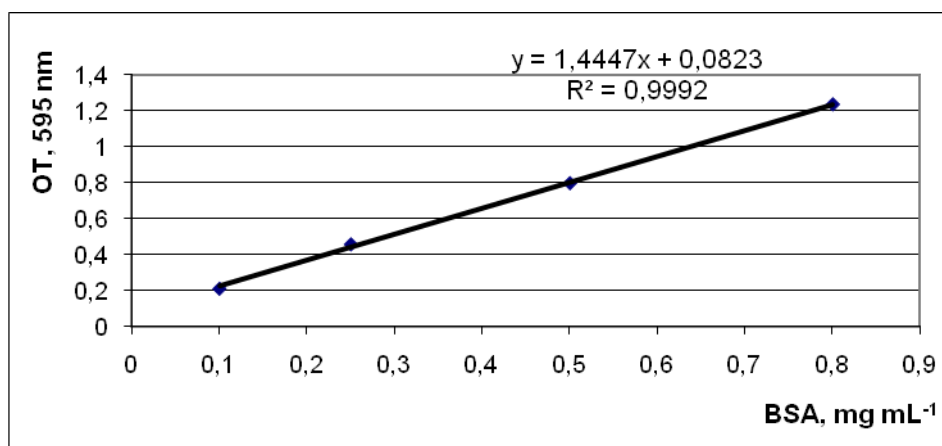
#### 2.2.15. Baltymų koncentracijos matavimas Bradford'o metodu

Šiame metode naudotas rūgštinis dažas Kumasi G-250, kuris jungiasi prie rūgštinių ir aromatinių aminorūgščių. Susiformavusių mėlynų dažo ir polipeptidinių grandinių kompleksų koncentraciją galima įvertinti matuojant absorbciją ( $\lambda = 595$ ).

Bradford'o reagento ruošimas. Ištirpinta 100 mg Kumasi G-250 dažo į 50 mL 95 % etanolio, pridėta 100 mL 85 % (svoris / tūris) ortofosforo rūgšties tirpalo. Visiškai ištirpus dažui, gautas tirpalas skiestas dist. H<sub>2</sub>O iki 1 L ir prieš naudojimą filtruotas. Toliau tirpalas laikomas esant 4°C temperatūrai tamsiame inde.

Fermentinis tirpalas maišytas su kambario temperatūros Bradford'o reagentu santykiu 1:50. Atsargiai pamaišant po 5 min. inkubavimo matuota absorbcija ( $\lambda = 595$ ). Kontrolinis tirpalas – identiškas tiriamajam, tik vietoj fermentinio tirpalo naudotas 50 mM Tris-HCl pH 7.0 buferis. Baltymų koncentracija fermentiniame tirpale apskaičiuota atsižvelgiant į kalibracinės kreivės lygtį.

Kaskart naujai pagamintam Bradford'o reagentui yra sudaroma kalibracinė kreivė matuojant žinomas jaučio albumino tirpalų koncentracijas (**5 pav.**) (<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html>).



5 pav. Bradford'o reagento kalibracinė kreivė

### 2.2.16. Pektino liazių substratinio specifiškumo ir termostabilumo nustatymas

Žinant, jog *Geobacillus sp.* kamienas Nr. 3 geba kaip pagrindinį anglies šaltinį naudoti pektiną, norėta išsiaiškinti, ar šio kamieno sekretuojami baltymai pasižymi pektinoliziniu aktyvumu.

Substratinio specifiškumo nustatymui naudotas fermentinis tirpalas (gautas remiantis 2.2.11.-2.2.13. metodais) ir du substratiniai tirpalai: 0,5 % pektino arba 0,5 % PGA 50 mM Tris-HCl buferio pH 7.0 (60 °C) tirpalas.

|                    |                                       |       |
|--------------------|---------------------------------------|-------|
| Reakcijos sudėtis: | substratinis tirpalas                 | 90 μL |
|                    | 50 mM Tris-HCl buferis pH 7.0 (60 °C) | 10 μL |
|                    | fermentinis tirpalas                  | 25 μL |

Kontrolinės reakcijos sudėtis identiška aprašytajai, tik fermentinis tirpalas (prieš sumaišant su kitais) 20 min. kaitintas 99 °C temperatūros sąlygomis.

Inkubuojant 60 °C temperatūros sąlygomis pradiniu laiko momentu ir kas valandą (iki 3 val.) spektrofotometriškai ( $\lambda = 235$ ) įvertintas fermentinio tirpalo baltymų specifiškumas abiem substratams, t.y. matuojamas pektino liazių suformuotų 4,5-nesočių reakcijos produktų kiekis. Tokiu pačiu metodu nustatytas fermentiniame tirpale esančių baltymų termostabilumas (40, 50, 60 ir 70 °C temperatūrų sąlygomis).

Liazėms skaidant pektiną arba PGA, susidaręs 4,5-nesotaus produkto kiekis apskaičiuotas pagal Bugerio-Lamberto-Bero dėsnį (Bagdonienė, Bendikienė et al. 2006). Šis dėsnis išreiškiamas formule:

$$OT_{235} = \varepsilon \times c \times l, \text{ kurioje:}$$

$\varepsilon_M$  – molinės ekstinkcijos koeficientas. Jis priklauso nuo bangos ilgio ir aprašo molekulės gebėjimą sugerti tam tikro bangos ilgio šviesą. Šiuo atveju 4,5-nesotiems produktams, juos detektuojant 235 nm bangos ilgio šviesa, būdingas  $\varepsilon_M = 4600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;

$c$  – susidariusio produkto koncentracija ( $\text{mol L}^{-1}$ );

$l$  – sluoksnio storis (cm), per kurį eina spindulys.

Fermento aktyvumo vienetas apibrėžiamas kaip fermento kiekis, kuris per minutę atpalaiduoja 1 mmol produkto:

$$U \text{ mmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1} = \frac{c}{t}$$

$c$  – mmol mL<sup>-1</sup>;

$t$  – laikas, min.

Savitasis aktyvumas išreiškiamas aktyvumo vienetais (U) miligrame baltymo:

$$U \text{ mg}^{-1} = \frac{\Delta OT_{235}}{4,6 \times m_b}$$

$\Delta OT_{235}$  – optinio tankio pokytis per min.;

4,6 – milimoliarinis ekstincijos koeficientas (būdingas 4,5-nesotiems produktams, juos detektuojant 235 nm bangos ilgio šviesa);

$m_b$  – baltymo masė mg mL<sup>-1</sup>.

### 2.2.17. Hidrolazių nustatymas DNS reagentu

Šis metodas naudojamas tiriant fermentinę polisacharidų hidrolizę, kai nėra aišku, kokios klasės fermentai vykdo šią reakciją. Fermentinė polisacharidų hidrolizės reakcija yra stabdoma DNS reagentu. Spektrofotometriškai ( $\lambda = 540$  nm) yra detektuojamas spalvos pasikeitimas, kuris parodo dėl hidrolazių poveikio reakcijoje susidariusius redukuojančius cukrus (Miller 1959).

Naudoti tirpalai:

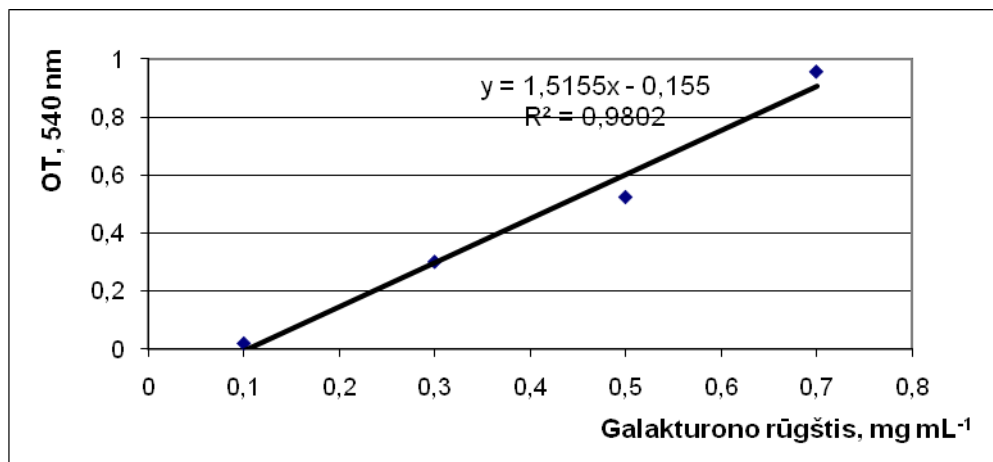
- Substratinis tirpalas: 0,5 % pektino arba 0,5 % PGA 50 mM Tris-HCl buferio pH 7.0 (60 °C) tirpalas.
- Fermentinis tirpalas (gautas remiantis 2.2.11.-2.2.13. metodais).
- DNS reagentas: 1 g 3,5-dinitrosalicilo rūgšties; 1,5 g NaOH; 20 g Na-K tartrato; 0,2 g Rochelle druskos [Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>]; iki 100 mL dist. H<sub>2</sub>O. Kiekviena DNS reagento sudedamoji dalis lėtai ištirpinta atskirai, gauti tirpalai lėtai sumaišyti, pripilta dist. H<sub>2</sub>O iki 100 mL.

|                    |                       |        |
|--------------------|-----------------------|--------|
| Reakcijos sudėtis: | substratinis tirpalas | 140 μL |
|                    | fermentinis tirpalas  | 70 μL  |

Kontrolinės reakcijos sudėtis identiška aprašytajai, tik fermentinis tirpalas (prieš sumaišant su kitais) 20 min. kaitintas 99 °C temperatūros sąlygomis.

Kontrolinės reakcijos bei tiriamojo fermentinio tirpalo reakcijų mišiniai inkubuoti 1 val. lėtai maišant 60 °C temperatūros sąlygomis. Pasibaigus inkubavimo laikui, reakcijos stabdytos įpilant po 630 μL DNS reagento, visas tūris kaitintas 10 min. esant 95 °C temperatūrai ir matuota absorbcija ( $\lambda = 540$ ).

Pagaminus DNS reagentą, sudaryta kalibracinė kreivė matuojant galakturono rūgšties žinomų koncentracijų tirpalus (**6 pav.**).



**6 pav.** DNS reagento kalibracinė kreivė

Pagal šią kreivę skaičiuota fermentiniame tirpale esančių hidrolazių katalizuojamos reakcijos metu susidariusios galakturono rūgšties koncentracija  $c_3$  (mg mL<sup>-1</sup>):

$$y = 1,515x - 0,155$$

$$y - OT_{540}$$

$$x - \text{susidariusios galakturono rūgšties koncentracija } c \text{ (mg mL}^{-1}\text{)}$$

$$c_3 \text{ mg mL}^{-1} = \frac{OT_{235} + 0,155}{1,515}$$

Gauta galakturono rūgšties koncentracija perskaičiuota į mmol mL<sup>-1</sup>:

$$n \text{ mmol mL}^{-1} = \frac{c_3}{M}$$

$n$  – medžiagos kiekio vienetas (mmol mL<sup>-1</sup>)

$c_3$  – galakturono rūgšties koncentracija (mg mL<sup>-1</sup>)

$M$  (galakturono rūgšties) = 194 g mol<sup>-1</sup> = 194 mg mmol<sup>-1</sup>.

Fermento aktyvumo vienetu  $U$  įvardijamas toks fermento kiekis, kuris atpalaiduoja 1 mmol monogalakturono rūgšties per min. (mmol mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>):

$$U_3 \text{ mmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1} = \frac{c_3}{t}$$

$t$  – inkubavimo laikas (min)

Taip pat skaičiuotas savitasis aktyvumas U miligrame baltymo:

$$U_3 \text{mg}^{-1} = \frac{U_3 \text{mmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}}{m_b}$$

$m_b$  – baltymo masė mg mL<sup>-1</sup>.

### 2.2.18. Baltymų nustatymas gelio elektroforezės metodu

Fermentinio tirpalo baltymai pagal jų masę atskirti vienakryptės stačiosios nutrūkstamos SDS-PAGE elektroforezės metodu (Vertikalus elektroforezės aparatas ASG-250, “C. B. S. Scientific Co.”).

Elektroforezei naudoti tirpalai:

- akrilamido ir N,N'-metilenbisakrilamido tirpalas: 30 % akrilamido, 0,8 % N,N'-metilenbisakrilamido ir dist. H<sub>2</sub>O iki 100 mL. Tirpalas perfiltruotas ir saugotas tamsoje esant 4°C temperatūrai.

- koncentruojančio gelio buferis: 1 M Tris-HCl pH 6.8 (23 °C);

- skiriančio gelio buferis: 1 M Tris-HCl pH 8.8 (23 °C);

- 10 % SDS.

- 10 % amonio perokso sulfato [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>] tirpalas (svoris / tūris). Ruoštas prieš pat naudojimą.

- TEMED.

- 4x baltymų denatūravimo buferis: 4 g sacharozės; 2 mL 2-merkaptoetanolio; 0,8 g SDS; 1 M Tris-HCl pH 6.8 (23 °C); 1 mg bromfenolio mėlynojo ir dist. H<sub>2</sub>O iki 100 mL. Gerai išmaišyta ir išpilsčius po 1 mL saugota esant -20 °C temperatūrai.

- 1x Tris-Glicino buferis: 3,03 g Tris; 14,42 g glicino; 1 g SDS; dist. H<sub>2</sub>O iki 1000 mL. Saugotas esant 0-4 °C temperatūrai iki 1 mėn.

- standartinis mišinys baltymų, turinčių žinomas molekulinės mases.

- baltymų dažymas:

- PageBlue Protein Staining Solution tirpalu (vadovautasi gamintojo pateikta instrukcija).

- Dažymas Kumasi mėliu:

Baltymų tvirtinimo tirpalas: 25 % (tūrio) izopropanolio, 10 % (tūrio) acto rūgšties ir 65 % (tūrio) vandens. Saugotas kambario temperatūros sąlygomis.

Dažo Kumasi mėlio tirpalas: 10 % (tūrio) acto rūgšties, 0,006 % (svoris/tūris) Kumasi mėlio G-250, 90 % (tūrio) vandens. Saugotas kambario temperatūros sąlygomis.  
10 % (tūrio) acto rūgštis.

**3 lentelė.** Skiriančio ir koncentruojančio gelių sudėtys

| Reagentų tirpalai                        | 12,5 % skiriantis gelis, mL | 8 % skiriantis gelis, mL | 5 % koncentruojantis gelis, mL |
|--|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Akrilamido ir N,N-bisakrilamido tirpalas | 10                          | 8                        | 1,67                           |
| 1 M Tris-HCl, pH 8.8 (23 °C)             | 9,3                         | 9,3                      | -                              |
| 1 M Tris-HCl, pH 6.8 (23 °C)             | -                           | -                        | 1,25                           |
| Dist. H <sub>2</sub> O                   | 5,17                        | 7,17                     | 7,03                           |
| SDS (10 %)                               | 0,25                        | 0,25                     | 0,1                            |
| APS (10 %)                               |                             |                          |                                |
| TEMED                                    | 0,01                        | 0,01                     | 0,01                           |

Surinkus elektroforezės aparato kasetę, paruoštas **12,5 %** skiriantis poliakrilamidinis gelis (sudėtis *3 lentelėje*), gerai išmaišytas. Juo kasetė yra užpildyta nuo stiklo viršutinio krašto paliekant 2-3 cm. Ant skiriančio gelio nedelsiant užpiltas ~1 cm 2-izopropanolio tirpalo sluoksnis. Laukta ~45 min., kol kambario temperatūros sąlygomis įvyks polimerizacija. 2-izopropanolio tirpalas nupiltas ir nuo gelio paviršiaus 1 M Tris-HCl pH 8.8 tirpalu visiškai pašalinti 2-izopropanolio likučiai. Paruoštas **5 %** koncentruojantis gelis (sudėtis *3 lentelėje*) ir piltas ant skiriančio gelio. Tarp stiklų įpildo gelio paviršiuje pašalinti oro burbuliukai. Į koncentruojančio gelio sluoksnį įstatytos šukos. Laukta, kol įvyks polimerizacija (30-45 min. kambario temperatūros sąlygomis).

Tiriamo fermentinio tirpalo paruošimas. Tiriamas fermentinis tirpalas sumaišytas su 4x baltymų denatūravimo buferiu santykiu 1:3, pakaitintas 15 min. esant 95 °C temperatūrai.

Visiškai sustingus geliui, šukos ištraukiamos, kasetė įstatoma į elektroforezės aparatą, jis užpildomas 1x Tris-Glicino buferiu. Į elektroforezės buferiu praplautus šulinėlius po ~50 µL įnešami paruošti kambario temperatūros fermentinio tirpalo mėginiai. Pagal poreikį naudojami molekulinų masių žymenys: Prestained Protein Molecular Weight Marker ir/arba Unstained Protein Molecular Weight Marker, (po 10 µL į šulinėlį). Tušti šulinėliai užpildomi 4x baltymų denatūravimo buferiu, sumaišytu su dist. H<sub>2</sub>O santykiu 1:3 (po ~50 µL). Elektroforezės aparatas



prijungiamas prie srovės šaltinio, nustatoma 20 mA stiprumo srovė. Kai bromfenolio mėlynojo dažo fronto riba visiškai pereina į skiriantį gelį, srovės stiprumas padidinamas iki 37 mA. Bromfenolio mėlynojo dažo fronto ribai pasiekus skiriančio gelio apačią, išjungiamas elektros srovė ir elektroforezės aparatas atjungiamas nuo srovės šaltinio.

Pasibaigus elektroforezei, gelis atskirtas nuo stiklų ir dažytas PageBlue Protein Staining Solution tirpalu, vadovaujantis gamintojo pateiktas instrukcija. Taip pat dažyta Kumasi mėlio tirpalu. Poliakrilamidinis gelis įdėtas į vonelę ir užpiltas baltymų tvirtinimo tirpalu. Lėtai siūbuojant inkubuotas kambario temperatūros sąlygomis ~20 min. Nupylus baltymų tvirtinimo tirpalą, užpiltas Kumasi mėlio dažo tirpalas. Vonelė lėtai siūbuota kambario temperatūros sąlygomis, kol baltymų juostelės nusidažo norimo ryškumo mėlyna spalva (1-12 val.). Nupylus dažo tirpalą, užpilta 10 % acto rūgštimi, lėtai siūbuojant inkubuota kambario temperatūros sąlygomis, vis keičiant atplovimo tirpalą, kol iš gelio išsiplauna dažas, nesusirišęs su baltymais. Gelį praplovus dist. H<sub>2</sub>O, gauti elektroforezės rezultatai užfiksuoti nuotraukoje. Gelis toliau saugotas 7 % acto rūgšties tirpale arba vandenyje.

#### **2.2.19. Baltymų aktyvumo nustatymas gelyje**

Fermentinio tirpalo baltymai pagal jų masę atskiriami vienakryptės stačiosios nutrūkstamos SDS-PAGE elektroforezės metodu, kurį šiek tiek modifikavus galima nustatyti ir baltymų aktyvumą tame pačiame poliakrilamidiniame gelyje. Šis metodas analogiškas aprašytajam 2.2.17. skyrelyje. Toliau bus aprašomos tik metodo modifikacijos.

Naudoti tirpalai:

- skalavimo buferis: 2,5 % (tūris/tūris) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.5 (60°C) buferiai. Vienam geliui 300 mL.

- inkubavimo buferis: 50 mM Tris-HCl pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.5 (60°C) buferiai.

- baltymų aktyvumo gelyje išryškimui: 0,025 % ruthenium red dažo vandeninis tirpalas.

Šiam metodui gamintas 8 % skiriantis poliakrilamidinis gelis, į kurį papildomai buvo įpolimerinta substrato: 0,1 % (svoris/tūris) pektino arba 0,05 % (svoris/tūris) PGA.

Naudotas molekulinį masių žymuo: Prestained Protein Molecular Weight Marker (po 10 µL į šulinėlį).

Pasibaigus elektroforezei, gelis atskirtas nuo stiklų. Takelis su molekulinį masių žymeniu Prestained Protein Molecular Weight Marker atpjautas, kita gelio dalis panardinta į 100 mL skalavimo buferio ir inkubuota lėtai siūbuojant 30 min. kambario temperatūros sąlygomis.

Skalavimo buferis keistas kas 10 min., po to nupiltas, ir ant gelio užpilta 100 mL inkubavimo buferio. Vienam geliui naudojami vienodo pH skalavimo ir inkubavimo buferiai. Toliau inkubacija vykdyta aerobinėmis sąlygomis termostate esant 60 °C temperatūrai 2-4 val. Nupylus inkubavimo buferį, gelis panardintas į 0,025 % ruthenium red dažo vandeninį tirpalą ir lėtai siūbuojant dažytas kambario temperatūros sąlygomis 30-60 min. Dažas atplautas dist. H<sub>2</sub>O, kol gelyje išryškėjo skaidresnės zonos, rodančios baltymų aktyvumą. Gauti rezultatai užfiksuoti nuotraukoje abi gelio dalis sudėjus greta viena kitos.

### **Tyrimų objektai**

Magistrinio darbo tyrimų metu ieškota bakterijų, gebančių degraduoti pektiną bei naudoti šį polisacharidą kaip pagrindinį anglies šaltinį. Pektinolizinio aktyvumo nustatymas atliktas tiriant termofilines, gramteigiamas, endosporas formuojančias bakterijas. Pradiniame etape buvo tirta 80 bakterijų izoliatų, iš kurių 72 – iš Vilniaus universiteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kolekcijos, o likę 8 išskirti iš komposto pavyzdžių. Iš visų turimų izoliatų atrinkti du, pasižymėję didžiausiu pektinoliziniu aktyvumu. Atlikus šių izoliatų 16S rRNR geno PGR bei sekoskaitą, nustatytas kamienų giminingumas *Geobacillus thermodenitrificans* rūšiai. Turimi kamieniai pavadinti *Geobacillus* sp. Nr. 3 ir Nr. 4. Baltymų tyrimai buvo atliekami su iš kamieno Nr. 3 kultūrinio skysčio išskirtu grubiu baltyminiu preparatu.

### 3. REZULTATAI

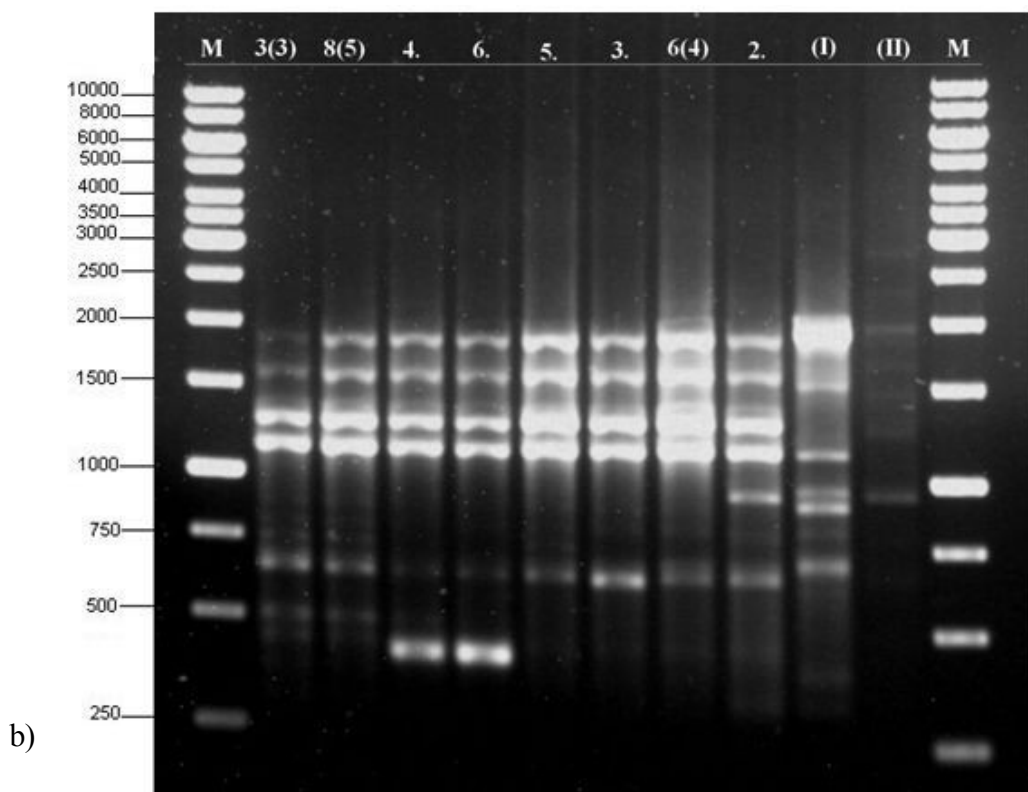
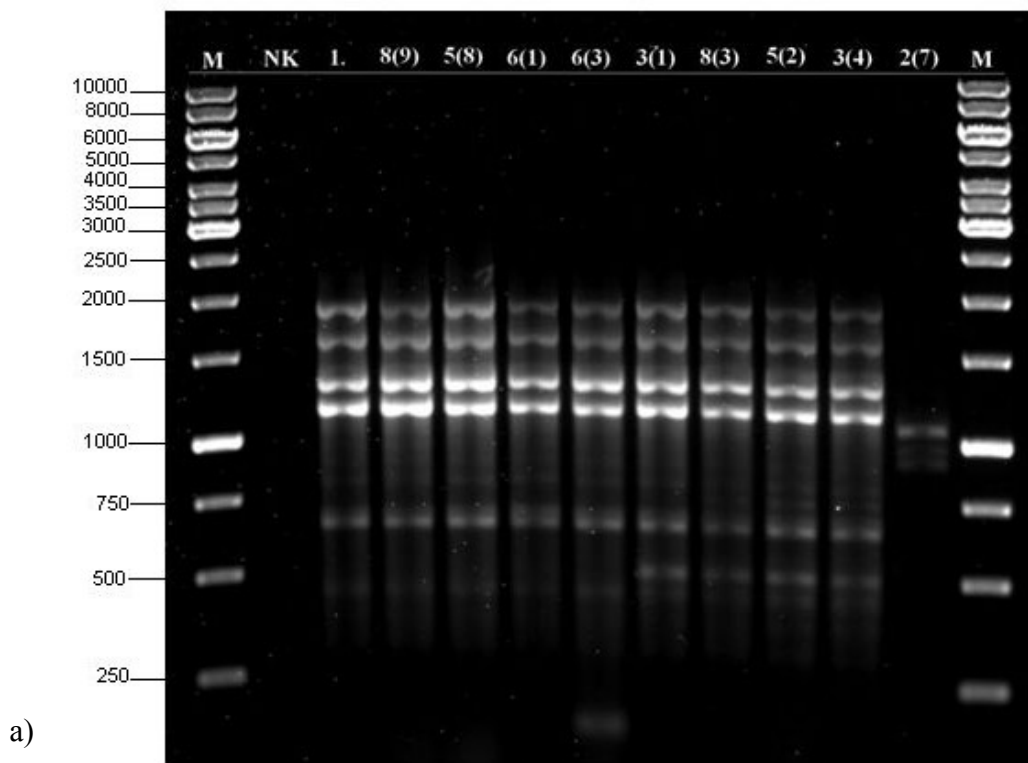
#### 3.1. Termofilinių endosporas formuojančių bakterijų kamienų, pasižyminčių pektinoliziniu aktyvumu, atrinkimas

Termofilinės endosporas formuojančios bakterijos buvo išskirtos iš komposto pavyzdžių. Bakterinių kultūrų augimas buvo stebimas Petri lėkštelėse su terpe be kalcio chlorido, nepriklausomai nuo to, ar pirminis inkubavimas buvo vykdomas purtyklėje, ar termostate. Patikrinus užaugusių kultūrų grynumą, iš viso buvo atrinkti aštuoni izoliatai (Nr. 1, 2, ..., 8.).

Taip pat termofilinės endosporas formuojančios pektiną skaidančios bakterijos buvo atrenkamos iš Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kolekcijos, išsėjant ant agarizuotos terpės-A neidentifikuotus izoliatų, saugotus -70 °C temperatūros sąlygomis. Iš 72 tikrintų izoliatų atrinkta 12: 2(7), 3(1), 3(3), 3(4), 5(2), 5(8), 6(1), 6(3), 6(4), 8(3), 8(5), 8(9). Taigi iš viso atsirinkta 18 izoliatų. Nei vieno izoliato taksonominė padėtis nebuvo žinoma. Kadangi visi pektiną skaidančių bakterijų izoliatai buvo gauti panaudojus sukaupiamąją kultūrą, nebuvo galima atmesti ir tikimybės, kad realiai visi izoliatai priklauso vienam kamienui.

Todėl, norint tolimesnius tyrimus vykdyti tik su skirtingais kamienais, visi 18 izoliatų buvo sugrupuoti į grupes BOX-PGR genotipavimo metodu. Pasirinktas šis metodas, kadangi BOX-PGR rezultatai dažniausiai atitinka DNR-DNR hibridizacijos rezultatus. Toks genotipavimas naudojamas prokariotų taksonomijoje kamienams apibūdinti, palyginti, grupuoti ir atrinkti DNR-DNR hibridizacijai atlikti. Šis genotipavimas paremtas PGR, kurios metu, naudojant standartinius pradmenis, pagausinami fragmentai tarp bakterijų genome pasikartojančių konservatyvių BOX elementų.

Atlikus gautų PGR produktų elektroforetinę analizę, izoliatai suskirstyti į grupes. Rezultatai pateikti **7 a** ir **b pav.**



7 a) ir b) pav. Termofilinių pektinoliziniu aktyvumu pasižyminčių izoliatų BOX-PGR fragmentai. Elektroforezės nuotraukų viršuje ties kiekvienu takeliu sužymėti izoliatų numeriai, NK – neigiama kontrolė, M – molekulinės masės žymuo GeneRuler 1kb DNA Ladder (DNR fragmentų molekulinė masė pateikta bp).

Iš 18 izoliatų atrinkti 8, traktuojant, jog tai skirtingi kamienai (žiūrėti **4 lentelėje**). Kiekvienas kamienas saugomas užšaldytas -70 °C temperatūros sąlygomis.

**4 lentelė.** Termostabilius pektiną degraduojančius fermentus produkuojančių kamienų suskirstymas į grupes, remiantis BOX-PGR rezultatais.

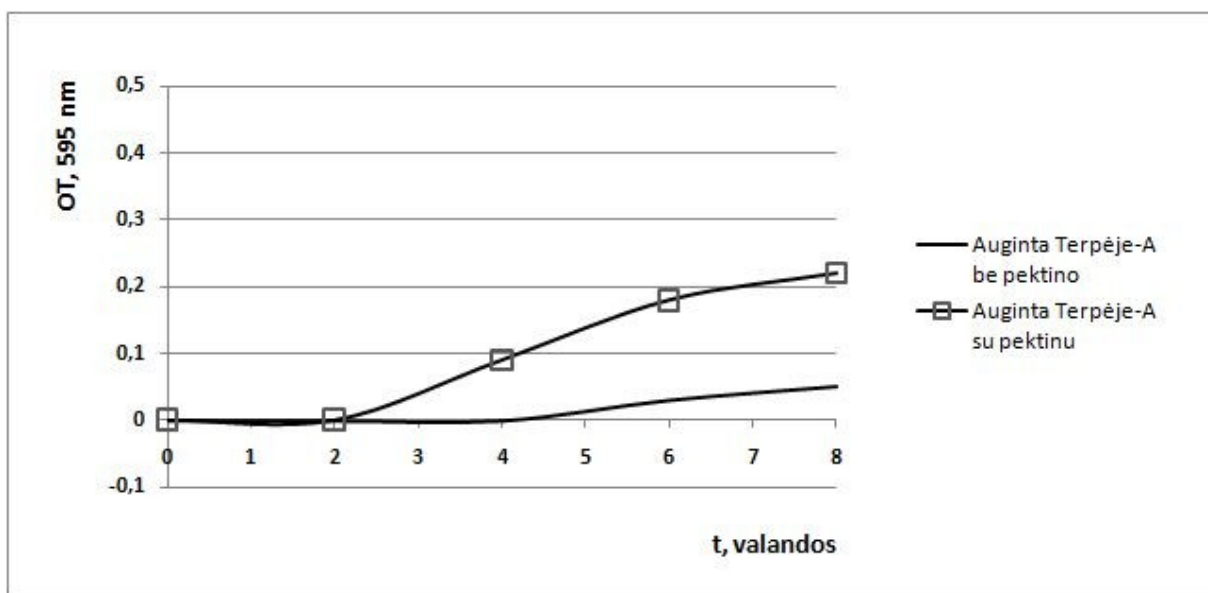
| <b>Grupės Nr.</b> | <b>Izoliatų Nr.</b>                | <b>Tolimesniam darbui atrinkti kamienai</b> |
|-------------------|------------------------------------|---|
| <b>I</b>          | 1, 8(9), 5(8), 6(1), 3, 5, 6(4)    | 5(8), 3                                     |
| <b>II</b>         | 6(3)                               | 6(3)  |
| <b>III</b>        | 3(1), 8(3), 5(2), 3(4), 3(3), 8(5) | 3(1), 3(3)                                  |
| <b>IV</b>         | 2(7)                               | 2(7)  |
| <b>V</b>          | 4, 6                               | 4   |
| <b>VI</b>         | 2                                  | 2   |

### **3.2. Pektinoliziniu aktyvumu pasižyminčių kamienų augimo kreivių sudarymas ir 16S rRNR filogenetinė analizė**

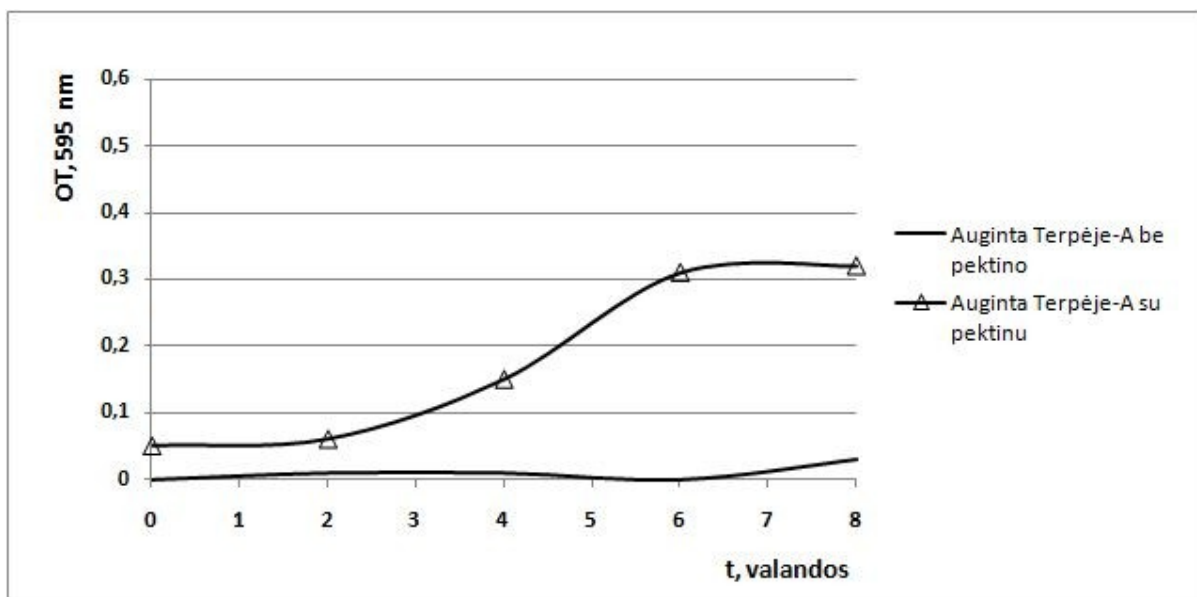
Norint įvertinti kiekvieno tiriamo kamieno gebėjimą degraduoti pektiną ir naudoti jį kaip pagrindinį anglies šaltinį, buvo sudarytos augimo kreivės. Šiuo būdu galima tiksliai išmatuoti kamienų kultūrų biomasės prieaugį, kuris tiesiogiai proporcingas jų sekretuojamų pektinolizinių fermentų kiekiui (ir / arba aktyvumui).

Remiantis gautomis OT matavimų vertėmis, buvo sudarytos kiekvieno kamieno augimo kreivės (**8-15 pav.**).

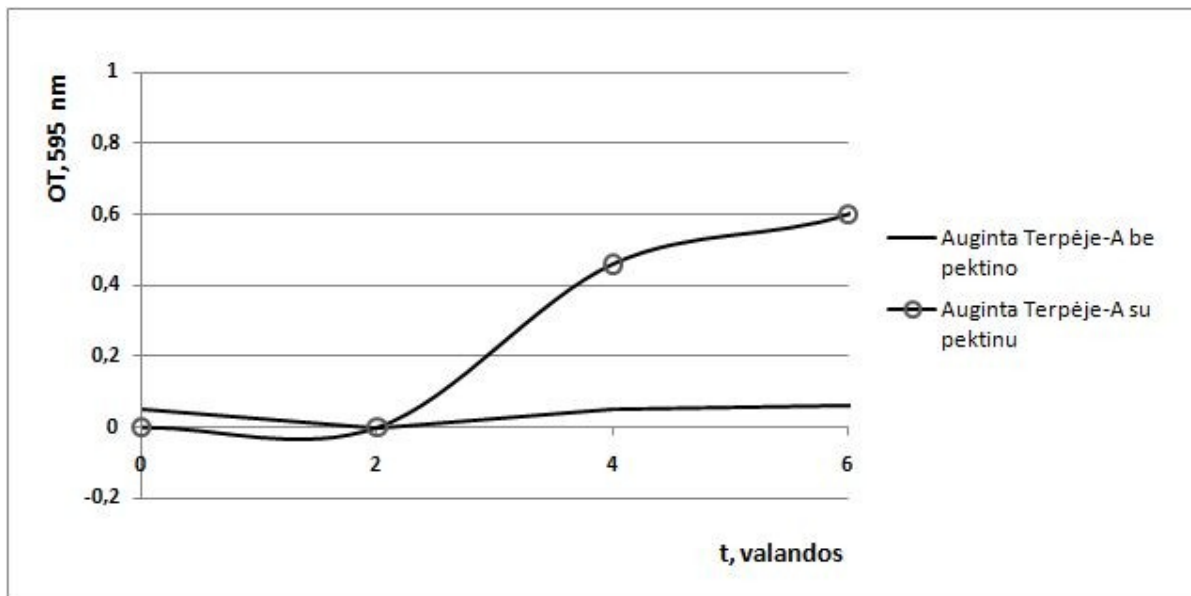
Didžiausiu pektinoliziniu aktyvumu pasižymėjusių kamienų (Nr. 2, 3 ir 4) augimo kreivės buvo sudarytos apskaičiavus OT verčių vidurkius. Apskaičiavus standartinį nuokrypį ( $S_y$ ), augimo kreivėse pažymėti pasikliauties intervalai (**13-15 pav.**).



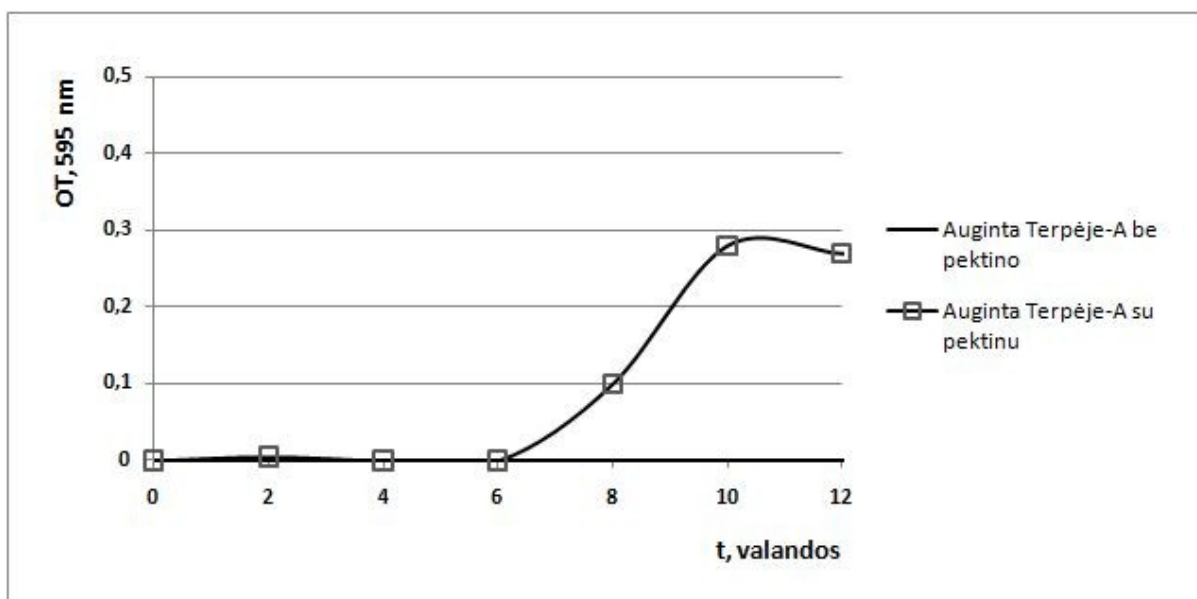
8 pav. Kamieno Nr. 2(7) augimo kreivė



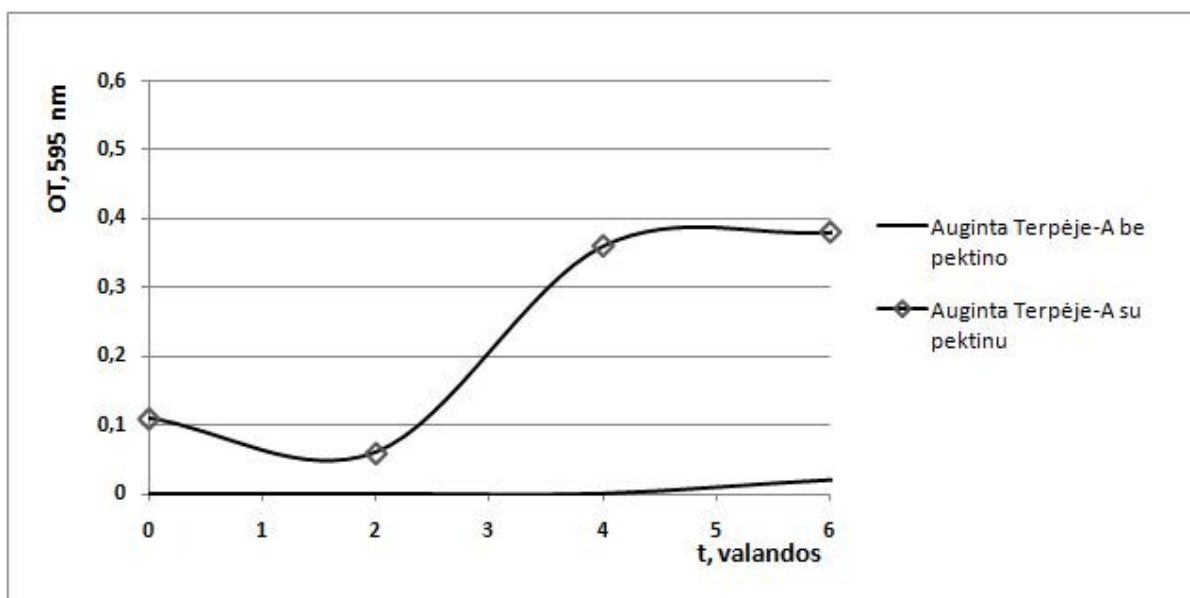
9 pav. Kamieno Nr. 3(1) augimo kreivė



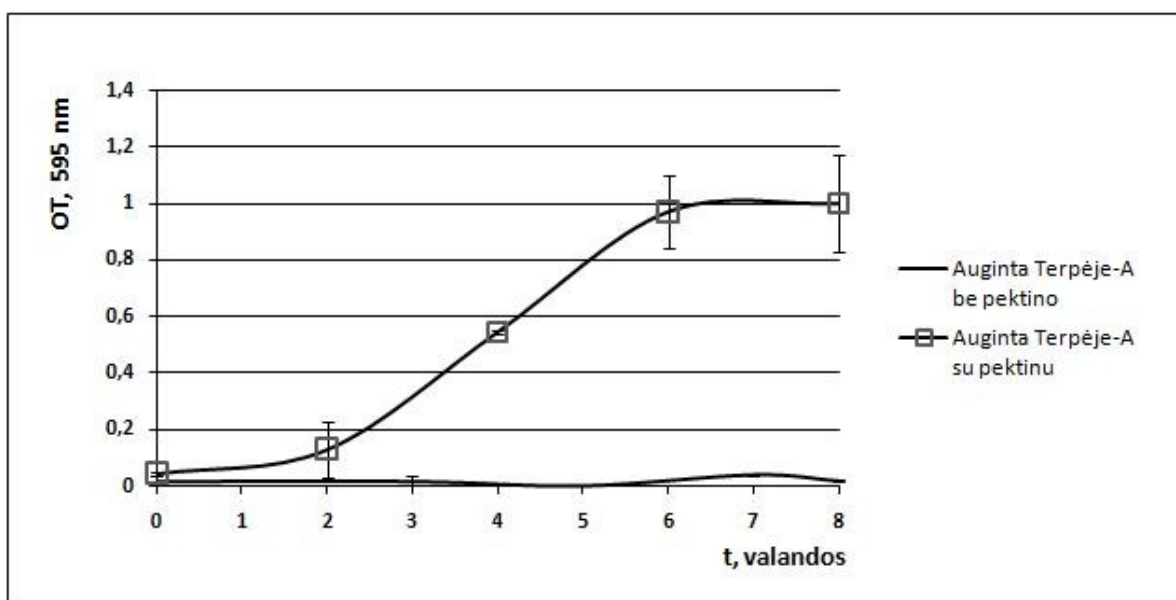
10 pav. Kamieno Nr. 3(3) augimo kreivė



11 pav. Kamieno Nr. 5(8) augimo kreivė

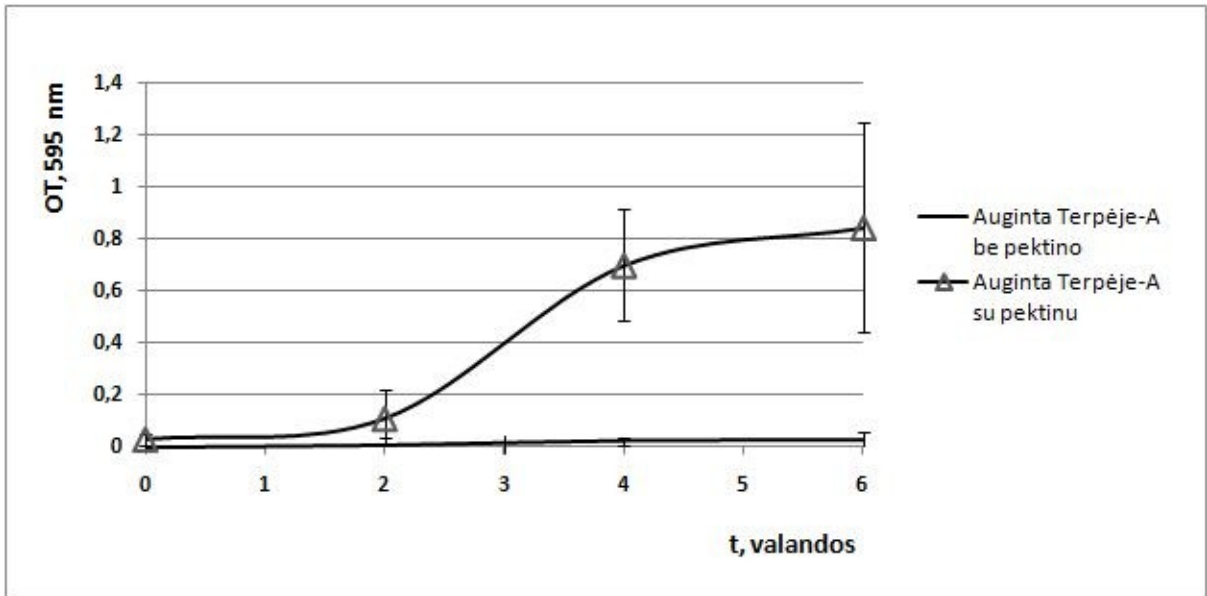


12 pav. Kamieno Nr. 6(3) augimo kreivė

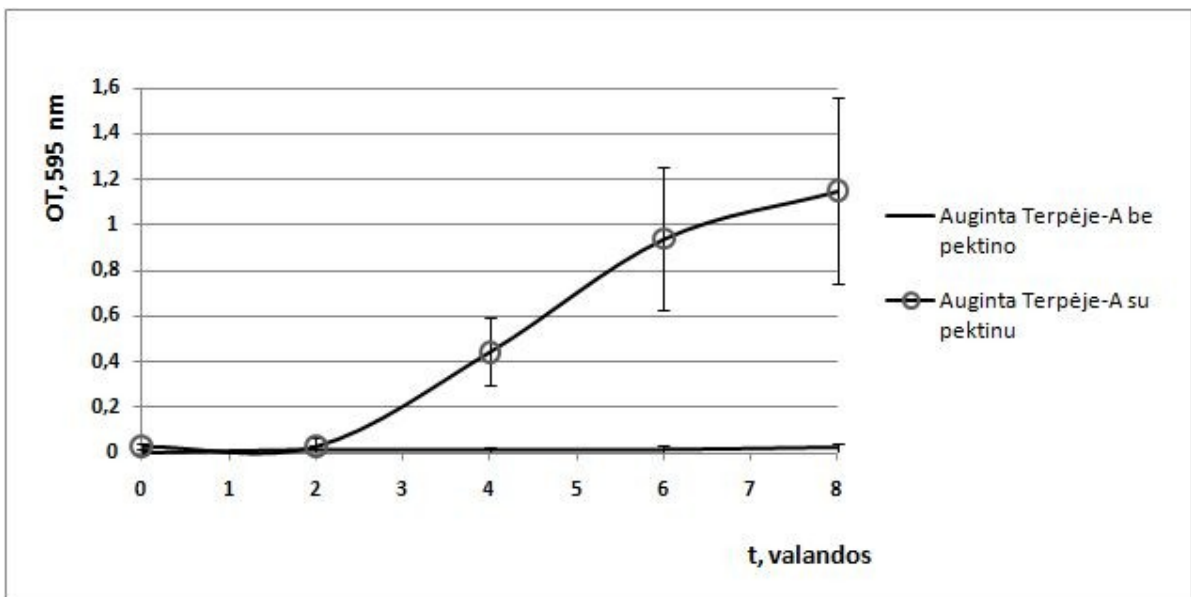


13 pav. Kamieno Nr. 2 augimo kreivė, sudaryta apskaičiuavus OT verčių vidurkius (n=2).





14 pav. Kamieno Nr. 3 augimo kreivė, sudaryta apskaičiuojant OT verčių vidurkius (n=2).



15 pav. Kamieno Nr. 4 augimo kreivė, sudaryta apskaičiuojant OT verčių vidurkius (n=2).

**16S rRNR geno sekos analizei** buvo pasirinkti kamienai Nr. 3 ir Nr. 4. Atlikus šių kamienų 16S rRNR geno PGR bei klonavimą, po sekoskaitos gautos 16S rRNR geno sekos buvo lyginamos naudojant Lasergene DNASTAR MegAlign BLAST paiešką.

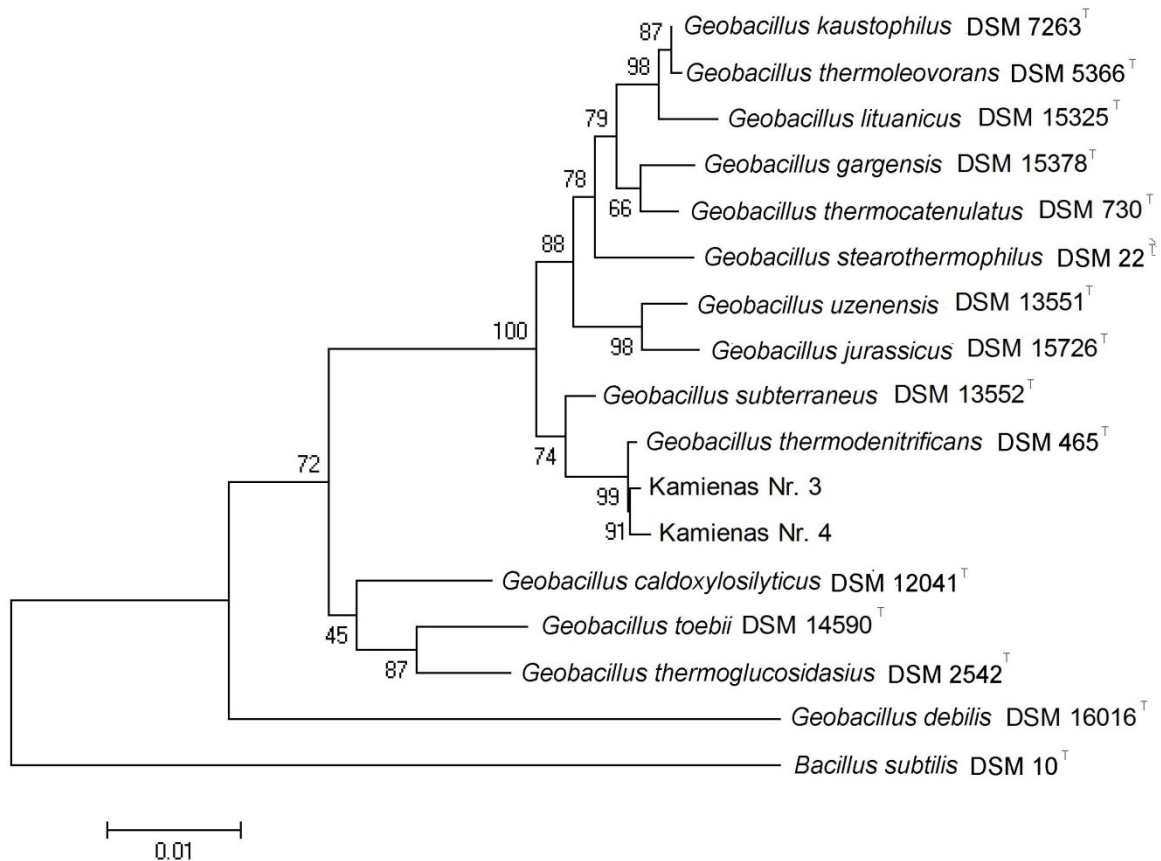
Kamieno Nr. 3 16S rRNR geno seka buvo 99,9 % identiška *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 16S rRNR geno sekai.

Kamieno Nr. 4 16S rRNR geno seka 99,8 % atitiko taip pat *G. thermodenitrificans* NG80-2 16S rRNR geno seką.

Filogenetinio evoliucinio medžio konstravimas buvo atliktas naudojantis MEGA programa pagal ClustalW algoritimą, taikant Neighbor-Joining metodą.

Tiriamų kamienų Nr. 3 ir Nr. 4 16S rRNR genų sekos buvo lyginamos su NCBI genų banke pateiktomis *Geobacillus* genties patvirtintų rūšių to paties geno sekomis: *Geobacillus caldxylosilyticus* DSM 12041<sup>T</sup>, *Geobacillus debilis* DSM 16016<sup>T</sup>, *Geobacillus gargensis* DSM 15378<sup>T</sup>, *Geobacillus jurassicus* DSM 15726<sup>T</sup>, *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263<sup>T</sup>, *Geobacillus lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup>, *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22<sup>T</sup>, *Geobacillus subterraneus* DSM 13552<sup>T</sup>, *Geobacillus thermocatenulatus* DSM 730<sup>T</sup>, *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup>, *Geobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup>, *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup>, *Geobacillus toebii* DSM 14590<sup>T</sup>, *Geobacillus uzenensis* DSM 13551<sup>T</sup>; ir atskaitos tašku pasirinkta *Bacillus subtilis* DSM 10<sup>T</sup> seka (**16 pav.**).

Filogenetinis evoliucinis medis patvirtina atliktos BLAST paieškos rezultatus, jog tirtiems kamienams Nr. 3 ir Nr. 4 filogenetiškai artimiausia yra *G. thermodenitrificans* rūšis.



**16 pav.** Filogenetiniame medyje parodytas filogenetinis ryšys tarp atrinktų termostabilius pektiną degraduojančius fermentus produkuojančių kamienų (Nr. 3 ir Nr. 4) ir *Geobacillus* genčiai priskiriamų atstovų pagal 16S rDNR. (Medžio skalė rodo filogenetinio panašumo indeksą (brūkšnyis – 0,01 nukleotidų pasikeitimų vienoje padėtyje))

### 3.3. Pektino liazių substratinio specifiškumo ir termostabilumo nustatymas

Suminis fermentinis tirpalas gautas iš *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 kultūrinio skysčio išsodinus baltymus amonio sulfatu. Po dializės Bradford'o metodu nustatyta baltymų koncentracija – 0,15 mg mL<sup>-1</sup>.

Pektino liazių substratinis specifiškumas tirtas substratais naudojant PGA ir pektiną. Po 2 val. inkubavimo 60 °C temperatūros sąlygomis išmatuotas OT<sub>235</sub>, pagal kurį apskaičiuojamas pektino liazių suformuotų 4,5-nesočių reakcijos produktų kiekis. Tokiu pačiu metodu tirtas temperatūros poveikis pektino liazių aktyvumui. Paaiškėjo, jog nepriklausomai nuo substrato pektino liazių aktyvumui optimaliausia temperatūra buvo 60 °C laipsnių. Inkubuojant 50 °C

temperatūros sąlygomis, liazių aktyvumas skaidant PGA sumažėja perpus, o skaidant pektiną – daugiau nei 2 kartus. Esant 40 ir 70 °C temperatūrai, 4,5-nesotaus produkto tiek iš PGA, tiek iš pektino atpalaiduojama 10 kartų mažiau.

Susidariusių 4,5-nesočių reakcijos produktų koncentracijų skaičiavimams naudotos dvi  $OT_{235}$  vertės, gautos 60 °C temperatūros sąlygomis 3 val. liažėms skaidant PGA (susidariusio 4,5-nesotaus produkto koncentracija pažymėta  $c_1$ ) ir pektiną (susidariusio 4,5-nesotaus produkto koncentracija pažymėta  $c_2$ ).

$$c_1 \text{ mmol mL}^{-1} = \frac{OT}{\varepsilon \times l} = \frac{2,086}{4600 \times 1} = 4,53 \times 10^{-4} \text{ M} = 453$$

$$c_2 \text{ mmol mL}^{-1} = \frac{OT}{\varepsilon \times l} = \frac{5,733}{4600 \times 1} = 1,25 \times 10^{-3} \text{ M} = 1250$$

Apskaičiuoti fermento aktyvumo vienetai, skaidant PGA ( $U_1$ ) ir pektiną ( $U_2$ ):

$$U_1 \text{ mmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1} = \frac{c_1}{t} = \frac{453}{180} = 2,52$$

$$U_2 \text{ mmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1} = \frac{c_2}{t} = \frac{1250}{180} = 6,94$$

Taip pat, naudojantis Bradford'o metodu gauta baltymų koncentracijos verte, paskaičiuoti savitieji aktyvumai. Jie išreikšti aktyvumo vienetais U miligrame baltymo:

$$U_1 \text{ mg}^{-1} = \frac{\Delta OT_{235}}{4,6 \times m_b} = \frac{1,159 \times 10^{-2}}{4,6 \times 0,15} = 0,023$$

$$U_2 \text{ mg}^{-1} = \frac{\Delta OT_{235}}{4,6 \times m_b} = \frac{3,185 \times 10^{-2}}{4,6 \times 0,15} = 0,462$$

Visų aktyvumų skaičiavimų rezultatai apibendrintai pateikti **5 lentelėje**.

### 3.4. Hidrolazių nustatymas

Hidrolazinis aktyvumas *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 fermentiniame tirpale matuotas naudojant DNS reagentą. Substratais naudoti PGA ir pektinas, inkubuota 1 val. 60 °C temperatūros sąlygomis. Reakcijos, kurioje substratas buvo pektinas, gautas OT<sub>540</sub> lygus 0,314. Susidariusios galakturono rūgšties koncentracija (c<sub>3</sub>) apskaičiuota remiantis kalibracinės kreivės lygtimi:

$$c_3 \text{ mg mL}^{-1} = \frac{OT_{540} + 0,155}{1,515} = \frac{0,314 + 0,155}{1,515} = 0,31$$

Galakturono rūgšties koncentracija perskaičiuota mg mL<sup>-1</sup>:

$$n \text{ mmol mL}^{-1} = \frac{0,31}{194} = 1,59 \times 10^{-3}$$

Apskaičiuoti fermentinio aktyvumo vienetai U (mmol mL<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>):

$$U_3 \text{ mmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1} = \frac{c_3}{t} = \frac{1,59 \times 10^{-3}}{60} = 2,663 \times 10^{-5}$$

Taip pat skaičiuotas savitasis aktyvumas U miligramame baltymo:

$$U_3 \text{ mg}^{-1} = \frac{2,663 \times 10^{-5}}{0,15} = 1,775 \times 10^{-4}$$

Hidrolazinio aktyvumo skaičiavimų rezultatai pateikti **5 lentelėje**.

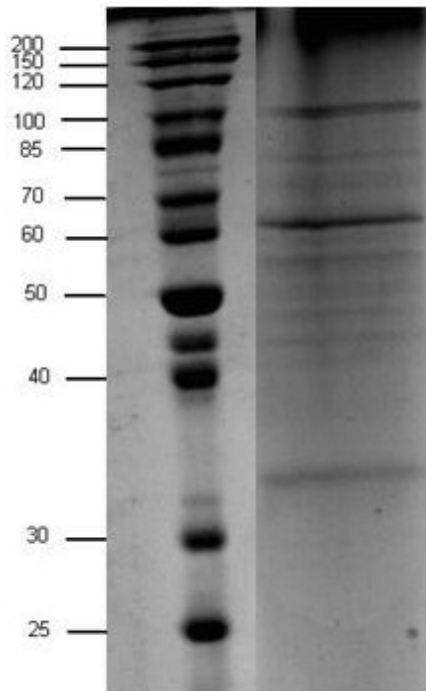
**5 lentelė.** Fermentinio aktyvumo skaičiavimų rezultatai.

| Fermentas         | Reakcijos produkto koncentracija c, mmol mL <sup>-1</sup> | Fermentinis aktyvumas vienetais μU mmol mL <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> | Savitasis aktyvumas vienetais μU mg <sup>-1</sup> |
|-------------------|---|--|---|
| PGA liazė         | 453   | 2 520 000  | 23 000  |
| Pektino liazė     | 1 250   | 6 950 000  | 462 000   |
| Pektino hidrolazė | 0,31  | 26,63  | 177,5   |

### 3.5. Elektroforetinė pektinolizinių fermentų charakteristika

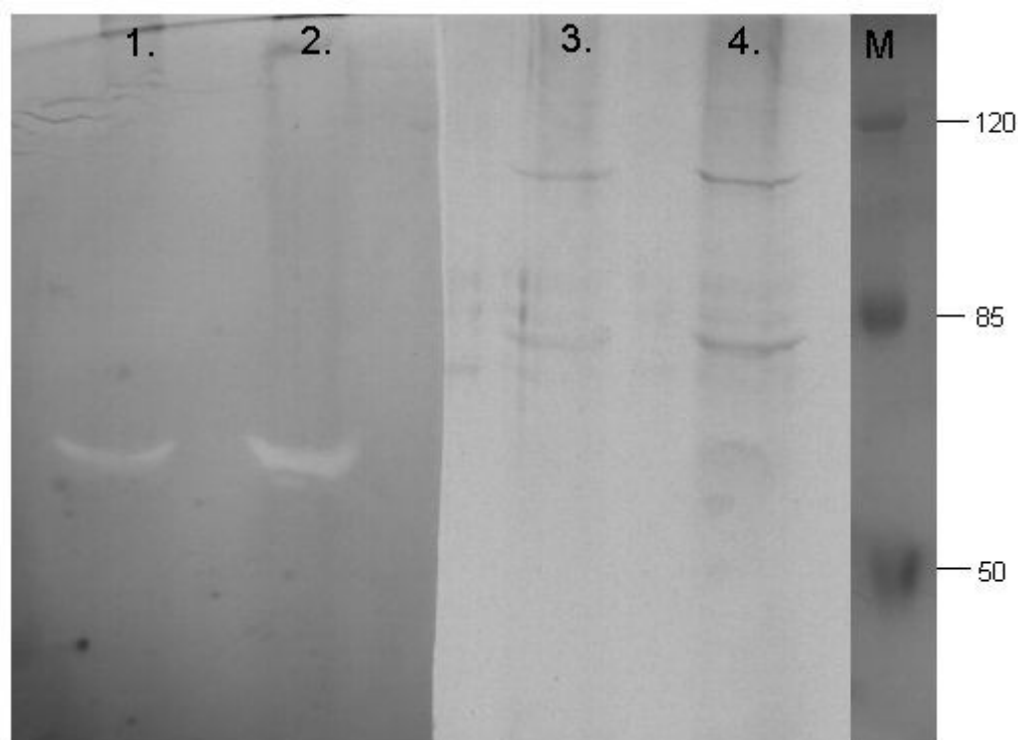
Gelio elektroforezės metodu nustatytas *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 kultūrinio skysčio grubaus fermentinio tirpalo baltymų profilis (**17 pav.**).

Naudotas baltymų aktyvumo nustatymo gelyje metodas, paremtas substratų (pektino arba poligalakturono rūgšties) įpolimerinimu į poliakrilamidinį gelį. Elektroforezės metu gelyje pagal molekulinę masę pasiskirstę baltymai inkubuojami. Nudažius gelį specifiniu polisacharidams dažu, matomos šviesesnės zonos ties baltymų, hidrolizuojančių substratą, juostele. Tokiu būdu buvo siekiama nustatyti, ar apskritai fermentiniame tirpale yra pektinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų, kiek jų ir kokios jų molekulinės masės. Taip pat tirta redukuojančių sąlygų, pH bei temperatūros įtaka šių fermentų aktyvumui.



**17 pav.** *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 sekre-tuojamų baltymų frakcijos profilis poliakrilamidiniame gelyje (dešinėje; kairėje – molekulinės masės žymuo Unstained Protein Molecular Weight Marker (frag-mentų molekulinė masė pateikta kDa)

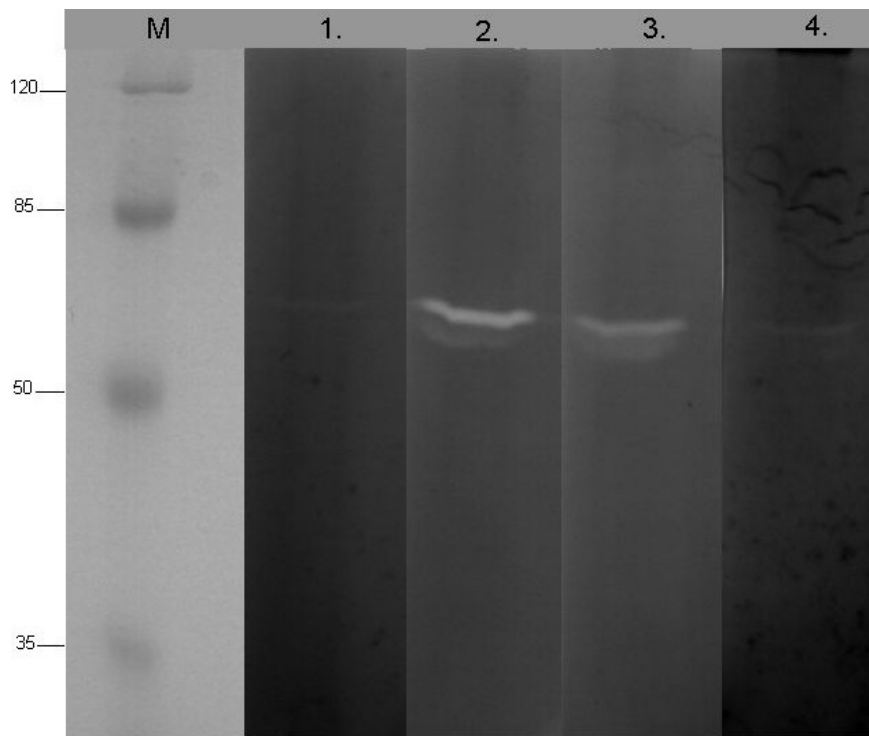
Visų pirma nustatyta, jog tiriamas *Geobacillus* sp. kamienas Nr. 3 sekretuoja vieną pektinoliziniu aktyvumu pasižymintį fermentą, kurio aktyvumo redukuojančios elektroforezės sąlygos nesumažino (**18 pav.**). Šio baltymo molekulinė masė, spėjama, yra apie 60-70 kDa, tačiau baltymo juostelė dėl per mažos koncentracijos gelyje neišryškėjo.



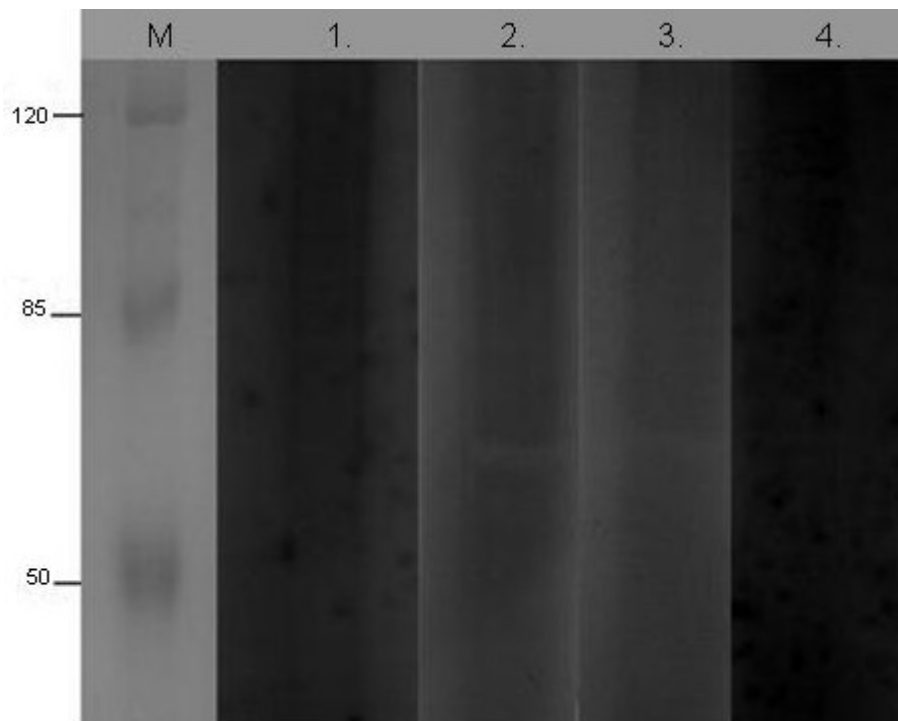
**18 pav.** *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 pektininius polisacharidus degraduojančių fermentų nustatymas. (Baltymų frakcija neredukuojančiomis (3.) ir redukuojančiomis (4.) sąlygomis; PGA degraduojančių fermentų nustatymas neredukuojančiomis (1.) ir redukuojančiomis (2.) sąlygomis (inkubuota 1 val. esant 60 °C, pH 7.0); M – molekulinės masės žymuo Prestained Protein Molecular Weight Marker (fragmentų molekulinė masė pateikta kDa))

Tiriant pH įtaką *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 produkuojamam pektinoliziniam fermentui nustatyta, jog šis fermentas efektyviausiai degraduoja tiek PGA, tiek pektiną esant neutraliam pH. Prie pH 8.0 stebimas kiek mažesnis aktyvumas. Tuo tarpu esant pH 6.0 ir pH 9.5 PGA degraduojama daug lėčiau, o gelyje su pektinu po 2 val. inkubavimo neišryškėjo jokios fermento aktyvumą įrodančios zonos (**19** ir **20 pav.**).

Po dažymo išanalizavus gelį, į kurį buvo įpolimerintas PGA, nustatyta, jog *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 pektininius polisacharidus degraduojančio fermento aktyvumas didžiausias buvo inkubuojant 60 °C temperatūros sąlygomis. Esant 50 °C temperatūrai buvo stebima kiek siauresnė degraduoto substrato zona, o 70 °C temperatūros sąlygomis aktyvumas buvo mažiausias (**21 pav.**). Gelyje su pektinu po 2,5 val. inkubavimo gautos daugmaž vienodo aktyvumo zonos nepriklausomai nuo to, kokiomis temperatūrinėmis sąlygomis buvo vykdoma reakcija (**22 pav.**).

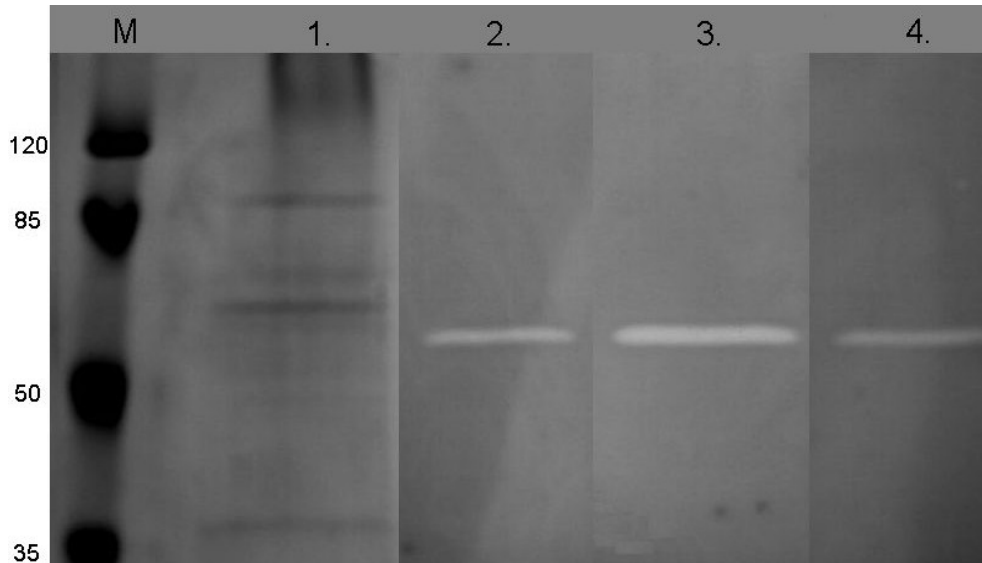


**19 pav.** pH įtaka *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 PGA degraduojančiam fermentui. Inkubuota 2 val. esant: 1. pH 6.0; 2. pH 7.0; 3. pH 8.0; 4. pH 9.5; M – molekulinės masės žymuo Prestained Protein Molecular Weight Marker (fragmentų molekulinė masė pateikta kDa)

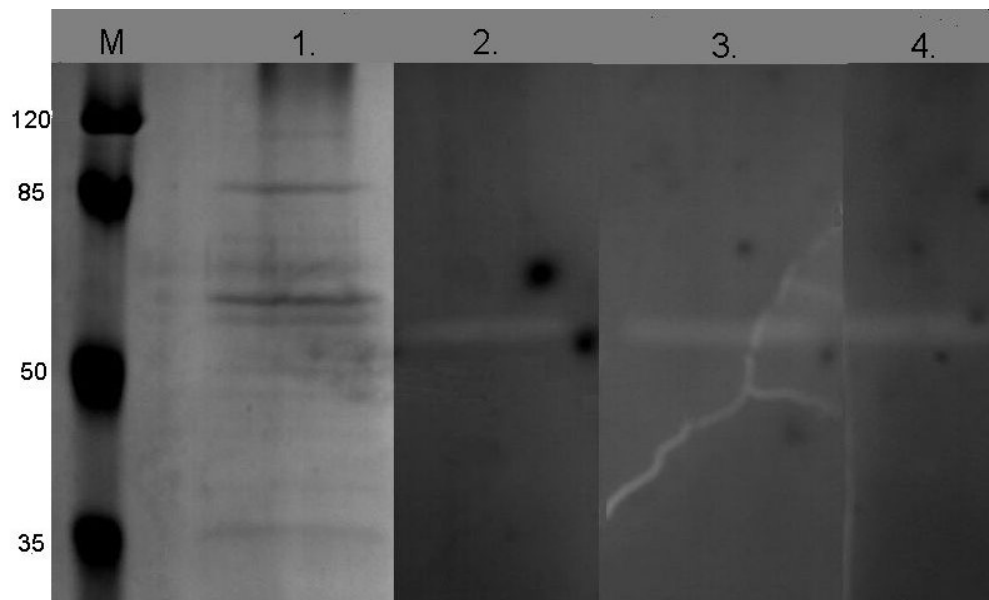


**20 pav.** pH įtaka *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 pektiną degraduojančiam fermentui. Inkubuota 2 val. esant: 1. pH 6.0; 2. pH 7.0; 3. pH 8.0; 4. pH 9.5; M – molekulinės masės žymuo Prestained Protein Molecular Weight Marker (fragmentų molekulinė masė pateikta kDa)





**21 pav.** Temperatūros įtaka *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 PGA degraduojančiam fermentui. 1. Baltymų frakcija; Inkubuota 1,5 val. esant: 2. 50 °C; 3. 60 °C; 4. 70 °C; M – molekulinės masės žymuo Prestained Protein Molecular Weight Marker (fragmentų molekulinė masė pateikta kDa)



**22 pav.** Temperatūros įtaka *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 pektiną degraduojančiam fermentui. 1. Baltymų frakcija; Inkubuota 2,5 val. esant: 2. 50 °C; 3. 60 °C; 4. 70 °C; M – molekulinės masės žymuo Prestained Protein Molecular Weight Marker (fragmentų molekulinė masė pateikta kDa)

#### 4. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Pektinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai pirmą kartą buvo nustatyti apie 1960 metus *Bacillus* sp. ir *Erwinia* sp. genčių bakterijose (Nagel and Vaughn 1961; Starr and Moran 1962). Daugiau nei po dvidešimties metų literatūroje pasirodė duomenys apie termofilinių mikroorganizmų produkuojamus fermentus, degraduojančius pektininius polisacharidus (Shink and Zeikus 1983; Stutzenberger 1987). Šie termostabilumu pasižymintys fermentai įgavo platesnį pramoninį pritaikomumą.

Tęsiant šią daug dėmesio mokslo pasaulyje sulaukusią termostabilių pektinolizinių fermentų tyrimų temą, magistrinis darbas pradėtas nuo Vilniaus universiteto Mikrobiologijos ir Biotechnologijos katedros kolekcijos dalies (t.y. 72 termofilinių endosporas formuojančių izoliatų) bei 8 izoliatų, išskirtų iš komposto pavyzdžių, pektinolizinio aktyvumo nustatymo. Atlikus atranką, kurios metu vertintas mikroorganizmų augimo intensyvumas skystoje pektino terpėje, pasirinkti 2 kamieniai. Atlikus šių kamienų 16S rRNR geno sekų analizę, nustatyta, jog jie giminingi *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. Tiriama kamieniai pavadinti *Geobacillus* sp. kamienas Nr. 3 ir *Geobacillus* sp. kamienas Nr. 4.

Tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas *Geobacillus* sp. kamienas Nr. 3, pasižymėjęs intensyviausiu augimu skystoje pektino terpėje bei greičiausiai pereinavęs iš eksponentinio į stacionaraus augimo fazę. Pastaroji kamieno ypatybė patogi tuo, jog sutrumpina eksperimentinių darbų trukmę.

Iš *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 kultūrinio skysčio suminis baltyminis tirpalas gautas baltymus išsodinant amonio sulfatu. Šis metodas dažnai taikomas baltymų išskyrimui (Hatada, Kobayashi et al. 2001; Kluskens, van Alebeek et al. 2003). Šiuo atveju buvo naudotas 50 % amonio sulfato įsotinimo laipsnis.

Pirmiausia buvo tiriama, ar šiame tirpale esantys baltymai pasižymi pektinoliziniu aktyvumu. Nustatytas liazinis aktyvumas dviems pektiniams polisacharidams: PGA ir pektinui. Taip pat tirtas fermentų termostabilumas skirtingų temperatūrų sąlygomis. Optimaliausia temperatūra liažėms skaidant abu substratus buvo 60 °C laipsnių; 40, 50 ir 70 °C temperatūrų sąlygomis aktyvumas buvo mažesnis. Tiriant hidrolazinį aktyvumą paaiškėjo, jog fermentiniame tirpale esama hidrolazės, kuri hidrolizuoja tik pektiną. Tačiau lyginant su liaziniu, hidrolazinis aktyvumas gautas labai mažas.

Pektininius polisacharidus skaidančių fermentų aktyvumas buvo tiriamas ir elektroforezės geliuose, į kuriuos atskirai įpolimerinta PGA arba pektinas. Po inkubavimo 60 °C laipsnių sąlygomis abejose geliuose gautos aiškios šviesesnės zonos ties fermento, skaidančio substratą, juostele. Sulyginus su baltyminiu žymeniu, nustatyta fermento ~60-70 kDa molekulinė masė. Yra žinoma, jog kitų termofilinių bakterijų pektinazių molekulinė masė svyruoja nuo 20 iki 100 kDa (2 lentelė). Tačiau, pavyzdžiui, dauguma *Bacillus* genties bakterijų produkuoja mažesnės molekulinės masės pektinazes (Karbassi and Vaughn 1980; Hatada, Kobayashi et al. 2001; Berensmeier, Singh et al. 2004). Literatūroje esama duomenų, jog šie fermentai gali būti sudaryti iš keleto baltyminių subvienetų (Kozianowski, Canganella et al. 1997; Kluskens, van Alebeek et al. 2003), tuo tarpu šiame darbe tai nenustatinėta.

Elektroforezės gelių metodu buvo tiriamas redukuojančių sąlygų poveikis pektino ir PGA liazei, tačiau aktyvumas dėl šio poveikio nesumažėjo.

Analizuojamų pektinolizinių fermentų termostabilumas buvo įvertinamas elektroforezės geli su į jį įpolimerinta PGA arba pektinu inkubuojant skirtingų temperatūrų (50, 60 ir 70 °C) sąlygomis. Po šio eksperimento buvo gauti beveik tokie pat rezultatai kaip ir nustatant liazinių aktyvumą, kai po fermentinio ir substratinio tirpalų inkubavimo viename reakcijos mišinyje buvo matuojamas OT<sub>235</sub>.

Šiuo atveju po dažymo išanalizavus gelį su PGA, nustatyta, jog *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 pektinazės aktyvumas didžiausias buvo inkubuojant 60 °C temperatūros sąlygomis. Esant 50 °C temperatūrai buvo stebima kiek siauresnė degraduoto substrato zona, o 70 °C temperatūros sąlygomis stebėtas aktyvumas buvo mažiausias. Gelyje su pektinu po 2,5 val. inkubavimo gautos daugmaž vienodo aktyvumo zonos nepriklausomai nuo to, kokiomis temperatūrinėmis sąlygomis buvo vykdoma reakcija. Tačiau vizualus gelyje matomų zonų vertinimas nėra toks tikslus kaip OT matavimas. Tikėtina, jog prailginus gelio su pektinu inkubavimo laiką, rezultatai būtų gauti tokie pat kaip ir matuojant optinį tankį.

Tiriant pH įtaką buvo nustatyta, jog *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 pektinazė efektyviausiai PGA ir pektiną skaido esant pH 7.0. Kiek mažesnis aktyvumas stebėtas prie pH 8.0. Tuo tarpu kai pH 6.0 ir pH 9.5, PGA buvo degraduojama daug lėčiau, o gelyje su pektinu po 2 val. inkubavimo nebuvo matyti jokių fermento aktyvumo požymių. Apskritai kalbant apie bakterines pektinazės reikėtų paminėti, jog dauguma jų yra aktyvios šarminėje aplinkoje (Miyairi, Ogasawara et al. 2004; Soriano, Diaz et al. 2005; Xiao, Bergeron et al. 2008).

Taigi *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 PGA ir pektino liazė didžiausiu aktyvumu pasižymi esant 60 °C temperatūros ir pH 7.0 sąlygoms. Tuo tarpu, pavyzdžiui, *Geobacillus stearothermophilus* pektino liazei yra reikalinga 70 °C temperatūra ir pH 9.0, be to šios pektino liazės molekulinė masė tik 20 kDa (Karbassi and Vaughn 1980).

Apibendrinant *Geobacillus* sp. kamieno Nr. 3 pektinolizinių fermentų tyrimo rezultatus, galima teigti, jog šis kamienas sekretuoja du fermentus: *liazė*, kuri geba degraduoti du pektininius substratus – PGA ir pektiną. Šio fermento 60-70 kDa molekulinė masė nustatyta gelio elektroforezės metodu; ir *pektino hidrolazė*, kuri nustatyta naudojant DNS reagentą. Šios pektinazės aktyvumas gelyje, manoma, neišryškėjo tiek dėl per mažos fermento koncentracijos, tiek dėl per mažo aktyvumo. Dėl šių priežasčių minėtas fermentas detaliau nebuvo tirtas.

## IŠVADOS

1. Iš 80 termofilinių endosporas formuojančių bakterijų izoliatų, atrinkti du kamienai (Nr. 3 ir Nr. 4.), pasižymėję didžiausiu pektinoliziniu aktyvumu. Analizuojant 16S rRNR geno seką, nustatytas šių kamienų giminingumas *Geobacillus thermodenitrificans* rūšiai.
2. *Geobacillus sp.* kamieno Nr. 3 kultūrinio skysčio sudėtyje esantiems fermentams būdingas PGA ir pektino liazinis bei pektino hidrolazinis aktyvumai.
3. Remiantis baltymų aktyvumo nustatymo gelyje metodu, identifikuota viena *Geobacillus sp.* kamieno Nr. 3 sekretuojama ~60-70 kDa liazė, kuri geba degraduoti PGA ir pektiną tiek redukuojančiomis, tiek neredukuojančios sąlygomis. Šio fermento didžiausias aktyvumas nustatytas esant 60 °C temperatūrai ir pH 7.0.

VILNIUS UNIVERSITY  
FACULTY OF NATURAL SCIENCES  
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Raimonda Petkauskaitė

**THERMOSTABLE PECTIN-DEGRADING ENZYMES:  
ANALYSIS OF PECTINOLYTIC ACTIVITY OF SOME GEOBACILLUS**

Master thesis

Summary

Plants, bacteria and fungi are known to synthesize pectic polysaccharides degrading enzymes called pectinases. These enzymes are important for plant growth and development, fruit ripening, phytopathogenesis *etc.*

The aim of this study was to select biotechnologically important strains of endospore-forming bacteria with the highest pectinolytic activity as well as characterize pectinolytic enzymes from the crude protein extract.

8 out of 80 tested strains were selected for the experiments of growth curve measurement. PCR and 16S rRNA gene sequence analysis ascertained that two pectinolytic strains with the highest activity are closely related to *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. Accordingly, these two strains were named *Geobacillus* sp. strain No. 3 and No. 4. Further analysis was performed with *Geobacillus* sp. strain Nr. 3 which was grown in the liquid medium with pectin. The crude protein extract was prepared using supernatant of the culture and then analysed spectrophotometrically for lyases and hydrolases activity, pectic substrates specificity, and thermostability. For further examinations electrophoretic and zymografic analyses were used.

It was demonstrated that *Geobacillus* sp. strain No. 3 secretes at least two enzymes: pectin and polygalacturonic acid lyase and pectin hydrolase. For lyase, molecular mass (60-70 kDa), temperature optimum (60 °C) and pH optimum (7.0) were determined.

## **PADEKA**

Noriu padėkoti magistrinio darbo vadovei dr. Nomedai Kuisienei už pasitikėjimą, suteiktą galimybę tobulėti ir dirbti šį mokslinį darbą bei nuoširdžią pagalbą klaidžiojant mokslo labirintuose.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Alana, A., I. Alkorta, et al. (1990). Pectin Lyase Activity in a *Penicillium italicum* Strain. *Appl Environ Microbiol* 56(12): 3755-3759.
2. Albersheim, P., A. Darvill, et al. (1996). An hypothesis; the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. *Pectins and Pectinases*: 47-55.
3. Antranikian, G., W. N. Konings, et al. (1996). Extremophiles. *FEMS Microbiol Rev* 18: 89-285.
4. Bagdonienė, L., V. Bendikienė, et al. (2006). *Biochemijos laboratoriniai darbai*. Vilniaus Universitetas. Biochemijos ir biofizikos katedra. .
5. Bekri, M. A., J. Desair, et al. (1999). *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. *J Bacteriol* 181(8): 2440-2447.
6. Berensmeier, S., S. A. Singh, et al. (2004). Cloning of the *pelA* gene from *Bacillus licheniformis* 14A and biochemical characterization of recombinant, thermostable, high-alkaline pectate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol* 64(4): 560-567.
7. Brown, I. E., M. H. Mallen, et al. (2001). Pectate lyase 10A from *Pseudomonas cellulosa* is a modular enzyme containing a family 2a carbohydrate-binding module. *Biochem J* 355(Pt 1): 155-165.
8. Bruhlmann, F. (1995). Purification and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp. *Appl Environ Microbiol* 61(10): 3580-3585.
9. Bruhlmann, F., K. S. Kim, et al. (1994). Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Appl Environ Microbiol* 60(6): 2107-2112.
10. Cao, J., L. Zheng, et al. (1992). Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of rammie. *Enzyme and Microbial Technology* 14: 1013-1016.
11. Carpita, N. C. (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445-476.
12. Carpita, N. C. and D. M. Gibeaut (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3(1): 1-30.
13. Chanliaud, E. and M. J. Gidley (1999). In vitro synthesis and properties of pectin *Acetobacter xylinus* cellulose composites. *Plant J* 20(1): 25-35.
14. Chatterjee, A. K., G. E. Buchanan, et al. (1979). Synthesis and excretion of polygalacturonic acid trans-eliminase in *Erwinia*, *Yersinia*, and *Klebsiella* species. *Can J Microbiol* 25(1): 94-102.
15. Cosgrove, D. J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 391-417.
16. Crawford, M. S. and P. E. Kolattukudy (1987). Pectate lyase from *Fusarium solani* f. sp. *pisi*: purification, characterization, in vitro translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity. *Arch Biochem Biophys* 258(1): 196-205.
17. Dave, B. A. and R. H. Vaughn (1971). Purification and properties of an polygalacturonic acid trans-eliminase produced by *Bacillus pumilus*. *J Bacteriol* 108(1): 166-174.
18. Doco, T., P. Williams, et al. (1997). Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydr Res* 297(2): 181-186.
19. Domingo, C., K. Roberts, et al. (1998). A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible. *Plant J* 13(1): 17-28.
20. Dosanjh, N. S. and G. S. Hoondal (1996). Production of constitutive, thermostable, hyper active exo-pectinase from *Bacillus* CK-8. *Biotechnology letters* 18(12): 1435-1438.
21. Edashige, Y. and T. Ishii (1998). Hemicellulosic polysaccharides from bamboo shoot cell-walls. *Phytochemistry* 49(6): 1675-1682.
22. Fleischer, A., M. A. O'Neill, et al. (1999). The Pore Size of Non-Graminaceous Plant Cell Walls Is Rapidly Decreased by Borate Ester Cross-Linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol* 121(3): 829-838.



23. Gardner, J. M. and C. I. Kado (1976). Polygalacturonic Acid *trans*-Eliminase in the Osmotic Shock Fluid of *Erwinia rubrifaciens*: Characterization of the Purified Enzyme and Its Effect on Plant Cells. *J Bacteriol* 127(1): 451-460.
24. Godfrey, A. (1985). Production of industrial enzymes and some applications in fermented foods. *Microbiology of Fermented Foods* 1: 345-373.
25. Godfrey, T. and S. West (1996). Introduction to industrial enzymology. *Industrial Enzymology*: 1-17.
26. Harley, J. P., L. M. Prescott, et al. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology*.-McGraw Hill.-. 5th ed.:58.
27. Hatada, Y., N. Higaki, et al. (1999). Cloning and sequencing of a high-alkaline pectate lyase gene from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Biosci Biotechnol Biochem* 63(6): 998-1005.
28. Hatada, Y., T. Kobayashi, et al. (2001). Enzymatic properties of the highly thermophilic and alkaline pectate lyase Pel-4B from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain P-4-N and the entire nucleotide and amino acid sequences. *Extremophiles* 5(2): 127-133.
29. Holbom, B., R. Ekman, et al. (1991). Chemical changes in peroxide bleaching of mechanical pulps. *Das Papier* A 45(10): V16-V22.
30. Horikoshi, K. (1990). Enzymes of alkalophiles. *Microbial Enzymes and Biotechnology*: 275-294.
31. Horn, D. and F. Linhart (1996). Retention aids. *Paper Chemistry*: 64-82.
32. <http://pec.biodbs.info/Applications.htm>.
33. <http://pec.biodbs.info/listofMicroorganisms.html>.
34. <http://www.cazy.org/>.
35. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.
36. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html>.
37. Ishii, T. (1997). O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiol* 113(4): 1265-1272.
38. Ishii, T., T. Matsunaga, et al. (1999). The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J Biol Chem* 274(19): 13098-13104.
39. Yadav, P. K., V. K. Singh, et al. (2009). In silico analysis of pectin lyase and pectinase sequences. *Biochemistry (Mosc)* 74(9): 1049-1055.
40. Yoshitake, S., T. Numata, et al. (1994). Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77(4): 370-375.
41. Kapoor, M., Q. K. Beg, et al. (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 fibres. *Process Biochemistry* 36: 803-807.
42. Karbassi, A. and R. H. Vaughn (1980). Purification and properties of polygalacturonic acid *trans*-eliminase from *Bacillus stearothermophilus*. *Can J Microbiol* 26(3): 377-384.
43. Kashyap, D. R., S. Chandra, et al. (2000). Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 277-282.
44. Kashyap, D. R., P. K. Vohra, et al. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol* 77(3): 215-227.
45. Klug-Santner, B. G., W. Schnitzhofer, et al. (2006). Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. *J Biotechnol* 121(3): 390-401.
46. Kluskens, L. D., G. J. van Alebeek, et al. (2003). Molecular and biochemical characterization of the thermoactive family 1 pectate lyase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochem J* 370(Pt 2): 651-659.
47. Kluskens, L. D., G. J. van Alebeek, et al. (2005). Characterization and mode of action of an exopolygalacturonase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS J* 272(21): 5464-5473.
48. Knox, J. P. (1997). The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *Int Rev Cytol* 171: 79-120.
49. Kobayashi, M., T. Matoh, et al. (1996). Two Chains of Rhamnogalacturonan II Are Cross-Linked by Borate-Diol Ester Bonds in Higher Plant Cell Walls. *Plant Physiol* 110(3): 1017-1020.

50. Kobayashi, T., Y. Hatada, et al. (1999a). Enzymatic properties and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Biochim Biophys Acta* 1427(2): 145-154.
51. Kobayashi, T., K. Koike, et al. (1999). Purification and properties of a low-molecular-weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63(1): 65-72.
52. Koziánowski, G., F. Canganella, et al. (1997). Purification and characterization of thermostable pectate-lyases from a newly isolated thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter italicus* sp. nov. *Extremophiles* 1(4): 171-182.
53. Liao, C. H., W. Fett, et al. (2006). Detection and sequence analysis of an altered pectate lyase gene in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and related bacteria. *Can J Microbiol* 52(11): 1051-1059.
54. Liao, C. H., H. Y. Hung, et al. (1988). An Extracellular Pectate Lyase is the Pathogenicity Factor of the Soft-Rotting Bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1(5): 199-206.
55. Liao, C. H. and J. M. Wells (1986). Properties of *Cytophaga johnsonae* strains causing spoilage of fresh produce at food markets. *Appl Environ Microbiol* 52(6): 1261-1265.
56. Liberman, M., S. Mutaftschiev, et al. (1999). Mung bean hypocotyl homogalacturonan: localization, organization and origin. *Ann. Bot.* 84: 225-233.
57. Longland, J. M., S. C. Fry, et al. (1989). Developmental Control of Apiogalacturonan Biosynthesis and UDP-Apiose Production in a Duckweed. *Plant Physiol* 90(3): 972-976.
58. Macmillan, J. D. and R. H. Vaughn (1964). Purification and properties of a polygalacturonic acid-trans-eliminase produced by *Clostridium multifermentans*. *Biochemistry* 3: 564-572.
59. Matoh, T. and M. Kobayashi (1998). Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectin polysaccharides in higher plant cell walls. *J. Plant Res.* 111: 179-190.
60. Miyairi, K., A. Ogasawara, et al. (2004). Low-Molecular-Weight Pectate Lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*. *J Appl Glycosci* 51: 1-7.
61. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31(426-429).
62. Minussi, R. C., M. C. Baracat-Pereira, et al. (1997). Methylxanthines as inducers of pectin lyase in *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. *Appl Microbiology* 24(5): 369-372.
63. Nagel, C. W. and R. H. Vaughn (1961). The characteristics of a polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*. *Arch Biochem Biophys* 93: 344-352.
64. Nasser, W., F. Chalet, et al. (1990). Purification and characterization of extracellular pectate lyase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie* 72(9): 689-695.
65. Nasuno, S. and M. P. Starr (1967). Polygalacturonic Acid *trans*-Eliminase of *Xanthomonas campestris*. *Biochem J* 104: 178-185.
66. Niranján, R. R. and S. A. Dhala (1981). Endo polygalacturonase lyase of *Streptomyces thermovulgaris* CR42. *J. Food Sci. Technology* 18: 171-175.
67. Nothnagel, E. A. (1997). Proteoglycans and related components in plant cells. *Int Rev Cytol* 174: 195-291.
68. O'Neill, M. A., D. Warrenfeltz, et al. (1996). Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *J Biol Chem* 271(37): 22923-22930.
69. Olsson, L., T. M. Christensen, et al. (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 612-619.
70. Payasi, A., P. C. Misra, et al. (2006). Purification and characterization of pectate lyase from banana (*Musa acuminata*) fruits. *Phytochemistry* 67(9): 861-869.
71. Pauly, M. and H. V. Scheller (2000). O-Acetylation of plant cell wall polysaccharides: identification and partial characterization of a rhamnogalacturonan O-acetyl-transferase from potato suspension-cultured cells. *Planta* 210(4): 659-667.
72. Rao, M. N., A. A. Kembhavi, et al. (1996). Role of lysine, tryptophan and calcium in the beta-elimination activity of a low-molecular-mass pectate lyase from *Fusarium moniliformae*. *Biochem J* 319 (Pt 1): 159-164.
73. Reid, I. I. and M. Ricard (2000). Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. *Enzyme Microb Technol* 26(2-4): 115-123.

74. Renard, C. M., M. J. Crepeau, et al. (1999). Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. *Eur J Biochem* 266(2): 566-574.
75. Renard, C. M., R. M. Weightman, et al. (1997). The xylose-rich pectins from pea hulls. *Int J Biol Macromol* 21(1-2): 155-162.
76. Ridley, B. L., M. A. O'Neill, et al. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57(6): 929-967.
77. Rogers, L. M., Y. K. Kim, et al. (2000). Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17): 9813-9818.
78. Rosenberg, I. M. (2004). Electroforesis Technigues. In *Protein Analysis and Purification. Benchtop Techniques*. 2th ed.-Birkhäuser.-Boston. : 63-117.
79. Sakai, T., T. Sakamoto, et al. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications. *Adv Appl Microbiol* 39: 213-294.
80. Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). *Molecular cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Vol. 1, 2, 3: 85-89.
81. Sato, M. and A. Kaji (1975). Purification and properties of pectate lyase produced by *Streptomyces fradiae* IFO3439. *Agric. Biol. Chem.* 39: 819-824.
82. Schols, H. A. and A. G. J. Voragen (1996). Complex pectins: Structure elucidation using enzymes. *Pectins and pectinases. Progress in Biotechnology*. Vol. 14: 3-19.
83. Shink, B. and J. G. Zeikus (1983). Characterization of pectinolytic enzymes of *Clostridium thermosulfurogenes*. *FEMS Microbiol Lett* 17: 295-298.
84. Si Si, H., T. Kikuta, et al. (2006). Enzymatic properties of two catalytic modules of *Clostridium stercoarium* pectate lyase Pel9A. *Biosci Biotechnol Biochem* 70(3): 667-671.
85. Simpson, S. D., D. A. Ashford, et al. (1998). Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology* 8(6): 579-583.
86. Soriano, M., A. Blanco, et al. (2000). An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. *Microbiology* 146 ( Pt 1): 89-95.
87. Soriano, M., P. Diaz, et al. (2005). Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin. *Curr Microbiol* 50(2): 114-118.
88. Soriano, M., P. Diaz, et al. (2006). Pectate lyase C from *Bacillus subtilis*: a novel endo-cleaving enzyme with activity on highly methylated pectin. *Microbiology* 152(Pt 3): 617-625.
89. Spinnler, H. E., B. Lavigne, et al. (1986). Pectinolytic activity of *Clostridium thermocellum*: Its use for anaerobic fermentation of sugar beet pulp. *Appl Microbiol Biotechnol* 23: 434-437.
90. Starr, M. P. and F. Moran (1962). Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot bacteria. *Science* 135: 920-921.
91. Stutzenberger, F. J. (1987). Inducible thermoalkalophilic polygalacturonate lyase from *Thermomonospora fusca*. *J Bacteriol* 169(6): 2774-2780.
92. Sukhumsirchart, W., S. Kawanishi, et al. (2009). Purification, characterization, and overexpression of thermophilic pectate lyase of *Bacillus* sp. RN1 isolated from a hot spring in Thailand. *Biosci Biotechnol Biochem* 73(2): 268-273.
93. Tahiri, M., P. Pellerin, et al. (2000). The rhamnogalacturonan-II dimer decreases intestinal absorption and tissue accumulation of lead in rats. *J Nutr* 130(2): 249-253.
94. Takao, M., T. Nakaniwa, et al. (2000). Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(11): 2360-2367.
95. Takao, M., T. Nakaniwa, et al. (2001). Molecular cloning, DNA sequence, and expression of the gene encoding for thermostable pectate lyase of thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(2): 322-329.
96. Tamaru, Y. and R. H. Doi (2001). Pectate lyase A, an enzymatic subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7): 4125-4129.
97. Tanabe, H., K. Yoshihara, et al. (1987). Pretreatment of pectic wastewater from orange canning process by an alkalophilic *Bacillus* sp. *J. Fermentation Technol.* 65(2): 243-246.

98. Tardy, F., W. Nasser, et al. (1997). Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *J Bacteriol* 179(8): 2503-2511.
99. Thornton, J., R. Ekman, et al. (1994). Polysaccharides dissolved from Norway Spruce in thermomechanical pulping and peroxide bleaching. *J. Wood Chem. Technol.* 14(2): 159-175.
100. Van Gijsegem, F. (1986). Analysis of the Pectin-degrading Enzymes Secreted by Three Strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of General Microbiology* 132: 617-624.
101. Vidal, S., T. Doco, et al. (2000). Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydr Res* 326(4): 277-294.
102. Walker, M. J. and J. M. Pemberton (1987). Construction of a transposon containing a gene for polygalacturonate *trans*-eliminase from *Klebsiella oxytoca*. *Arch Microbiol* 146: 390-395.
103. Walker, S. G. and M. E. Ryan (2003). Cloning and expression of a pectate lyase from the oral spirochete *Treponema pectinovorum* ATCC 33768. *FEMS Microbiol Lett* 226(2): 385-390.
104. Wattad, C., A. Dinoor, et al. (1994). Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. *Mol Plant Microbe Interact* 7(2): 293-297.
105. Wen, F., Y. Zhu, et al. (1999). Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell* 11(6): 1129-1140.
106. West, S. (1996). Olive and other edible oils. *Industrial Enzymology*: 293-300.
107. Whitaker, J. R. (1991). Microbial pectolytic enzymes. *Applied Science*: 133-176.
108. Wiegel, J., L. G. Ljungdahl, et al. (1979). Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J Bacteriol* 139(3): 800-810.
109. Willats, W. G., G. Limberg, et al. (2000a). Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydr Res* 327(3): 309-320.
110. Willats, W. G., L. McCartney, et al. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47(1-2): 9-27.
111. Xiao, Z., H. Bergeron, et al. (2008). Improvement of the Thermostability and Activity of a Pectate Lyase by Single Amino Acid Substitutions, Using a Strategy Based on Melting-Temperature-Guided Sequence Alignment. *Appl Environ Microbiol* 74(4): 1183-1189.
112. Zhai, C., J. Cao, et al. (2003). Cloning and expression of a pectate lyase gene from *Bacillus alcalophilus* NTT33. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 173-178.
113. Zhan, D., P. Janssen, et al. (1998). Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of citrus pectin. *Carbohydr Res* 308(3-4): 373-380.
114. Zhao, Q., S. Yuan, et al. (2007). Expression, purification and characterization of pectate lyase A from *Aspergillus nidulans* in *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 1057-1064.
115. Zhuge, B., G. C. Du, et al. (2007). Efficient secretory expression of an alkaline pectate lyase gene from *Bacillus subtilis* in *E. coli* and the purification and characterization of the protein. *Biotechnol Lett* 29(3): 405-410.
116. Zucker, M. and L. Hankin (1970). Regulation of Pectate Lyase Synthesis in *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia carotovora*. *J Bacteriol* 104(1): 13-18.