

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Raimonda
PETKAUSKAITĖ

Heteropolisacharidus skaidančių fermentų atranka, charakterizavimas ir funkcinės svarbos analizė

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai
Biologija N 010

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2011-2016 metais (2011-2015 Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultete, vėliau Vilniaus universiteto Biomokslų institute, Gyvybės mokslų centre, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje). Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Disertacija ginama eksternu

Mokslinis vadovas – prof. dr. Nomedą Kuisienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **prof. habil. dr. Algimantas Paulauskas** (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Nariai:

prof. dr. Peter Czermak (Vidurinėsios Heseno žemės Taikomųjų mokslų universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005);

doc. dr. Eglė Lastauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010);

prof. dr. Elena Servienė (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, biologija, N 010);

prof. dr. Rimantas Venskutonis (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005).

Disertacija ginama viešame Biologijos mokslų krypties gynimo tarybos posėdyje 2020 m. gegužės mėn. 25 d. 11 val. Vilniaus universiteto, Gyvybės mokslų centro R101 auditorijoje (Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva).

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>.

VILNIUS UNIVERSITY

Raimonda
PETKAUSKAITĖ

Screening, characterization
and functionality analysis of
heteropolysaccharide degrading
enzymes

DOCTORAL DISSERTATION

Natural sciences
Biology N 010

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2011 and 2016 (2011-2015 in the Faculty of Natural Sciences, Vilnius University, 2015-2016 in the Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University). The research was supported by Research Council of Lithuania.

The dissertation is defended on an external basis.

Academic consultant – prof. dr. Nomeda Kuisienė (Vilnius university, Natural sciences, Biology, N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Vilnius University Council of Biology Sciences Dissertation Defence Panel:

Chairman – prof. habil. Dr. Algimantas Paulauskas (Vytautas Magnus University, Natural sciences, Biology, N 010).

Members:

prof. dr. Peter Czermak (University of Applied Sciences Mittelhessen, Technological sciences, Chemical Engineering, T 005);

doc. dr. Eglė Lastauskienė (Vilnius university, Natural sciences, Biology, N 010);

prof. dr. Elena Servienė (Nature research centre, Natural sciences, Biology, N 010);

prof. dr. Rimantas Venskutonis (Kaunas University of Technology, Technological sciences, Chemical Engineering, T 005).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Council of Biological Sciences Dissertation Defence Panel at 11 a.m. on 25th of May 2020 in the R101 Room at the Natural Sciences Center, Vilnius University, Saulėtekio ave. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

TURINYS

ĮVADAS	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Polisacharidus skaidančių fermentų nustatymo strategijos	13
1.2. Pululanas ir pululanazės	14
1.2.1. Pululanas – linijinis polisacharidas.....	14
1.2.2. Pululanoliziniai fermentai	16
1.3. Pektinas ir pektinazės	18
1.3.1. Pektinas – vienas heteropolisacharidų.....	18
1.3.2. Pektinoliziniai fermentai	20
1.4. <i>Geobacillus</i> spp. ir polisacharidus skaidantys fermentai.....	29
1.4.1. <i>Geobacillus</i> spp. bendrosios charakteristikos bei adaptyvumas	29
1.4.2. <i>Geobacillus</i> spp. polisacharidus skaidantys fermentai	31
2. METODAI.....	34
2.1. Suminių baltymų preparatų išskyrimas iš dirvos mėginių.....	34
2.2. Sukaupiamųjų kultūrų išskyrimas iš dirvos mėginių.....	34
2.3. Suminių baltymų preparatų išskyrimas iš sukaupiamųjų kultūrų.....	34
2.4. Fermentų aktyvumo detekcija zimografija.....	35
2.5. Baltymų identifikavimas masių spektrometrija	35
2.6. Natyvių amilazių ir pektinazių gryninimas	35
2.7. Masių spektrometrija identifikuotų baltymų bioinformatinė analizė	36
2.8. Pradmenų genų pagausinimui bei klonavimui konstravimas	36
2.9. Suminės bei genominės DNR išskyrimas.....	36
2.10. Polimerazės grandininė reakcija.....	37
2.11. Fermentų genų klonavimas raiškai <i>E. coli</i>	37
2.12. PL47 geno klonavimas raiškai mieliagrybiuose.....	38
2.13. Fermentų raiška <i>E. coli</i> bei raiškos optimizavimas	40
2.14. PL47 raiška mieliagrybiuose	41

2.15. Rekombinantinių fermentų gryninimas	41
2.16. PL47 sekretinė produkcija	43
2.17. Kiekybinis fermentinio aktyvumo nustatymas	43
2.18. Temperatūros ir pH įtakos AmyA1 ir PL47 aktyvumui bei stabilumui charakterizavimas	43
2.19. Metalų jonų ir reagentų įtakos AmyA1 ir PL47 aktyvumui charakterizavimas	44
2.20. AmyA1 ir PL47 substratinio savitumo nustatymas	44
2.21. Plonasluoksnė chromatografija.....	45
2.22. AmyA1 ir PL47 aktyvumo moduliavimas.....	45
2.23. AmyA1 ir PL47 imobilizavimas	46
2.24. PL47 konstitutyvios sekrecijos įvertinimas <i>Geobacillus</i> sp. PA-3	46
2.25. <i>Geobacillus</i> sp. PA-3 genomo nuskaitymas bei anotavimas	46
2.26. AmyA1 homologo ir PL47 operoninės organizacijos nustatymas	47
2.27. Baltymų elektroforezė	47
2.28. Statistinė analizė.....	48
3. REZULTATAI	49
3.1. Krakmolą arba pektiną skaidančių fermentų atranka	49
3.1.1. Fermentų iš sukaupiamųjų kultūrų detekcija bei identifikavimas	49
3.1.2. Fermentų iš dirvožemio mėginių detekcija bei identifikavimas	54
3.1.3. Fermentų genų klonavimas bei aktyvumo patvirtinimas	57
3.2. Termoaktyvi bei termostabili AmyA1 pululanazė	61
3.2.1. AmyA1 geno klonavimas ir sekos analizė	61
3.2.2. Rekombinantinės AmyA1 raiška bei gryninimas	63
3.2.3. Temperatūros įtaka AmyA1 aktyvumui ir stabilumui	64
3.2.4. pH įtaka AmyA1 aktyvumui ir stabilumui	66
3.2.5. Metalų jonų ir reagentų įtaka AmyA1 aktyvumui	68
3.2.6. AmyA1 aktyvumas ir substratinis savitumas	72
3.2.7. Imobilizavimo įtaka AmyA1 aktyvumui ir stabilumui.....	75

3.3. Termoaktyvi bei termostabili pektato liazė PL47.....	76
3.3.1. PL47 geno klonavimas ir sekos analizė.....	76
3.3.2. Rekombinantinės PL47 raiška <i>E. coli</i> ir mieliagyriuose	78
3.3.3. Rekombinantinės PL47 gryninimas.....	81
3.3.4. Temperatūros įtaka PL47 aktyvumui ir stabilumui	83
3.3.5. pH įtaka PL47 aktyvumui ir stabilumui	85
3.3.6. Metalų jonų ir reagentų įtaka PL47 aktyvumui	87
3.3.7. PL47 aktyvumas ir substratinis savitumas.....	90
3.3.8. Imobilizavimo įtaka PL47 aktyvumui ir stabilumui	94
3.4. <i>Geobacillus</i> sp. PA-3 genomo nuskaitymas bei anotavimas	96
3.4.1. <i>Geobacillus</i> sp. PA-3 taksonominė padėtis ir genomo ypatybės.....	96
3.4.2. AmyA1 homologo ir PL47 operoninė organizacija <i>Geobacillus</i> <i>thermodenitrificans</i> DSM 101594.....	104
4. APIBENDRINIMAS	110
IŠVADOS.....	117
BENDRADARBIAVIMAS	118
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	119
SUMMARY	136
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR JŲ KOPIJOS	189
UŽRAŠAMS	225

SANTRUMPOS

A – absorbcija
ar. – amino rūgštis
ASR – atviro skaitymo rėmelis
 β -ME – β -merkaptoetanolis
CASO (angl. *Casein Soya broth*) – kazeino sojos buljonas
CAZy – angl. *Carbohydrate-Active enZYmes database*
CE (angl. *Carbohydrate Esterases*) – angliavandenių esterazės
EC – angl. *Enzyme Commission*
DNS – dinitrosalicilo rūgštis
DTT – ditionitritolis
EDTA – etilendiamino tetraacto rūgštis
GalpA – D-galakturono rūgštis
GH – glikozidų hidrolazės
hGK2898 – GK2898 hipotetinio baltymo homologas
HGP – horizontali genų pernaša
HIS-AmyA1 – rAmyA1 be histidino giminingumo inkaro
HIS+AmyA1 – rAmyA1 su histidino giminingumo inkaru
HIS-SP.PL47 – rPL47 be signalinio peptido, be histidino giminingumo inkaro
HIS+SP.PL47 – rPL47 be signalinio peptido, su histidino giminingumo inkaru
HSC – hidrofobinės sąveikos chromatografija
IPTG – izopropil β -D-1-thiogalaktopiranozidas
JMCh – jonų mainų chromatografija
kfv – kolonijas formuojantis vienetas
KT – kambario temperatūra
LB – Luria-Bertani
MM – molekulinė masė
MO – mikroorganizmas (-ai)
MS – masių spektrometrija
NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato-poliakrilamido gelio elektroforezė
NiGCh – nikelio giminingumo chromatografija
NiG-6HisIn – nikelio giminingumo heksahistidininis inkaras
OI – obuolių išspaudos
OS – oligosacharidas (-ai)
OT – optinis tankis
PGA (angl. *PolyGalacturonic Acid*) – poligalakturono rūgštis
PGR – polimerazės grandininė reakcija
PL – pektato liazė

PL47_{Bsp.TS47} – *Bacillus* sp. TS-47 produkuojama pektato liazė

PS – polisacharidas (-ai)

rAmyA1 – rekombinantinė AmyA1

rPL47 – rekombinantinė PL47

SP – signalinis peptidas

sp.rPL47 – rekombinantinė PL47 be signalino peptido koduojančios sekos

TCEP (angl. *Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine*) – tris(2-karboksietil)fosfinas

IVADAS

Polisacharidai – biosferoje didžiausią biomasę sudarantys biopolimerai, sintetinami įvairių organizmų (1). Modulinė polisacharidų organizacija įvairiems angliavandeniams skirtingais būdais jungiantis į polimerines grandines užtikrina išpūdingą polisacharidų struktūrinį variabilumą (2). Vieni dažniausių biosferos polisacharidų – krakmolas ir pektinas, kartu organizmams vieni funkciškai svarbiausių biopolimerų. Krakmolas – energijos bei organinės anglies talpykla, o pektinas – augalų struktūrinės organizacijos palaikymui svarbus polisacharidas. Minėtų heteropolisacharidų svarba biotechnologijai nekelia abejonų (1).

Krakmolo arba pektino funkcijų užtikrinimas organizmams nebūtų įmanomas, jei nevyktų šių junginių skaidymas. Naudojant biotechnologijai krakmolą bei pektiną, susiduriama su savito šių polisacharidų skaidymo būtinybe. Paplitimas biosferoje netiesiogiai užtikrino minėtų heteropolisacharidų skaidymo fermentų gausą (3). Nors aprašyta daug amilolizinių arba pektinolizinių aktyvumą demonstruojančių fermentų, tačiau skirtingomis savybėmis pasižyminčių fermentų poreikis išlieka nepatenkintas (4, 5). Termoaktyvūs ir/ar termostabilūs polisacharidus skaidantys fermentai – vieni labiausiai pageidaujamų fermentų biotechnologijos sprendimams (3, 6).

Dirvos mikroorganizmai – vieni efektyviausių krakmolo bei pektino skaidytojų, taigi ir vieni perspektyviausių minėto substratinio savitumo fermentų šaltinių. Nekultivuojamų dirvos mikroorganizmų produkuojamų heteropolisacharidų skaidymo fermentų įvairovė išlieka tik fragmentiškai tirta (7). Nemažiau svarbiu uždaviniu išlieka fermentų išskyrimo, detekcijos bei identifikavimo būdų tobulinimas, teikiantis galimybę charakterizuoti anksčiau nenustatytų fermentų charakteristikas bei funkcinę svarbą.

Tikslas

Atlikti dirvos mikroorganizmų produkuotų heteropolisacharidus skaidančių fermentų atranką, bei charakterizuoti *Geobacillus* spp. produkuotas pululanazę AmyA1 ir pektato liažę PL47 apibrėžiant fermentų funkcinę svarbą.

Uždaviniai

1. Pasitelkus sukaupiamųjų kultūrų ir metaproteominius metodus iš dirvos mėginių išskirti krakmolą arba pektiną skaidančius fermentus bei masių spektrometrija identifikuoti žimografija detektuotus fermentus.
2. Charakterizuoti *in vitro* rekombinantinę pululanazę AmyA1 bei įvertinti hidrolazės biotechnologinį pritaikomumą.

3. Charakterizuoti *in vitro* rekombinantinę pektato liažę PL47 bei įvertinti liažės biotechnologinį pritaikomumą.
4. Anotavus *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 genomą, charakterizuoti kamieno koduojamų AmyA1 homologo ir PL47 genų operoninę organizaciją bei *in silico* apibrėžti fermentų funkcinę svarbą.

Mokslinis naujumas

Heteropolisacharidus skaidančių fermentų, produkuotų kultivuojamų ir/ar nekultivuojamų dirvos mikroorganizmų, atranka vykdyta pasitelkus kokybiškai naują bei inovatyvią fermentų išskyrimo, detekcijos ir identifikavimo strategiją, užtikrinusią efektyvų fermentų nustatymą. Amilolizinių arba pektinolizinių aktyvumą demonstravusių fermentų tiesioginis identifikavimas masių spektrometrija iš zimogramų mėginių bei fermentų išskyrimo iš dirvos mėginių vykdytas, užtikrinant nedegradavusių ir/ar nedematūravusių fermentų išskyrimą, atliekant dirvos ekonišų metaproteominę analizę, anksčiau nebuvo taikytas. Sėkmingai atlikta heteropolisacharidus skaidžiusių fermentų atranka leido nustatyti ne tik amilazes bei pektinazes, homologiškas charakterizuotiems fermentams, bet taip pat užtikrino galimybę detektuoti fermentų, homologiškų nenustatytų funkcijų baltymams, aktyvumą bei identifikuoti pastaruosius fermentus.

Charakterizavus *Geobacillus* genties produkuotas AmyA1 pululanazę bei PL47 pektato liažę, nustatyti anksčiau netirtų fermentų charakteristikų deriniai, kartu patvirtinant charakterizuotų fermentų biotechnologinį pritaikomumą. PL47 gebėjimas efektyviai skaidyti obuolių išspaudų pektiną taip pat sėkmingai patvirtintas. Charakterizuojant AmyA1 bei PL47, minėti fermentai klonuoti bei sėkmingai įvertinta šių fermentų heterologinės ekspresijos *Escherichia coli* galimybė. Taip pat įvertintas rekombinantinės PL47 gavimas dėka sekrecinės produkcijos, naudojant heterologinę raišką mieliagybiuose. Tiriant *Geobacillus* spp. produkuotus fermentus, atliktas fermentų aktyvumo moduliavimo įvertinimas bei imobilizavimo įtakos esminėms fermentų charakteristikoms nustatymas. *Geobacillus* amilazių/pululanazių ar pektinazių aktyvumo moduliavimo galimybės anksčiau nebuvo analizuotos. *Geobacillus* amilazių/pululanazių ar pektinazių anksčiau nebuvo bandyta imobilizuoti.

Siekiant apibrėžti AmyA1 ir PL47 funkcinę svarbą, nuskaitytas bei anotuotas *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 kamieno genomą. Anotavus naują *G. thermodenitrificans* rūšies kamieno genomą, nustatytos bendrosios rūšies geno savybės bei geno genų rinkinyje stebimas kamieno prisitaikymas įsivirti įvairius angliavandenius. Kamieno genome

anotuoti du regionai, tikėtina, patekę į genomą horizontalios genų pernašos būdu, kurie anksčiau nėra anotuoti *Geobacillus* genomuose. Vienne minėtų regionų anotuota genų, koduojančių fermentus, sietinus su heteropolisacharidų bei oligosacharidų skaidymu, santalka, kurios struktūra skiriasi nuo anksčiau anototų polisacharidų įsisavinimą užtikrinančių fermentų genų santalkų. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome anotavus PL47 geną, pirmą kartą patvirtinta, jog *Geobacillus* gentis koduoja pektato liažę. Be to, charakterizavus PL47 operoninę organizaciją patvirtinta, jog *Geobacillus* pektino įsisavinimo eiga identiška tai, kuri būdinga mezofilinėms *Bacillus* bakterijoms. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genomo anotavimas leido sėkmingai apibrėžti charakterizuotų fermentų funkcinę svarbą kamieno mitybai bei adaptyvumui užimamai ekonišai.

Mokslinė reikšmė

Heteropolisacharidus skaidančių fermentų atrankos strategija gali būti sėkmingai taikoma angliavandenių katabolizmo fermentų nustatymui iš skirtingų ekonišų. Sėkmingai atrinkti fermentai, kurių charakterizavimas *in vitro* nebuvo plėtotas, gali būti tiriami įvertinant jų pritaikomumą. AmyA1 bei PL47 charakterizavimo rezultatai leidžia tęsti tolesnį fermentų diegimą į biotechnologinius procesus ir/ar vykdyti baltymų inžineriją modifikuojant fermentų savybes. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genomo anotavimo rezultatai leidžia panaudoti tapusius prieinamais sekoskaitos duomenis *Geobacillus* filogenijos tyrimams bei plėtoti kamieno koduojamų baltymų charakterizavimą. Apibrėžta *in silico* AmyA1 bei PL47 funkcinė svarba teikia galimybę geriau suvokti *Geobacillus* genties mitybos adaptyvumą bei prisitaikymą prie ekonišų.

Ginamieji teiginiai

1. Heteropolisacharidus skaidančių fermentų tiesioginis identifikavimas iš zimogramų mėginių masių spektrometrija užtikrina efektyvų bei detektuotų fermentų homologiškumo charakterizuotiems fermentams neribojamą fermentų nustatymą.
2. Termoaktyvios bei termostabilios AmyA1 ir PL47 efektyviai skaido heteropolisacharidus iki ilgos grandinės oligosacharidų.
3. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 kamienas įgijo gebėjimą įsisavinti pektiną dėka horizontalios genų pernašos.
4. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 gebėjimas skaidyti krakmolą – viena esminių kamieno mitybinių strategijų, o kamieno gebėjimas įsisavinti pektiną atspindi prisitaikymą prie užimamos ekonišos.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Polisacharidus skaidančių fermentų nustatymo strategijos

Polisacharidai (PS) – plačiai biosferoje paplitę atsinaujinantys polimerai (6). Skirtingų organizmų PS atlieka įvairias funkcijas, bei kartu tarnauja energijos ir/ar anglies šaltiniu PS skaidantiems (mikro)/organizmams (8). PS struktūrinė organizacija varijuoja skirtingiems monosacharidams įvairiomis kombinacijomis per glikozidines jungtis jungiantis į didelės molekulinės masės (MM) grandines. Stebimą struktūrinį PS variabilumą lemia ne tik monosacharidai, bet ir PS sintetinančių organizmų išnaudojama galimybė formuoti skirtingas glikozidines jungtis tarp angliavandenių monomerų (9). Evoliucijos metu vystantis PS struktūrinei įvairovei ir funkicinei svarbai, šiuos biopolimerus sintetintiems/įsisavinantiems organizmams kilo būtinybė produkuoti konkrečių PS skaidymo fermentus (3). Minėtų fermentų atranka bei biocheminis detektuotų fermentų charakterizavimas vyksta jau daugiau nei penkis dešimtmečius, tačiau naujų PS charakterizavimas išlieka aktualus. Gamtinės kilmės PS bei jų oligosacharidai (OS) vis plačiau naudojami biotechnologijoje/farmacijoje, taigi PS modifikavimui/skaidymui būtini optimalių savybių derinių pasižymintys fermentai (10). Atsižvelgiant į tai, jog daugelis biotechnologinių procesų vykdomi aukštoje temperatūroje, termofilai, produkuojantys termoaktyvius ir/ar termostabilius PS modifikuojančius/skaidančius fermentus, išlieka ypač vertingi minėto funkcionalumo fermentų šaltiniai (11). Charakterizuotą PS skaidančių fermentų įvairovę sudaro apie 330 fermentų, remiantis CAZy (angl. *Carbohydrate-Active enZYmes database*) duomenų bazės klasifikacija, skirstomų į 162 glikozidų hidrolazių bei 36 PS liazių šeimas (12). Dauguma aprašytų PS ar jų OS skaidančių mikroorganizmų (MO) fermentų išskirti iš kultivuojamų MO, o nekultivuojamų MO šių fermentų įvairovė mažai tirta (7). Dirvos ekonišų (ne)kultivuojami MO – vieni perspektyviausių PS skaidančių fermentų šaltinių (13, 3), nes daugelyje dirvos ekonišų nuolat gausu skirtingų PS (14). PS skaidančių fermentų funkcionalumo nustatymas taip pat svarbus tiriant MO metabolizmą, adaptacinį plastiškumą ekonišai bei sąveiką su kitais MO konkrečios sudėties MO bendrijoje (3, 5, 14).

Klasikinės MO produkuojamų PS skaidančių fermentų nustatymo strategijos remiasi kokybine fermentų atranka, kultivuojant MO ant standžių terpių ir nustatant jų fermentinį aktyvumą (15, 16) ir kiekybiniu spektrofotometrinio arba chromatografinio PS skaidymo produktų nustatymu (10, 17, 18). Našūs fermentų atrankos atžvilgiu detekcijos metodai, pagrįsti metagenomika bei

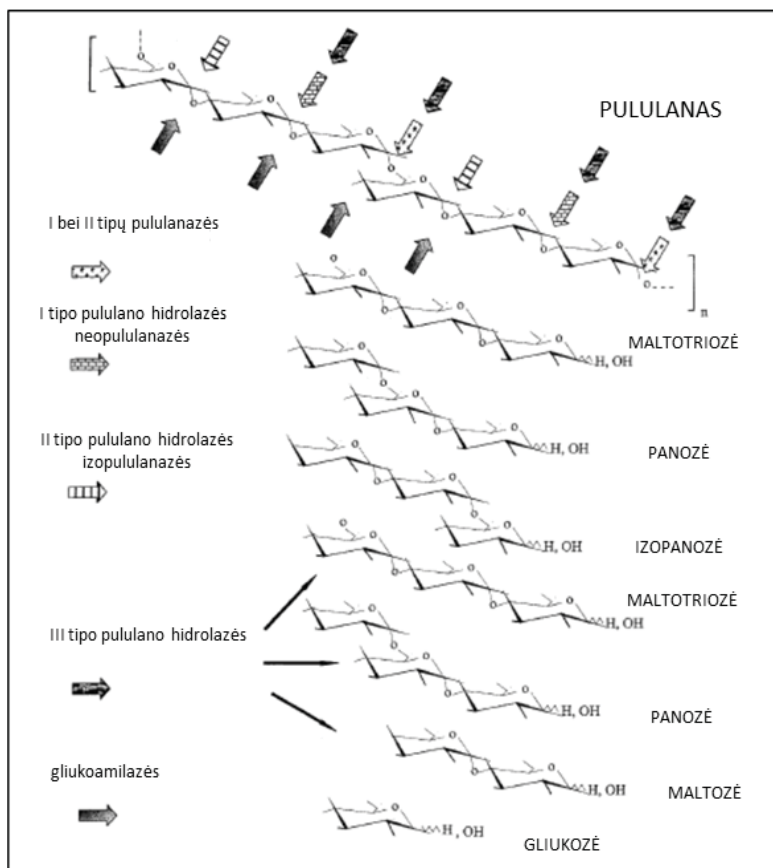
metaproteomika, taip pat sėkmingai pritaikyti dirvos MO produkuojamų PS skaidančių fermentų detekcijai (7, 19, 20, 21).

Vykdamas dirvos MO produkuojamų, PS skaidančių fermentų nustatymą, atliekamas mėginių surinkimas iš dirvos ekonišų, kuriose nuolat gausu PS, arba vykdomas išankstinis pasirinktų dirvos ekonišų *in situ* įsotinimas PS (22). MO, produkuojantys PS skaidančius fermentus, gali būti išskirti bei išgryninti iki grynų kultūrų ant standžių terpių su PS, ir/arba kultivuoti sukauptųjų kultūrų metodu, kultūrų negryninant. Abiem atvejais nekultivuojamų MO PS skaidantys fermentai nebus išskirti (7). Visgi iš MO kultūrų galima išskirti sąlyginai didelius fermentų kiekius, o tai palengvina detektuotų fermentų identifikavimą masių spektrometrija (MS) (23). Kultivavimo sąlygos, netgi taikius labai išsamų MO kultivavimo sąlygų optimizavimą, neužtikrina galimybės gyvybingais palaikyti visus natūralioje MO bendrijoje buvusius kultivuojamus MO, todėl dalies MO produkuojami, PS skaidantys fermentai nebus išskirti bei detektuoti. Metaproteominė, iš dirvos mėginių išskirtų fermentų analizė potencialiai teikia galimybę nustatyti nekultivuojamų dirvos MO fermentus (7, 20), o efektyvus fermentų išskyrimas iš dirvos, naudojant tirpiklius ir/ar detergentus, denatūruoja fermentus, taigi apsunkina fermentų aktyvumo detekciją (21). Metaproteominės ir MS analizės baltymų identifikavimo rezultatai dažnai būna priklausomi nuo identifikuotų sekų homologijos jau aprašytų fermentų sekoms, taigi, riboja galimybę identifikuoti naujus fermentus (24). Pastaraisiais metais reikšmingas metagenominių fermentų nustatymo metodų tobulinimas leidžia išspręsti minėtas problemas taikant funkcinės metagenomikos strategijas (15, 25). PS skaidančių fermentų nustatymą iš dirvos mėginių taip pat efektyvina fermentų detekcijos taikymas naudojant mikrogardeles (10). Apibendrinant PS skaidančių fermentų nustatymo strategijas, galima teigti, jog efektyviausią fermentų nustatymą užtikrina kelių fermentų nustatymo strategijų derinimas.

1.2. Pululanas ir pululanazės

1.2.1. Pululanas – linijinis polisacharidas

Pululanas – vandenyje tirpus neutralus linijinis PS sudarytas iš α -1,6-glikozidinėmis jungtimis susijungusių maltotriozės molekulių (1 pav.). Vertinant glikozidinių jungčių kartotinumą D-gliukopiranoliziniuose vienetuose, pululano grandinės struktūrą galima charakterizuoti kaip kas dvi α -D-1,4-glikozidines jungtis įsiterpiančios α -D-1,6-glikozidinės jungties grandinę. Pululano struktūriniai variantai reti, visgi pululano grandinėse 5-7 % gali sudaryti ne maltotriozės, bet dispersiškai pasiskirsčiusios malto-



1 pav. Pululano struktūra bei polisacharidą skaidančių hidrolazių tipai (4).

tetraozės molekulės, susijungusios α -1,6-glikozidinėmis jungtimis (26). Pululano struktūra gali būti vertinama ir kaip panozės bei izopanozės linijinė grandinė (27). Pastarąjį egzopolisacharidą sintetina polimorfinis grybas *Aureobasidium pullulans* (26), grybo kultivavimui naudojant mitybinę terpę, papildytą gliukoze bei sacharoze. Menka išeiga pululaną sintetina *Tremella gentic* saprofitinių grybų rūšys, *Cyttaria* bei *Cryphonectria* augalų obligatinių parazitinių grybų rūšys (28). Priklausomai nuo augimo sąlygų, *A. pullulans* sintetina skirtingo grandinės ilgio pululaną (nuo kelių tūkstančių iki 2 MDa MM). Pramoninei pululano produkcijai taikomi keli genetiškai modifikuoti *A. pullulans* kamienai, PS sintetinantys didelę išeigą. Skirtingi *A. pullulans* kamienai produkuoja maltotetraozės kiekio pululano grandinėje atžvilgiu nežymiai besiskiriančius pululano struktūrinius variantus. Pululanas yra biodegradabilus, nehigroskopiškas, nepralaidus deguoniui bei neredukuojantis polimeras. Kartu pululanas tirpus net šaltame vandenyje, tačiau netirpus metanolyje ar acetone bei daugelyje organinių tirpiklių. Dėl didelio pululano tirpumo vandenyje lengvai galima gauti aukštos koncentracijos pululano

vandeninius tirpalus, kurie pasižymi klampumu, adhezija bei gali būti naudojami pululano plėvelių ruošimui (27). Pululano plėvelės termostabilios bei pasižymi antistatinėmis bei elastinėmis savybėmis, nulemtomis pululano polimerinių grandinių struktūrinių ypatybių, sąlygojančių maltotriozės jungimosi į polimerinę grandinę. Neimunogeniškumas, nekancerogeniškumas, nemutageniškumas, netoksiškumas bei biodegradabilumas – tai pululano biotechnologinio/farmacinio pritaikymo potencialą atspindinčios savybės (29).

Fiziologinė pululano svarba *A. pullulans* išlieka nesuprasta. Pululaną produkuojančio polimorfino grybo kamienai efektyviai skaido daugelį PS, tačiau pululano efektyviai metabolizuoti negali, taigi egzopolisacharidas grybui nėra energijos ir/ar anglies šaltinis. Manoma, jog pululanas svarbus grybo ląstelių apsaugai nuo išdžiūvimo bei kartu padeda užtikrinti grybo adhezyvumą prie gamtinių substratų, pvz., medienos (30). Pululanas netiesiogiai svarbus *A. pullulans* plitimui, nes taip pat užtikrina blastosporų adhezyvumą prie paviršių (31).

1.2.2. Pululanoliziniai fermentai

Pululaną gebantys hidrolizuoti fermentai skirstomi į 4 tipus (1 pav.): 1. gliukoamilazės (EC 3.2.1.3) pululaną hidrolizuoja nuo polimero neredukuojančio galo susidarant gliukozei; 2. pululanazės arba α -dekstrin-6-gliukanohidrolazės (EC 3.2.1.41) hidrolizuoja α -1,6-glikozidines jungtis susidarant maltotriozei; 3. izopululanazės (EC 3.2.1.57) hidrolizuoja α -1,4-glikozidines jungtis susidarant izopanozei; 4. neopululanazės hidrolizuoja α -1,4-glikozidines jungtis pululano grandinėje susidarant panozei (32).

Pululanoliziniai fermentai, nepriklausomai nuo fermento tipo, saviti hidrolizuojamos glikozidinės jungties tipo atžvilgiu, tačiau nėra saviti PS struktūrai. Pastaroji substratinio savitumo charakteristika lemia pululanolizinių fermentų gebėjimą efektyviai hidrolizuoti krakmolą, amilopektiną, glikogeną, dekstrinus bei amilozę (4).

I tipo (tikrosiomis) pululanazėmis laikomos α -dekstrin-6-gliukano-hidrolazės, pululano grandinėse hidrolizuojančios tik α -1,6-glikozidines jungtis. I pululanazių tipas taip pat apjungia dekstrinazes bei amilopektin-6-gliukanohidrolazes (33). I tipo pululanazės tipiniu atveju pululano bei šakotų OS polimerinių grandinių atžvilgiu veikia kaip endohidrolazės, efektyviai mažindamos PS šakotumą. Skaidydamos krakmolą I tipo pululanazės, vėlgi veikdamos endomechanizmu, užtikrina amilozės susidarymą. I tipo pululanazės identifikuotos bei klonavus *in vitro* charakterizuotos iš daugelio skirtingų organizmų (4). Pagal CAZy klasifikaciją šios glikozidų hidrolazės priskirtos GH 13 šeimai (12). Palyginus I tipo pululanazių sekas, išskirti

keturi konservatyvūs hidrolazių sekų regionai, iš kurių YNWGYDP aminorūgščių (ar.) motyvas visiškai konservatyvus I tipo pululanazėms (34). Šis ar. motyvas būtinas fermento jungimuisi su substrato molekule (35).

I tipo pululanazių katalizės mechanizmas išsamiai charakterizuotas išsprendus šių fermentų erdvinę struktūrą: katalizinę triadą sudaro katalizinė aspartato liekana, veikianti kaip nukleofilas; katalizinė glutamato liekana, veikianti kaip bendroji rūgštis/bazė, ir aspartatas, kuris būtinas stabilizuojant pereinamąją būseną (36). Katalizės akte taip pat dalyvauja argininas, kurį pululanazių sekose visuomet skiria dvi ar. nuo kataliziniu nukleofilu funkcionuojančio aspartato (35). Kaip įprasta hidrolizės reakcijoms, vandens molekulė – būtinas antrasis fermentinės reakcijos substratas.

Dažniausiai sutinkamos MO vidulastelinės I tipo pululanazės, tačiau sekretuojamos, membraninės ar periplazminėje erdmėje funkcionuojančios taip pat nėra retos. Vertinant fizikochemines charakteristikas, I tipo pululanazės aktyviausios pH 3-11, esant 50-95 °C, o šių fermentų termostabilumą reikšmingai didina substrato bei produktų molekulės (4). Metalų jonai šių pululanazių aktyvumą veikia skirtingai: Mg^{2+} , Ca^{2+} bei Co^{2+} jonai tipiniu atveju pululanazių aktyvumą stimuliuoja, o Zn^{2+} , Cu^{2+} bei Fe^{2+} slopina. Chelatoriai, pvz., EDTA, neturi įtakos arba nežymiai slopina pululanolizinį aktyvumą (34).

II tipo pululanazėms priskiriamos α -1,4- bei α -1,6-glikozidines jungtis hidrolizuojančios amilopululanazės (37), kurių sekose išskiriami 4 konservatyvūs sekos regionai, tačiau jie nėra panašūs į būdingus I tipo pululanazėms, nors abiejų tipų pululanazių katalizinis mechanizmas tapatus. Mezofilinėse ir (hiper)termofilinėse bakterijose amilopululanazės yra identifikuotos, tačiau jų charakterizuota įvairovė ne tokia didelė kaip I tipo pululanazių (4). Aprašytų amilopululanazių gebėjimas skaidyti krakmolą, amilozę, amilopektiną, glikogeną bei ciklodekstrinus iki gliukozės, maltozės bei maltotriozės patvirtintas *in vitro* (38, 39). Dažniausiai amilopululanazės yra indukuojami fermentai, kurių tipiškai induktoriai – maltozė, amilozė ar amilopektinas (40). Dauguma MO amilopululanazių yra sekretuojamos arba membraninės hidrolazės. Amilopululanazių amilolizinis bei pululanolizinis aktyvumai optimaliausi esant pH 5-9,6, ir 50-105 °C temperatūrai. Metalų jonų įtaka amilopululanazėms bei I tipo pululanazėms gana panaši: Ca^{2+} jonai reikšmingai aktyvina amilopululanazių aktyvumą bei termostabilumą. Sr^{2+} ir Mg^{2+} jonai taip pat aktyvina amilopululanazės, tačiau ne taip intensyviai, o Ni^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} bei Zn^{2+} jonai amilopululanazės reikšmingai slopina (4).

Neopululanazės, skaidančios pululaną iki panozės, demonstruoja savitą katalizinį aktyvumą. MO neopululanazių sekoms būdingi tipiškai amilazėms

konservatyvūs motyvai bei du papildomi motyvai (41, 42). Neopululanazės aktyviai skaido α -1,4-glikozidines jungtis bei gali hidrolizuoti kai kurių šakotų PS α -1,6-glikozidines jungtis (4). Be to, neopululanazės minėtų glikozidinių jungčių atžvilgiu geba katalizuoti transglikozilinimo reakcijas (43).

Izopululanazės pululaną hidrolizuoja iki izopanozės ir yra retos MO (44). Pastarosios hidrolazės neskaido krakmolo (34). Pululaną (α -1,4- bei α -1,6-glikozidines jungtis) iki maltotriozės, panozės ir maltozės taip pat skaido III tipo pululano hidrolazės. Šie fermentai demonstruoja platų substratinį savitumą – hidrolizuoja krakmolą, amilozę bei amilopektiną iki maltotriozės bei maltozės. Gliukoamilazės – aktyvios egzogliukanazės, taip pat priskiriamos pululanazėms, nes hidrolizuodamos α -1,6-glikozidines jungtis geba užtikrinti pululano skaidymą iki gliukozės (4).

Pululanas bei jo hidrolizės produktai – vertingi junginiai. Taigi pululaną iki skirtingų produktų skaidantys fermentai pasižymi biotechnologinio panaudojimo potencialu (27). Skirtingų tipų pululanazės gali būti tiesiogiai taikomos gaminant alų, išskiriant sirupus iš skirtingos augalinės žaliavos. Neopululanazės gali būti naudojamos sveikatinančių saldiklių gamyboje (4). Pululanazės leidžia efektyviai išgauti vandenyje tirpius ciklodekstrinus. Daugelį pululanazių galima taikyti plovimo/skalbimo priemonėse (45).

1.3. Pektinas ir pektinazės

1.3.1. Pektinas – vienas heteropolisacharidų

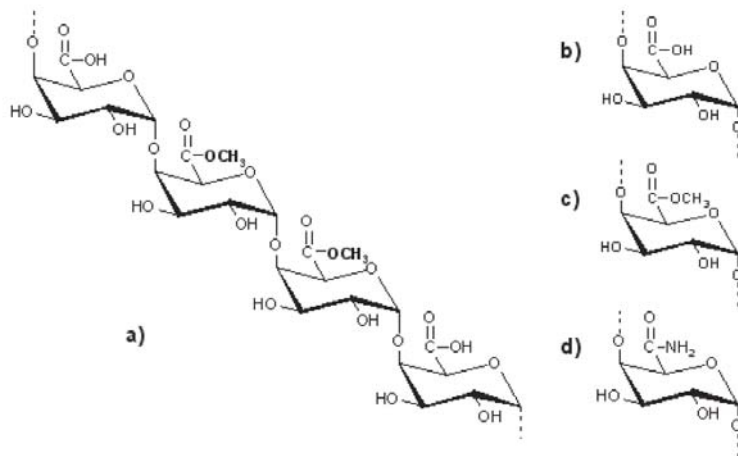
Pektinas yra sudėtingas linijinis anijoninis heteropolisacharidas – pagrindinis sausumos augalų ląstelių pirminės sienelės ir tarpinės plokštelės komponentas, didžiausiu kiekiu sutinkamas nesumedėjusiose augalo dalyse – metilintas, α -1-4-glikozidiniu ryšiu sujungtų D-galakturono rūgšties (GalpA) (apie 70 %) esteris (GalpA karboksigrupės iš dalies esterintos metoksigrupių ir iš dalies/visiškai neutralizuotos Na^+ , K^+ ar NH_4^+ jonų), (2 pav.) įsiterpiančios šoninėms grandinėms, sudarytoms iš kitų neutralių cukrų (L-ramnozės, L-arabinozės, D-galaktozės, ksilozės) liekanų. Pektino biologinė funkcija – (hemi)celiuliozės pluoštų kryžminis surišimas, lemiantis augalų ląstelių sienelių tvirtumą. Pektino kiekis, sudėtis ir struktūra priklauso nuo augalo rūšies, amžiaus ir varijuoja tarp augalo dalių (46).

Atsižvelgiant į pagrindines PS grandinės jungčių bei funkcinių grupių modifikacijas, išskiriami: protopektinas, pektinatas, pektinas ir pektatas. Protopektinas, kaip vandenyje netirpi pektininė medžiaga, sutinkamas augalų tarpinių plokštelių sudėtyje. Šio biopolimero netirpumą lemia didelė MM, esterinių jungčių susidarymas tarp karboksilinių pektino rūgščių grupių ir

hidroksilintų kitų ląstelės sienelės komponentų grupių, druskų tiltelių sudarymas tarp baltymų ir karboksilinių pektininės medžiagos grupių (47). Neesterintų metoksigrupėmis GalpA neutralios ar šarminės druskos apibūdinamos kaip pektatai, o polimetilgalakturono rūgšties neutralios arba šarminės druskos vadinamos pektinatais arba tiesiog pektinu (48).

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, OS sąveika su įvairiais veiksniais (fenolio junginiais, kalciumu, boratu, poliaminu) sukuria daugiafunkcinę makromolekulinę sistemą. Pektinas svarbus celiuliozės mikrofibrilių susirinkimui (49). Ląstelių sienelių matrikso pH ir joninę jėgą nulemia pektino tinklas, atsakingas už gelinės matrikso konsistencijos susidarymą bei už mechanines ir poringumo savybes, ir tai turi įtakos ląstelių tarpląstelinėms jungtims, hidratacijos laipsniui, judėjimui ir ląstelių sienelių matriksą modifikuojantiems baltymams. Pektino tinklas svarbus tarpląstelinėje adhezijoje ir signalų perdavime, koordinuojant augalo vystymąsi (šaknies šalmelio ląstelių diferenciacija, sienelių pabrinkimą ir minkštėjimą vaisiams nokstant, ląstelių atsiskyrimą nukrentant lapams ar vaisiams, savaiminį ankščių atsidarymą joms subrendus) (50, 51).

Pektino tinklas yra pagrindinis bakterinių ir grybinių fermentų taikinytis, ir pektiną degraduojantys fermentai gali būti virulentiškumą nulemiantys veiksniai. Todėl nepaisant svarbaus vaidmens ląstelės fiziologijoje ir vystymesi, pektinas atlieka ir apsauginę funkciją prieš augalų patogenus, kurie turi skirtingo savitumo pektinazes ir sukelia augalų ląstelių nekrozę bei audinių pažeidimus (52).



2 pav. Pasikartojantys pektino molekūlės segmentai (a) ir funkcinės grupės pektino grandinėje: karboksi (b), esterinė (c), amidinė (d) (47).

1.3.2. Pektinolininiai fermentai

Pektiną gebantys skaidyti fermentai, trumpiau vadinami pektinazėmis, klasifikuojami atsižvelgiant į tris kriterijus: savitumą tam tikram PS (substratui) arba keliams; substrato grandinės skėlimo reakcijos mechanizmą; skėlimo vietą substrato grandinėje.

Pagal substrato grandinės skėlimo reakcijos mechanizmus išskiriamos 2 didelės šių fermentų grupės: *metilesterazės* ir *acetilesterazės* – pektino hidrolazės (CAZy CE 8 ir 12 angliavandenių esterazių šeimos (12); EC 3 klasė), kurios nuo substrato atskelia, atitinkamai, metilo ir acetilo grupes. Šių deesterinimo reakcijų metu susidaro pektatai, metanolis arba etanolis. Esteraziniu aktyvumu pasižyminčių 8 šeimos daugumai fermentų būdinga α/β -sankloda, o SHD sudaro jų aktyviąją triadą, tačiau tarp pektininių PS esterazių dažniau stebima DDR a.r. aktyviojo centro triada, apsupta konservatyvaus aromatinių a.r. regiono, išsidėsčiusi tirpikliui prieinamoje dešiniojo sukinio paralelinės β -spiralsės ertmėje, apsuptoje išorinių kilpų. Fermentai funkcionuoja kaip monomerai, kurių struktūroje nėra stebima aiškiai išreikšta domeninė organizacija (53).

Antrąją grupę sudaro *depolimerazės* (hidrolazės ir liazės), kurios skelia pagrindinę pektininio PS grandinę. Hidrolazės (poligalakturonazės ir ramnogalakturonazės, priskiriamos CAZy GH 28 glikozidų hidrolazių šeimai (12)) katalizuoja PS α -1-4-glikozidinių ryšių hidrolizę. Šie baltymai pasižymi kompaktiška 10 sūkių dešinio sukinio β -spirale ir 10 paralelių išilginei ašiai lakštų sankloda. Fermento molekulės viršutiniame linkyje, atviraime iš abiejų galų, į kurią lengvai patenka PS grandinės galai, išsidėstęs DDD a.r. aktyvus centras. Fermento molekulės paviršiuje išskiriama konservatyvi aromatinių a.r. sritis, galimai tarnaujanti kaip angliavandenį surišantis regionas (53). Sutinkama ir stabilią ketvirtinę struktūrą formuojančių fermentų, sudarytų iš keturių monomerų, besijungiančių vidumolekuline spiraline struktūra (54). Fermentų katalizinio centro bei kitos svarbios konservatyvios a.r. pozicionuoja substratą *syn*-konformacijoje. Hidrolizės reakcija vyksta vienu etapu, invertuojančiu mechanizmu, kuomet, vykstant atskeliamos grupės anomerinės C atomo stereocheminei inversijai, yra atpalaiduojamas pektininio PS n-meras, jam prie C4-O⁻ prisijungus protoną iš vandens molekulės, o paskutiniam PS monomero C1 atomui prijungiama vandens hidroksigrupė (53).

Liazių (priskiriamų CAZy PL 1, 2, 3, 9, 10 ir 22 šeimoms; EC 4 klasė) katalizuojamų reakcijų metu, pašalinant chemines grupes, susidaro dvigubas ryšys. Pirmoji pektato liazių (PL1) šeima pasižymi analogiška CAZy CE 8 šeimai dešiniojo sukinio paralelinės β -spiralsės sankloda. Aktyvųjį centrą

formuoja DDD arba RRK a.r. triada, koordinuojanti ir pozicionuojanti Ca^{2+} joną (55, 56). PL2 šeimai priskiriami fermentai, kurių nustatyta erdvinė struktūra, demonstruoja $(\alpha/\alpha)_7$ statinės sanklodą ir aktyviąją diadą iš RR a.r. Šios šeimos fermentų struktūrai ir aktyvumui reikalingi Ca^{2+} jonai gali būti pakeisti kitų divalenčių metalų jonais (Mn^{2+} ar Mg^{2+}) (55), kurie koordinuojami aktyviojo centro.

PL3 šeimai būdinga dešiniojo sukinio paralelinės β -spiralinės sankloda, katalizinį aktyvumą užtikrina kartu su Ca^{2+} jonais KKR a.r. (57). PL9 šeimai taip pat būdinga dešiniojo sukinio paralelinės β -spiralinės sankloda, kurioje išreikšti N-galinis, C-galinis ir katalizinis domenai, aktyvioji tetrada suformuota DDDK/R a.r. (58). PL10 šeima pasižymi $(\alpha/\alpha)_3$ toroidine sankloda, formuojančia dviejų – N-galinio ir C-galinio – domenų struktūrą, tarp kurių plačiame griovyje išsidėstęs RD a.r. aktyvusis centras (59).

Pektato liazių β -eliminacijos būdu skeliami α -1-4-glikozidiniai ryšiai, susidarant tarp paskutinės GalpA C4 ir C5 atomų dvigubą ryšį turinčiam oligogalakturonidui. Pirmiausia C5 atomo hidroksigrupė priartinama katalizinės arginino liekanos ir vyksta Ca^{2+} (dėka C5 uronato grupės) nulemtas H5 rūgštinių savybių sustiprinimas, kuriam būtinas pH 7,5-10 (53). Guanidino grupė greičiausiai akumuliuoja Ca^{2+} jono, veikiančio kaip kofaktorius, sukeltus pK_a pokyčius (60). Antrame β -eliminacijos etape susidaro reakcijos produktas dėka elektronų perkėlimo ant O4 atomo, o tai lemia atskylančiosios grupės eliminavimą.

Depolimerazės skirstomos pagal skėlimo vietą PS grandinėje (endo, egzo) bei pagal savitumą substratui: *hidrolazės*: PMGH – polimetilgalakturonato (pektino), PGH – poligalakturonato (pektato). PGHs yra plačiai paplitusios bakterijose ir grybuose (jų tarpe ir mieliagyrybiuose), aptinkamos ir augaluose ir augalus parazituojančiuose nematoduose (53); *liazės*: PMGL (PNL) – polimetilgalakturonato (pektino), PGL (PL) – poligalakturonato (pektato). PL dažniausiai yra produkuojamos alkalofilinių bakterijų (*Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas* ir *Streptomyces*) ir maistą gadinančių grybų genčių bei yra tiesiogiai priklausomos nuo Ca^{2+} (54). PNL daugiausiai yra sintetinės *Aspergillus* ir *Glomerella* grybų (53). Priešingai nei pektato liazės, pektino liazės ardo pektiną ir nesant aplinkoje Ca^{2+} jonų (55). Tačiau yra žinoma, jog, pavyzdžiui, *Erwinia chrysanthemi* PL poreikis Ca^{2+} jonams priklauso ir nuo terpės pH: optimali 0,1 mM Ca^{2+} koncentracija yra, kai pH 7,8-8,5, o didžiausią aktyvumą lemia 0,025 mM koncentracija esant pH 9,2 (56).

Pradinius pektininių PS depolimerizacijos ir deesterinimo etapus užtikrina ekstraląsteliniai fermentai. Susidarę OS per anijoninius OS savitus porinus (KdgM šeima) yra pasyviai transportuojami į periplazminę ertmę (71), kurioje

kitų veiksmų skaidomi į di-, trigalakturonidus. Pastarieji per TogMNAB (daugiasubvienetinį CUT1 šeimos ABC transporterį), dėka ATP hidrolizės, transportuojami į citoplazmą (56). Pagalbinės ExuT ir KdgT transporto sistemos dalyvauja transportuojant atitinkamai sočiuosius ir nesočiuosius monosacharidus (62, 63). OS ląstelės viduje metabolizuojami į piruvatą ir 3-fosfogliceraldehidą, kurie patekę į Krebso ciklą paverčiami energija (63).

Pektiną skaidančių fermentų genai koduojami eukariotinių MO genomuose, kurių aplinkoje yra pektino, ir jis metabolizuojamas kaip anglies šaltinis. Dažniausiai tai fitopatogeniniai arba simbiozėje su augalais gyvenantys grybai. Paminėtinos gentys: *Aspergillus* (53, 64), *Chondrostereum*, *Claviceps*, *Colletotrichum* (65, 66), *Fusarium* (67, 68), *Kluyveromyces* (69), *Neosartorya* (53), *Penicillium* (53, 70, 71), *Trichoderma* (72).

Pirmą kartą pektinoliziniu aktyvumu pasižyminčios bakterijos *Erwinia carotovora* ir *Bacillus polymyxa* identifikuotos Starr ir Moran 1962 m. (73). Pektiną degraduojančius fermentus sintetinančios bakterijos išskiriamos iš dirvožemio, vandens telkinių, augalų, aptinkamos žuvų virškinamajame trakte, atrajotojų skrandyje bei žmonių žarnyne. Aprašytos mezofilinių bakterijų gentys, pasižyminčios pektinoliziniu aktyvumu: *Amycolata* sp. (74), *Azospirillum* (75), *Bacillus* (73, 76, 77, 78, 79), *Cytophaga* (80), *Clostridium* (81, 82, 83), *Erwinia* (73, 84, 85, 86), *Yersinia* (87), *Klebsiella* (88), *Pseudomonas* (89, 90, 91, 92), *Streptomyces* (93), *Treponema* (94), *Xanthomonas* (95).

Nepaisant didelio susidomėjimo MO pritaikymu pektino degradacijoje, ganėtinai mažas dėmesys iki šiol buvo skirtas termofilinių bakterijų pektinoliziniams fermentams, kurie yra daug stabilesni negu mezofiliniai (96). 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.

Apibendrinant 1 ir 2 lentelėse pateiktus duomenis, galima teigti, jog bakterinių pektinazių MM 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.

Daugiausia mokslininkų dėmesio sulaukę fitopatogeniniai MO, produkuojantys pektinolizinius fermentus, kurie svarbūs infekcijos pradžiai kaip invaziniai veiksniai. Nustatyta, jog enterobakterijos *Erwinia chrysanthemi* 3937 produkuoja dvi pektino metilesterazes, septynias pektato liazes,

1 lentelė. Mezofilinės bakterijos bei jų produkuojami termostabilūs pektinoliziniai 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 ²⁺ (min. konc. 0,2 mM)	ND	(74)
<i>Bacillus</i> GK-8	Trys ekstraląstelinės egzopektinazės	ND	PGA, Pektinas	60	5,4, 7,0, 10,4	Kof. Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ ir Mn ²⁺	ND	(97)
<i>Bacillus</i> sp. KSM-P7	Pektato liazė	33	PGA	60-65	10,5	Kof. Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Sr ²⁺ Inh. Fe ³⁺	EC 4.2.2.2	(98)
<i>Bacillus</i> sp. KSM-P15	Pektato liazė	20	PGA → 4,5-nesotūs oligo-galakturonidai	50-55	10,5	Kof. 0,6 mM Ca	EC 4.2.2.2	(99)
<i>Bacillus</i> sp. KSM-P103	Pektato liazė	33	PGA	60-65	10,5	Kof. 0,2 mM CaCl ₂	ND	(100)
<i>Bacillus</i> sp. BP-23	Pektato liazė	25	PGA, pektinas (89 %)	50	10,0	Kof. Ca ²⁺ Inh. Ba ²⁺	ND	(101)
<i>Bacillus</i> sp. DT-7	Ekstraląstelinė pektino liazė	106	Pektinas	60	8,0	Kof. 100 mM CaCl ₂ Inh. HgCl ₂ , EDTA, FeCl ₃	ND	(102)
<i>Bacillus</i> sp. MG-cp-2	Poligalakturo-nazė	ND	PGA	60	10,0	ND	ND	(103)
<i>Bacillus</i> sp. RNI	Pektato liazė	33	PGA	90	10,0	Kof. 0,5 mM Ca ²⁺	ND	(104)
<i>Bacillus alcalophilus</i> NTT33	Pektato liazė	35	PGA, Pektinas	45	9-10	Kof. Ca ²⁺ ; be CaCl ₂ – 100 %, 0,2 mM – 571 % aktyvumas. Inh. Ba ²⁺ ir Mn ²⁺	ND	(76)

<i>Bacillus pumilus</i>	Ekstraląstelinė endoliazė	ND	PGA, pektinas (68%) → nesotūs oligogalakturonidai	60	8,0-8,5	Kof. Ca ²⁺ Inh. Cu ²⁺ , Co ²⁺	ND	(105)
<i>Bacillus pumilus</i> BK2	Ekstraląstelinė endoliazė	37,3±4,8	Pektinas (29,5%), PGA → nesotios tetragalakturono r.	70	8,5	Inh.: 50% - 0,09 mM EDTA; 0,38 mM Co ²⁺ ; 2,8 mM Zn ²⁺	EC 4.2.2.2	(78)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Pektato endoliazė	23	PGA, pektinas → oligogalakturonų mišinys	65	10,0	Kof. 2,0 mM Ca ²⁺ = 1 mM Hg ²⁺ ; Inh. EDTA	ND	(106)
<i>B. subtilis</i> WSHB04-02	Pektato liazė	44	PGA → 4,5 nesotios di-, trigalakturono r.	50	9,4	ND	ND	(107)
<i>Clostridium stercorarium</i>	Pektato liazė	ND	PGA, pektinas	60	7,0	Kof. 0,05 mM Ca ²⁺ ; Inh. 0,2 mM EDTA	ND	(83)
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937	Ekstraląstelinės liazės	PelA	PGA, pektinas → nuo dimerų iki dekamerų (PelA); - trimerai (PelB, PelC); - dimerai (PelE)	55	8,5	Kof. 0,1 mM Ca ²⁺ ; Inh.: - 1 mM dauguma divalentių kationų (Ba ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺); ->0,5-1 g/L substrato konc.	ND	(56)
		PelB		60	9,3			
		PelC		60	9,2			
		PelD		50	8,8			
		PelE		50	8,0			
<i>Xanthomonas campestris</i>	Pektato liazė	35	PGA	65-90	8,5	Kof. 0,5 mM CaCl ₂	ND	(108)

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

Bakterija	Fermentas	MM, kDa	Substratas → R-jos produktai	Opt. T, °C	Opt. pH	Kofaktoriai / Inhibitoriai	Kitos ypatybės	Literatūra
<i>Bacillus</i> sp. BP-7	Pektino ir pektato liazės	28, 42, 56 ir 63	PGA	50	8,0, 10,0	Kof. 1 mM CaCl ₂ Inh. 3 mM EDTA	ND	(55)
			Pektinas					
<i>Bacillus</i> sp. P-4-N	Pektato liazė	35	PGA, Pektinas (esterifikacija 31 ir > %)	70	11,5	Kof. CaCl ₂ ; Inh. 1 mM EDTA	ND	(109)
<i>Bacillus</i> sp. TS 47	Endoliazė	50	PGA, Protopektinas	70	8,0	Inh. 100 mM EDTA, Ag ²⁺ , Ba ²⁺ ir Zn ²⁺ ; Kof. 0,5-1 mM Ca ²⁺	EC 4.2.2.1	(66, 67)
<i>Bacillus licheniformis</i> 14A	Pektato liazė	33,4	PGA → 4,5 nesotūs trigalakturonatai	65	8,5	Kof. 0,6 mM Ca ²⁺	ND	(77)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Ekstraląstelinė endoliazė	24	Pektinas	70	9,0	ND	ND	(110)
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	Pektino liazė, Galakturonazė	ND	Poligalakturono r. → acto r.; Pektinas → metanolis ir acto r.	60	5,5	ND	ND	(111)
<i>Clostridium thermohydro-sulfuricum</i>	ND	ND	Pektinas	70	ND	ND	ND	(112)
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	Poligalakturonato hidrolazė ir liazė, pektino metilesterazė	32	PGA, Pektinas	70-75	5,5-6,5	ND	EC 3.2.1.15 ir EC 3.1.1.11	(113)

<i>Paenibacillus</i> sp. BP-23	Pektino ir pektato liazės	25, 32, 38, 44 ir 53	Pektinas, PGA	65	10,0	Kof. 0,5 mM CaCl ₂	ND	(55)
<i>Pseudomonas cellulosa</i>	Pektato liazė	68,5	PGA	62	10,0	Kof. 2,0-4,0 mM Ca ²⁺	ND	(89)
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	Pektato endoliazė	28	→ 4,5 nesocios di- ir tri-galakturonos r.	50	9,0	Kof. 0,6 mM Ca ²⁺	ND	(114)
<i>Streptomyces thermovulgaris</i> CR42	Pektato liazė	ND	PGA, Pektinas	55	7,6	ND	ND	(115)
<i>Thermoanaerobacter italicus</i>	Liazė-a	135	PGA → mono-, di- ir tri-galakturonatai	80	9,0	Kof. 1 mM CaCl ₂ ; Mn ²⁺ ; Inh. 1 mM EDTA	Ksilanas (70-75 °C), krakmolas ir glikogenas (80-85 °C)	(116)
	Liazė-b	2 subvnt. - 93 ir 158						
<i>Thermomonospora fusca</i>	Poligalakturonato liazė, pektinesterazė, poligalakturonazė	56	PGA, Pektinas	60	10,45	Kof. Ca ²⁺	EC 4.2.2.2, EC 3.1.1.11 ir EC 3.2.1.15	(117)
<i>Thermotoga maritima</i>	Ekstraląstelinė pektato liazė	152 ir 40 (tetra- ir mono- meras)	PGA, Pektinas	90	9,0	Kof. Ca ²⁺ (opt.konc. 0,6 mM); 200 mM NaCl; Inh. EGTA	ND	(118)
<i>Thermotoga maritima</i>	Egzopoligalakturo nazė	50	PGA	80	6,4	-	EC 3.2.1.67	(119)

poligalakturonazę ir pektino liažę. Pektinazių genai yra ekspresuojami nuo nepriklausomų cistronų, o jų transkripciją lemia pačio pektino ar augalinių liekanų prieinamumas aplinkoje, stacionari bakterijų augimo fazė, žema temperatūra, deguonies arba geležies trūkumas ir kitos aplinkos sąlygos. Be to, PL geno transkripcija skatinama DNR ardančių agentų. Varijuojanti konkrečios pektinazės raiška, tikėtina, atspindi nevienodą fermentų vaidmenį augalo infekcijos metu. Žinomos kelios *pel* genų reguliacinės sistemos, įskaitant KdgR represorių, lemiantį visų pektinolizėje dalyvaujančių genų indukciją esant pektininių katabolitų. KdgR taip pat valdo pektinazių sekrecijai reikalingus genus ir kitus pektino indukuojamus genus, kurių funkcijos nėra aprašytos. Kitiems transkripcijos reguliatoriams homologiškas citoplazminis baltymas PecS *in vitro* jungiasi prie pektinazių ir celiulazių genų reguliacinių sričių. Baltymas PecT, priskiriamas transkripcijos reguliatorių LysR šeimai, slopina tam tikrų pektinazių genų raišką bei veikia kitus metabolinius kelius bakterijose. Žinomi ir kiti baltymai, kaip CRP ar HNS, kurie taip pat jungiasi prie reguliatorinių pektinazių genų sekų ir veikia jų transkripciją.

Dauguma pektiną degraduojančių fermentų yra bakterijų išskiriami į aplinką, kur prieinamas substratas, tačiau yra nustatyta ir periplazminių bei membraninių pektiną skaidančių fermentų. Pektiną degraduojančių fermentų sekrecija gali būti nespecifinė, kai dėl bakterijų voko padidėjusio pralaidumo fermentai išeina iš ląstelės (120). Lyginamieji (ne)patogeninių bakterijų pektinazių sintezės ir sekrecijos tyrimai atskleidė akivaizdžius skirtumus: ne fitopatogeninių *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pseudotuberculosis* ir *Yersinia enterocolitica* bakterijų PL genų skaičius genome yra mažesnis, sekrecijos lygis žemesnis, o fermentų raiška nėra indukuojama substrato (121). Tiriant pektinazių sintezę valdančius fiziologinius veiksnius, minkštąjį augalų audinių puvinį sukeliančiose bakterijose *Erwinia chrysanthemi* ir *Erwinia carotovora* gauti panašūs rezultatai. Ekologiniai veiksniai, palaikantys minėtos ligos vystymąsi, dažnai iššaukia ir pektinazių produkciją bei dažniausiai turi neigiamos įtakos bakterijų augimui. Pektinazių sintezė yra labiau skatinama stresinėmis sąlygomis nei esant palankioms MO augimui sąlygoms (121).

Nustatyta, jog pagrindinis visų *E. chrysanthemi* pektinolizėje dalyvaujančių genų indukciją lemiantis signalas yra bakterijoms aplinkoje prieinamo pektino buvimas. Tačiau prieš aktyvinant pektinazių genų transkripciją, yra taikoma papildoma fiziologinė kontrolė, atsižvelgiant į augimo fazę, katabolinę represiją, kintančias aplinkos sąlygas: substrato (ne)buvimą, temperatūrą, anaerobiozę, geležies trūkumą, osmoliariškumą ar azoto trūkumą (121). Visgi šios sąlygos retai veikia sinergistiškai, todėl atsakas į jas greičiausiai yra valdomas keleto nepriklausomų reguliacinių mechanizmų. Vertinant atskirai pavienius *pel*

genus, parodyta, jog kiekvienas jų skirtingai jautriai reaguoja į tuos pačius aplinkos signalus, o kartais pasireiškia net visiškai priešingas atsakas.

PL produkcija *Erwinia* bakterijose yra priklausoma ir kontroliuojama katabolinės represijos veikiant cikliniam AMP (cAMP). Pavyzdžiui, didelė nesočiųjų digalakturonatų koncentracija dalyvaujant cAMP lemia grįžtamą PL produkavimo katabolinę represiją (122). Panašiai galakturonatai tarpininkauja tiek pektinazių sintezės indukcijos, tiek katabolinės represijos iniciavime. Be to, pektinazių, produkuojamų *Erwinia*, spektras labai priklauso nuo augimo terpėje esančio anglies šaltinio, o tai rodo, jog skirtingi genai yra nevienodai jautrūs katabolinės represijos signalams (123).

Tiriant minkštąjį puvinį sukeliančias bakterijas, nustatyta, jog pektinazių genai yra 5-60 kartų ekspresuojami intensyviau vėlyvojoje nei ankstyvoje eksponentinio bakterijų augimo fazėje (121). Tai tiesiogiai siejama su infekcijos požymių išryškėjimu, kai bakterijos maksimaliai prisidaugina ir produkuoja fermentus, padedančius kolonizuoti augalų audinius.

1930 m. prasidėjo pektinolizinių fermentų tyrimai, o po kelių dešimtmečių augalų ląstelių sienelės ardantys fermentai imti plačiai naudoti įvairiose pramonės šakose. Sulčių gamyboje dažniausiai naudojamos *Aspergillus niger* pektinazės, kurių aktyvumas yra didžiausias rūgštinėje terpėje. Šie fermentai leidžia padidinti žaliavos vertę, gaunant didesnę produktų išėigą, ir skaidresnes sultis (48). Pektinoliziniai fermentai pritaikyti ir kavos gamyboje šalinant nuo kavos pupelių likusius augalinius audinius, kurie didžiąja dalimi sudaryti iš pektinu gausių medžiagų. Arbatos fermentacija dažnai pagreitinama dėka grybinių pektinazių, taip pat padidinamas putų formavimasis greitai paruošiamose, tirpiose arbatose (124). Augalinis aliejus tradiciškai yra išgaunamas naudojant organinius tirpiklius, kurie pasižymi potencialiu kancerogeniniu poveikiu. Fermentinis augalų apdirbimas vandeninėje terpėje, nenaudojant jokių cheminių medžiagų, duoda didesnę ekologiškesnio produkto gamybos išėigą ir ilgesnį realizacijos laiką (125). Tekstilės pramonėje bakterinės (*Bacillus*, *Clostridium*) ir grybinės (*Aspergillus*, *Penicillium*) šarminės pektinazės yra naudojamos augalų (kanapės, pluoštinės bėmerijos, kokoso palmės ir kt.) žievės pektino ardymui, augalinio pluošto skaidulų atskyrimui, jų lipnumo ir glitumo pašalinimui (126, 127). Popieriaus gamyboje medienos plaušų masės balinimas veikiant šarmais ir peroksidu tirpina PS, kurie dažnai užkemša filtravimo sistemą. Dalyvaujant pektinazėms, PGA polimerai yra suskaidomi ir pektino tirpale bei filtrate balinimo metu yra sumažinamas susidariusių agregatų kiekis, augalo audinių apdirbimo bakterijomis laipsnis aukštesnis, lyginant su tradiciniais metodais. Popieriaus lapai, paruošti iš šių MO skaidytų plaušų, gaunami vienodi bei

lygūs (128, 129). Daug pektinu turtingų medžiagų yra išmetama į vaisius apdirbančių pramonės įmonių nuotekas. 1987 m. pirmą kartą Tanabe vadovaujama mokslininkų grupė išbandė naują efektyvų nuotekų valymo būdą, naudojant iš dirvožemio išskirtą alkalofilinį MO – *Bacillus* sp. (130).

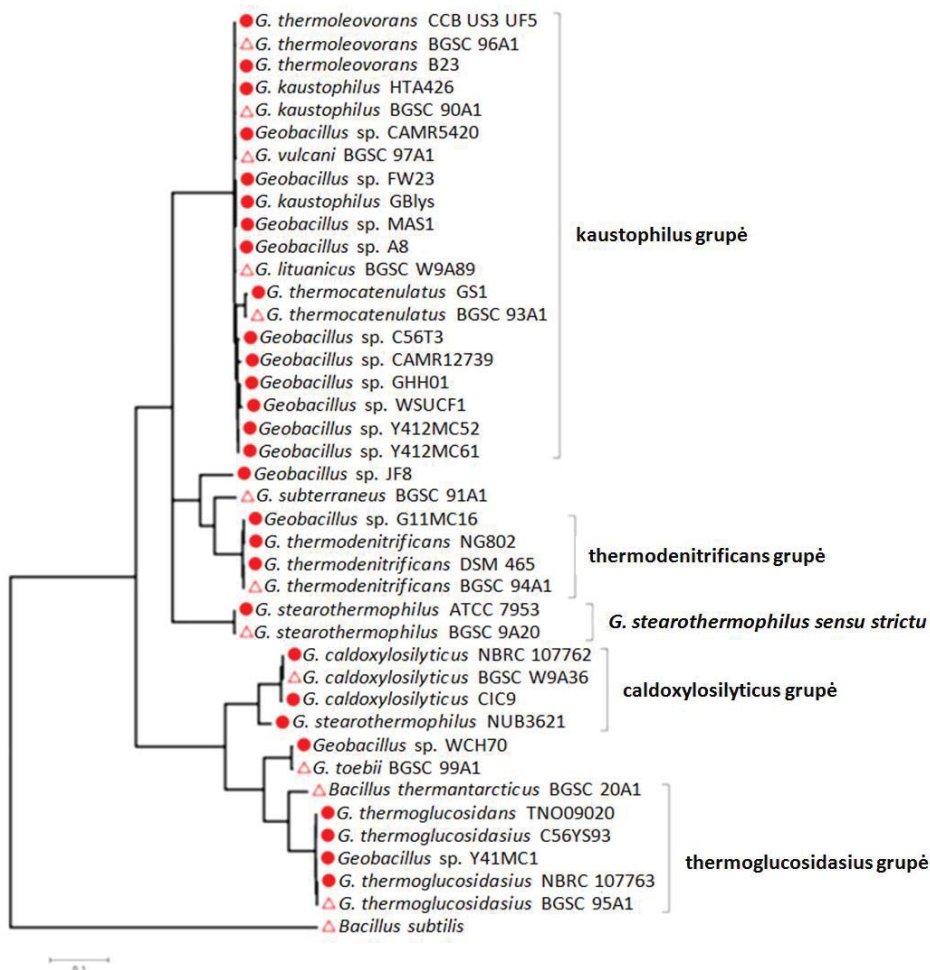
Komerciniais tikslais pektinas išgaunamas iš citrusinių vaisių žievelių, obuolių išspaudų (OI) (131), cukrinių runkelių, mango ir kitų vaisių atliekų (132). Polimeras yra tirpus vandenyje ir priklausomai nuo jo struktūrinių ypatybių pasižymi klampia, drebutine ar geline konsistencija. Esant žemam pH, yra slopinama karboksigrupių jonizacija ir taip mažinama šių grupių hidratacija, ko pasekoje, tarp PS molekulių susilpnėjus elektrostatiniam pasipriešinimui, suformuojama gelinė struktūra (131). Šią savybę daugiausia lemia PS sudarančių vienetų – PGA liekanų – esterinimo laipsnis, polimero MM, taip pat šoninių grupių krūvių tankio pasiskirstymas, joninė jėga, pH bei kitų junginių (pvz., cukrų) buvimas aplinkoje (133). Mažesnio esterinimo laipsnio pektinas gelinę struktūrą formuoja aplinkoje esant polivalentiniams jonams (dažniausiai kalciui), o aukšto esterinimo laipsnio pektinas – esant rūgštinėms sąlygoms bei papildomai skirtingiems cukrams, pavyzdžiui, sacharozei ar gliukozei. Dėl šio gebėjimo formuoti gelį, klampią ir stabilizuojančią struktūrą, pektinas plačiai pritaikomas ir naudojamas maisto pramonėje, farmacijoje ir kosmetikoje (133).

1.4. *Geobacillus* spp. ir polisacharidus skaidantys fermentai

1.4.1. *Geobacillus* spp. bendrosios charakteristikos bei adaptyvumas

Plėtojant *Bacillus* genties taksonominį revizavimą, paremtą Ash ir kt. (134), remiantis 16S rRNR genų sekų analize, išskirta *Geobacillus* gentis – lazdelės formos aerobai arba fakultatyvūs anaerobai, chemoorganotrofai, endosporas formuojantys gramteigiamieji MO (135). Skirtingų *Geobacillus* kamienų augimui reikalinga 35-80 °C temperatūra, bet dažniausiai jie sutinkami kaip nuosaikūs termofilai, kurie yra potencialus biotechnologijoje pritaikomų termoaktyvių ir/ar termostabilių fermentų šaltinis, svarbus bioremediacijai bei efektyviai taikomas biokuro gamybai (136, 137). Atsižvelgiant į *Geobacillus* augimui optimalų pH 6-8,5, galima teigti, jog ši gentis – neutrofilai. Genties kamienų genomų dydis svyruoja 3,5-3,9 Mbp, G+C kiekis varijuoja 48,2-58 mol%, o 16 rRNR genų sekos identiškos virš 96,5 % (135). Visgi *Geobacillus* genties klasifikaciją reikšmingai papildė kamienų analizė, remiantis *recN* bei *spoOA* genų sekų palyginimu (3 pav.) (14, 138).

Geobacillus gentį sudaro 15 rūšių, kurios, remiantis 16S rRNR bei *recN* genų sekų palyginimu, skirstomos į 9 grupes (4, 135). Pagal šerdinio genties



3 pav. *Geobacillus* genties tipinių kamienų (▲) bei kamienų, kurių genomai anotuoti (●), filogenijos palyginimas remiantis *recN* geno sekų homologija (139, 140).

genomo nukleotidų variabilumą bei *recN* geno sekų palyginimą rūšys išskirtos į 4 filogenetines šakas (139). Patikimai nuskaityti bei išsamiai anotuoti 7 rūšių (*Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus caloxylosilyticus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus* ir *Geobacillus thermoglucosidasius*) kamienų genomai (13). Tipine genties rūšimi, remiantis DNR-DNR hibridizacija, riebalų rūgščių bei 16 rRNR genų sekų analize, išskirta *Geobacillus stearothermophilus* (135, 141).

Vertinant *Geobacillus* bakterijų užimamų ekonišų įvairovę, stebima, jog jos – daugumos natūralių bei antropogenuotų MO bendrijų dalis. Nauji kamienai dažniausiai išskiriami iš karštųjų šaltinių (142), požeminių naftos telkinių (135) arba dirvos/komposto (143). Šie MO, gebėdami augti sąlyginai aukštoje temperatūroje, aptinkami ir neaukštos temperatūros buveinėse

(dirvoje, aukštikalnėse, vandenyno nuoguluose) (144, 145). Dirvoje šios genties bakterijų santykinis dažnumas siejamas su efektyvesne sklaida dėl endosporų formavimo. Trašioje dirvoje/komposte gausu augalinės kilmės organikos, kurią įsisavindamos bakterijos aktyviai proliferuoja (14). Pirmą organikos biodegradacijos fazę, kuriai būdinga 10-42 °C temperatūra, vykdo mezofilai, formuodami bioplėveles ir įsiskverbdami į sąlyginai inertiškas biomasės daleles. Intensyvus angliavandenių katabolizmas lemia energijos bei šilumos išsiskyrimą ir mezofilinė skaidymo fazė pereina į termofilinę 40-70 °C fazę. *Geobacillus* genties bakterijos, būdamos obligatiniai termofilai, dirvoje aktyviai auga būtent šios termofilinės fazės metu. Po termofilinės seka antroji mezofilinė fazė, lydima skaidymo sistemos nusistovėjimo bei brendimo, ir tipiniu atveju tolimesnė skaidymo proceso temperatūra būna žemesnė nei optimali *Geobacillus* augimui (146).

Aptartos dirvos biodegradacijos termofilinės fazės metu, temperatūrai esant 60-69 °C, *Geobacillus* gentis MO bendrijose dominuoja kaip oportunistiniai skaidytojai (147, 148). Tai parodė ir palyginamoji šios genties atstovų, išskirtų iš skirtingų ekonišų, genomų analizė (13, 14, 139). Tačiau šios bakterijos neilgai išlieka aktyviausiais augalinių PS skaidytojais, nes dėl žemėjančios temperatūros sporuliuoja (14). *Geobacillus* šerdinio genomo ~1600 genų (13, 23) rinkinys atspindi šių termofilų filogenetinį artimumą ląstelės metabolizmo ir išgyvenimo strategijų atžvilgiu *Bacillus* genties mezofilams, tačiau genų rinkinyje už (hetero)polisacharidų skaidymą tiesiogiai atsakingi genai nesutinkami. Genai, koduojantys PS skaidančius fermentus arba kitus svarbius baltymus, reikalingus OS transportui į ląstelę bei šių sacharidų skaidymui citoplazmoje, identifikuoti *Geobacillus* suminio genomo (pan-genomo) genų rinkinyje. Kartu pažymėtina, jog su PS skaidymu sietini genai dažnai sutinkami santalkose, kurioms būdingi horizontaliai genų pernašai (HGP) svarbūs elementai (3, 13). Mikroevoliuciniai veiksniai, lėmę *Geobacillus* genties evoliuciją iš *Bacillus* genties, kartu užtikrina aptariamų termofilų adaptyvumą augalinės kilmės biomasėje sutinkamų PS įsisavinimui ir, atsižvelgiant į išties platų šių termofilų paplitimą, galima išskirti jų svarbą globaliam anglies ciklo palaikymui (13, 14, 139).

1.4.2. *Geobacillus* spp. polisacharidus skaidantys fermentai

Geobacillus gentis – viena perspektyviausių termoaktyvių ir/ar termostabilių fermentų šaltinių (14). Didėjant *Geobacillus* anotuotų genomų skaičiui, charakterizuota gan maža dalis šios genties produkuojamų, potencialiai biotechnologijai pritaikomų fermentų. Tirtos *Geobacillus* lipazės, proteazės, DNR polimerazės bei kitų funkcijų fermentai (3, 139). Taip pat aprašyti ir

PS bei OS skaidantys fermentai: α - ir β -galaktozidazės (149, 150), ksilanazės (151, 152), α -gliukuronidazės (153), ksilozidazės (154), arabino-furanozidazė (155), amilazės bei pululanazės (156) iš *Geobacillus* kamienų. Skirtingai nei būdinga daugeliui PS aktyviai įsisavinančių MO, konkretūs *Geobacillus* kamienai produkuoja sąlyginai mažą PS bei OS skaidančių fermentų įvairovę ir šių baltymų genai sutinkami ne kaip pavieniai, nepriklausomai transkribuojami arba kelių genų operonuose, o lokalizuoti su PS skaidymu sietinų genų santalkose (3). *Geobacillus* produkuojamų PS skaidančių fermentų domeninėse organizacijose retai išreikšti sąveikos su angliavandeniais domenai, nulemiantys fermento savitumą substrato struktūrai. Tikėtina, tokie plataus substratinio savitumo PS skaidymo fermentai lemia efektyvesnę *Geobacillus* adaptaciją mitybiniais ekonišos ištekliams (3).

Anotuojant *Geobacillus* kamienų genomus, dažnai tiriamos PS skaidymą užtikrinančių fermentų genų santalkos (157). Išsamiausiai aprašyta ksilano/hemiceliuliozės įsisavinimą užtikrinančių fermentų genų santalka, būdinga *Geobacillus stearothermophilus* T-6 bei šešioms *Geobacillus* sp. C56 kamienų grupės genomams. *G. stearothermophilus* T-6 genome sutinkama 60 baltymų genų santalka, kurios koduojamų baltymų funkcionalumas kamienui leidžia įsisavinti hemiceliuliozę (3, 158). Šios santalkos genai skirstomi į 13 funkcinių grupių (3), iš kurių 12 grupių genai koduoja baltymus, tiesiogiai sietinus su hemiceliuliozės įsisavinimu (159). Septynioms santalkos genų funkcinėms grupėms priskiriamų genų koduojami baltymai lemia esminį hemiceliuliozės skaidymą. Vienos genų grupės koduojamos sekretuojamos hidrolazės skaido aplinkoje tapusį prieinamą arabino gliukuronoksilaną, dvių genų grupių koduojami baltymai, veikdami koordinuotai, užtikrina hemiceliuliozės OS transportą į ląstelės vidų. Likusių keturių funkcinių grupių genai koduoja viduląstelinius fermentus, kurie citoplazmoje baigia skaidyti hemiceliuliozės OS į monosacharidus (3). Viena iš 5 funkcinių grupių vienija 9 genus, koduojančius L-arabinano – esminio pektino struktūrinio elemento (159) – įsisavinimą užtikrinančius fermentus, todėl hemiceliuliozės įsisavinimo genų santalkos koduojamų baltymų funkcinę svarbą galima pagrįstai sieti taip pat ir su pektino įsisavinimo užtikrinimu (3, 160). Hemiceliuliozės įsisavinimo santalkai analogiškos santalkos sąlyginai konservatyvioje chromosomos vietoje *in silico* identifikuotos daugumoje *Geobacillus* anonuotų genomų (3). Skirtingų kamienų hemiceliuliozės įsisavinimo santalkos struktūra išreikštai varijuoja, visgi visais atvejais santalkos struktūroje stebimi sekos elementai, patvirtinantys santalkos patekimą į kamienų genomus dėka HGP. Skirtingos struktūros santalkose konservatyviausi operonai sudaryti iš ksilanazių arba ksilano transportui svarbių baltymų genų (3, 161). Atsižvelgiant į santalkų

variabilumą, galima teigti, jog skirtingi *Geobacillus* kamienai geba prisitaikyti prie konkretaus hemiceliuliozės struktūrinio tipo (3).

Geobacillus sp. C56 kamienų ksilano/hemiceliuliozės įsisavinimą užtikrinančių genų santalka yra sudėtinė kamienų supra-santalkos dalis. Joje identifikuoti daugumos kamieno įsisavinamų angliavandenių (fruktozės, ksilozės, arabinozės, manitolio, gliukonato bei pululano) skaidymo bei transporto genai (3).

Aptartas ksilano/hemiceliuliozės įsisavinimo baltymų genų pavyzdys atspindi bendrąsias *Geobacillus* produkuojamų PS skaidymo genų genominės organizacijos charakteristikas. Šios genties koduojama maža PS įsisavinimo genų įvairovė sutinkama genų santalkose kartu su PS OS transporto sistemų baltymų genais bei OS skaidančių fermentų genais. Tipiniu atveju santalkose sekretuojamus fermentus, veikiančius pradiniais PS skaidymo etapais, koduoja vos keli genai, santalkose dominuojant OS skaidančių fermentų bei transporto sistemų baltymų genams. *Geobacillus* PS įsisavinimo baltymų genų santalkų struktūros variabilumą, taigi ir MO adaptyvumą konkrečiam PS ar netgi PS struktūrinei variacijai, užtikrina dėka HGP vykstanti santalkų reorganizacija.

Daugelio *Geobacillus* genomuose *in silico* nuspėtos genų santalkos, koduojančios baltymus, sietinus su celiuliozės, krakmolo/pululano, arabinano, gliukomanano, ksilano bei galakturonano įsisavinimu (14). Šios genties užimamose ekonišose gausu ir pektino, taigi pektino įsisavinimą užtikrinančios genų santalkos, į šios genties kamienų genomą patekusios dėka HGP, identifikavimas yra pagrįstai tikėtinas (13). *Geobacillus* genomuose anotuoti CAZy PL11 bei PL22 šeimų pektato liazes koduojantys genai, tačiau minėti genai nėra priskirtini genų santalkoms. Efektyviai pektiną/pektatą įsisavinantis *Geobacillus* kamienas, tikėtina, turėtų koduoti sekretuojamą pektato liažę(-es) bei pektino OS skaidančias glikozidų hidrolazes, galimai iš CAZy GH 88 ir/ar 105 šeimų. *Geobacillus* pektato liažės ar glikozidų hidrolazės nėra tirtos (12).

Termoaktyvios bei termostabilios CAZy PL1 šeimos priskirtos pektato liažės charakterizuotos iš termofilinių *Bacillus* kamienų. Viena išsamiausiai tirtų *Bacillus* sp. TS-47 sekretuojama termoaktyvi bei termostabili PL47_{Bsp.TS47} pektato liažė (12, 54, 162, 163). Fermentas aktyviausias pH 8, esant 70 °C bei yra termostabilus temperatūrose, ne aukštesnėse nei fermentinam aktyvumui optimali temperatūra. PL47_{Bsp.TS47} aktyviai skaido PGA, vidutiniškai metilintą pektiną bei taip pat protopektiną. Ca²⁺ jonai nėra būtini šios PL aktyvumui, bet fermentą reikšmingai aktyvina (162, 163, 164). CAZy GH 88 bei 105 šeimų glikozidų hidrolazės iš *Bacillus* spp. yra charakterizuotos aprašant fermentų biochemines savybes bei erdvinę struktūrą (165, 166, 167, 168).

2. METODAI

2.1. Suminių baltymų preparatų išskyrimas iš dirvos mėginių

Surinkti dirvos mėginiai iki baltymų išskyrimo laikyti ne ilgiau nei 24 val., 4 °C. Suminių baltymų preparato išskyrimas atliktas pagal modifikuotą Murase ir kt. (169) metodiką, 200 g mėginio ir 500 mL 67 mM fosfatinio buferio (pH 6/KT) 1 val. maišant 100 rpm, 25 °C. Pirminis homogenizatas atvėsintas iki 4 °C. Antrinė homogenizacija buvo atlikta ultragarsinės dezintegracijos būdu (režimu: 5 sek. veikimo ir 55 sek. neveikimo, 40 ciklų, 20 kHz, 20 % amplitudės), homogenizatą nuolat šaldant ledo vonelėje. Gautas antrinis homogenizatas centrifuguotas 7000×g, 15 min., 4 °C, nuosėdos atskirtos nuo supernatanto, kuris toliau filtruotas vakuuminio būdu naudojant 0,22 μm filtrus (Millipore). Iki 80 % amonio sulfato įsotintas filtratas centrifuguotas 12000×g, 40 min., 4 °C. Gautos baltyminės nuosėdos resuspenduotos į 2 mL 50 mM MES-NaOH buferio (pH 6/KT) ir dializuotos prieš tokį patį buferį 12 val., 25 °C.

2.2. Sukaupiamųjų kultūrų išskyrimas iš dirvos mėginių

Sukaupiamosios MO kultūros iš dirvos mėginių buvo išskirtos remiantis Al-Qodah ir kt. (170) bei Takao ir kt. (163), substratais naudojant krakmolą, pektiną ar PGA, o terpių pH keičiant 6, 7, 8. Į 100 mL terpės įnešta 1 g dirvos mėginio ir kultivuota 24 val., 180 rpm, 60 °C. Po paros 1 mL kultūros perneštas į 100 mL tokios pačios sudėties terpės ir kultivuota 24 val. Vykdamas sukaupiamųjų kultūrų išskyrimą taip pat buvo įvertinta, ar gautų termofilinių sukaupiamųjų kultūrų augimas gali būti palaikomas kultivavimui naudojant OI (100 mL skystos terpės su 1 % (svoris/tūris) OI). Sukaupiamosios kultūros biomasės augimo pokytis įvertintas atlikus kolonijas formuojančių vienetų (kfv) skaičiavimą. Biomasės augimo pokytis vertintas išglaištymui ant agarizuotos krakmolo arba pektino terpės naudojant 100 μL kultūros. Išglaiščius kultivuota 12 val., 60 °C temperatūroje.

Gryni izoliatai išskirti išsėjant sukaupiamąsias kultūras ant agarizuotos terpės, papildytos krakmolu arba pektinu, kultivuojant 12 val., 60 °C. Atlikus kultivavimą, atrinktos morfologiškai besiskiriančios kolonijos.

2.3. Suminių baltymų preparatų išskyrimas iš sukaupiamųjų kultūrų

Suminių baltymų preparatų išskyrimas buvo atliktas baltymus išsodinant amonio sulfatu iš sukaupiamųjų kultūrų supernatanto. Ląstelės nusodintos

centrifuguojant 7000×g, 15 min., esant 4 °C temperatūrai. Supernatantas surinktas ir išotintas amonio sulfatu iki 80 % išotrinimo. Išsodinti baltymai surinkti centrifugavus 12000×g, 40 min., 4 °C (171). Nuosėdos surinktos ir visiškai ištirpintos 2 mL 50 mM MES buferio, kurio pH 6, arba TRIS-HCl buferio, kurio pH 7 arba 8 (atitinkamai pagal kultūros augimo sąlygas)/60 °C.

2.4. Fermentų aktyvumo detekcija zimografija

Amilolizinio arba pektinolizinio aktyvumo įvertinimui NDS-PAGE elektroforezės metodu (171) suminių baltymų preparatų iš dirvos mėginių arba sukaupiamųjų kultūrų supernatanto baltymai frakcionuoti poliakrilamidiniame gelyje, į kurį buvo įpolimerinta 0,1 % (svoris/tūris) tirpaus krakmolo iš bulvių (Sigma-Aldrich) (170) arba 0,05 % (svoris/tūris) pektino iš obuolių (Sigma-Aldrich) ar PGA (Alfa-Aesar) (163). Po elektroforezės zimograminiai geliai plauti 2,5 % (tūris/tūris) Triton X-100 tirpalu 20 min. purtant KT. Triton X-100 iš gelių šalintas praplaunant distiliuotu vandeniu, po to 2-3 val. zimograminiai geliai inkubuoti 50 mM TRIS-HCl buferyje pH 6, 7 arba 8/60 °C (atsižvelgiant į nustatytą dirvos mėginių pH arba sukaupiamųjų kultūrų augimui optimalų pH, esant 60 °C). Amilolizinis fermentų aktyvumas vizualizuotas zimograminius gelius nudažius jodu (1 % (svoris/tūris) elementinio jodo ir 0,2 % (svoris/tūris) kalio jodido tirpalas distiliuotame vandenyje). Atlikus 10 min. trukusį dažymą geliai plauti distiliuotu vandeniu. Pektinolizinis fermentų aktyvumas vizualizuotas dažant 10 min. 0,025 % (svoris/tūris) rutenio raudonojo tirpalu distiliuotame vandenyje, gelius po dažymo skalaujant distiliuotu vandeniu.

2.5. Baltymų identifikavimas masių spektrometrija

Baltymai iš NDS-PAGE gelių bei zimogramų mėginių išpjovus saugoti 50 mM TRIS-HCl pH 7,4/20 °C, 4 °C. Polipeptidų sekos identifikuotos skysčių chromatografija, integruota su masių spektrometrija (LC-MS/MS) naudojant nanoAcquity (Waters) chromatografijos sistemą bei Orbitrap Velos masių spektrometrą (Thermo Electron Corp.). Baltymų identifikavimas atliktas Lenkijos mokslų akademijos Biochemijos ir biofizikos instituto Masių spektrometrijos laboratorijoje (Varšuva, Lenkija).

2.6. Natyvių amilazių ir pektinazių gryninimas

Natyvūs amilolizini arba pektinolizini aktyvumą demonstravę fermentai, išskirti iš dirvos mėginių arba sukaupiamųjų kultūrų supernatanto, gryninti hidrofobinės sąveikos chromatografija (HSC). Fermentai gryninti iš 300 mL

dirvos mėginių pirminio homogenizato arba 2 L sukaupiamųjų kultūrų supernatanto. HSC vykdyta baltymų preparatus išotinus amonio sulfatu iki 80 % išotininimo, naudojant Macro-Prep Methyl (Bio-Rad) HSC dervą. Baltymai eliuuoti 20 mM TRIS-HCl buferiu, pH 7/KT, išotintu amonio sulfatu, sudarius atvirkštinį laiptinį (kas 0,25 M) gradientą nuo 1,5 M iki 0 M amonio sulfato. Surinktos frakcijos dializuotos prieš minėtą buferį. Kiekvienos frakcijos baltymai vizualizuoti NDS-PAGE ir krakmolo arba pektino zimografija vertintas frakcijų baltymų fermentinis aktyvumas, kurio zonos, atlikus sugretinimą su NDS-PAGE baltymų elektroforeziniu profiliu, išpjautos ir pateiktos baltymų identifikavimui masių spektrometrija.

2.7. Masių spektrometrija identifikuotų baltymų bioinformatinė analizė

Identifikuotų baltymų homologija baltymų sekoms įvertinta naudojantis NCBI BLAST serveriu (157) atliekant Standard Protein BLAST. Baltymų sekų identiškumas (%) apskaičiuotas MEGALIGN iš LASERGENE 6 (DNASTAR), taikant Jotun Hein algoritimą, pagal PAM250. Angliavandenių katabolizmo fermentai anotuoti naudojantis dbCAN serveriu (172), remiantis CAZy duomenų baze (12). Baltymų domenai bei domenų konservatyvumas nustatytas NCBI CDD 3 (173), InterProScan (174) ir Pfam 28 (175) duomenų bazių serveriais. Signaliniai peptidai (SP) *in silico* nuspėti SignalP 4 (176) serveriu.

2.8. Pradmenų genų pagausinimui bei klonavimui konstravimas

Nustatytų fermentų sekų pagausinimui bei klonavimui pradmenys konstruoti PrimerSelect iš LASERGENE 6 (DNASTAR), pradmenų parametrus papildomai analizuojant PCR Primer Stats (177). Konstruojant pradmenis remtasi MS duomenimis bei identifikuotų baltymų genų sekų homologija anotuotų genų sekoms. Fermentų klonavimui skirti pradmenys konstruoti taip pat atsižvelgus į klonavimo vektoriaus struktūrą bei įterpiančios restrikcijos endonukleazių atpažįstamas sekas. Sekos analizuotos bei sulygintos MEGA 6 (178), o daugybiniai genų sekų palyginiai atlikti ClustalX 2 (179). Sukonstruotus pradmenis (3 lentelė) sintetino Metabion International AG (Planegas, Vokietija).

2.9. Suminės bei genominės DNR išskyrimas

Suminė DNR iš dirvos mėginių išskirta naudojant ZR Soil Microbe DNA MicroPrep (Zymo Research) bei PureLink Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen) rinkinius pagal gamintojų rekomendacijas. Genominė DNR

išskirta iš MO biomasės atlikus kultivavimą ant agarizuotos terpės naudojant GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį pagal gamintojų rekomendaciją. Nukleorūgščių ilgio, kokybės bei koncentracijos nustatymui taikyta DNR elektroforezė agarozės gelyje. Horizontaliosios agarozės elektroforezės atlikimui TAE buferyje, palaikant 5-10 V/cm įtampą, naudotas 1 % agarozės gelis (agarozės svoris/TAE buferio tūris), kurio sudėtis papildyta etidžio bromido tirpalu (galutinė koncentracija gelyje 10 µg/mL). Elektroforezei naudotas 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) mėginių užnešimo į šulinėlius buferis. Nukleorūgštys gelyje vizualizuotos apšvietus UV. Išskirtų DNR mėginių kokybė bei koncentracija taip pat analizuota spektrofotometriškai, esant 260 nm ir 260/280 nm bangos ilgiui. Išskirta DNR toliau buvo saugoma atsižvelgiant į rinkinio protokole pateiktus gamintojų nurodymus.

2.10. Polimerazės grandininė reakcija

Genų ar jų fragmentų pagausinimui buvo naudota iš dirvos mėginių arba sukaupiamųjų kultūrų MO išskirta suminė DNR. Polimerazės grandininės reakcijos (PGR) mišinio sudėtis (50 µL): DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 0,4 µM kiekvieno pradmens, 10 ng DNR matricos. PGR sąlygos: pradinė denatūracija – 95 °C, 2 min.; galutinė elongacija – 72 °C, 7 min.; 30 ciklų: denatūracija – 95 °C, 1 min.; lydymo – 50/60 °C, 2 min., elongacija – 72 °C, 3 min. Vykdamas PGR atsižvelgta į taikomų pradmenų lydymosi temperatūrą (3 lentelė). Gauti PGR produktai analizuoti agarozės elektroforeze. PGR produktai, atitikę apskaičiuotą ilgį, nuskaityti VU GMC Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre (Vilnius, Lietuva).

2.11. Fermentų genų klonavimas raiškai *E. coli*

Atlikus heteropolisacharidus skaidančių fermentų atranką, nustatytų fermentų genai klonuoti į pET-28c(+) (Novagene) baltymų genų raiškos vektorius. Klonavimui fermentų genai pagausinti PGR, naudojant pradmenų poras su įvestomis restrikcijos endonukleazių atpažįstamomis sekomis. Naudojant minėtą vektorius, klonuotų fermentų genų sekos N arba C-gale papildytos histidininio giminingumo inkaru. PGR produktai bei vektorius restriktuoti atitinkamomis restrikcijos endonukleazėmis pagal gamintojo rekomendacijas bei liguoti naudojant T4 DNR ligazę (Thermo Fisher Scientific). Atlikus ligavimą, vykdyta elektroporacija į *Escherichia coli* DH5α (F⁻endA1 hsdR17(r_K-, m_K+) glnV44 thi-1 λ⁻recA1 gyrA96 relA1 deoR

nupG $\Delta(lacZYA-argF)$ -U169 Φ 80d*lacZ* Δ M15) (Novagen) ląsteles. Transformantai kultivuoti 12-14 val., 37 °C, ant agarizuotos Luria-Bertani (LB) (180) terpės, papildytos kanamicinu iki 30 µg/mL. Transformantų atranka vykdyta kolonijų PGR naudojant T7-F ir T7-R pradmenų porą (3 lentelė). Atrinkta plazmidė, patvirtinus klonuoto baltymo geno seką sekoskaita, elektroporuota į baltymų raiškos kamieną *Escherichia coli* BL21(DE3) (*F^oompT hsdSB(r_B-, m_B-) gal dcm lon λ (DE3 (lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5))*) (Novagen). Transformantų *E. coli* BL21(DE3) atranka vykdyta identišškai atrankai elektroporavus rekombinantines plazmides į *E. coli* DH5α. Klonuojant rekombinantinės plazmidės išskirtos iš ląstelių biomasės, gautos kultivuojant 6 val. LB, papildytą kanamicinu iki 30 µg/mL, 37 °C, naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas.

2.12. PL47 geno klonavimas raiškai mieliagyriuose

Siekiant užtikrinti rekombinantinės PL47 be signalino peptido koduojančios sekos (*SP*-PL47) raišką mieliagyriuose, fermento geno seka adaptuota raiškai mieliagyriuose. Adaptuotą geno seką sintetino GenScript (Piskatavėjus, JAV) pateikiant seką rekombinantinėje pUC57simple plazmidėje. PL47 klonavimui į integraciją į mieliagyrių genomus užtikrinančius vektorius pPLacZ-Kan ir pKLacZ-Kan (181) fermento geno seka pagausinta matrica taikius rekombinantinę pUC57simple plazmidę, kaip pateikta Spohner ir kt. (182). Pagausinant PL47 geno seką atitinkamų pradmenų pagalba (3 lentelė), geno seka papildyta 5' ir 3' sritimis, būtinomis homologinei rekombinacijai ir tuo pačiu PL47 geno įterpimui, vykdomam *Escherichia coli* GB05-dir (Gene Brigdes) kamieno, į pPLacZ-Kan ir pKLacZ-Kan vektorius. Restrikcija linearizuotos plazmidės bei pagausinti PL47 sekos variantai elektroporuoti į minėtą *E. coli* kamieną. Transformantai kultivuoti 12-14 val., 37 °C, ant agarizuotos LB, papildytos kanamicinu iki 30 µg/mL. Transformantų atranka vykdyta kolonijų PGR naudojant pradmenis (3 lentelė), atsižvelgus, koks PL47 sekos variantas klonuotas. Atrinktos bei sekoskaita patvirtintos heterologinės baltymų raiškos įvedimui *Pichia pastoris* ir *Kluyveromyces lactis* sukonstruotos rekombinantinės pPLacZ-Kan ir pKLacZ-Kan plazmidės restriktuotos, o restrikcijos mišiniai elektroporuoti atitinkamai į *P. pastoris* SMD1163 (*his4 pep4 prb1*) (Invitrogen) bei *K. lactis* G7799 (*MATaade1 adeX his7 ura3-2 atp2::KanR LEU2::pCXJ4-atp2-9*) (New England BioLab). Transformuotos, su genome integruotu PL47 genu, mieliagyrių ląstelės atrinktos atlikus kolonijų PGR mieliagyrių kultivavimui naudojant

agarizuotą YPD (183) terpę, papildytą geneticinu (G418) iki 2,5 mg/mL galutinės koncentracijos, kultivuojant dvi paras, 30 °C. Siekiant patvirtinti fermento geno integraciją, atliekant kolonijų PGR, *P. pastoris* SMD1163 klonų atrankai pasitelkti pradmenys: 5'αF-f, 5'ohneαF-f ir 3'AOX-r, atitinkamai *K. lactis* G7799: 5'αF-f, 5'αF-opt-f ir 3'LAC4-r (3 lentelė).

3 lentelė. Naudoti pradmenys

Pradmens pavadinimas	Seka, 5'-3'	Lydimosi temperatūra, T _m °C	Restrikcijos endonukleazės seka
AmyA1-F	ATGCTTCATATTAACCGAACGTTTGTCG	57	-
AmyA1-R	TCATCCCGCATTTCATCGGCATTC	58	-
GEOPUL-F	CATATGGCTAGCATGCTTCATATTAACCG	59	<i>NheI</i>
GEOPUL-R	AGTGGCGCCGCTCATCCCGCATTTCATC	66	<i>NorI</i>
P-1/2/3-PL47-F	GAGACGATGGTATACGAATATATTCTAGG	57	-
P-1/2/3-PL47-R	CTAATGAAGATTTCCCGCACCCG	57	-
PL47-F1	CATATGGCTAGCATGAGACGATGGTATACG	62	<i>NheI</i>
PL47-R	CGCAAGCTTCTAATGAAGATTTCCCGC	60	<i>HindIII</i>
PL47-s-F2	CATATGGCTAGCATGAAGGAATTAGGGC	60	<i>NheI</i>
RP2-2F	GGATGGGTTGGAAAAATGGATG	53	-
RP2-2R	GGTTATTGCCCTTTCGTCACC	54	-
RP2-2-F2	TGGATCCTTATTGCCCTTTCGTCACCGT	61	<i>BamHI</i>
RP2-2-R	GGTTATTGCCCTTTCGTCACC	54	<i>SalI</i>
P10-F	CATATGGCTAGCATGAAGGAAAAAATTA AAATGG	58	<i>NheI</i>
P10-R	CGCAAGCTTTCACTTATCAGGATAGAA	57	<i>HindIII</i>
P10-s-F2	CATATGGCTAGCATGGCGTCCTATGTTACC	63	<i>NheI</i>
P11-F	CATATGGCTAGCATGGTTTGTGTGTGCA ATGG	63	<i>NheI</i>
P11-R	CGCAAGCTTTTATGCGTTGTTTCTGACG	60	<i>HindIII</i>
P12-s-Fs	ATATGGCTAGCATGGCCGTCATCATG	61	<i>NheI</i>
P12-R	CGCAAGCTTTCACCCTTCTTTGACTTC	60	<i>HindIII</i>
X17-F	CATATGGCTAGCATGAATCTATGGAGAA GG	60	<i>NheI</i>
X17-R	CGCAAGCTTTTAACTTGAATGTATCGT CTAGC	62	<i>HindIII</i>

X17sigfr-F	CATATGGCTAGCATGAAAGCGGATGATAGCG	63	<i>NheI</i>
T7-F	TAATACGACTCACTATAGGG	48	-
T7-R	CTAGTTATTGCTCAGCGG	48	-
SSpPEC-001-PP-f	CCAAAAGACTTTAAATTTAATTTATT TGTCCTATTTCAATCAATTGAACAA CTATCAAAACACAGAATTCGAAACG ATGAGATTCCCATCTATCTTC	62	-
SSpPEC-005-PP-f	CCAAAGACTTTAAATTTAATTTATTT GTCCCTATTTCAATCAATTGAACAAC TATCAAAACACAGAATTCGAAACGA TGAAGGAATTGGGTCACGAAGTC	63	-
SSpPEC-002-PP-r	TTACAAATAAAAAAGTATCAAAAATG AAGCCTGC	56	-
SSpPEC-010-KL-f	GCAATAATAGCGGGCGGACG	56	-
SSpPEC-018-KL-f	GATGAGATTCCTCATCTATTTTCACC	54	-
SSpPEC-002-KL-r	TTCATCTGCTGCGAGATAGG	52	-
5'ohneAF-f	CCAAAGACTTTAAATTTAATTTATTT GT	48	-
5'αF-f	CTTCCATTGCTGCTAAGG	48	-
5'αF-opt-f	ATGAGATTCCCATCTATCTTCAC	52	-
3'AOX-r	GAAGCCTGCATCTCTCA	47	-
3'LAC-4-r	CACCTATTACATGGGCCAAG	52	-

2.13. Fermentų raiška *E. coli* bei raiškos optimizavimas

Rekombinantinės pET-28c(+) plazmidės su fermentus koduojančiomis sekomis elektroporuoiant transformuotos į *E. coli* BL21(DE3). Pirminių raiškos kultūrų inokuliacijai naudota ląstelių biomasė, gauta kultivuojant 12-14 val. ant agarizuotos LB, papildytos kanamicinu iki 30 µg/mL. Pirminė kultūra kultivuota skystoje (aukščiau aprašytos sudėties) LB terpėje 180 rpm, 37 °C ir po 12 val. gauta kultūra inokuliuota iki 1 % (tūris/tūryje) į šviežią 37 °C LB terpę su kanamicinu. Rekombinantinių baltymų antrinė raiškos kultūra kultivuota nekeičiant sąlygų, tikslinio baltymo geno heterologinę raišką indukavus 1 mM izopropil β-D-1-thiogalaktopiranozido (IPTG) 3 val., indukciją atliekant kultūros optiniam tankiui (OT) pasiekus OT₆₀₀ 0,5. Indukcija vykdyta nekeičiant aeracijos sąlygų ar temperatūros. Rekombinantinių fermentų išėiga, tirpumas bei lokalizacija įvertinta NDS-PAGE bei krakmolo arba pektino zimografija vertinant fermentų aktyvumą.

Charakterizuotų *in vitro* AmyA1 ir PL47 raiška buvo optimizuota *E. coli* BL21(DE3). Rekombinantinės AmyA1 (rAmy) raiškos optimizavimo metu

palyginta indukcijai taikytos IPTG koncentracijos sumažinimo nuo 1 mM iki 0,7 mM įtaka fermento išėigai, o rekombinantinės PL47 (rPL47) raiškos optimizavimo metu palyginta raiškos parametrų įtaka fermento išėigai bei tirpumui. rPL47 raiška vykdyta naudojant LB ir CASO terpes, 30 °C ir 37 °C kultivavimo temperatūras, 2 arba 3 val. indukuojant 0,1 arba 1 mM IPTG koncentracijomis, antrinei raiškos kamieno kultūrai pasiekus OT₆₀₀ 0,5 arba 0,75. Vykdyt rekombinantinių fermentų raiškos optimizavimą fermentų išėiga, tirpumas bei lokalizacija įvertinta NDS-PAGE bei krakmolo arba pektino zimografija vertinant fermentų aktyvumą.

2.14. PL47 raiška mieliagyriuose

Siekiant gauti sekretuojamą rPL47, liazė ekspresuota *P. pastoris* SMD1163 (fermento seką N-gale (ne)/papildžius α faktoriaus seka) bei *K. lactis* G7799 (fermento seką N-gale papildžius α faktoriaus seka (nepriklausomai naudojant dviejų skirtingų faktorių sekas) arba be minėto faktoriaus sekos). *P. pastoris* SMD1163 bei *K. lactis* G7799 transformantai, į kurių genomą sėkmingai integravosi aptarti PL47 variantai, kultivuoti ant agarizuotos YPD terpės 48 val., 30 °C. Gauta biomasė naudota pirminės raiškos kultūros inokuliavimui į YPD terpę, ir kultivuota 24 val., 30 °C, 250 rpm. Antrinė PL47 raiškos kultūra inokuliuota pirmine kultūra iki OT₆₀₀ 1 ir kultivuota nekeičiant terpės ar kultivavimo parametrų tris paras. Kultūros kultivavimo metu kas 24 val. vertintas kultūros biomasės prieaugis bei rPL47 sekrecijos išėiga. Suminiai raiškos kultūrų supernatantų baltymų preparatai, gauti sukcentravus antrinių raiškos kultūrų supernatantus, vertinant rPL47 išėiga analizuoti NDS-PAGE bei pektino zimografija.

2.15. Rekombinantinių fermentų gryninimas

Rekombinantiniai fermentai gryninti iš raiškos *E. coli* BL21(DE3) ląstelių viduląstelinės baltymų frakcijos. Gryninimui rAmyA1 bei rPL47 heterologinė raiška vykdyta iš 1 L antrinės raiškos kultūros, o gryninimui kitų rekombinantinių amilazių arba pektinazių raiška vykdyta iš 200 mL antrinių raiškos kultūrų. Atlikus rekombinantinių fermentų raiškos indukciją, *E. coli* BL21(DE3) ląstelės nuo supernatanto atskirtos centrifuguojant 7000×g, 30 min., 4 °C. Ląstelių dezintegracija vykdyta ultragarsu. Lizatas nuo gauto homogenizato atskirtas centrifuguojant 12000×g, 40 min., 4 °C.

Heteropolisacharidus skaidantys rekombinantiniai fermentai gryninti taikant dviejų gryninimo etapų strategiją. Nuo daugumos *E. coli* BL21(DE3) viduląstelinės frakcijos baltymų fermentai atskirti nikelio giminingumo

chromatografija (NiGCh), o jonų mainų chromatografija (JMCh) leido fermentus išgryninti iki homogeniškumo. Fermentų gryninimas vykdytas kambario temperatūroje naudojant BioLogic DuoFlow 40 vidutinio slėgio chromatografijos sistemą (Bio-Rad).

NiGCh naudota 1 mL Bio-Scale Mini Profinity IMAC (Bio-Rad) kolonėlė. Fermentai gryninti naudojant 20 mM TRIS-HCl pH 7/KT buferį su 250 mM NaCl. Lizato baltymų resuspendavimui bei kolonėlės ekvilibravimui minėtas buferis papildytas imidazolu iki 10 mM. Rekombinantinių fermentų giminingumas dervai užtikrintas klonuojant fermentų sekas N-gale papildžius nikelio giminingumo heksahistidininį inkarą (NiG-6HisIn) koduojančia seka. Gryninti fermentai eliuuoti linijiniu gradientu nuo 25 iki 250 mM imidazolo, 1 mL/min. pratekėjimu. NiGCh gryninamų netirpių fermentų tirpumas užtikrintas veikiant 4-6 M karbamido. Frakcijos, kuriose nustatyti gryninami baltymai, apjungtos bei dializuotos prieš jonų mainų buferį.

JMCh gryninti rekombinantiniai fermentai atsižvelgiant į jų koncentraciją naudojant kolonėles UNO Q1 arba UNO Q6 (Bio-Rad) ir 20 mM TRIS-HCl buferį, parenkant buferio pH/KT pagal apskaičiuotą gryninamo baltymo izoelektrinį tašką. rAmyA1 giminingumas JMCh dervai užtikrintas su pH 8,6/KT, o rPL47 – pH 9/KT. Gryninami fermentai eliuuoti linijiniu gradientu nuo 0 iki 1 M NaCl, 3 mL/min. pratekėjimu. Netirpių rekombinantinių fermentų tirpumas užtikrintas veikiant juos 4-6 M karbamido. rAmyA1 stabilumas, gryninant JMCh, užtikrintas 0,5 mM EDTA, o rPL47 tirpumas – 10 mM imidazolo ir 2 M karbamido. Atlikus fermentų gryninimą JMCh, frakcijos, kuriose nustatyti gryninami fermentai, apjungtos bei dializuotos prieš fermentų preparatų buferius. Išgrynintiems fermentams naudotas buferis 50 mM TRIS-HCl (pH 7/60 °C) arba 50 mM MES-NaOH (pH 6/60 °C). Karbamidas iš išgrynintų fermentų preparatų šalintas pakopomis, kas 2 M dializuojant fermentų preparatus prieš atitinkamą fermentų preparatų buferį. rPL47 tirpumą fermento preparato buferyje užtikrino 7 mM imidazolo. Tuo atveju, jei 6HisIn šalintas nuo išgryninto fermento makromolekulės, taikytas Thrombin Cleavage Capture Kit (Novagen) pagal gamintojo rekomendacijas. Pašalinus 6HisIn rekombinantinių fermentų preparatai dializuoti prieš minėtus fermentų preparatų buferius.

Vykdamas rPL47 tirpinimo optimizavimą parinktos sąlygos, leidžiančios baltymui gryninimo metu išlikti tirpiam. *E. coli* BL21(DE3) lizato netirpi frakcija veikta 2, 4, 6, 8 M karbamido bei 2, 4, 6 M guanidino-HCl koncentracijomis. Taip pat įvertinta 1 M NaCl, 500 mM imidazolo bei inkliuzijos kūnelių tirpdyimo reagento (Thermo Fisher Scientific) įtaka rPL47 tirpumui. Fermentų grynumas bei MM nustatyti NDS-PAGE, o fermentų aktyvumas –

krakmolo arba pektino zimografija. Baltymų koncentracija įvertinta Bredfordo metodu (184) naudojant Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Grynų fermentų koncentracija nustatyta matuojant A_{280} , atsižvelgus į apskaičiuotus fermentų ekstinkcijos koeficientus.

2.16. PL47 sekretinė produkcija

rPL47 sekretinė produkcija vykdyta kultivuojant 1 L *P. pastoris* SMD1163 raiškos kultūros su į genomą integruota *sp*.PL47 seka (N-gale papildyta *Saccharomyces cerevisiae* α faktorių koduojančia seka). Supernatantas nuo mieliagybio ląstelių atskirtas centrifuguojant $7000\times g$, 30 min., 4 °C, koncentruotas bei dializuotas prieš 50 mM TRIS-HCl (pH 7/60 °C) buferį tūrių santykiu 1:5000, 4 °C. Sekretuotos rPL47 grynumas, stabilumas bei MM įvertinta NDS-PAGE. Baltymų koncentracija nustatyta Bredfordo metodu.

2.17. Kiekybinis fermentinio aktyvumo nustatymas

Kiekybinis amilazių/pululanazių ir pektinazių fermentinis aktyvumas įvertintas vykdant reakciją 10 min., 60 °C, ir susidariusių redukuojančių cukrų koncentraciją vertinant spektrofotometriškai (540 nm) dinitrosalicilo rūgšties (DNS) metodu (185). Pululanolizinis aktyvumas vertintas 200 μ L 50 mM MES-NaOH (pH 6/60 °C) su 0,24 % (masė/tūryje) pululano (Sigma-Aldrich) ir 2 μ g pululanazės. Pektinolizinis aktyvumas vertintas 215 μ L 50 mM TRIS-HCl (pH 7/60 °C) su 1,4 % (masė/tūryje) PGA (Alfa Aesar) ir 9,45 μ g pektinazės. Fermentinės reakcijos stabdytos dvigubai didesniu tūriu DNS reagento (1 g 3,5-dinitrosalicilo rūgšties; 1,5 g NaOH; 20 g Na-K tartrato; 0,2 g Rochelle druskos [Na_2SO_3]; iki 100 mL dist. H_2O). Kontrolinių reakcijų sudėtis identiška aprašytoms fermentinėms reakcijoms, tik substratinis tirpalas papildomas fermentu, inkubuotu 20 min. 99 °C temperatūros sąlygomis.

Pululanolizinio aktyvumo vienetas (U) žymi pululanazės kiekį, per 1 min. katalizuojantį 1 μ mol redukuojančių cukrų susidarymą, maltotriozę naudojant redukuojančių cukrų standartu. Pektinolizinio aktyvumo vienetas (U) žymi pektinazės kiekį, katalizuojantį 1 μ mol redukuojančių cukrų susidarymą per 1 min., monogalakturno rūgštį naudojant redukuojančių cukrų standartu.

2.18. Temperatūros ir pH įtakos AmyA1 ir PL47 aktyvumui bei stabilumui charakterizavimas

Temperatūros įtaka pululanoliziniam rAmyA1 aktyvumui vertinta 4-95 °C intervale, esant pH 6 bei 7. rAmyA1 termostabilumas nustatytas fermentą 30, 60, 210, 270, 340 ir 960 min. inkubavus 60, 70 ir 80 °C, esant pH 6. Taip pat

buvo vertinta 1 ir 10 mM Ca^{2+} koncentracijos įtaka rAmyA1. Likutinis pululanolizinis aktyvumas spektrofotometriškai įvertintas atlikus pradinį fermento inkubavimą. Temperatūros įtaka PGA skaidymo bei pektinoliziniam rPL47 aktyvumui vertinta 10-90 °C intervale, esant pH 7 bei 8. rPL47 termostabilumas nustatytas fermentą 60 min. inkubavus 50-90 °C, esant pH 7. Likutinis PGA skaidymo aktyvumas spektrofotometriškai įvertintas atlikus pradinį fermento inkubavimą.

Charakterizuojant pH įtaką rAmyA1 ir rPL47 aktyvumui bei stabilumui naudoti buferiai: 50 mM natrio acetatas-acto rūgštis (pH 4-5), 50 mM MES-NaOH (pH 5-7), 50 mM TRIS-HCl (pH 7-8) ir 50 mM glicinas-NaOH (pH 8-10). rAmyA1 pululanolizinis bei rPL47 PGA skaidymo ir pektinolizinis aktyvumai, palaikant 60 °C, vertinti pH 4-10. pH įtaka rAmyA1 ir rPL47 stabilumui vertinta fermentų preparatus 60 min., 60 °C, inkubuojant minėtuose buferiuose pH 4-10. Likutinis pululanolizinis arba PGA skaidymo aktyvumas spektrofotometriškai įvertintas atlikus pradinį fermentų inkubavimą.

2.19. Metalų jonų ir reagentų įtakos AmyA1 ir PL47 aktyvumui charakterizavimas

Charakterizuojant metalų jonų įtaką rAmyA1 ir rPL47 aktyvumui fermentų preparatai 60 min., 60 °C, inkubuoti su 1 mM koncentracijos vienvalenčių bei divalenčių metalų ir trivalentės geležies chloridais. Taip pat įvertinta 50 mM Na^+ ir K^+ bei 10 mM Ca^{2+} koncentracijų įtaka fermentų aktyvumui. Metalų jonų įtaka rAmyA1 pululanoliziniui aktyvumui vertinta pH 6, o metalų jonų įtaka rPL47 PGA skaidymo aktyvumui vertinta pH 7. Atlikus pradinį fermentų preparatų inkubavimą su metalų chloridais spektrofotometriškai įvertintas fermentų aktyvumas. Reduktorių, chaotropikų, detergentų bei tirpiklių nurodytų koncentracijų įtaka rAmyA1 ir rPL47 aktyvumui charakterizuota identiškai, kaip vertinant metalų jonų įtaką.

2.20. AmyA1 ir PL47 substratinio savitumo nustatymas

rAmyA1 substratinis savitumas įvertintas naudojant pululaną iš *Aureobasidium pullulans* (Sigma-Aldrich), glikogeną iš jaučio kepenų (Sigma-Aldrich), tirpų krakmolą bei amilopektiną (Carl Roth). rPL47 substratinis savitumas įvertintas naudojant PGA, pektiną, karboksimetilceliuliozę (Fluka), natrio alginatą (Carl Roth) bei ksilaną iš *Betula pendula* (Sigma-Aldrich) ir pektino preparatą, išskirtą iš OI. Išskiriant pektiną, išdžiovintos OI triskart gausiai praplautos 50 mM natrio citrato-citrinų

rūgštis (pH 4,5/KT) buferiu ir 16 val. RT veiktos 10U/100 mL lakaze iš *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich). OI surinktos centrifuguojant 10000×g, 10 min., 20 °C bei triskart praplautos 50 mM TRIS-HCl(pH 7/60 °C) ir pakartotinai surinktos centrifuguojant minėtomis sąlygomis (126).

Charakterizuojant substratinį savitumą taikytos identiškos fermentinių reakcijų mišinių sudėtyms bei reakcijų sąlygos, kaip ir atliekant kiekybinį fermentų aktyvumo įvertinimą. Vertinant rekombinantinių fermentų gebėjimą skaidyti skirtingus substratus, taip pat taikytas fermentinių reakcijų inkubavimas 960 min. 1 ir 10 mM Ca²⁺ koncentracijos įtaka rAmyA1 substratiniam savitumui įvertinta naudojant visus minėtus fermento substratus. rPL47 pektinolinis aktyvumas, kai substratai – pektinas ir OI pektinas, vertintas pH 8. rPL47 PGA skaidymo į oligosacharidus aktyvumas taip pat vertintas matuojant sugertį A₂₃₅.

2.21. Plonasluoksne chromatografija

Charakterizuotų fermentų hidrolizės produktų ilgis, įvairovė bei koncentracija analizuota plonasluoksne chromatografija. Naudotos silikagelio-aliuminio plokštelės TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck), kurios paruoštos panardinant į nešiklį (n-butanolis-acto rūgštis-vanduo (5:5:3 tūrių santykiu)) ir 5 min. džiovinant 80 °C. Ant plokštelės užnešta 4 µL mėginio. Po frakcionavimo rAmyA1 fermentinių reakcijų OS vizualizuoti 20 % (tūris/tūryje) sieros rūgštis etanolyje tirpalu, o rPL47 fermentinių reakcijų produktai – 3 % (svoris/tūryje) fosfomolibdeno rūgštis ir 10 % (tūris/tūryje) sieros rūgštis etanolyje tirpalu, plokšteles džiovinant 10 min., 120 °C (186).

2.22. AmyA1 ir PL47 aktyvumo moduliavimas

Siekiant parinkti sąlygas, užtikrinančias ilgą grandinės OS produkciją iš pululano, PGA bei pektino, rAmyA1 ir rPL47 fermentinės reakcijos vykdytos skirtingomis kombinacijomis naudojant fermentų aktyvumui neoptimalias fermentinių reakcijų sąlygas. rAmyA1 fermentinio aktyvumo moduliavimo reakcijoms naudota 0,5-2 µg fermento, reakciją inkubuojant 5-25 min., pH 6-9, 40-60 °C. rPL47 aktyvumo moduliavimo reakcijoms naudota 2-6 µg fermento, inkubuojant 60-240 min., pH 4-10, 40-60 °C. Vertinant sąlygų, neoptimalių rekombinantinių fermentų aktyvumui, įtaką substratų skaidymo produktų grandinės ilgiui, po reakcijų inkubavimo kiekybinis fermentų aktyvumas vertintas spektrofotometriškai, o fermentinių reakcijų mišiniai analizuoti plonasluoksne chromatografija.

2.23. AmyA1 ir PL47 imobilizavimas

Rekombinantiniai fermentai (kiekvieno naudota po 0,565 mg) imobilizuoti naudojant nešiklius: Sepabeads EC-HA/M (Resindion) pagal Nawani ir kt. (187), Sepabeads EC-P/M (Resindion) pagal Pessela ir kt. (188) bei kalcio alginatą (Carl Roth) pagal Roy ir Gupta (189).

Imobilizavimo įtakos rAmyA1 ir rPL47 aktyvumui bei termostabilumui įvertinimas atlikas identišškai kaip charakterizuojant pastarąsias rekombinantinių fermentų charakteristikas nevykdžius imobilizavimo. Imobilizuotos rPL47 substratinis savitumas taip pat charakterizuotas identišškai kaip neimobilizuoto fermento. Atliekant imobilizavimo įtakos fermentų charakteristikoms įvertinimą, fermentų aktyvumas nustatytas spektrofotometriškai, naudojant DNS reagentą. Fermentinių reakcijų mišiniai analizuoti plonasluoksne chromatografija.

2.24. PL47 konstitutyvios sekrecijos įvertinimas *Geobacillus* sp. PA-3

Geobacillus sp. PA-3 kultivuotas analogiškoje sukaupiamųjų MO kultūrų kultivavimui naudotoje terpėje, tik be heteropolisacharidų, su 0,4 % (svoris/tūris) mielių ekstrakto. Kamieno kultūra kultivuota Erlenmėjerio kolbose, terpe užpildant $\leq 1/3$ kolbos tūrio, inokuliuojant 1 % (tūris/tūris) identiškos sudėties terpėje auginta kultūra, pasiekusia eksponentinės fazės vidurį. Po inokuliacijos *Geobacillus* kultūra kultivuota aeruojant 250 rpm, 60 °C, iki stacionarios augimo fazės. Kultūros augimo dinamika vertinta kas 30 min., OT₆₀₀. Remiantis sudaryta kultūros augimo dinamikos kreivė, PL47 konstitutyvaus produkavimo įvertinimui surinktas ankstyvosios ir vėlyvosios eksponentinės bei ankstyvosios stacionarios augimo fazių kamieno kultūros sekretomai. Atitinkamų kamieno augimo tarpsnių ekstraktų baltymų suminiai preparatai gauti koncentravus amonio sulfatu. Įvertinus natyvos PL47 sekrecijos išėigą, fermento pektinolizinis aktyvumas detektuotas pektino zimografija.

2.25. *Geobacillus* sp. PA-3 genomo nuskaitymas bei anotavimas

Geobacillus sp. PA-3 kultūra kultivuota skystoje terpėje Difco Nutrient Broth (BD Diagnostics) 8 val., aeruojant 200 rpm, 60 °C. Centrifuguojant surinkus kamieno ląsteles, genomine DNR išskirta naudojant GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific), remiantis

gamintojo instrukcija. Išskirtos genominės DNR integralumas analizuotas agarozės elektroforeze. DNR koncentracija nustatyta matuojant A_{260} .

Pirminė *Geobacillus* sp. PA-3 genomo seka nuskaityta, taikant našią naujos kartos sekoskaitos strategiją, generuojant Illumina HiSeq2500 system (BaseClear, Leidenas, Nyderlandai). Nuskaitytos genomo atkarpos FASTQ formatu suformuotos Illumina Casava pipeline 1.8.3 (BaseClear). Sekoskaitos metodu generuotos kamieno genominės DNR atkarpos į vientisą genomo seką buvo surenkamos (190) naudojant SPAdes Genome Assembler 3.1.0 programą. Automatinis genomo anotavimas, įvertinant genome koduojančių sekų, rRNR regionų bei tRNR genų skaičių, buvo atliekamas GenDB programa (191), o būtini papildomi patikslinimai, anotuojant genomo ASR rinkinį, atlikti pasitelkiant InterProScan (174), Pfam 28 (175) bei NCBI CCD 3 (173) serverius. Determinuotos tiriamo kamieno genomo sekos palyginimui su kitų *Geobacillus* spp. sekvenuotais genomais buvo naudojama EDGAR programa (190). Palyginamasis *Geobacillus* sp. PA-3 genomo atlasas su filogenetiškai artimiausių kamienų genomais parengtas GView 1.7 (192). Angliavandenių katabolizmo fermentai *Geobacillus* sp. PA-3 genome anotuoti dbCAN serveriu (172), remiantis CAZy duomenų baze (12). Horizontalios genų pernašos dėka į *Geobacillus* sp. PA-3 genomą patekę regionai bei regionų struktūra identifikuota IslandViewer 4 (193) serveriu. Identifikuotų regionų, patekusių dėka HGP, struktūrinis tapatumas anotuotoms genų santalkoms analizuotas NCBI BLAST serveriu (52).

2.26. AmyA1 homologo ir PL47 operoninės organizacijos nustatymas

Charakterizuojant AmyA1 homologą ir PL47 koduojančių genų operoninę organizaciją remtasi *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 genomo anotavimu. Genų promotoriai nuspėti BPROM Softberry (194), terminatoriai – FindTerm Softberry (194) bei ARNold (195) programomis. Priskirtinumas operonams analizuotas FGENESB Softberry (194) programa bei įvertintas MicrobesOnline (196) ir Prokaryotic Operon Database (197) duomenų bazėse.

2.27. Baltymų elektroforezė

Baltymų išskirstymui naudota vienakryptė, vertikali, nutrūkstama, glicino natrio dodecilsulfato-poliakrilamido gelio elektroforezė (NDS-PAGE) (56). NDS-PAGE vykdyta kambario temperatūroje, naudojant koncentruojančiuosius ir išskirstančiuosius, atitinkamai, 4 ir 12 % akrilamido/

N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 37,5:1) gelius, palaikant 30 V/cm įtampą. Mėginių užnešimui naudotas 4x mėginio buferis 50 mM TRIS-HCl (pH 6,8/KT) buferis su 20 mM β-ME ir 4 % (masė/tūris) NDS bei 20 % (tūris/tūris) glicerolio ir 0,01 % (masė/tūris) bromfenolio mėlynojo. Jei kitaip nenurodyta, gauti mišiniai prieš užnešimą 5 min. kaitinti 95 °C. Baltymai vizualizuoti PageBlue Protein Staining solution (Thermo Fisher Scientific) dažant pagal gamintojo rekomendacijas.

2.28. Statistinė analizė

Jei kitaip nenurodyta, nepriklausomų kartojimų skaičius n=3-12. Matavimų rezultatų vertės laikytos statistiškai patikimomis, jei $p \geq 0,05$, pateikiant vidurkius ± standartinius nuokrypius.

3. REZULTATAI

3.1. Krakmolą arba pektiną skaidančių fermentų atranka

3.1.1. Fermentų iš sukaupiamųjų kultūrų detekcija bei identifikavimas

Siekiant detektuoti krakmolą arba pektiną skaidančius fermentus 2010 m. kovo mėn. Vilniaus universiteto Botaniko sodo Vingio parko padalinyje (Vilniaus m. sav., Lietuva) buvo surinkti trąšios dirvos mėginiai: D1; D2; D3; D4; D5; D6; PEK, o mėginiai: A1; A2; DSP1; IK; J1; J2; J3; J4; KO1; KO2; KO3; KO4; KO5; Komp; OP; poL; poLLac; PS1; PS2; PSP1; RP1; RP2 buvo surinkti 2011 m. spalio bei lapkričio mėn. Rubinavo kaimo apylinkėse (Šilalės raj., Lietuva).

Kiekvienas dirvos mėginys (1 g) naudotas sukaupiamosios kultūros gavimui. Siekiant detektuoti amiloliziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus, sukaupiamųjų kultūrų kultivavimo terpės papildytos 1 % (masė/tūryje) krakmolo. Skysta sukaupiamųjų kultūrų terpė papildyta 0,375 % (masė/tūryje) pektino arba 1 % (masė/tūryje) OI, siekiant sudaryti kultivavimo sąlygas, palankias pektiną skaidančių MO vyravimui sukaupiamajoje kultūroje. Krakmolą, pektiną arba OI sukaupiamųjų kultūrų MO tarnavo kaip vieninteliai anglies bei energijos šaltiniai. Sukaupiamosios kultūros gebėjimas įsisavinti konkretų PS laikytas reikšmingu, jei gautas kultūros biomasės priaugis siekė $\geq 2,5 \times 10^3$ kfv/mL.

Sudarius minėtas selektyvumo sąlygas nustatyta, jog krakmolą efektyviai įsisavino sukaupiamosios kultūros A1 bei RP2 (4 lentelė). Pastarosios kultūros demonstravo išreikštą biomasės augimą pH 6 bei taip pat augo kultivavus pH 7, tačiau minėto augimo sąlygomis augimas nesiekė $\geq 2,5 \times 10^3$ kfv/mL. Pektiną bei pektiną iš OI gebėjo įsisavinti DSP1; PEK; poL; PS2 bei PSP1 kultūros, kultivuotos pH 7 terpėje (4 lentelė). Sukaupiamosios kultūros KO4 bei KO5 pektiną bei pektiną iš OI efektyviai įsisavino tik esant pH 8. Pastarųjų sukaupiamųjų kultūrų augimas pH 7 sąlygomis nesiekė $\geq 2,5 \times 10^3$ kfv/mL. Sukaupiamoji kultūra PEK efektyviai skaidė pektiną bei pektiną iš OI kultivavus ir pH 7, ir pH 8 terpėje (4 lentelė). Sukaupiamosios kultūros Komp ir OP, esant pH 6 ir 7, pektino neskaidė, tačiau aktyviai įsisavino pektiną iš OI (4 lentelė). Aptartomis kultivavimo sąlygomis, pagrindiniu anglies bei energijos šaltiniu naudojant krakmolą, pektiną arba OI, iš dirvos mėginių: A2; D1; D2; D3; D4; D5; D6; IK; J1; J2; J3; J4; KO1; KO2; KO3; poLLac; PS1; RP1 mikroorganizmų kultūrų augimo negauta.

4 lentelė. Amilolizinių ir/ar pektinolizinių aktyvumą demonstravusių fermentų, išskirtų iš sukauptųjų kultūrų, žimografinė detekcija bei identifikavimas masių spektrometrija

Sukauptieji kultūra*	Zimogramose detektuotos aktyvumo zonos: amilolizinio** (amy), pektinolizinio*** (pek)	Masių spektrometrija identifikuotas baltymų skaičius****	Tikėtina aktyvumą žimogramoje demonstravęs baltymas (atrinkto baltymo trumpinys)	Aktyvumą tikėtina demonstravusio baltymo molekulinė masė, Da	Identifikuotų oligopeptidų skaičius/ Dengimas, %/ Įvertis
A1 (pH 6; krakmolas)	A1 amy zona ties ~83 kDa	37	I tipo pululanazė homologiška <i>Geobacillus</i> hipotetinei pululanazei (AmyA1)	81698	3/4/60
DSP1 (pH 7; pektinas, obuolių išspaudos)	DSDpek-1 zona ties ~75 kDa	33	baltymas homologiškas hipotetiniam konservatyviam <i>Geobacillus</i> sp. G11MC16 baltymui DI43_5 (P11)	17161x4****	4/35/161
	DSDpek-2 zona ties ~50 kDa	27	pektato liazė homologiška <i>Bacillus</i> sp. TS47 pektato liazei (PL47)	50197	8/19/1578
	KO4pek-1 zona ties ~85 kDa KO4pek-2 zona ties ~55 kDa KO4pek-3 zona ties ~30 kDa	- - -	- - -		
KO5 (pH 8; pektinas, obuolių išspaudos)	KO5pek-1 zona ties ~85 kDa	9	bioinformacine masių spektrometrija patikimai detektuotų baltymų sekų analizė neleido priskirti pektinolizio aktyvumo nė vienam identifikuotų baltymų	-	
	KO5pek-2 zona ties ~60 kDa KO5pek-3 zona ties ~30 kDa	32 17	pektato liazė homologiška <i>Bacillus</i> sp. TS47 pektato liazei (PL47) baltymas homologiškas hipotetiniam <i>Geobacillus</i> sp. WCH70 baltymui	50197 13819x2	11/33/429 6/27/122

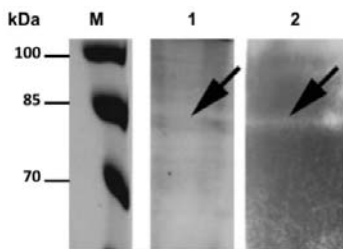
Komp (pH 6,7; obuolių išspaudos)																				
OP (pH 6,7; obuolių išspaudos)																				
PEK (pH 7,8; pektinas, obuolių išspaudos)																				
poL (pH 7; pektinas, obuolių išspaudos)																				
PS2 (pH 7; pektinas, obuolių išspaudos)																				
PSP1 (pH 7; pektinas, obuolių išspaudos)																				
RP2 (pH 6; krakmolai)																				

*kiekvienos sukaupiamosios kultūros atžvilgiu nurodyti pH bei anglies šaltinis, užtikrinę kultūros augimą;
**krakmolo zimografija vertintas sukaupiamosios kultūros ekstraktelinų baltymų amilolizinis aktyvumas baltymų frakciją išskyrus iš sukaupiamosios kultūros, kultivuotos 60°C, pH 6 terpeje su krakmolu, supernatanto;
***PGA zimografija vertintas sukaupiamosios kultūros ekstraktelinų baltymų pektinolizinis aktyvumas baltymų frakciją išskyrus iš sukaupiamosios kultūros, kultivuotos 60°C, pH 7 terpeje su pektinu, supernatanto;
***baltymas laikytas patikimai identifikuotu, jei masių spektrometrija identifikuoti ne mažiau du oligopeptidai, identifikavę baltymo seką (198);
***,x4“ – aktyvumą zimogramoje demonstravo atrinkto baltymo homotetrameras, atitinkamai „x2“ – homodimeras.

Sukaupiamųjų kultūrų A1 ir RP2 ekstraląstelinėje baltymų frakcijoje krakmolo zimografija detektuoti ~83 kDa ir ~110 kDa MM termoaktyvūs bei termostabilūs amiloliziniai fermentai. Abu detektuoti baltymai produkuoti maža išėiga, nes zimografijai naudojus 15 µg suminio ekstraląstelių baltymų preparato, po 24 val. inkubavimo nustatytas silpnai išreikštas detektuotų fermentų amilolizinis aktyvumas (4 pav.). Mažą amilolizinių fermentų koncentraciją A1 ir RP2 sukaupiamųjų kultūrų suminiame ekstraląstelių baltymų preparate taip pat netiesiogiai patvirtino tai, jog krakmolo zimogramoje amilolizinio aktyvumo zonas sugretinti su konkrečiu baltymu NDS-PAGE gelyje nepavyko (4 pav.).

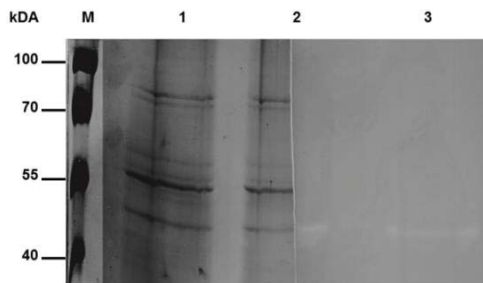
Devynių sukaupiamųjų kultūrų ekstraląstelių baltymų suminiuose preparatuose PGA zimografija detektuoti pektinolizinį aktyvumą demonstravę fermentai (4 lentelė). Sukaupiamosios kultūros pagal zimograminių profilių panašumą suskirstytos į tris sąlygines grupes. Komp, OP, PEK, poL, PS2 bei PSP1 sukaupiamųjų kultūrų MO produkavo ~50 kDa pektinazę didele išėiga, vertinant pektinolizinio aktyvumo zonas zimogramose bei sėkmingą aktyvumo zonas asocijavimą su detektuotu ~50 kDa baltymu NDS-PAGE gelyje (5 pav.). KO4 ir KO5 sukaupiamosios kultūros sudaro vieną grupę, kurios kultūrų ekstraląstelių baltymų preparate nustatyti trys ~30, ~55(60) bei ~85 kDa pektinoliziniai fermentai (nepateikti rezultatai). Pastarųjų kultūrų fermentų produkcijos išėiga buvo maža, detektuoti ~30 bei ~85 kDa MM fermentai demonstravo silpną aktyvumą lyginant su ~55(60) kDa pektinazės aktyvumu, stebėtu PGA zimogramose (nepateikti rezultatai). Atsižvelgus į zimograminį profilį, DSP1 sukaupiamoji kultūra išskirta į atskirą grupę. DSP1 kultūros MO maža išėiga produkavo ~50 bei ~75 kDa pektinazes, demonstravusias išreikštą pektinolizinį aktyvumą (nepateikti rezultatai).

Masių spektrometrija analizuotos A1, RP2 sukaupiamųjų kultūrų amilolizinio aktyvumo zonos. Pektinolizinio aktyvumo zonos MS analizuotos atsižvelgus į aptartą sukaupiamųjų kultūrų grupavimą pagal zimografiškai nustatytus pektinolizinio aktyvumo profilius. MS baltymai identifikuoti iš DSP1 pektinolizinio profilio abiejų aktyvumo zonų. Baltymai identifikuoti (4 lentelė) iš KO5 nustatytų pektinolizinio aktyvumo zonų, o KO4 mėginio pektinolizinio aktyvumo zonų baltymai neidentifikuoti. Iš gausiausios sukaupiamųjų kultūrų grupės: Komp, OP, PEK, poL, PS2 bei PSP1, MS tirtos tik PEK bei PS2 pektinolizinio aktyvumo zonos (4 lentelė). Jei MS patikimai nustatyti ne mažiau kaip du oligopeptidai, identifikuojantys baltymo seką, traktuojama, kad baltymas identifikuotas patikimai (199). Analizuotuose zimogramų mėginiuose patikimai identifikuotų baltymų skaičius svyravo nuo 9 iki 37 (4 lentelė).



4 pav. Natyvio AmyA1 pululanazės aktyvumo detekcija ir natyvaus fermento produkcijos nustatymas sukaupiamosios kultūros A1 supernatante.

Takeliai: 1 – sukaupiamosios kultūros A1 supernatanto suminio baltymų preparato* analizė NDS-PAGE (rodyklė žymi baltymų elektroforezinio profilio sritį, kurioje, sugretinus su aktyvumo zona, nustatyta natyvi AmyA1); 2 – natyvio AmyA1 amilolizinio aktyvumo detekcija krakmolo zimografija* (rodyklė žymi natyvaus fermento aktyvumo zoną – A1amy zoną); M – baltymų molekulių masių žymuo PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). *į takelį užnešta ~15 µg suminė baltymų masė.



5 pav. Natyvio PL47 pektato liazės aktyvumo detekcija ir natyvaus fermento produkcijos nustatymas sukaupiamosios kultūros PEK supernatante.

Takeliai: 1 – sukaupiamosios kultūros PEK supernatanto suminio baltymų preparato* analizė NDS-PAGE; 2 – natyvio PL47 molekulinės masės bei išėigos nustatymas dėka sukaupiamosios kultūros PEK suminio baltymų preparato baltymų elektroforezinio profilio sugretinimo su natyvio PL47 aktyvumo zona; 3 – natyvio PL47 pektinolizinio aktyvumo detekcija PGA zimografija* (pektinolizinio aktyvumo PEKpek zona); M – baltymų molekulių masių žymuo PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). *į takelį užnešta ~15 µg suminė baltymų masė.

Patikimai identifikuotų baltymų sekos analizuotos *in silico* siekiant nustatyti, kurių baltymų fermentinis aktyvumas nustatytas zimografija. Bioinformatine analize vertinta identifikuotų baltymų sekų homologija biochemiškai charakterizuotiems fermentams, identifikuotos sekos domeninė organizacija bei išskirtų domenų homologija konservatyvių domenų, kurie patikimai atspindi priskirtinumą konkrečiai baltymų/fermentų grupei, sekoms. MS analizuojant identifikuotų baltymų sekas, taip pat *in silico* nuspėtos SP sekos bei atsižvelgus į homologiją charakterizuotų baltymų sekoms vertintas identifikuoto baltymo gebėjimas homo/heterooligomerizuotis.

Identifikuotų baltymų sekų bioinformatinė analizė leido aukštu patikimumu nustatyti sukaupiamųjų kultūrų amilolizinius bei pektinolizinius fermentus visų zimografija detektuočių aktyvumo zonų atžvilgiu (4 lentelė). Visgi atlikus devynių iš KO5pek-1 mėginio identifikuotų baltymų bioinformatinę analizę, nepavyko nustatyti, kuris baltymas(-ai) (~85 kDa) skaidė PGA, nes identifikuotų baltymų funkcijos, pagal jų sekų homologiją jau aprašytiems baltymams, negalėjo būti susietos su pektinolize (nepateikti rezultatai). Aštuoniuose mėginiuose *in silico* nustatyti penki tikėtinai zimogramose aktyvumą demonstravę fermentai, produkuoti sukaupiamųjų kultūrų MO.

Alamy krakmolo zimografija detekuotą amilolizinio aktyvumo zoną, tikėtina, lėmė I tipo pululanazės (AmyA1) aktyvumas. Detekuotos pululanazės seka beveik 83 % identiška *G. thermoleovorans* US105 išsamiai aprašytos I tipo monomerinės pululanazės (EMBL CAC85704.1 (200)) sekai. AmyA1 sekoje SP nuspėtas. RP2amy amilolizinio aktyvumo zoną, detekuotą ties ~110 kDa, tikėtina, lėmė *Geobacillus kaustophilus* HTA426 GK2898 hipotetinio baltymo (DDBJ BAD77183.1) homologas (hGK2898), kurio seka daugiau nei 99 % identiška GK2898 polipeptido sekai. GK2898 baltymo seka nėra homologiška jokio charakterizuoto fermento sekai, polipeptido sekoje detekuoti konservatyvūs domenai ir/ar motyvai *in silico* taip pat nuspėti. hGK2898 tikėtinai sekretuojamas baltymas, nes polipeptido sekoje ¹M---A²⁸ patikimai nuspėtas SP.

DSDpek-2, KO5pek-2, PEKpek bei PS2pek pektinolinio aktyvumo zonos, tikėtina, atspindi pektato liazės, daugiau nei 99 % homologiškos *Bacillus* sp. TS47 sekretuojamos monomerinės pektato liazės PL47 (EMBL BAB40336.1 (163)) sekai, aktyvumą. Detekuota liazė, tikėtina, sekretuojamas fermentas – PL47 polipeptido sekoje ¹M---A²⁵ nuspėtas SP. PGA zimografija detekuotas DSDpek-1 bei KO5pek-3 pektinolinio aktyvumo zonos, tikėtina, lėmė mažos MM pektinazės, atitinkamai P11 ir P10, homologiškos hipotetiniams baltymams, anotuotiems *Geobacillus* genomuose. DSDpek-1 zona galimai atspindi P11 – *Geobacillus* sp. G11MC16 hipotetinio baltymo DI43_5 (GenBank EDY066831.1) homologo, >99 % identiško DI43_5 polipeptido sekai, gebėjimą skaidyti PGA; tikėtinai suformavus homotetramerą. P11 polipeptido sekoje SP nenustatytas. Detekuotas P10 baltymas, kurio, tikėtina, homodimero pektinolinį aktyvumą atspindi KO5pek-3 pektinolinio aktyvumo zona, beveik visiškai identiškas hipotetiniam *Geobacillus* sp. WCH70 GWCH70_0582 baltymui bei 68 % identiškas *Bacillus thermoamylovorans* 1A1 koduojamai, tikėtina, įvairius PS degraduojančiai amilazei (EMBL CEE03027.1). P10 sekoje patikimai ²²⁴G---R³³¹ detekuotas konservatyvus sekos domenas (pfam00877 (210)), sutinkamas amilazių sekose. *In silico* P10 sekoje ¹M---K²⁷ nuspėtas SP.

3.1.2. Fermentų iš dirvožemio mėginių detekcija bei identifikavimas

Siekiant detekuoti krakmolą arba pektiną gebančius skaidyti fermentus, produkuotus dirvožemio MO, atliktas suminių baltymų preparatų išskyrimas iš 29 trąšios dirvos mėginių, taip pat naudotų sukaupiamųjų kultūrų gavimui. Pasirinkta metodika (169) leido suminių baltymų preparatus išskirti nedenaatūruojančiomis sąlygomis, nuolat palaikant ~4 °C bei vertinant pH.

Dirvožemio MO produkuotus baltymus pavyko išskirti iš visų mėginių,

tačiau skirtingu efektyvumu. Suminis išskirtų baltymų kiekis svyravo tarp 387-1608 μg . Amilolizinį aktyvumą demonstravo tik RP2 mėginio išskirtas baltymas(-ai) (5 lentelė), o pektiną gebantys skaidyti, termoaktyvūs ir/ar termostabilūs fermentai detektuoti suminiuose D4; IK bei RP1 dirvos mėginių baltymų preparatuose (5 lentelė). Iš likusių dirvos mėginių išskirtuose suminiuose baltymų preparatuose fermentų, demonstravusių amilolizinį arba pektinolinį aktyvumą, nedetektuota.

RP2 dirvos mėginio suminio baltymų preparato analizė krakmolo zimografija leido detektuoti ~110 kDa amilolizinį fermentą, kurio aktyvumas buvo silpnai išreikštas, todėl tikėtina, jog detektuoto fermento kiekis buvo mažas (nepateikti rezultatai). PGA zimogramose detektuotas D4; IK bei RP1 mėginių suminių baltymų preparatų pektinolinis aktyvumas, tačiau lyginant pastarųjų mėginių profilius, akivaizdu, jog jie skirtingi ir negali būti grupuojami (5 lentelė). D4 bei RP1 suminiuose preparatuose detektuotų ~35 kDa bei ~50 kDa pektinazių koncentracija buvo maža atsižvelgus į jų aktyvumo zonų intensyvumą, detektuotą taikius PGA zimogramų inkubavimą 24 val. (nepateikti rezultatai), o trijų skirtingų MM (atitinkamai ~25, ~40 ir ~80 kDa) pektinazės, išskirtos iš IK mėginio, aktyvumo zonos zimogramose (nepateikti rezultatai) buvo išreikštos, kas netiesiogiai pažymi aukštą pastarųjų fermentų koncentraciją IK suminiame baltymų preparate.

Išreikštų amilolizinio bei pektinolinio aktyvumo zonų baltymų identifikavimas MS buvo sėkmingas (5 lentelė). Remiantis baltymų identifikavimo patikimumo bei identifikavimo tikslumo kriterijais, identiškais taikytiems identifikuojant baltymus iš sukaupiamųjų kultūrų amilolizinio arba pektinolinio aktyvumų zonų, patikimai identifikuotų baltymų skaičius analizuotuose zimogramų mėginiuose nustatytas 2-44 skirtingų baltymų, išskirtų iš dirvos mėginių (5 lentelė).

Iš sukaupiamųjų kultūrų zimogramų mėginių MS identifikuotų baltymų bioinformatine analize *in silico* pavyko aukštu patikimumu nustatyti, kurie iš dirvos mėginių identifikuoti baltymai demonstravo gebėjimą skaidyti krakmolą arba PGA (5 lentelė). Visgi kurie iš detektuotų baltymų demonstravo aktyvumą D4pek bei RP1pek-1 ir RP1pek-2 zonų atveju, nepavyko nustatyti, nes identifikuotų baltymų funkcijos, atsižvelgus į jų sekų homologiją aprašytiems baltymams, negalėjo būti sietinos su pektinolize. Keturiuose zimogramų mėginiuose *in silico* nustatyti keturi, tikėtina, zimogramose aktyvumą demonstravę iš dirvos mėginių išskirti fermentai.

RP2amy amilolizinio aktyvumo zoną ties ~110 kDa, tikėtina, lėmė baltymo hGK2898 homodimero aktyvumas, kuris detektuotas ir RP2 sukaupiamosios kultūros MO produkuotiems baltymams skaidant krakmolą (5 lentelė).

5 lentelė. Amilolizinių ir/ar pektinolizinių aktyvumą demonstravusių fermentų, išskirtų iš dirvožemio mėginių, zimoografinė detekcija bei identifikavimas masių spektrometrija

Dirvožemio mėginys	Zimogramose detektuotos aktyvumo zonos: amilolizinio* (amy), pektinolizinio** (pek)	Masių spektrometrija identifikuotas baltymų skaičius***	Tikėtina aktyvumą zimoogramoje demonstravęs baltymas (atrinkto baltymo trumpinys)	Aktyvumą tikėtina demonstravusio baltymo molekulinė masė, Mr	Identifikuotų oligopeptidų skaičius/ Dengimas, %/ Ivertis
D4	D4pek zona ties ~35 kDa	2	bioinformatinė masių spektrometrija patikimai detektuotų baltymų sekų analizė neleido priskirti pektinolizinio aktyvumo nė vienam identifikuotų baltymų	-	
IK	IKpek-3 zona ties ~80 kDa	34	hipotetinis baltymas, homologiškas įvairius cukrus skaidančiam <i>Geobacillus</i> sp. WCH70 fermentui GWCH70_3172 (X16)	37687x2****	11/18/141
	IKpek-2 zona ties ~40 kDa	29	hipotetinis baltymas, homologiškas įvairius cukrus skaidančiam <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2 fermentui GTNG 3182 (X17)	37646	8/15/153
RP1	IKpek-1 zona ties ~25 kDa	41	hipotetinis baltymas, homologiškas hipotetiniams <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2 baltymui GTNG_0378 (P12)	22498	4/12/54
	RP1pek-2 zona ties ~50 kDa	7	bioinformatinė masių spektrometrija patikimai detektuotų baltymų sekų analizė neleido priskirti pektinolizinio aktyvumo nė vienam identifikuotų baltymų	-	
RP2	RP1pek-1 zona ties ~35 kDa	4			
	RP2amy zona ties ~110 kDa	44	hipotetinis baltymas, homologiškas hipotetiniams <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 baltymui GK2898 (hGK2898)	53056x2	7/5/67

*iš dirvožemio mėginio išskirto suminio baltymų preparato amilolizinis aktyvumas pH 6, esant 60°C, vertintas krakmolo zimografija;

**iš dirvožemio mėginio išskirto suminio baltymų preparato pektinolizinis aktyvumas pH 7, esant 60°C, vertintas PGA zimografija;

***baltymas laikytas patikimai identifikuotu, jei masių spektrometrija identifikuota ne mažiau du oligopeptidai, identifikavę baltymo seką (198);

****„x2“ – aktyvumą zimogramoje demonstravo atrinkto baltymo homodimeras.

IK dirvos mėginio suminiame baltymų preparate išskirtos dvi tarpusavyje homologiškos ~40 kDa pektinazės, atitinkamai X17 (aktyvumo zona IKpek-2) bei aktyvumą demonstravusi, homodimerą suformavusi X16 (aktyvumo zona IKpek-3), homologiškos hipotetinėms, galimai įvairius angliavandenius skaidančioms amilazėms, anotuotoms *Geobacillus* spp. genomuose. X17 seka daugiau nei 99 % identiška hipotetinei *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 GTNG_3182 amilazei (GenBank ABO68527.1). X16 seka daugiau nei 99 % identiška hipotetinei *Geobacillus* sp. WCH70 GWCH70_3172 amilazei (GenBank ACS25830.1). Deja, pastarieji fermentai nėra tirti, hipotetinių amilazių oligomerizacija taip pat nėra charakterizuota. X16 ir X17 sekose ²²⁴G---R³³¹ patikimai detektuojamas konservatyvus, amilazių sekose sutinkamas domenas (pfam00877 (175)). *In silico* X16 ir X17 sekose nuspėti signaliniai peptidai, atitinkamai ¹M---R²⁶ ir ¹M---A²⁸. Trečioji iš IK mėginio išskirta pektinazė (P12), demonstravusi aktyvumą ties ~25 kDa, daugiau nei 99 % homologiška netirtam hipotetiniam *G. thermodenitrificans* NG80-2 GTNG_0378 baltymui (GenBank ABO65760.1). P12 sekoje ¹M---A²² identifikuotas signalinis peptidas.

3.1.3. Fermentų genų klonavimas bei aktyvumo patvirtinimas

Atsižvelgiant į aktyvumo detekcijos sąlygas, siekiant *in vitro* detektuoti didžiausią įmanomą amilazių bei pektinazių, produkuotų kultivuojamų ir/arba nekultivuojamų MO, įvairovę, MS analizuoti baltymai išskirti tiesiogiai iš zimogramų mėginių. Pastaroji fermentų identifikavimo strategijos modifikacija anksčiau sėkmingai taikyta PS skaidančių fermentų atrankai iš įvairių gamtinių šaltinių (16, 17, 25). Nekultivuojamų MO produkuoti fermentai metaproteominiuose mėginiuose išskiriami itin mažais kiekiais (20, 21, 169). Jei tiriamus fermentus produkuoja kultivuojami MO, sukaupiamųjų kultūrų metodas leidžia santykinai padidinti dominančių fermentų kiekį (201, 202), tačiau visgi ne visais atvejais užtikrina reikšmingą fermentų kiekio padidinimą (23). Atsižvelgus į galimai mažą natyvių fermentų kiekį, amilolizinį ar pektinolizinį aktyvumus demonstravę sukaupiamųjų kultūrų produkuoti baltymai bei metaproteominiuose baltymų preparatuose aptikti fermentai prieš identifikavimą MS nebuvo gryninti. Atlikus *in silico* baltymų iš zimogramų mėginių bioinformatinę analizę, susidurta su būtinybe detektuotą aktyvumą priskirti konkrečiam MS identifikuotam baltymui. Bioinformatinės analizės metu vertintos (17, 24, 25) identifikuoto polipeptido sekos charakteristikos leido patikimai nustatyti baltymus, demonstravusius fermentinį aktyvumą (3 ir 4 lentelės). Makromolekuliniai fermentų substratai, tarp jų ir PS, nežymiai lėtina (5-10 %) baltymų

migravimą poliakrilamidiniu geliu (203). Į galimą PS įtaką baltymų migravimui, vertinant amilolizinio bei pektinolizinio aktyvumo zonų baltymų MM, neatsižvelgta, laikant, jog baltymų MM žymens standartų migravimą PS irgi lėtino. Fermentų, skaidančių krakmolą ar pektiną, detekcijos bei bioinformatinės atrankos rezultatai buvo patvirtinti baltymus, sietinus su zimografija detektuoju aktyvumu, klonavus bei įvertinus rekombinantinių baltymų fermentinį aktyvumą *in vitro* (6 lentelė).

Tikėtina, amilolizini arba pektinolizini aktyvumą demonstravusių baltymų genų sekos pagausintos sukonstruotais pradmenimis matricomis naudojant suminius DNR preparatus, išskirtus iš atitinkamų sukaupiamųjų kultūrų MO ląstelių arba tiesiogiai iš dirvos mėginių (6 lentelė). Baltymų genų klonavimui pradmenys sudaryti atsižvelgiant į baltymų raiškos vektoriaus pET-28c(+) architektūrą, įterpiant restrikcijos endonukleazių atpažįstamas sekas (6 lentelė). Jei tikėtino fermento sekoje nuspėtas SP, tuomet baltymas klonuotas be SP sekos. Hipotetinė, galimai pektinolizini aktyvumą demonstravusi, įvairius cukrus skaidanti amilazė X16 nebuvo klonuota, kadangi buvo beveik visiškai homologiška taip pat iš IK metaproteominio mėginio identifiikuotai hipotetinei, tikėtina, įvairius cukrus skaidančiai amilazei X17.

Sėkmingai pagausintos patvirtintos sekos (remiantis ne mažiau dviejų nepriklausomai nuskaitytų geno fragmentų sutapimu), tikėtinų fermentų genai klonuoti į pET-28c(+), o gauti konstruktai elektroporuoti į heterologinės baltymų raiškos kamieną *E. coli* BL21(DE3). Taikant pirmines baltymų heterologinės raiškos sąlygas, nurodytas 2.11. dalyje, *E. coli* BL21(DE3) ekspresavo visus rekombinantinius baltymus. Visgi vertinant NDS-PAGE (nepateikti rezultatai), nustatyta nevienoda rekombinantinių baltymų genų raiškos išėiga. PL47, hGK2898 ir P10 ekspresuoti aukšta, AmyA1, P11 ir P12 – vidutiniška, o X17 – žema išėiga (6 lentelė). AmyA1 ir hGK2898 raiškos kamieno citoplazmoje išliko tirpios, o PL47, P10 bei X17 visiškai agregavo. Iš dalies *E. coli* BL21(DE3) citoplazmoje agregavo tikėtina pektinazės P11 ir P12 – apytiksliai pusė gauto pastarųjų baltymų kiekio nustatyta raiškos kamieno lizato tirpių baltymų frakcijoje. Kaip tikėtasi, atsižvelgus į tikslinių baltymų klonavimo strategiją, nei vienu atveju sekretinės produkcijos nenustatyta (6 lentelė).

Siekiant *in vitro* patvirtinti hipotetinių fermentų aktyvumą, rekombinantiniai baltymai gryninti NiGCh ir JMCh, tačiau gryninant sąlyginai mažą tikėtino fermento kiekį, neplėtojant gryninimo optimizavimo. Pagal metodinėje dalyje aptartą gryninimo strategiją, kiekvieną rekombinantinį baltymą pavyko išgryninti iki beveik visiško grynumo ir pakankamą baltymo kiekį (nepateikti rezultatai) pirminiam aktyvumo įvertinimui zimografija.

6 lentelė. Amiloliziniu arba pektinoliziniu aktyvumu tikėtinai pasižyminčių baltymų, identifikuotų masių spektrometrija iš sukaupiamųjų kultūrų ir dirvožemio mėginių, genų klonavimas bei rekombinantinių baltymų aktyvumo patvirtinimas

Baltymas/ Koduojančio geno ilgis, bp	Geno pagausinimo pradmenys/Pagausintos sekos ilgis, bp	Geno klonavimo pradmenys/Sekos klonavimui ilgis, bp	Rekombinantinio baltymo geno raiškos išėiga*/Tikslinio baltymo lokalizacija**	Rekombinantinio baltymo aktyvumas***
AmyA1, 2181	AmyA1-F/R; 2196	GEOPUL-F/R; 2194	vidutiniška išėiga/lizato tirpi baltymų frakcija	amilolizinis aktyvumas
PL47, 1326	P-1/2/3-PL47-F/R; 1344	PL47-s-F2 ir PL47-R; 1271 (PL47 geno seka be signalinį peptidą koduojančios sekos)	aukšta išėiga/lizato netirpi baltymų frakcija	pektinolizinis aktyvumas
hGK2898, 1521	RP2-2F/2R, 1525	RP2-2-F2 ir RP2-2-R, 1476 (hGK2898 geno seka be signalinį peptidą koduojančios sekos)	aukšta išėiga/lizato tirpi baltymų frakcija	amilolizinis homodimero aktyvumas
P10, 387	P10-F/R, 406	P10-s-F2 ir P10-R, 351 (P10 geno seka be signalinį peptidą koduojančios sekos)	aukšta išėiga/lizato netirpi baltymų frakcija	aktyvumas nenustatytas
P11, 483	P11-F/R, 505		vidutiniška išėiga/lizato tirpi bei netirpi baltymų frakcija	aktyvumas nenustatytas
P12, 561	P12-s-F2 ir P12-R, 525 (P12 geno seka be signalinį peptidą koduojančios sekos)		vidutiniška išėiga/lizato tirpi bei netirpi baltymų frakcija	pektinolizinis aktyvumas
X17, 1008	X17-F/R, 1029	X17sigfr-F ir X17-R, 951 (X17 geno seka be signalinį peptidą koduojančios sekos)	maža išėiga/lizato netirpi baltymų frakcija	aktyvumas nenustatytas

*rekombinantinio baltymo išėiga pasiekta taikius nurodytas pirmines heterologinės raiškos sąlygas, vertinta atlikus NDS-PAGE į gelį įnešant 50 µg suminio baltymų mėginio;

**tikslinio baltymo lokalizacija vertinta atlikus NDS-PAGE taikant raiškos kamieno lastelių lizato tirpios ir netirpios baltymų frakcijų bei raiškos kamieno sekretomo baltymų preparatus;

*** aktyvumas įvertintas naudojant krakmolo bei PGA zimografiją inkubavus 30 °C bei 60 °C. Į kiekvieną zimograminio gelio takelį buvo įnešta po 50 µg išgrynintų baltymų mėginio.

Visų išgrynintų tikėtinų fermentų aktyvumas įvertintas krakmolo arba PGA zimografija atsižvelgiant į pH reikšmes, kurioms esant detektuotas natyvių fermentų aktyvumas. Rekombinantinių AmyA1 ir hGK2898 amilolizinis aktyvumas *in vitro* vertintas palaikant pH 6, o likusių rekombinantinių tikėtinų fermentų – pH 7, abiem atvejais zimografijai naudojant 50 µg rekombinantinio baltymo preparato.

Rekombinantinių AmyA1 bei hGK2898 amilolizinis aktyvumas *in vitro* taip pat buvo patvirtintas. hGK2898 aktyvumą demonstravo tik fermento homodimeras. Pektinolizinis aktyvumas *in vitro* buvo patvirtintas rekombinantinių PL47 ir P12, o rekombinantinių P10, P11 bei X17 aktyvumas nebuvo detektuotas.

Atlikus NDS-PAGE bei PGA zimogramos gelių sugretinimą nustatyta, jog zimografijai taikyta 0,05 % (masė/tūryje) PGA koncentracija iš dalies HSC išgryninto natyvaus PL47 migravimo PGA zimogramos geliu nekeitė (5 pav.).

Natyvi PL47 buvo iš dalies HSC išgryninta iš PEK ir PS2 sukaupiamųjų kultūrų supernatanto (2 L), o gauti natyvios PL47 preparatai leido MS nepriklausomai identifikuoti PL47 kaip pektinazę (5 pav.). Bandymai išgryninti likusius natyvius fermentus, kurių aktyvumas detektuotas iš sukaupiamųjų kultūrų supernatanto bei metaproteominių mėginių PGA arba krakmolo zimografija, siekiant išvengti būtinybės detektuotą aktyvumą priskirti konkrečiam baltymui iš identifikuotų MS įvairovės, nebuvo sėkmingi (nepateikti rezultatai).

Atlikus MS duomenų analizę, buvo sėkmingai patvirtintas A1amy zimogramos aktyvumo zonos susiejimas su AmyA1 amilaze; DSDpek-2, KO5pek-2, PEKpek bei PS2pek zonų susiejimas su PL47 pektinaze; RP2amy zonų, gautų zimografijai taikius baltymų preparatus iš sukaupiamosios kultūros supernatanto ir metaproteominio mėginio, susiejimas su hGK2898 amilaze bei IKpek-1 susiejimas su P12 pektinaze.

Remiantis atliktos amilolizinių bei pektinolizinių fermentų iš sukaupiamųjų kultūrų bei metaproteominių dirvos mėginių atrankos rezultatais, detaliam charakterizavimui pasirinktos AmyA1 amilazė/pululanazė bei PL47 pektinazė/pektato liazė. Kartu nuspręsta nuskaityti PA-3 kamieno, išskirto (198) iš PEK dirvos mėginio, ir 16S rRNR geno filogenetine analize priskirto *Geobacillus* genčiai, genomą. Kamienas geba sekretuoti termoaktyvią/termostabilią pektato liazę (198), atitinkančią PL47 pektato liazės molekulinę masę. Patvirtinus, jog PA-3 kamienas koduoja PL47 pektato liazę, kamieno geno anotavimas gali leisti charakterizuoti PL47 produkcijos valdymą ir/ar operoninę organizaciją.

3.2. Termoaktyvi bei termostabili AmyA1 pululanazė

3.2.1. AmyA1 geno klonavimas ir sekos analizė

Klonavimui AmyA1 geno seka buvo pagausinta naudojant GEOPUL-F ir GEOPUL-R pradmenų porą ir papildant fermento seką N-gale 6HisIn. Klonuojamo fermento geno seka pagausinta matrica naudojant suminę DNR, išskirtą iš sukaupiamosios MO kultūros A1, pasitelkiant AmyA1-F ir AmyA1-R pradmenų porą. Naudojant standintą terpę su krakmolu iš sukaupiamosios kultūros A1 grynų MO kultūrų išskirti nepavyko. Sekvenavus įvertintas AmyA1 geno sekos homologiškumas pululanazių sekoms.

AmyA1 pululanazės geno seka yra 2181 bp ilgio (GenBank suteiktas identifikacinis geno sekos numeris: KF192948.1), AmyA1 polipeptido ilgis – 726 a.r. (GenBank suteiktas identifikacinis baltymo sekos numeris: AGW21593.1); apskaičiuota fermento MM – 81,7 kDa. AmyA1 geno seka 78,3 % identiška *G. thermoleovorans* US105 genome anotuotos I tipo pululanazės PULUS105 geno (EMBL AJ315595.1 (200)) sekai. Pažymėtina, jog AmyA1 geno seka 24 bp ilgesnė nei *G. thermoleovorans* US105 I tipo pululanazės genas (200). Palyginus AmyA1 seką su *G. thermoleovorans* US105 I tipo pululanazės polipeptido seka (EMBL CAC85704.1 (200)) nustatytas 82,9 % sekų identiškumas. Lyginant AmyA1 seką su *G. thermodenitrificans* NG80-2 ir *Geobacillus* sp. G11MC16 koduojamų galimai I tipo pululanazių sekomis (atitinkamai GenBank ABO68076.1 ir GenBank EDY05272.1) nustatyta didesnė homologija, siekianti atitinkamai 99,2 ir 99,3 % identiškumo. Rekombinantinio fermento sekos homologiškumas I tipo pululanazėms, anuotoms *Geobacillus* genomuose, netiesiogiai patvirtina, kad AmyA1 taip pat koduojama šios genties bakterijų.

AmyA1 sekoje nustatyti regionai (6 pav.), tapatūs visiems MS identifikuotiems oligopeptidams, leidusiems aptikti natyvią AmyA1 sukaupiamosios MO kultūros A1 suminiame baltymų preparate. Pastarasis rezultatas patikimai patvirtino, jog iš minėtos kultūros suminio DNR preparato klonuota būtent I tipo pululanazė, identifikuota krakmolo zimografija.

Konservatyvūs AmyA1 sekos elementai būdingi aprašytoms pululanazėms ir hidrolazėms, demonstruojančioms amilolizinį aktyvumą (6 pav.) (204). AmyA1 sekoje *in silico* patikimai identifikuoti konservatyvūs domenai: ¹⁰⁶K---A¹⁸⁴ angliavandenių jungimosi 48 domenas (izoamilazės N-galinis domenas (pfam02922)) bei ²⁶²S---D⁵⁸¹ α-amilazių katalizinis domenas (CAZY GH13 šeimos domenai (pfam00128)) (175). Pastarojo AmyA1 domeno sekoje identifikuotos tikėtinai hidrolazės katalizinę triadą formuojančios a.r.,

AmyA1	MLHINRTFVVYLDEMDQLTVLVPKSCCPDEMAFFTMTVAAPS GEEIPLSVQQLLEDLGDVMVKYVCRFASAFEFGATY	74
PULUS105	MLHISRTFAAYLDEMDQIVVLAPKSLGFDGMAPFTLVAPS GEEIPLSVQHVVDVGETVKYVCRFASAFEFGATY	74
	*****.***.*****:*.*** * *****:*****:***:*. *****	
AmyA1	WVRARSGERTDVQIGAVVR TAFFDDQFFYEGK LGVDYTKEQTVFRVWAPTATAVNVK LIHDSGDARY VPLERG	148
PULUS105	WVRSCRGEETDVQIGAVVRTPAFDDRFYDGPLGAEYLKEQTVFRVWAPTATAVSVKLVHPHLDEIRCVPLVRG	148
	: *.**:***:*.***:*. *****:***:*. *****	
AmyA1	ERGVSAVVPGDWERTYTYVACINRVVREAVDPYATAVSVINGEYGV IIDWEKTKLAPSARPLPLPTSPTDAII	222
PULUS105	ERGVSAVVPGDWERARYTYIACINRVVREAVDPYATAVSVNGEFGVVIDWEKTKLAPPSLPLPLCSPTDAII	222
	*****:***:*****:***:*.*****:***** *****	
AmyA1	YELSI RDTFSHPDSGAHKGYLGLSEANTSGPNGTSTGLSYLKELGVTHTVQIMPFT FAGVDRDP SPASY YNWG	296
PULUS105	YELSI RDTFSHPDSGAVHKGKYLGLAETNTSGPNGTATGLSYVKELGVTHVQLMPFMDFAGVDERDPQAA YNWG	296
	*****.*****:*.*****:*****:*****:*** *****. *.*****	
AmyA1	YNELHLYAE GSYATDPTDPYARIVELKQMI R TLHENGRLRVMDAVCNHVV DREQSLEKLVPGYYFRYGAYGQ	370
PULUS105	YNELHLYAEP GSYATDPADPYARIVELKQAIHTLHENGRLRVMDAVYNHVV DREQSLEKLVPGYYFRYDAYGQ	370
	*****:*****:*****:*****:*****:***** *****	
AmyA1	PANGTGVGNDIASERRMARRIVDSVIFWAKEYGINGFR F LMGVHDIETMKVVRDALDAIDPSILVY G GWDL	444
PULUS105	PANGTGVGNDIASERRMARRIVDSVVFWAKEYIDGFRFLMGVHDIETMKAVRDLDAIDPSILVY G EGWDL	444
	*****:*****:*****:*****:*****:***** *****	
AmyA1	PTPLAPEQKATMTNAWKLPRIAYFNDRFRDTIKGSTFHLPSR GFALGDASGRE QAKTVIAGSLRALGLGFCHPL	518
PULUS105	PTPLPEEQKATMANAKQLPRFAYFNDRFRDAVKGSTFHLPDGRGFALGNPGGREQVKLAIAGSLRALGLGFCHPR	518
	*** *****:*.***:*****:*****:*****:***** * :.***** *****	
AmyA1	QSLNYVECH D NHTFWDKMEVANGYSEAIRRRKQKLATAI VLLAQGIPFLHSGQEFYRTKGGDGNYSQPDEVN	592
PULUS105	QSLNYVECHDNHTFWDKMEANHDEPEWLRKRKQKLATAI VLLAQGIPFLHSGQEFYRTKGGDGNYSRSPDEVN	592
	*.*****:*****:*****:*****:*****:***** *****:*** **	
AmyA1	WIDWEQKSRYENDVRYVQGLIALRRAHGAFRLATEAEVLRHFEFLEPTPPSVIAYWLRDVAVYGPWGDIIVVHH	666
PULUS105	QLDWERKSRYEDDVRYVQGLIALRRAHGAFRLATEAEVLRHFTFLEPLPPSVIAYRHLDAAVYGPWEDIIVVHH	666
	*****:*****:*****:*****:*****:***** ***** * :.***** *****:***	
AmyA1	HEEKSETIVLPDQEEWVVCDDGEGSGTIPLRRVRHVVDLDGIGTWLVLRTEAMNADENAG	718
PULUS105	NEEKETAIALPDEREWA VVCDGQRCGTFPGQARGMLRLDGI GTWLVLVHPAG -----	718
	:***. :*.*****:*.*** *****:*.*** * :.*** :. *****:***	

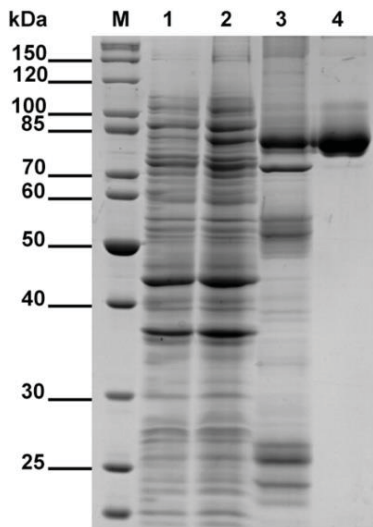
6 pav. AmyA1 sekos (GenBank AGW21593.1) palyginimas su charakterizuotos *Geobacillus thermoleovorans* U105 I tipo pululanazės PULUS105 seka (EMBL AJ315595.1) (17, 18, 205). Masių spektrometrija identifikuoti natyvio AmyA1 oligopeptidai pateikti kursyvu raudonai. Konservatyvūs (206) AmyA1 sekos domenai – angliavandenių jungimosi (¹⁰⁶K---A¹⁸⁴; pfam02922) bei α-amilazių katalizinis (²⁶²S---D⁵⁸¹; pfam00128) domenai pabraukti. Konservatyvus I tipo pululanazių sekos motyvas (⁴³⁸Y---P⁴⁴⁴) (4) AmyA1 sekoje pateiktas geltoname fone. Ca²⁺ joną tikėtina koordinuojančios D²⁸⁰, E²⁸⁶ bei E³⁰⁶ aminorūgščių liekanos AmyA1 sekoje pateiktos žaliai, rudame fone. Tikėtina AmyA1 katalizinę triadą formuojančios D⁴¹¹, E⁴⁴⁰ bei D⁵²⁸ aminorūgščių liekanos pateiktos rausvai, violetiniame fone. Identiškos aminorūgštys pabrauktos (*). Konservatyvios aminorūgščių pakaitos pabrauktos (/):

atitinkamai D⁴¹¹, E⁴⁴⁰ bei D⁵²⁸. Taip pat *in silico* AmyA1 sekos analize identifikuotas konservatyvus ~70 a.r. Ca²⁺ jono jungimosi motyvas. Pastarąjį katijoną tikėtina koordinuoja D²⁸⁰, E²⁸⁶ bei E³⁰⁶ a.r. iš identifikuoto motyvo. Visų aprašytų I tipo pululanazių sekose nustatytas septynių a.r. sudaromas konservatyvus motyvas YNWGYNP (204) AmyA1 sekoje nustatytas atitinkamai ⁴³⁸Y---P⁴⁴⁴. Signalinis peptidas AmyA1 sekoje *in silico* nuspėtas.

Konservatyvūs sekos domenai bei motyvai, būdingi AmyA1 sekai, pažymi, jog šis fermentas – nuo kalcio jonų priklausoma I tipo pululanazė. Atsižvelgus į AmyA1 sekos homologiją pululanazių sekoms bei konservatyvius fermento sekos elementus, AmyA1 galima priskirti CAZY GH13 šeimos, vienijančios įvairaus substratinio savitumo glikozidų hidrolazes, 14 pošeimui (12).

3.2.2. Rekombinantinės AmyA1 raiška bei gryninimas

Rekombinantinė AmyA1 (rAmyA1) nustatyta tirpioje *E. coli* BL21(DE3) lizato frakcijoje bei ekspresuota vidutine išeiga (7 pav.). Palyginus rAmyA1 išeigą, gautą heterologine raiška indukuojant 0,7 mM arba 1 mM IPTG, reikšmingo išeigų skirtumo nenustatyta. Heterologine rekombinantinių pululanazių raiška tipiniu atveju gaunama vidutinė arba aukšta išeiga lyginant su natūralaus producento produkuojamu natyvaus fermento kiekiu (4). Minėtų fermentų produkcijai sėkmingai pritaikyta ir sekrecinė produkcija į periplazmą (205), tačiau visgi dažniausiai taikyta raiškos strategija užtikrino šių rekombinantinių hidrolazių viduląstelinę lokalizaciją *E. coli* raiškos kamienuose bei fermentų agregaciją raiškos kamieno citoplazmoje (204, 207, 208, 209). NDS-PAGE nustatyta rAmyA1 MM atitiko teorinę ~82 kDa MM, o oligomerizacija nenustatyta (7 pav.). Kitos aprašytos pululanazės – taip pat monomeriniai fermentai (18, 208, 210). Oligomerizacija taip pat nėra būdinga *Bacillus* genties I tipo pululanazėms (211), kaip ir *Geobacillus* (212, 209), tačiau žinoma išimtis – *Geobacillus thermoleovorans* US105 homodimerinė I tipo pululanazė PULUS105 (205).



7 pav. Rekombinantinės AmyA1 pululanazės heterologinės raiškos efektyvumo bei fermentinio preparato grynumo įvertinimas NDS-PAGE.

Takeliai: 1 – kontrolė (rekombinantinės *Escherichia coli* BL21(DE3) ląstelių tirpios lizato frakcijos baltymai* neindukavus AmyA1 raiškos); 2 – rekombinantinės *E. coli* BL21(DE3) ląstelių tirpios lizato frakcijos baltymai indukavus AmyA1 raišką 0,7 mM IPTG; 3 – rekombinantinės AmyA1 preparatas po gryninimo nikelio giminingumo chromatografija; 4 – rekombinantinės AmyA1 preparatas po gryninimo jonų mainų chromatografija bei dializės prieš fermentinio preparato buferį; M – baltymų molekulinį masių žymuo PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

*jei kitaip nenurodyta, į takelį užnešta suminė baltymų masė siekė ~50 µg.

Dviejų gryninimo etapų strategija leido gauti didelio grynumo rAmyA1 preparatą (7 lentelė, 7 pav.), nustačius 134,3 U/mg savitojo aktyvumo. Atsižvelgus į fermento sekos papildymą N-galiniu afiniškumo inkaru, AmyA1 gryninimui taikyta NiGCh. Pradiniame gryninimo etape efektyviai pašalinti raiškos kamieno lizato baltymai, tačiau po iš dalies išgryninto AmyA1 preparato dializės prieš JMCh buferį A NDS-PAGE nustatyta fermento nespecifinė proteolizinė degradacija. Atliekant didelio kiekio rAmyA1

gryninimą, raiškos kamieno proteazės inhibuotos gryninimo buferius papildžius 0,5 mM EDTA. Kaip tikėtasi, atsižvelgus į gryninamo fermento seką, AmyA1 pasižymėjo išreikštu giminingumu JMCh dervai, esant pH 8,6. Gryninimo eigoje rAmyA1 homooligomerizacijos arba agregavimo taip pat nenustatyta. Gryninant rekombinantines pululanazes iš *E. coli* raiškos kamienų tirpios lizato frakcijos, derinant kelis chromatografijos etapus, pasiektas aukštas grynumas bei neiškilo būtinybės riboti gryninamų pululanazių agregavimą ar papildomai užtikrinti jų stabilumą (5, 205, 208).

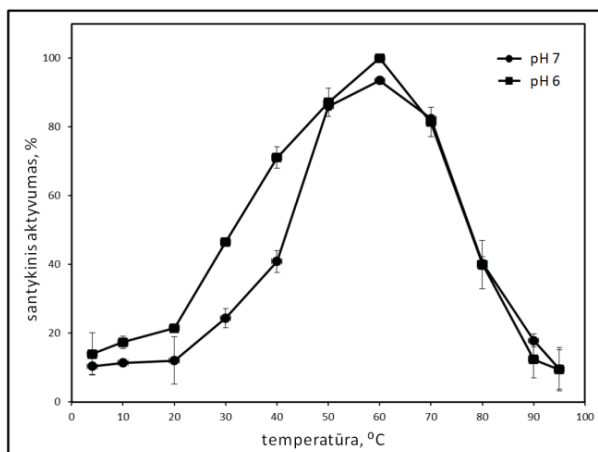
7 lentelė. Rekombinantinės AmyA1 gryninimo įvertinimas

Gryninimo etapas	Suminis aktyvumas, U*	Suminė baltymų masė, mg	Savitasis aktyvumas, U/mg	Išeiga, %	Gryninimo efektyvumas
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) lizatas	714	156	4,6	100	-
Po nikelio giminingumo chromatografijos	350	26,8	13,1	49	3
Po jonų mainų chromatografijos	282	2,1	134,3	39	29

*Vienetas U žymi pululanazės kiekį katalizuojantį 1 μmol redukuojančių cukrų susidarymą per 1 min. taikant 2.17. dalyje nurodytas fermentinės reakcijos sąlygas; maltotriozė laikyta redukuojančių cukrų standartu.

3.2.3. Temperatūros įtaka AmyA1 aktyvumui ir stabilumui

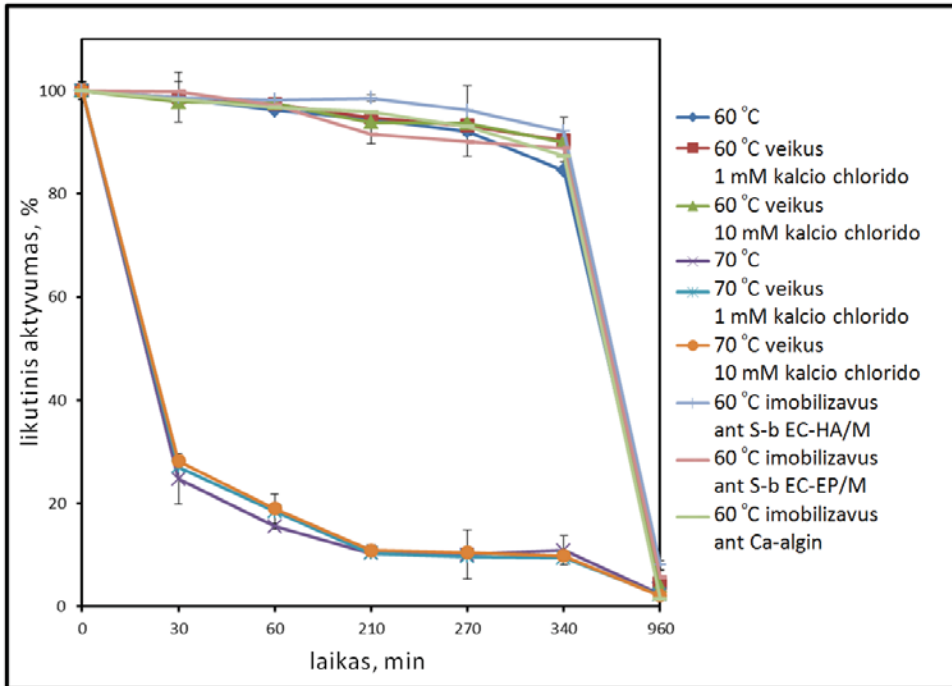
AmyA1 demonstravo pululanolizinį aktyvumą 4-95 °C temperatūriniame intervale. Optimali fermento veikimo temperatūra siekė 60 °C ir šis rezultatas patvirtina fermento termoaktyvumą. AmyA1 aktyvumo



8 pav. Temperatūros įtaka rekombinantinės AmyA1 aktyvumui. 100 % savitasis fermentinis aktyvumas – 134,3 ± 0,003 U/mg.

priklausomybę nuo temperatūros atspindi beveik vienodo profilio varpo pavidalo kreivės, fermentinį aktyvumą matavus pH 6 ir pH 7. Tirta pululanazė pH 6 ir pH 7 demonstravo efektyvų aktyvumą (ne mažiau 40 % aktyvumo, lyginant su aktyvumu optimaliomis sąlygomis) 40-80 °C temperatūriniame intervale (8 pav.).

rAmyA1 demonstravo termostabilumą 60 °C. Likutinis AmyA1 pululanolizinis aktyvumas po 340 min. inkubavimo 60 °C siekė 84,54 %, o inkubuojant ilgesnį laiką 60 °C, stebėtas išreikštas termostabilumo praradimas. Nustatytas mažas AmyA1 termostabilumas 70 °C, nes jau po rekombinantinio fermento inkubavimo 30 min. likutinis aktyvumas siekė tik 24,73 %. Esant 80 °C, po 15 min. inkubacijos AmyA1 visiškai prarado aktyvumą. 1 ir 10 mM CaCl₂ koncentracija nekeitė rAmyA1 termostabilumo (9 pav.).



9 pav. Temperatūros įtaka rekombinantinės AmyA1 stabilumui bei Ca²⁺ jonų ir imobilizavimo įtaka fermento termostabilumui. 100 % likutinis pululanolizinis aktyvumas – 134,3 ± 0,003 U/mg. Santrumpos: S-b EC-HA/M – Sepabeads EC-HA/M nešiklis, S-b EC-EP/M – Sepabeads EC-EP/M nešiklis, Ca-algin – kalcio alginatas.

Termofilų I tipo pululanazėms būdingas temperatūrinis optimumas 60-80 °C (4, 213). Taigi AmyA1 aktyvumui optimali 60 °C temperatūra – viena žemiausių. AmyA1 termoaktyvumą rodo nustatytas pululanazės efektyvus aktyvumas 40-80 °C, nes mezofilų ne termoaktyvios I tipo pululanazės dažniausiai demonstruoja mažą aktyvumą >40 °C (213). *Geobacillus* spp. I tipo pululanazių temperatūros optimumai skiriasi. *Geobacillus* sp. LM14-3 pul-3 pululanazė aktyviausia 60 °C (209), *Geobacillus stearothermophilus* TRS128 I tipo pululanazė – 65 °C (212), o panašiausias į AmyA1 *G. thermoleovorans* US105 PULUS105 pululanazės optimali temperatūra – 75 °C (17, 205). Beveik identiškas AmyA1 temperatūros optimumui būdingas *Bacillus acidopullulyticus* NCIB 11647 F1 ir F2 pululanazėms (209). AmyA1

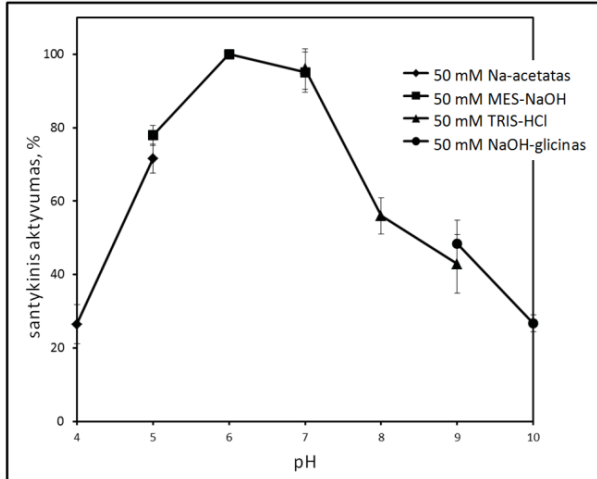
aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros rodo išreikštą aktyvumo mažėjimą virš optimalios temperatūros, būdingą kitoms termoaktyvioms I tipo pululanazėms (18, 204, 211), kaip ir *Geobacillus* I tipo pululanazėms (209, 210). Visgi AmyA1 aktyvumas išsiskiria plačiausiu efektyvaus aktyvumo intervalu 40-80 °C bei sąlyginai aukštu aktyvumu 4-40 °C ir 80-95 °C. Termoaktyvios pululanazės beveik neaktyvios ≤20 °C temperatūros sąlygomis (18, 210), o AmyA1 aktyvumas 4 °C siekia ~14 %.

Lyginant su hipertermofilų I tipo pululanazėmis, rAmyA1 demonstravo gana žemą termostabilumą (208, 214, 215). Atsižvelgus į AmyA1 aktyvumui optimalią temperatūrą, nustatytas hidrolazės termostabilumas atitinka termoaktyvumo ir termostabilumo santykinę priklausomybę, nustatytą anksčiau aprašytoms nuosaičių termofilų (taigi ir *Geobacillus*) I tipo pululanazėms (205, 209, 212). AmyA1 termostabilumą tiesiogiai lyginant su *Geobacillus* pululanazių termostabilumais, galima teigti, jog *G. thermoleovorans* US105 PULUS105, kurios $t_{1/2}$ (70 °C) siekė 4 val., išlieka termostabiliausia *Geobacillus* I tipo pululanazė (205). Tačiau AmyA1 yra termostablesnė nei *Geobacillus* sp. LM14-3 pul-3 ar *G. stearothermophilus* TRS128 I tipo pululanazė, kurios praranda aktyvumą po <10 min., atitinkamai 70 °C (210) ar 65 °C (209). Ca^{2+} įtaka, reikšmingai didinanti termoaktyvių I tipo pululanazių stabilumą aukštos temperatūros sąlygomis, charakterizuota (208, 210), tačiau termoaktyvios, nuo Ca^{2+} jonų nepriklausančios I tipo pululanazės, taip pat nėra retos (204, 207, 215). Atsižvelgus, jog AmyA1 sekoje *in silico* identifikuotas Ca^{2+} jungimosi motyvas, pululanazė priskirtina nuo kalcio priklausomų I tipo pululanazių grupei. Skirtingai nei tikėtasi, rAmyA1 termostabilumui Ca^{2+} (1 ir 10 mM) įtaka *in vitro* nebuvo patvirtinta. *G. thermoleovorans* US105 PULUS105 stabilumą 45-75 °C Ca^{2+} reikšmingai didino. Visgi stabilizuojantis Ca^{2+} poveikis nebuvo pakankamas, kad >75 °C užtikrintų rekombinantinės PULUS105 termostabilumą (205).

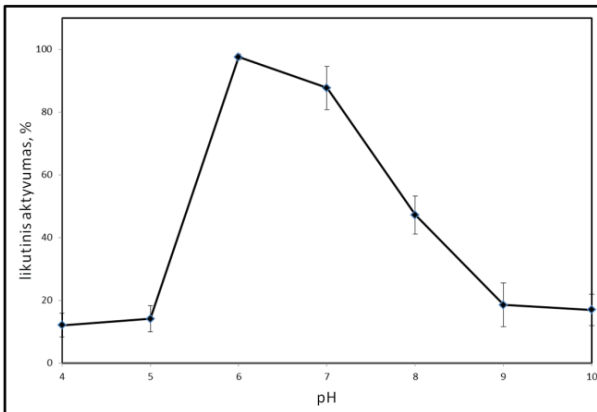
3.2.4. pH įtaka AmyA1 aktyvumui ir stabilumui

Pululanolizinis AmyA1 aktyvumas nustatytas pH 4-10 intervale (10 pav.): didžiausias aktyvumas nustatytas pH 6, o pH 4 ir pH 10 aktyvumas siekė ~26 %. Tirta pululanazė demonstravo efektyvų aktyvumą (ne mažiau 40 % aktyvumo lyginant su aktyvumu optimaliomis sąlygomis) pH 5-9 intervale. AmyA1 aktyvumo priklausomybės nuo pH kreivė atspindi poslinkį į šarminę pH intervalo pusę. AmyA1 aktyvumas pH 7 siekė 95,97 %, o pH 5 – 77,91 %. AmyA1 pululanazės aktyvumo priklausomybės nuo pH poslinkį į šarminę pusę taip pat rodo aktyvumo skirtumas pH 4 ir beveik dvigubais didesnis aktyvumas pH 8 sąlygomis (10 pav.).

rAmyA1 buvo stabili pH 6-8 intervale vykdant inkubavimą 60 min. 60 °C. Lyginant su aktyvumu optimaliomis sąlygomis, likutinis aktyvumas pH 6 siekė 97,55 %. Didesnį AmyA1 pululanazės stabilumą šarminiame pH patvirtina išreikštai tolydesnis AmyA1 likutinio pululanolizinio aktyvumo mažėjimas pH 7-8 lyginant su pH 4-5. AmyA1 likutinis pululanolizinis



10 pav. pH įtaka rekombinantinės AmyA1 aktyvumui. 100 % savitasis fermentinis aktyvumas – $134,3 \pm 0,003$ U/mg.



11 pav. pH įtaka rekombinantinės AmyA1 stabilumui. Likutinis AmyA1 pululanolizinis aktyvumas veikus pH 6 siekia 97,55 % – $131 \pm 0,004$ U/mg.

aktyvumas pH 7 siekė ~90 %, pH 8 – ~50 %, o pH 4-5 neviršijo ~15 %. Visgi šarminėje pH intervalo srityje AmyA1 demonstravo tik mažiau nei 20 % likutinio pululanolizinio aktyvumo (11 pav.).

AmyA1 aktyvumo optimumas pH 6 – tipiškas aprašytoms *Geobacillus* spp. pululanazėms (37, 210). Alkalofilų pululanazės aktyviausios šarminiame pH (175, 216), bet ši savybė nėra tipiška pululanazėms (213). Mezofilinių ir termofilinių MO (tiek archėjų (208, 217), tiek ir bakterijų (218)) I tipo pululanazės būdingas artimas AmyA1 pH optimumas (pH 5,5-6). Skirtingai nei tikėtasi, AmyA1 demonstravo

aktyvumo priklausomybės nuo pH poslinkį į šarminę pH intervalo sritį. Visoms aprašytoms I tipo pululanazėms, demonstravusioms pH optimumą (silpnai) rūgštiniame pH intervale, priešingai nei AmyA1, būdingas aktyvumo priklausomybės nuo pH poslinkis į rūgštinę pH intervalo sritį (207, 208, 210, 212). Taip pat iš aprašytų I tipo pululanazių AmyA1 išsiskiria plačiu pH 5-9 intervalu, kuriame demonstruoja efektyvų aktyvumą. Termostabilios bei termoaktyvios I tipo pululanazės demonstravo bent

ketvirtadaliu siauresnį nei AmyA1 pH intervalą, kuriame nustatytas ≥ 40 % aktyvumas (204, 207, 208, 210). rAmyA1 demonstravo pH 4-5 ir pH 9-10 intervalų srityse sąlyginai aukštą aktyvumą, siekusi ≥ 25 %. Aukštas aktyvumas (>25 %) labiau rūgštiniame pH už efektyvaus aktyvumo pH ribų taip pat nustatytas charakterizuojant *Geobacillus* sp. LM14-3 rekombinantinę pul-3 (209). Dažniausiai I tipo pululanazių aktyvumas labiau rūgštinėse/šarminėse pH intervalo srityse lyginant su pH intervalu, kuriame AmyA1 aktyvumas siekia ≥ 40 %, neviršija 10 % (204, 207, 208, 210).

Termostabilių ir termoaktyvių I tipo pululanazių stabilumo priklausomybė nuo pH daugeliu atvejų nebuvo vertinta arba įvertinta tik fragmentiškai. Palyginus aprašytą I tipo pululanazių stabilumo priklausomybę nuo pH, AmyA1 demonstravo stabilumą gana siaurame pH 6-8 intervale. Vienintelė, kurios stabilumo priklausomybė nuo pH nustatyta, *G. stearothermophilus* TRS128 I tipo pululanazė stabili pH 6-9 (215). *Bacillus flavocaldarius* KP 1228 I tipo pululanazė ir *Bacillus acidopullulyticus* NCIB 11647 F1 ir F2 pululanazės neprarado stabilumo atitinkamai pH 4,5-10 (219) ir pH 4-8,5 (211). *Anaerobranca gottschalkii* DSM 13577 rekombinantinė pululanazė rPulAg išliko stabili pH 4-10 (204). AmyA1 aktyvumo nuo pH bei fermento stabilumo nuo pH priklausomybė rodo tolydų pululanazės aktyvumo mažėjimą silpnai šarminiame pH intervale, taigi AmyA1 palankesnė silpnai šarminė aplinka. Silpnai rūgštinės aplinkos palankumas *G. stearothermophilus* TRS128 I tipo pululanazei nustatytas įvertinus fermento aktyvumo priklausomybę nuo pH, taip pat patvirtintas nustačius pastarosios pululanazės stabilumo priklausomybę nuo pH (210). rAmyA1, veikiamą pH 4-5 ir pH 9-10, demonstravo sąlyginai aukštą likutinį pululanolizinį aktyvumą, siekusi ne mažiau 15 %. I tipo pululanazės, kurių stabilumo priklausomybė nuo pH nustatyta, likutinio fermentinio aktyvumo už pH intervalo, kurio atžvilgiu išlieka stabiliomis, beveik nedemonstravo arba demonstravo mažesnę nei AmyA1 likutinį fermentinį aktyvumą (210, 211).

3.2.5. Metalų jonų ir reagentų įtaka AmyA1 aktyvumui

Metalų jonų įtakos rAmyA1 aktyvumui įvertinimo rezultatai, pateikti 8 lentelėje, leidžia teigti, jog charakterizuotos pululanazės aktyvumą metalų jonai veikė skirtingai. Vienvalenčių metalų K^+ , Li^+ bei Na^+ jonų 1 mM ir 50 mM koncentracija AmyA1 pululanolizinio aktyvumo statistiškai reikšmingai nekeitė, kaip ir divalenčių metalų Ba^{2+} ir Ca^{2+} jonų 1 mM ir 10 mM koncentracija, tačiau 1 mM Mg^{2+} ir Mn^{2+} koncentracija statistiškai reikšmingai didino rAmyA1 aktyvumą, atitinkamai ~ 13 % ir ~ 40 %. Kitų

8 lentelė. Metalų jonų įtaka rekombinantinės AmyA1 pululanoliziniam aktyvumui

Metalo druska	Koncentracija	Santykinis aktyvumas, %
Kontrolė	-	100*
LiCl	1 mM	100,37 ± 0,46
NaCl	1 mM	103,99 ± 1,04
	50 mM	99,65 ± 1,93
MgCl ₂	1 mM	113,82 ± 0,53
KCl	1 mM	101,63 ± 2,41
	50 mM	99,07 ± 1,79
CaCl ₂	1 mM	102,93 ± 0,19
	10 mM	99,50 ± 2,02
MnCl ₂	1 mM	139,48 ± 1,97
FeCl ₃		22,43 ± 1,79
CoCl ₂		55,13 ± 1,87
NiCl ₂		41,95 ± 2,48
CuCl ₂		18,45 ± 2,31
ZnCl ₂		16,16 ± 1,63
SnCl ₂		52,92 ± 3,77
BaCl ₂		101,26 ± 0,25

*100 % savitasis fermentinis aktyvumas optimaliomis AmyA1 aktyvumui sąlygomis – 134,3 ± 0,003 U/mg.

metalų jonai slopino charakterizuoto fermento aktyvumą, tačiau nevienodai: 1 mM Co²⁺, Ni²⁺ ir Sn²⁺ koncentracija pululanazės aktyvumą slopino perpus, o 1 mM Cu²⁺ ir Zn²⁺ bei Fe³⁺ koncentracija charakterizuotos hidrolazės aktyvumą slopino daugiau nei dviem trečdaliais.

Vienvalenčių metalų jonai, kaip tipiška hidrolizinių aktyvumą demonstruojantiems fermentams (254), taip pat ir AmyA1, aktyvumo nekeitė. Pastarųjų metalų jonų poveikis *A. gottschalkii* DSM 13577 bei *Thermus caldophilus* GK-24 I tipo pululanazių aktyvumui nenustatytas (204, 214). Ba²⁺ įtaka pululanoliziniam aktyvumui analizuota retai, tačiau yra nustatytas pastarojo metalo jonų stimuliuojantis efektas (210, 212) arba jokio efekto (204) pululanoliziniam aktyvumui. Dažniausiai Ca²⁺ jonai I tipo pululanazių aktyvumą *in vitro* didina (207, 214, 221) arba aktyvumo nekeičia (18). Esant Ca²⁺, *B. flavocaldarius* KP 1228 I tipo pululanazė pululaną hidrolizavo 14 % efektyviau (212), o *G. stearothermophilus* TRS128 I tipo pululanazę Ca²⁺ jonai efektyvino net 88 % (210). *G. thermoleovorans* US105 I tipo pululanazės PULUS105 aktyvumą Ca²⁺ jonai padidino 44 %. Visgi pastarojo metalo jonų įtakos PULUS105 analizė atskleidė, jog Ca²⁺ stabilizuoja fermentą aukštesiose temperatūrose, tiesiogiai neveikdami katalizinio aktyvumo (205). Vieninteliai Mg²⁺ ir Mn²⁺ jonai *in vitro* reikšmingai stimuliuoja AmyA1 aktyvumą. Mg²⁺ stimuliuoja termostabilias bei termoaktyvias bei I tipo

pululanazes (207, 210, 214) arba nekeičia pululanolizinio aktyvumo (18, 204, 205, 212). *G. thermoleovorans* US105 PULUS105 aktyvumo Mg^{2+} nekeitė (205), tačiau akivaizdžiai stimuliuo (55 %) *G. stearothermophilus* TRS128 I tipo pululanazės aktyvumą (207). Tiriant *G. stearothermophilus* TRS128 (210) ir *T. caldophilus* GK 24 (214) I tipo pululanazes nustatytas Mn^{2+} gebėjimas stimuliuoti fermentų aktyvumą, tačiau šis metalas *G. thermoleovorans* US105 ir *Thermotoga neapolitana* KCCM 41025 I tipo pululanazes slopino, atitinkamai, visiškai (205) arba beveik visiškai (85 %) (207), o *A. gottschalkii* DSM 13577 ir *Fervidobacterium pennavorans* Ven5 I tipo pululanazių aktyvumo nekeitė (18, 204). Atsižvelgus, jog Mn^{2+} AmyA1 aktyvumą stimuliuo net 40 %, tuo AmyA1 išsiskiria iš kitų termostabilių bei termoaktyvių I tipo pululanazių. Divalentčių metalų Co^{2+} , Ni^{2+} , Sn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} jonai bei trivalenčio metalo Fe^{3+} jonai I tipo pululanazių (18, 205, 207, 212), kaip ir AmyA1, aktyvumą reikšmingai slopino.

Reduktorių, chaotropikų, detergentų bei tirpiklių įtakos rAmyA1 pululanoliziniam aktyvumui įvertinimo rezultatai pateikti 9 lentelėje.

9 lentelė. Reagentų įtaka rekombinantinės AmyA1 pululanoliziniam aktyvumui

Reagentas	Koncentracija	Santykinis aktyvumas, %
Kontrolė	-	100*
Ditiotreitolis	1 mM	116,36 ± 0,47
Tris(2-karboksietil) fosfinas		99,62 ± 0,28
β-merkaptioetanolis		97,52 ± 3,02
Karbamidas	0,1 M	91,15 ± 0,56
	4 M	88,85 ± 1,74
Guanidino HCl	1 mM	91,50 ± 2,67
NDS	0,1 %	ND**
	1 %	
DMSO	0,1 %	94,63 ± 2,5
	1 %	81,23 ± 3,07
Metanolis	1 %	91,51 ± 0,59
	5 %	87,57 ± 0,52
Etanolis	1 %	97,41 ± 0,43
	5 %	91,87 ± 0,9
Etilenglikolis	0,1 %	96,56 ± 1,05
	1 %	95,96 ± 0,92
Glicerolis	0,1 %	109,39 ± 0,85
	1 %	98,74 ± 1,06
Triton X-100	0,1 %	95,71 ± 2,91
	1 %	89,85 ± 2,78
Triton X-305	0,1 %	41,74 ± 4,6
	1 %	ND

Tween 20	0,1 %	77,11 ± 1,99
	1 %	70,45 ± 2,04
Tween 40	0,1 %	53,07 ± 2,38
	1 %	45,68 ± 2,82
Tween 60	0,1 %	53,95 ± 1,67
	1 %	52,95 ± 2,6
Tween 80	0,1 %	73,24 ± 3,85
	1 %	51,29 ± 2,42
Brij 35	1 mM	113,11 ± 0,74
Brij 58		112,10 ± 0,49

*100 % savitasis fermentinis aktyvumas optimaliomis AmyA1 aktyvumui sąlygomis – 134,3 ± 0,003 U/mg; **ND – nedetektuotas pululanolizinis aktyvumas.

Naudojant 1 mM TCEP bei β -ME koncentracijas, statistiškai reikšmingos įtakos AmyA1 aktyvumui nenustatyta. Trečiasis reduktorius, t.y. DTT, jo 1 mM koncentracija AmyA1 aktyvino beveik 20 %. AmyA1 aktyvumo 100 mM karbamido bei 1 mM guanidino-HCl beveik neslopino. Veikiant 4 M karbamido koncentracija, AmyA1 demonstravo aukštą ~90 % pululanolizinį aktyvumą, o veikiant 0,1 ar 1 % (masė/tūris) NDS koncentracija AmyA1 aktyvumo nenustatyta. Detergentai AmyA1 aktyvumą veikė skirtingai. 0,1 ir 1 % (tūris/tūris) Triton X-100 ir Triton X-305 koncentracijos slopino AmyA1 aktyvumą, tačiau 1 % (tūris/tūris) Triton X-305 visiškai inaktyvavo rekombinantinę pululanazę. Tween detergentai AmyA1 veikė panašiai: 0,1 % (tūris/tūris) koncentracija slopino fermentą 25-45 %, o 1 % (tūris/tūris) koncentracija – 30-55 %. Brij 35 ir Brij 58, skirtingai nei kiti detergentai, aktyvino hidrolazę beveik 12 %. Tirpikliai AmyA1 aktyvumą slopino nežymiai. Glicerolio 0,1 % (tūris/tūris) koncentracija hidrolazės aktyvumą didino beveik 10 %. Visgi statistiškai reikšmingas 1 % (tūris/tūris) glicerolio koncentracijos poveikis AmyA1 aktyvumui nenustatytas.

Rekombinantines *F. pennavorans* Ven5 ir *T. neapolitana* KCCM 41025 rPulA pululanazes veikiant β -ME ar DTT nustatytas beveik vienodai išreikštas reikšmingas aktyvumo padidėjimas (18, 207), o AmyA1 aktyvumą didino tik DTT, o taikytos β -ME bei TCEP koncentracijos hidrolazės aktyvumo nekeitė. Guanidino-HCl bei NDS slopinimo lygis aprašytų I tipo pululanazių (18, 205, 207) aktyvumui reikšmingai nesiskiria nuo nustatyto minėtais junginiais veikiant rAmyA1. Išskirtinį stabilumą, lyginant su kitomis I tipo pululanazėmis (18, 205, 207), AmyA1 demonstravo veikiant ją 0,1 ir 4 M koncentracijų karbamidu. *G. thermoleovorans* US105 PULUS105 pululanazė, veikiamą 10 mM karbamido, demonstravo tik 10 % pululanolizinio aktyvumo (18), AmyA1 veikiamą 4 M karbamido – ~90 %. Detergentų poveikis I tipo pululanazių aktyvumui tirtas mažai. Veikus

pasirinktais detergentais rAmyA1 demonstravo aukštą pululanolizinių aktyvumą, o Brij 35 bei Brij 58 AmyA1 aktyvumą netgi stimuliavo. Neišreikštas pululanolizinio aktyvumo sumažėjimas stebėtas, detergentais veikus, *A. gottschalkii* DSM 13577 ir *F. pennavorans* Ven5 I tipo pululanazės (18, 204). Veikiant detergentais AmyA1 demonstravo didesnę stabilumą nei *G. thermoleovorans* US105 PULUS105 (205). Nustatytas aukštas AmyA1 pululanolizinis aktyvumas veikiant tirpikliais bei gliceroliu praplečia fermento biotechnologinį pritaikomumą.

3.2.6. AmyA1 aktyvumas ir substratinis savitumas

rAmyA1 pululanazė gebėjo hidrolizuoti pululaną, glikogeną bei tirpų krakmolą (10 lentelė), tačiau neskaidė amilopektino (nepateikti rezultatai). Pululanas, glikogenas bei krakmolai – PS, kurių polimerinei sandarai būdingos α -1,6-glikozidinės jungtys (4, 213). Kaip tikėtasi, atsižvelgus į minėtų jungčių santykinį pasiskirstymą bei jungčių išsidėstymą PS struktūroje AmyA1 efektyviausiai hidrolizavo pululaną. Fermentinę reakciją vykdžius 10 min. AmyA1 demonstravo beveik tris kartus mažesnę glikogenolizinių nei pululanolizinių aktyvumą. Fermentinės reakcijos inkubavimo laiką optimaliomis **10 lentelė.** Rekombinantinės AmyA1 substratinis savitumas bei Ca^{+2} jonų įtaka substratų hidrolizės intensyvumui

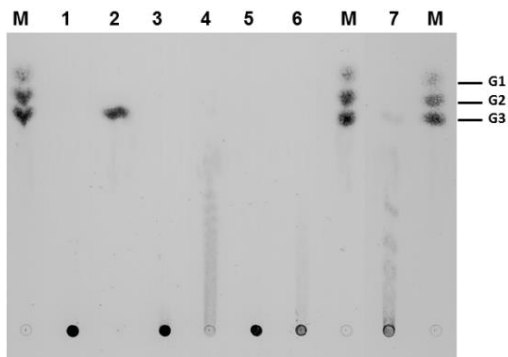
	Substratas	Santykinis aktyvumas, %					
		10 min	960 min	10 min	960 min	10 min	960 min
				1 mM CaCl ₂	1 mM CaCl ₂	10 mM CaCl ₂	10 mM CaCl ₂
AmyA1 su histidino giminimo inkaru	Pululanas	100*	-**	102,93	-	99,50	-
	Glikogenas	34,51	43,59	32,55	43,36	31,92	43,13
	Tirpus krakmolai	ND***	21,60	ND	19,73	ND	19,04
AmyA1 be histidino giminimo inkaro	Pululanas	105,44	-	113,14	-	121,12	-
	Glikogenas	48,13	50,40	53,49	57,08	56,54	59,65
	Tirpus krakmolai	ND	24,35	ND	28,78	ND	32,05

*100 % savitasis fermentinis aktyvumas optimaliomis AmyA1 aktyvumui sąlygomis – $134,3 \pm 0,003$ U/mg; ** “-”, – pululanolizinis aktyvumas nevertintas; ***ND – nedetektuotas pululanolizinis aktyvumas.

sąlygomis pratęsus iki 960 min., AmyA1 demonstravo ~10 % didesnę glikogenolizinę aktyvumą. Tirpų krakmolą AmyA1 hidrolizavo beveik penkis kartus silpniau nei pululaną, tačiau patikimai pastarojo substratinio savitumo detekcijai buvo būtina fermentinę reakciją inkubuoti 960 min. Analizavus metalų įtaką rAmyA1 (su 6HisIn) aktyvumui bei substratiniam savitumui Ca^{2+} statistiškai reikšmingos įtakos fermento veikimui neturėjo.

Trombino katalizuojama proteolize pašalinus 6HisIn, rekombinantinės pululanazės substratinis savitumas nekito, tačiau 6HisIn pašalinimo įtaka stebėta rAmyA1 aktyvumui (10 lentelė). rAmyA1 be histidino giminingumo inkaro ($_{HIS}$ -AmyA1) ~5 % efektyviau hidrolizavo pululaną, reakciją vykdant 10 min. optimaliomis fermentinei reakcijai sąlygomis. Įvertinus $_{HIS}$ -AmyA1 aktyvumą glikogenui bei tirpiam krakmolui, taip pat nustatytas pastarųjų aktyvumų padidėjimas, siekęs ~3-13 %. 1 ir 10 mM Ca^{2+} jonų koncentracija stimuliavo $_{HIS}$ -AmyA1 hidrolizinę aktyvumą tarp ~5-16 %, tačiau nekeitė pululanazės substratinio savitumo. Lyginant 1 mM su 10 mM Ca^{2+} koncentracijos poveikį $_{HIS}$ -AmyA1 aktyvumui, stebima tiesioginė hidrolizinio aktyvumo skatinimo priklausomybė nuo Ca^{2+} koncentracijos, visgi priklausomybė nėra linijinė. 6HisIn pašalinimas bei fermentinės reakcijos papildymas $CaCl_2$ skatino AmyA1 hidrolizuoti tirpų krakmolą, tačiau mažai efektyviai – patikimai minėtų veiksnių įtaka tirpaus krakmolo hidrolizės AmyA1 efektyvinimui nustatyta fermentinę reakciją vykdžius 960 min.

Plonasluoksne chromatografija išskirsčius pululano, glikogeno bei tirpaus krakmolo hidrolizės AmyA1 reakcijų produktus, įvertinti gauti OS (12 pav.). Optimaliomis sąlygomis AmyA1 hidrolizavo visą reakcijos mišinio pululano kiekį iki maltotriozės, o glikogeną ir tirpų krakmolą – iki skirtingo grandinės ilgio OS, ilgesnių nei iš trijų gliukozės molekulių sudaryta maltotriozė, tačiau abiejų substratų atveju konkretaus ilgio OS dominavimo nenustatyta.



12 pav. Rekombinantinės AmyA1 polisacharidų hidrolizės produktų oligosacharidinės grandinės ilgio įvertinimas plonasluoksne chromatografija.

Takeliai (užnešta 5 μ L mėginio):

1 – pululanas*; 2 – pululano hidrolizės** AmyA1 produktai; 3 – glikogenas; 4 – glikogeno hidrolizės AmyA1 produktai reakciją inkubavus 960 min; 5 – tirpus krakmolas; 6 – tirpaus krakmolo hidrolizės AmyA1 produktai reakciją inkubavus 960 min; 7 – pululano hidrolizės AmyA1

produktai fermentinei reakcijai taikius 0,8 μ g rekombinantinės AmyA1, pH 9, reakciją inkubavus 5 min esant 60°C; M – sacharidų mišinys (kiekvieno koncentracija 10 mg/mL): G1–gliukozė, G2–maltozė, G3 – maltotriozė. *kiekvieno substrato kontrolės koncentracija 10 mg/mL; **AmyA1 hidrolizės reakcijos vykdytos optimaliomis fermento aktyvumui sąlygomis.

Tiriant AmyA1 biotechnologinio taikymo galimybes buvo atliktas pirminis hidrolazės pululanolizinio aktyvumo įvertinimas – ar AmyA1 neoptimaliomis fermentinės reakcijos sąlygomis geba hidrolizuoti pululaną iki ilgos grandinės OS. AmyA1 pululaną iki ilgos grandinės OS hidrolizavo fermentinei reakcijai naudojant sumažintą rAmyA1 kiekį ($\leq 1 \mu\text{g}$) bei iki 5 min. sutrumpinus fermentinės reakcijos inkubavimo trukmę, palaikant hidrolazės aktyvumui optimalią temperatūrą bei $\text{pH} \geq 8$ (12 pav.).

Nustatytas AmyA1 substratinis savitumas bei hidrolizės produktai patvirtino šio fermento *in silico* priskyrimą I tipo pululanazėms (4), nes AmyA1 hidrolizavo tik α -1,6-glikozidines jungtis, demonstruodama visišką inertiškumą α -1,4-glikozidinių jungčių atžvilgiu. rAmyA1, veikdama kaip endohidrolazė, hidrolizavo α -1,6-glikozidines jungtis pululano linijinėje polimerinėje grandinėje skaidydama pululaną iki maltotriozės. Šakotus PS (glikogeną bei tirpų krakmolą) hidrolizavo iki skirtingo ilgio oligosacharidinių grandinių, lemdama šakotos struktūros praradimą, nes minėtų PS struktūrose α -1,6-glikozidinės jungtys sutinkamos oligosacharidinių grandinių jungimosi vietose (222). Kitos I tipo pululanazės demonstruoja didesnę glikogenolizinį aktyvumą nei gebėjimą skaidyti krakmolą, tačiau abu reikšmingai mažesnius nei pululanolizinis aktyvumas (200, 204, 211, 212, 207). Taigi AmyA1 būdingas tipiškas I tipo pululanazėms (4) substratinis savitumas. AmyA1 glikogenolizinio aktyvumo intensyvumas, lyginant su pululano skaidymo intensyvumu, reikšmingai didesnis nei *A. gottschalkii* DSM 13577 I tipo pululanazės (204). *B. acidopullulyticus* NCIB 11647 F1 ir F2 pululanazės glikogeną bei tirpų krakmolą skaidė beveik vienodai intensyviai kaip rAmyA1 (211). Vertinant AmyA1 glikogenolizinį bei tirpaus krakmolo skaidymo (60 °C ir fermentinę reakciją prailginus) aktyvumus, netiesiogiai patvirtinta, jog aukštoje temperatūroje AmyA1 yra stabilizuojama minėtų substratų. Substratų bei PS, kuriems pululanazės inertiškos, gebėjimas didinti šių fermentų termostabilumą yra jau nustatytas (4, 211, 212).

6HisIn, kurio seka klonuojant papildyta rAmyA1 seka, slopino pululanazės aktyvumą, tačiau substratinio savitumo nekeitė. Nenatyvių a.r. neigiamas poveikis, mažinantis fermentinį aktyvumą, yra aprašytas (219, 223). Netiesiogiai nustatytas, dėl 6HisIn sekos pakitęs AmyA1 natyvus erdvinis susilankstymas, lėmęs aktyvumo sumažėjimą, tikėtina, riboja AmyA1 ir Ca^{2+} sąveiką, nuspėtą *in silico* AmyA1 sekoje identifikavus Ca^{2+} jungimosi motyvą. Trombino proteolize pašalinus 6HisIn, rAmyA1 aktyvumas, veikiant Ca^{2+} , statistiškai reikšmingai padidėjo. Visgi prielaida, jog Ca^{2+} tiesiogiai svarbūs hidrolazės kataliziniam aktyvumui, bet ne termostabilumui, negali būti atmesta. AmyA1 termostabilumo Ca^{2+} nekeitė, tačiau pastaroji išvada gauta

termostabilumo įvertinimui *in vitro* naudojant rAmyA1 su 6HisIn (_{HIS+}AmyA1). *G. thermoleovorans* US105 I tipo pululanazės PULUS105, kurios seka panašiausia į AmyA1, aktyvumą Ca²⁺ jonai efektyvino didindami PULUS105 termostabilumą, bet tiesiogiai nebuvo svarbūs fermento katalizei (205).

AmyA1 optimaliomis sąlygomis visiškai hidrolizavo pululaną, tačiau neoptimaliomis eksperimento sąlygomis bei sutrumpinus reakcijos trukmę, AmyA1 vykdė pululano hidrolizę iki ilgos grandinės OS. Galimybė efektyviai moduluoti AmyA1 aktyvumą fermentinės reakcijos produktų grandinės ilgio atžvilgiu pažymi fermento biotechnologinio taikymo galimybes. I tipo pululanazių pululano skaidymo sąlygos bei reakcijos trukmė tiesiogiai lemia gaunamų OS ilgį, o α -1,6-glikolizidinių jungčių lokalizacija bei pasikartojimas glikogeno ir tirpaus krakmolo polimerinėse struktūrose lemia šių substratų hidrolizę iki ilgos grandinės OS (4). Pradiniais hidrolizės I tipo pululanazėmis reakcijos momentais stebimi pululano, glikogeno ar tirpaus krakmolo skaidymo produktų ilgiai skiriasi nežymiai (18, 200, 207, 211). I tipo pululanazių glikogeno bei tirpaus krakmolo hidrolizės produktų grandinės ilgis ir konkretaus grandinės ilgio OS kiekių santykis tiesiogiai priklauso nuo PS struktūros, bet ne nuo I tipo pululanazių katalizinių charakteristikų (4).

3.2.7. Imobilizavimo įtaka AmyA1 aktyvumui ir stabilumui

Siekiant visapusiškai charakterizuoti AmyA1 biotechnologinio taikymo galimybes, įvertinta imobilizavimo įtaka hidrolazės pululanoliziniams aktyvumui ir termostabilumui. *Geobacillus* spp. pululanazės anksčiau nebuvo imobilizuotos. _{HIS+}AmyA1 imobilizavimas didino pululanolizinį hidrolazės aktyvumą. Imobilizuota ant Sepabeads EC-HA/M ir Sepabeads EC-EP/M nešiklių AmyA1 demonstravo, atitinkamai, 27,13 % ir 8,43 % didesnį pululanolizinį aktyvumą. Imobilizavimas ant kalcio alginato AmyA1 aktyvumą didino 2,4 %. Imobilizuotos _{HIS-}AmyA1 aktyvumas 5,44 % didesnis nei neimobilizuotos _{HIS-}AmyA1. Taigi rAmyA1 imobilizavimas ant pasirinktų Sepabeads tipo nešiklių ~3-22 % didino fermento pululanolizinį aktyvumą. Tik ant kalcio alginato imobilizuotos rAmyA1 stebėtas 3,04 % mažesnis pululanolizinis aktyvumas nei neimobilizuotos _{HIS-}AmyA1.

Imobilizavimas nežymiai didino rAmyA1 termostabilumą: ant Sepabeads EC-HA/M nešiklio – 7,57 % (inkubavus 340 min., 60 °C), o ant Sepabeads EC-EP/M ir kalcio alginato (taikius identišką sąlygą) – atitinkamai 4,38 % ir 2,84 % (9 pav.).

Pululanazės sėkmingai imobilizuotos naudojant skirtingos prigimties nešiklius – klasikiniams fermentų imobilizavimui laikomus alginatą ir agarą bei naujų struktūrinių savybių polimerines daleles (224, 225, 226), o Sepabeads

tipo nešikliai pululanazių imobilizavimui anksčiau naudoti nebuvo. Pastarojo tipo nešikliai buvo tinkamesni nei kalcio alginatas_{HIS+}AmyA1 imobilizavimui. Ant Sepabeads tipo nešiklių dalelių AmyA1 makromolekulių imobilizavimas lėmė didesnę hidrolazės pululanolizinę aktyvumą bei termostabilumą, tačiau skirtingi Sepabeads nešikliai minėtus AmyA1 parametrus keitė skirtingai. Imobilizavimas ant Sepabeads EC-HA/M AmyA1 pululanolizinę aktyvumą padidino beveik tris kartus, o termostabilumą – beveik du kartus nei imobilizavimas ant Sepabeads EC-EP/M. Šiuos skirtumus, tikėtina, lėmė skirtinga jungčių tarp fermento ir nešiklio prigimtis. Baltymų imobilizaciją ant Sepabeads EC-HA/M užtikrina nešiklio paviršiaus amino (heksametilen-amino) grupės, o ant Sepabeads EC-EP/M – oksirano (epoksi) grupės (227). Kovalentinė imobilizacija epoksi grupių pagalba tinka rekombinantiniams fermentams su 6HisIn (188), tačiau AmyA1 palankesnė buvo kovalentinė imobilizacija per amino grupes. rAmyA1 kovalentinė imobilizacija ant kalcio alginato, susidarant jungtims tarp fermento amino grupių bei nešiklio karboksi grupių, reikšmingai nekeitė AmyA1 aktyvumo ir termostabilumo. Ant alginato imobilizuota termostabili ir termoaktyvi *Klebsiella pneumoniae* ATCC 15050 I tipo pululanazė 60 °C demonstravo sumažėjusį pululanolizinę aktyvumą, tačiau beveik penkis kartus išaugusį termostabilumą (224). Imobilizuotų ant skirtingų silikatinių nešiklių *B. acidopullulyticus* NCIB 11647 F1 ir F2 pululanazių kito pH optimumas, temperatūros optimumas bei aktyvumas sumažėjo, o termostabilumas reikšmingai padidėjo (228). Dažniausiai imobilizavimas lemia I tipo pululanazių aktyvumo mažėjimą, o termostabilumo didėjimą (225, 228, 229). Skirtingai nei tikėtasi, imobilizuotos rAmyA1 termostabilumas nekito, bet aktyvumas netgi padidėjo, kas vėlgi pažymi šio fermento imobilizavimo tikslingumą.

3.3. Termoaktyvi bei termostabili pektato liazė PL47

3.3.1. PL47 geno klonavimas ir sekos analizė

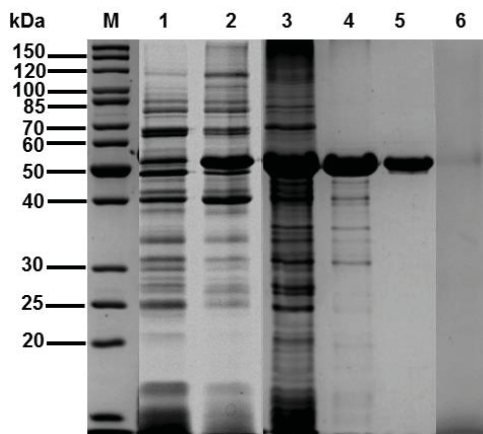
PL47 geno seka pagausinta naudojant P-1/2/3-PL47-F ir P-1/2/3-PL47-R pradmenų porą, matrica naudojant *G. thermodenitrificans* DSM 101594 suminę DNR. Nuskaičius PL47 geno seką, buvo įvertintas sekos panašumas su pektinazių sekomis. Pektato liazės PL47 seka yra 1326 bp ilgio (GenBank suteiktas identifikacinis geno sekos nr.: WP_060475609.1), PL47 polipeptido ilgis – 441 a.r. (GenBank suteiktas identifikacinis baltymo sekos numeris: KQB94501.1), fermento apskaičiuota MM – 50,2 kDa. PL47 geno seka 99,9 % identiška *Bacillus* sp. TS-47 produkuojamai pektato liazės PL47 (PL47_{Bsp.TS47}) geno (EMBL AB045986.1 (163)) sekai. Lygintos sekos skiriasi vienu

PL47 sekoje *in silico* patikimai identifikuotas konservatyvus ¹⁴⁷Q---F³⁵⁵ pektato liazės C katalizinis domenas (CAZy PL6 šeimos katalizinis domenas (pfam 00544 (175))). Pastarojo PL47 sekos domeno sekoje identifikuotos tikėtinai hidrolazės katalizinę triadą formuojančios a.r. (K²⁶⁰, R²⁸⁸ bei R²⁹⁶). *In silico* atlikus PL47 sekos analizę, taip pat identifikuotos konservatyvios Ca²⁺ jonų koordinuojančios a.r. liekanos (D²¹⁴, D²⁵⁴ bei D²⁵⁸). Pektato liazių paralelinės β-spiralinės erdvinės struktūros įgijimą apsprendžiantis motyvas vWiDH – IWIDH (108, 232, 233), konservatyvus visiems CAZy PL1 šeimos fermentams (206), nustatytas ir PL47 sekoje ²⁰⁰I---H²⁰⁴. PL47 sekoje taip pat nustatytos visos konservatyvios a.r., būdingos CAZy PL1 šeimos termoaktyvioms bei termostabilioms PL (108): A⁴⁰, G⁴⁵, I⁸⁶, V⁸⁸, T⁹¹, I⁹², R¹⁸⁶, I²⁶⁶, F³¹⁶ (13 pav.). PL47 sekoje *in silico* patikimai nuspėtas ir ¹M---A²⁵ SP. Identiškas SP nustatytas PL47_{Bsp.TS47} sekoje (163, 164). Apskaičiuota _{sp}.PL47 MM siekia 47,3 kDa.

Konservatyvūs PL47 sekos domenai bei motyvai rodo, jog šis fermentas – nuo Ca²⁺ priklausoma termoaktyvi bei termostabili PL. Atsižvelgus į PL47 sekos panašumą į kitų pektinazių sekas, PL47 galima priskirti CAZy PL1 šeimos, vienijančios skirtingų organizmų PL, 6 pošeimiui (12).

3.3.2. Rekombinantinės PL47 raiška *E. coli* ir mieliagrybiuose

_{sp}.PL47 *E. coli* BL21(DE3) ekspresavo didele išeiga, tačiau baltymas buvo nustatytas NDS-PAGE tik netirpioje raiškos kamieno lizato frakcijoje bei neaktyvus (14 pav.). Atlikus rPL47 raiškos optimizaciją, pasirinkta raiškos kamieną kultivuoti CASO, 30 °C, indukuojant 0,1 mM IPTG koncentracija raiškos kamieno kultūrai pasiekus OT₆₀₀ 0,5 ir heterologinę raišką palaikant 2 val. Kaip jau minėta, agregacija visiškai slopino rPL47 aktyvumą, tačiau



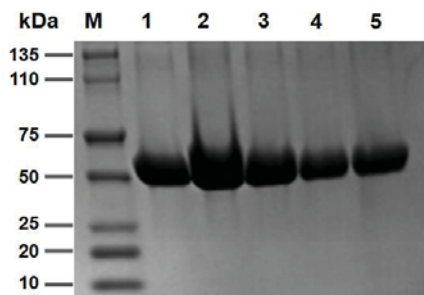
14 pav. Rekombinantinės PL47 (rPL47) heterologinės raiškos bei sekretinės produkcijos efektyvumo ir fermentinio preparato grynumo įvertinimas NDS-PAGE. Takeliai: 1 – kontrolė (rekombinantinės *Escherichia coli* BL21(DE3) ląstelių netirpios lizato frakcijos baltymai (~50 μg) neindukavus rPL47 raiškos); 2 – rekombinantinės *E. coli* BL21(DE3) ląstelių netirpios lizato frakcijos baltymai indukavus rPL47 raišką; 3 – rekombinantinės *E. coli* BL21(DE3) ląstelių lizato baltymai indukavus rPL47 raišką taikant optimizuotas raiškos sąlygas; 4 – rPL47 preparatas po gryninimo nikelio giminingumo chromatografija; 5 – rPL47 preparatas po

gryninimo jonų mainų chromatografija bei dializės prieš fermentinio preparato buferį; 6 – rPL47 sekretuotos *Pichia pastoris* SMD1163 preparatas po dializės. M – baltymų molekulinį masių žymuo PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

NDS-PAGE mėginių užnešimo buferyje naudota NDS koncentracija efektyviai ištirpdė rPL47 formuojamus agregatus. Nustatyta ~50 kDa PL47 MM atitiko apskaičiuotą $_{SP}$ -PL47 teorinę MM. PL47 (kaip ir PL47 $_{Bsp.TS47}$ (162)) nedemonstravo gebėjimo oligomerizuotis. Dažniausiai PL yra monomeriniai fermentai (12, 101, 234, 235, 236), tačiau termoaktyvių bei termostabilių PL homooligomerizacija yra nustatyta. *Thermotoga maritima* DSM 3109 PeA geba tetramerizuotis (118). Rekombinantinių PL raiška vykdyta naudojant *E. coli* ir *Bacillus* kamienus, bei mieliagrybius. *Bacillus* rekombinantinių PL raišką vykdydant *E. coli* BL21(DE3), PL dažnai išlieka tirpios (53, 236, 237), nors ne visada (234, 238). Siekiant to išvengti, rekombinantinių fermentų gavimui taikoma ir sekretinė produkcija, vykdoma *E. coli* kamienų (107, 231, 239). Heterologinei raiškai pasitelkus *Bacillus* kamienus, rekombinantinės PL gautos tirpioje raiškos kamieno lizato frakcijoje arba sekretuotos (39, 240). PL47 $_{Bsp.TS47}$ heterologinę raišką vykdydant *Bacillus subtilis* MI112, fermentas sekretuotas vidutiniška išėiga (162, 212). Mieliagrybiai taip pat efektyviai vykdo rekombinantinių PL sekretinę produkciją (241, 242).

Siekiant užtikrinti tirpios rPL47 gavimą, tikslinis fermentas ekspresuotas *Pichia pastoris* SMD1163 bei *Kluyveromyces lactis* G7799 (15 pav., 11 lentelė). Mieliagrybių sekretuotos PL47 MM, įvertinta NDS-PAGE, atitiko apskaičiuotą rekombinantinio fermento masę be nuspėtos SP sekos – ~47 kDa. Kaip tikėtasi, sekretinė produkcija, naudojant *P. pastoris* bei *K. lactis*, užtikrino tirpios, stabilios bei nelinkusios agreguoti rPL47 gavimą.

rPL47 sekretinės produkcijos išėiga priklausė ne tik nuo mieliagrybio raiškos kamieno, bet ir nuo integracinio konstrukto sekos, tiesiogiai lemiančios konstrukto integravimosi į mieliagrybių genomą efektyvumą (11 lentelė). PL47 sekretinės produkcijos išėiga kiekvienu atveju vertinta atsitiktinai pasirenkant ±10 klonų, iš kurių atrinktas pasižymėjęs efektyviausia rPL47



15 pav. Rekombinantinės PL47 (rPL47) sekretinės produkcijos įvertinimas NDS-PAGE.

Takeliai: 1 – koncentruotas rPL47 (be nuspėto signalinio peptido (SP) sekos) sekretuotos *Pichia pastoris* SMD1163 preparatas; 2 – koncentruotas rPL47 (be SP sekos, N-gale *Saccharomyces cerevisiae* α faktoriaus bei kexsino proteazės (Kex2) atpažįstama seka) sekretuotos *P. pastoris* SMD1163 preparatas; 3 – koncentruotas rPL47 (be SP sekos, N-gale *S. cerevisiae* α faktoriaus bei Kex2

atpažįstama seka) sekretuotos *Kluyveromyces lactis* G7799 preparatas; 4 – koncentruotas rPL47 (be SP sekos, N-gale optimizuota *S. cerevisiae* α faktoriaus bei Kex2 atpažįstama seka) sekretuotos *K. lactis* G7799 preparatas; 5 – koncentruotas rPL47 (be SP sekos, N-gale optimizuota *K. lactis* α faktoriaus bei dubliuota 2xKex2 atpažįstama seka) sekretuotos *K. lactis* G7799 preparatas. M – baltymų molekulinį masių žymuo Precision Plus Protein™ Dual Color Standart (Bio Rad).

sekrecija (nepateikti rezultatai). Naudojant *P. pastoris* SMD1163, pasiekta apytiksliai dvigubai didesnė PL47 sekrecinės produkcijos išėiga nei su *K. lactis* G7799 (11 lentelė). *P. pastoris* SMD1163 rPL47, kurios seka N-gale papildyta *S. cerevisiae* α faktorius bei keksino proteazės sekomis, sekretavo ~23 % efektyviau nei rPL47, kurios seka nebuvo papildyta α faktorius seka. rPL47, papildytą N-gale *S. cerevisiae* α -faktorius bei keksino proteazės sekomis, *P. pastoris* SMD1163 sekretavo tris kartus efektyviau nei natyvi PL47, sekretuota *G. thermodenitrificans* DSM 101594. Visgi *K. lactis* G7799 rPL47,

11 lentelė. Rekombinantinės PL47 sekrecinės produkcijos efektyvumas

Raiškos kamienas	Integracinio konstrukto sandara	Sekrecinės produkcijos išėiga*, U/mL	Santykinė sekrecinės produkcijos išėiga, %
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> DSM 101594 (natyvios PL47 sekrecija)	-	1,27	28,4
<i>Pichia pastoris</i> SMD1163	optimizuota PL47 seka be nuspėto signalinio peptido sekos	3,44	76,9
	optimizuota PL47 seka be nuspėto signalinio peptido sekos N-gale papildyta <i>Saccharomyces cerevisiae</i> α faktorius bei keksino proteazės (Kex2) atpažįstama seka	4,47	100
<i>Kluyveromyces lactis</i> G7799	optimizuota PL47 seka be nuspėto signalinio peptido sekos N-gale papildyta <i>S. cerevisiae</i> α faktorius bei Kex2 atpažįstama seka	2,78	62,2
	optimizuota PL47 seka be nuspėto signalinio peptido sekos N-gale papildyta optimizuota <i>S. cerevisiae</i> α faktorius bei Kex2 atpažįstama seka	1,21	27
	optimizuota PL47 seka be nuspėto signalinio peptido sekos N-gale papildyta <i>Kluyveromyces lactis</i> α faktorius bei dubliuota 2xKex2 atpažįstama seka	1,14	25,5

*Sekrecinės produkcijos išėiga įvertinta visais atvejais kultivuojant 500 mL terpės. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 kultūros sekrecinės produkcijos vertinimo momentu siekė OT₆₀₀ 0,7 (vėlyva eksponentinė kultūros augimo fazė), mieliagybių OT₆₀₀ svyravo 50-60 (vėlyva eksponentinė kultūros augimo fazė).

kurios seka N-gale papildyta *S. cerevisiae* α -faktorius bei keksino proteazės sekomis, sekretavo beveik 12 % efektyviau nei sekretuota natyvi PL47 (11 lentelė). Naudojant ekspresijai standartines sąlygas, mieliagybiai rPL47 sekretavo neefektyviai. *Bacillus subtilis* WSB04-2 bei *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 pektato liazių PelA sekrecijai taikius *Pichia pastoris* GS115 rekombinantinių PL produkcijos išeigos buvo kartais didesnės nei nustatytos įvertinus natyvių PelA sekreciją (241, 242). Pektato liazių sekrecinei produkcijai naudojant *E. coli* arba *Bacillus* kamienus pasiektas rekombinantinių PL sekrecijos intensyvumas (236) taip pat reikšmingai viršijo rPL47 sekrecinės produkcijos intensyvumą. *B. subtilis* MI112 sekretavo PL47_{Bsp.TS47} beveik penkis kartus intensyviau nei *Bacillus* sp. TS-47 natyvią PL47_{Bsp.TS47} (162).

3.3.3. Rekombinantinės PL47 gryninimas

Taikant optimizuotas heterologinės raiškos sąlygas, _{sp.}PL47, N-gale papildyta 6HisIn, ekspresuota *E. coli* BL21(DE3) didele išeiga, tačiau buvo netirpi ir neaktyvi. Siekiant optimizuoti rPL47 tirpinimą, *E. coli* BL21(DE3) lizato netirpi frakcija veikta įvairiais tirpinimo agentais: guanidinu, NaCl, komerciniu inkliuzijos kūnelių tirpdyimo reagentu (Thermo Fisher Scientific) (243) ir karbamidu. rPL47 visiškai ištirpdė 6 ir 8 M karbamido koncentracija, o kiti agentai buvo mažai efektyvūs (nepateikti rezultatai).

rPL47 nustatyta jau tik tirpioje *E. coli* BL21(DE3) lizato baltymų frakcijoje po lizavimo ultragarsu į 20 mM TRIS-HCl (pH 7; KT) su 350 mM NaCl, 10 mM imidazolo bei 6 M karbamido. Gryninimas NiGCh iš rPL47 preparato leido pašalinti didžiąją dalį raiškos kamieno lizato baltymų. Iš dalies išgrynintos rPL47 preparatą dializuojant pakopomis, kas 2 M mažinant karbamido koncentraciją iki 2 M, naudojant JMCh (20 mM TRIS-HCl (pH 9; KT)) buferį, rPL47 neprarado tirpumo. Po antrojo gryninimo etapo rPL47 preparatas dializuotas prieš 20 mM TRIS-HCl (pH 7; 60 °C) su 7 mM imidazolo buferį. Optimizuojant rPL47 tirpinimą, nustatyta minimali 7 mM imidazolo koncentracija, palaikanti tirpų fermentą ir nekeičianti aktyvumo (nepateikti rezultatai). *E. coli* BL21(DE3) ekspresuotos rPL47 tirpinimo bei dviejų etapų gryninimo strategija leido gauti didelio grynumo tikslio fermento preparatą, nustačius 611,9 U/mg savitojo aktyvumo. rPL47 polinkio homooligomerizuotis arba agreguoti fermento preparato buferyje nenustatyta net inkubuojant fermento preparatą dvi paras, 4 °C (12 lentelė, 14 pav.).

Rekombinantinių baltymų genų raiškai genetiškai optimizuoti mieliagybių kamienai sekretuoja mažai natyvių baltymų, todėl sekretuotas rekombinantinis baltymas gaunamas beveik be priemaišinių baltymų (182). Dažnai *P. pastoris* kamienų sekretuoti rekombinantiniai fermentai, patvirtinus jų funkcinį grynumą

12 lentelė. Rekombinantinės PL47, ekspresuotos *Escherichia coli* BL21(DE3), gryninimo išeišos įvertinimas

Gryninimo etapas	Suminis aktyvumas, U*	Suminė baltymų masė, mg	Savitasis aktyvumas, U/mg	Išeiša, %	Gryninimo efektyvumas
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) lizatas	24083	858,1	28	100	-
Po nikelio giminingumo chromatografijos	17960	87,9	204,3	76	7
Po dializės prieš jonų mainų buferį A	17803	86,5	205,8	74	7
Po jonų mainų chromatografijos	12976	21,5	603,5	54	22
Po dializės prieš fermento preparato buferį	12789	20,9	611,9	53	22

*Vienetas U žymi pektato liazės kiekį, katalizuojantį 1 μ mol redukuojančių cukrų susidarymą per 1 min taikant 2.17. poskyryje nurodytas fermentinės reakcijos sąlygas; monogalakturno rūgštis laikyta redukuojančių cukrų standartu.

nėra gryninami (181). Efektyvi produkcija gauta *P. pastoris* SMD1163 sekretuojant rPL47 su N-gale papildytomis *S. cerevisiae* α faktorius bei keksino proteazės sekomis (13 lentelė). Kaip tikėtasi, PL sekrecinė produkcija *P. pastoris* sekretome užtikrino beveik bepriemaišinių tikslinio fermento gavimą (14, 15 pav.). Funkcinis rPL47, sekretuotas *P. pastoris* SMD1163, grynumas buvo patvirtintas pektino zimografija – vienintelė pektinolinio aktyvumo zona visiškai atitiko apskaičiuotą teorinę $_{SP}$ -PL47 MM (nepateikti rezultatai). *P. pastoris* SMD1163 sekretomas dializuotas prieš 20 mM TRIS-HCl (pH 7; 60°C) buferį, neprarandant rPL47 tirpumo, o rPL47 savitasis aktyvumas siekė 593,4 U/mg (13 lentelė). Dvi paras inkubuojant 4 °C, rPL47 proteolizinės degradacijos nenustatyta. rPL47, sekretuota *P. pastoris*, polinkio homooligomerizuotis nedemonstravo. Sekrecine produkcija gauta didelio grynumo, nelinkusi agreguoti, be papildomų nenatūvių polipeptido sekos fragmentų, tirpi bei aktyvi rPL47.

rPL47 tirpumą užtikrinęs karbamidas – rekombinantinių baltymų tirpdymui tipiška naudojamas chaotropas (238). *Bacillus subtilis* RCK ir *Phytophthora capsici* rekombinantinių PL tirpinimui šarminėje aplinkoje taip pat taikyta ≥ 2 M karbamido koncentracija (234, 238), o imidazolo chaotropinės savybės išnaudotos grynos rPL47 tirpumo palaikymui. Teigiamas žemų imidazolo koncentracijų poveikis nustatytas ir kitų grynų rekombinantinių baltymų tirpumui (244). *E. coli* BL21(DE3) ekspresuota rPL47 išgryninta pasiekiant

13 lentelė. Rekombinantinės PL47, ekspresuotos *Pichia pastoris* SMD1163, sekrecinės produkcijos išeiga

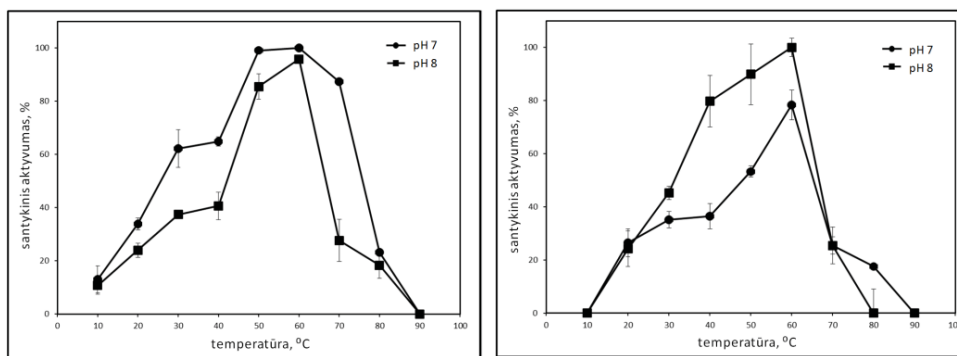
Gryninimo etapas	Suminis aktyvumas, U*	Suminė baltymų masė, mg	Savitasis aktyvumas, U/mg	Išeiga, %	Gryninimo efektyvumas
<i>Pichia pastoris</i> SMD1163 sekretomas	2325	4	581,2	100	-
Po dializės prieš fermento preparato buferį	2279	3,8	593,4	98	1

*Vienetas U žymi pektato liazės kiekį katalizuojantį 1 μmol redukuojančių cukrų susidarymą per 1 min taikant nurodytas fermentinės reakcijos sąlygas; monogalakturno rūgštis laikyta redukuojančių cukrų standartu.

53 % išeigą, o *P. pastoris* SMD1163 sekretuota rPL47 su 98 % išeiga. Nors *E. coli* BL21(DE3) ekspresuota rPL47 buvo netirpi, tačiau gauta 78,9 mg/L liazės produkcija. Naudojant *P. pastoris* SMD1163, rPL47 sekrecinės produkcijos išeiga siekia 7,8 mg/L. rPL47 *E. coli* BL21(DE3) raiškos išeiga (mg/L) nesiskiria nuo kitų citoplazmoje inkliuzijos kūnelius formavusių PL išeigos (234, 238), o gauta rPL47 sekrecinės produkcijos išeiga reikšmingai mažesnė nei kitų *Bacillus* PL sekrecinės produkcijos išeiga, fermentų raiškai naudojant *P. pastoris*, *E. coli* ar *Bacillus* kamienus (229, 242, 245).

3.3.4. Temperatūros įtaka PL47 aktyvumui ir stabilumui

Vertinant rPL47 aktyvumo priklausomybę nuo temperatūros, esant pH 7 ir pH 8, substratais naudojant PGA ir pektiną, gautos panašaus profilio priklausomybę atspindinčios kreivės (16 pav.). rPL47 skaidė PGA bei pektiną 20-80 °C. Abiejų substratų atžvilgiu didžiausias rPL47 aktyvumas buvo 60°C. Nustatytas identiškas rPL47 fermentinio aktyvumo priklausomybės nuo temperatūros optimumas esant pH 7 ir pH 8. Pektato liazė pH 7 demonstravo efektyvų PGA skaidymo aktyvumą (ne mažiau 40 % aktyvumo optimaliomis

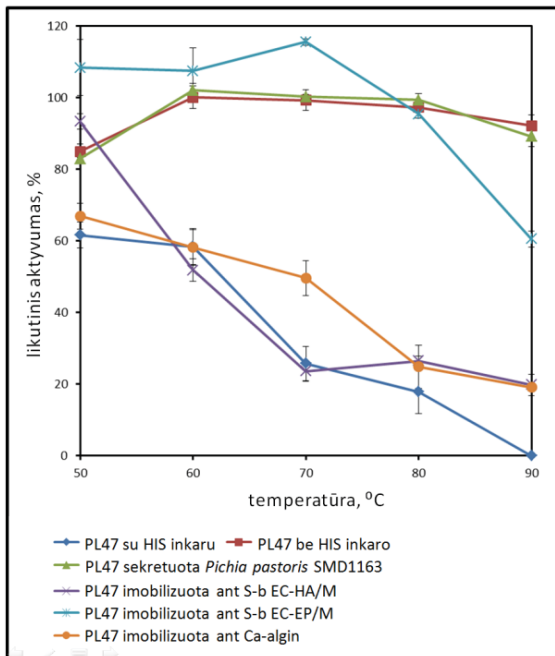


16 pav. Temperatūros 10-90 °C įtaka rekombinantinės PL47 PGA (kairėje) ir pektino (dešinėje) skaidymo aktyvumui. 100 % savitasis fermentinis aktyvumas – 611,9 ± 0,012 U/mg.

sąlygomis) 30-70 °C temperatūrų intervale, o pH 8 fermento efektyvaus aktyvumo intervalas 30-60 °C. Efektyvus rPL47 pektinolinis aktyvumas, esant pH 7, nustatytas 30-60 °C, o pH 8 – 40-60 °C. *sp*.PL47, gautos dėka sekrecinės produkcijos iš *P. pastoris* SMD1163, PGA skaidymo bei pektinolinio aktyvumų priklausomybė nuo temperatūros reikšmingai nesiskyrė (nepateikti rezultatai) lyginant su aptarta temperatūros įtaka *HIS+SP*.PL47 aktyvumui (16 pav.).

rPL47 termostabilumo įvertinimo rezultatai rodo, jog fermento sekos papildymas 6HisIn seka reikšmingai mažina tirtos PL termostabilumą. Inkubavus 60 min. 60 °C *HIS+SP*.PL47 prarado daugiau nei 40 % PGA skaidymo intensyvumo, o po inkubavimo 60 min. 90 °C visiškai prarado aktyvumą (17 pav.).

rPL47 demonstravo maksimalų aktyvumą 10 °C mažesnėje temperatūroje nei natyvos ar rekombinantinės PL47_{Bsp.TS47} temperatūrinis optimumas – 70°C (162). Ši skirtumą, tikėtina, lėmė viena a.r. (30 pozicijoje PL47 sutinkamas argininas, PL47_{Bsp.TS47} – histidinas (163)) besiskiriančios PL sekos. Visgi yra žinoma, kai *Bacillus* sp. rekombinantinės pektinazės temperatūrinis



17 pav. Temperatūros įtaka rekombinantinės PL47 stabilumui bei histidino giminingumo inkaro ir imobilizavimo įtaka liazės termostabilumui.

100 % likutinis PGA skaidymo aktyvumas – $611,9 \pm 0,012$ U/mg. Santrumpos: S-b EC-HA/M – Sepabeads EC-HA/M nešiklis, S-b EC-EP/M – Sepabeads EC-EP/M nešiklis, Ca-algin – kalcio alginatas.

optimumas žemesnis nei natyvaus fermento (229). Kitos *Bacillus* spp. PL, homologiškos PL47, irgi aktyviausios 50-70 °C (168). Temperatūros įtaką PL47 aktyvumui atspindinčios kreivės taip pat būdingos PL47_{Bsp.TS47} bei termoaktyvių *Bacillus subtilis* WSHB04-02 ir *Bacillus tequilensis* SV11 pektato liazių aktyvumo priklausomybės nuo temperatūros kreivėms (106, 107, 163). rPL47 pH 7 demonstravo vieną plačiausių efektyvaus aktyvumo intervalų (30-70 °C), kada nors nustatytų tarp PL (12). Pastarąja charakteristika iš aprašytų termoaktyvių PL taip pat išsiskiria *Bacillus*

subtilis TCCC11286 pektato liazė ApeI (106) bei *B. tequilensis* SV11 pektato liazė (107). Natyvios ar rekombinantinės iš PL47_{Bsp.TS47} efektyvus aktyvumas nustatytas tik 60-75 °C (163). Dauguma tirtų *Bacillus* PL demonstruoja efektyvų aktyvumą temperatūrų intervale, neviršijančiame 20 °C (162, 168).

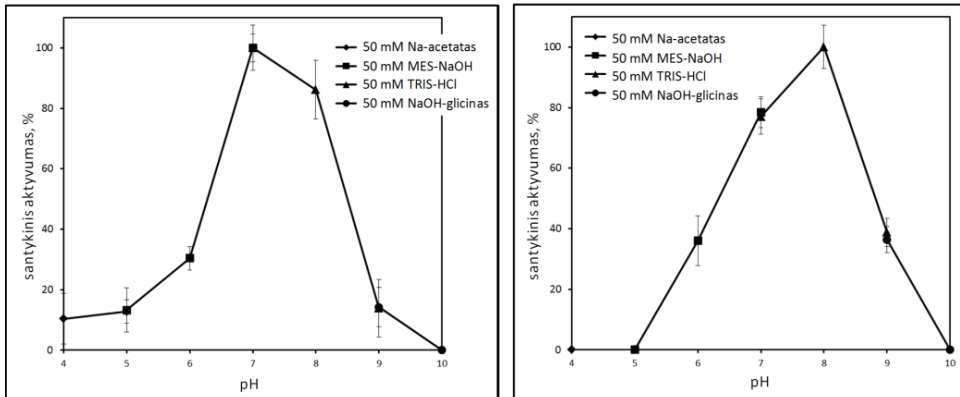
PL47 termostabilumo įvertinimo rezultatai leidžia teigti, jog N-galinė 6HisIn seka keičia PL47 erdvinę struktūrą – šią seką pašalinus, *sp*.PL47 *in vitro* demonstravo *G. thermodenitrificans* DSM 101594 augimo temperatūrą atspindintį termostabilumą (246). Fermentų charakteristikas *in vitro* iškreipianti 6HisIn sekos įtaka nėra dažnai nustatoma charakterizuojant rekombinantines pektinazės (219, 237), tačiau yra žinoma (247). rPL47 termostabilumo įvertinimas kartu netiesiogiai patvirtino, jog fermento heterologinės raiškos *E. coli* bei tirpumo regeneravimo strategijos lėmė tinkamas sąlygas *sp*.PL47 erdvinės struktūros įgijimui, ką netiesiogiai patvirtina beveik identiškas *HIS-SP*.PL47 ir *sp*.PL47, gautos sekrecine produkcija iš *P. pastoris* SMD1163, termostabilumas. Nustatytas rPL47 termostabilumas reikšmingai didesnis nei natyvios ar rekombinantinės PL47_{Bsp.TS47} (162, 163). Natyvi PL47_{Bsp.TS47} išliko stabili inkubuojant 30 min., 40-60 °C, su 50 µg/mL BSA, tačiau demonstravo tik ~85 % likutinio aktyvumo veikus 70 °C bei visiškai prarado aktyvumą po 30 min. inkubavimo 80 °C, o rekombinantinės PL47_{Bsp.TS47} termostabilumas buvo tik nežymiai mažesnis nei natyvios (162, 163). PL47 termostabilumas reikšmingai didesnis nei mezofilinių *Bacillus* spp. ne termoaktyvių PL (5), bei viršija ir visų nuosaičių termofilinių *Bacillus* spp. charakterizuotų termoaktyvių PL termostabilumą (63). *sp*.PL47 išties išsiskiria termostabilumu – ji net termostablesnė už *Bacillus* sp. RN1 PelSWU pektato liazė, aprašytą termoaktyviausią (temperatūriniam optimumui siekiant 90 °C) *Bacillus* genties pektinazę (200). Pastaroji liazė prarado aktyvumą po 60 min. inkubavimo 80 °C, kai rPL47 identiškomis sąlygomis demonstravo 90 % viršijantį likutinį PGA skaidymo intensyvumą. Visgi PL47 mažiau termostabili nei pektato liazės iš hipertermofilinių bakterijų. *Thermotoga maritima* DSM 3109 demonstravusios temperatūros optimumą PelA pektato liazės 90°C $t_{1/2}$ (95 °C) siekė 120 min. (118).

3.3.5. pH įtaka PL47 aktyvumui ir stabilumui

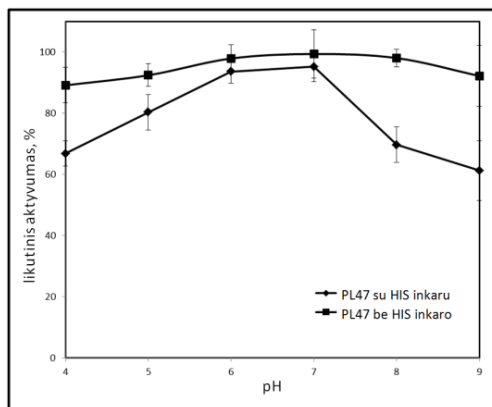
rPL47 PGA skaidė pH 4–9 intervale, o liazės pektinolizinis aktyvumas nustatytas pH 6–9 (18 pav.). Didžiausias liazės PGA skaidymo intensyvumas nustatytas pH 7, o pektinolizinio aktyvumo maksimumas gautas pH 8. Charakterizuojama pektato liazė taikytų substratų atžvilgiu demonstravo efektyvų aktyvumą (ne mažiau 40 % aktyvumo optimaliomis sąlygomis) pH 7-8 intervale. 6HisIn seka *sp*.PL47 aktyvumo priklausomybės nuo pH

nekeitė, nes HIS-SP-PL47 PGA skaidymo bei pektinolinio aktyvumų priklausomybė nuo pH nepakito (nepateikti rezultatai).

Įvertinus rPL47 stabilumą pH 4-9 inkubuojant 60 min. 60 °C, nustatyta, jog HIS-SP-PL47 buvo stabilus pH 4-9, o HIS+SP-PL47 – tik pH 6-7 (19 pav.). Esant optimaliam PL47 PGA skaidymo aktyvumui pH 7, pašalinus 6HisIn, nustatytas fermento likutinis aktyvumas siekė 99,35 %. HIS-SP-PL47 stabilumas rūgštinėje ar šarminėje aplinkoje reikšmingai nesiskyrė, o HIS+SP-PL47 buvo stabilėsnė rūgštinėje pH intervalo srityje.



18 pav. pH 4–10 įtaka rekombinantinės PL47 PGA (kairėje) bei pektino (dešinėje) skaidymo aktyvumui. 100 % savitasis fermentinis aktyvumas – $611,9 \pm 0,012\text{U/mg}$.



19 pav. pH 4-9 įtaka rekombinantinės PL47 su bei be histidino giminingumo inkaru stabilumui. Likutinis PL47 be histidino giminingumo inkaru PGA skaidymo aktyvumas veikus pH 7 siekia 99,35 % – $607,9 \pm 0,011\text{U/mg}$.

Natyvi $\text{PL47}_{\text{Bsp.TS47}}$ demonstravo PGA skaidymo optimumą pH 8 (162), o rPL47 PGA skaidymo optimumas nustatytas pH 7, o abiejų fermentų pektino skaidymo maksimumas nustatytas pH 8. Taigi tirtai PL47 ir $\text{PL47}_{\text{Bsp.TS47}}$ būdingas identiškas pH 7-8 intervalas, kuriame fermentai demonstravo efektyvų aktyvumą (162). Dažniausiai *Bacillus* spp. PL demonstruoja pH 9-10 optimumą (56, 77, 101), tačiau šių bakterijų PL, aktyvios labiau šarminiame pH

intervale, taip pat nėra retos (97, 248), o tirta PL47, kurios pH optimumas artimas $\text{PL47}_{\text{Bsp.TS47}}$ (162) bei *Bacillus subtilis* B66 Pel-66 (56), išsiskiria, nes išlieka aktyviausia esant neutraliai/silpnai šarminiai aplinkai. Aprašytos *Streptomyces* bei *Clostridium* genčių PL, aktyviausios rūgštinėje aplinkoje, nėra būdingos *Bacillus* ar *Geobacillus* (249, 250). Kaip būdinga *Bacillus*

pektato liazems (77, 105), rPL47 išliko efektyviai aktyvi siauro pH intervalo atžvilgiu. $_{sp}PL47$ pH įtakos stabilumui įvertinimo rezultatai leidžia teigti, jog N-galinė 6HisIn seka keičia PL47 erdvinę struktūrą. $_{HIS+SP}PL47$ buvo stabili tik pH 6-7, tuo tarpu $_{HIS-SP}PL47$ stabilumas nustatytas pH 4-9 intervale.

Aprašytoms *Bacillus* spp. PL būdingas išreikštas pH stabilumas plačiame pH intervale (53, 166). Kaip minėta, dauguma *Bacillus* PL aktyviausios šarminėje aplinkoje (233), tačiau pastarųjų pektinazių makromolekulės išlieka stabilios veikiant neutraliu ar silpnai rūgštiniu pH (53). Pastaruosius apibendrinimus rPL47 demonstruotas stabilumas atitiko, kai fermentas analizuotas pašalinus 6HisIn, priešingu atveju, rPL47 išliko stabili siaurame pH intervale, atitinkančiame fermento pH optimumą. $_{HIS-SP}PL47$ demonstravo tolydų stabilumą pH 4-9. Pastaroji charakteristika taip pat būdinga natyviai $PL47_{Bsp.TS47}$ (162), tačiau nėra tipiška charakterizuotoms *Bacillus* pektato liazems (53, 233).

3.3.6. Metalų jonų ir reagentų įtaka PL47 aktyvumui

Metalų jonų įtakos $_{HIS+SP}PL47$ aktyvumui įvertinimo rezultatai pateikti 14 lentelėje. Vienvalenčių metalų K^+ , Na^+ ir Li^+ jonų 1 mM ir 50 mM koncentracija PL47 PGA skaidymo aktyvumo statistiškai reikšmingai nekeitė, o divalenčių metalų Ca^{2+} ir Mg^{2+} jonų 1 mM koncentracija reikšmingai didino PL47 aktyvumą, atitinkamai beveik 190 % ir ~11 %. Padidintos iki 10 mM Ca^{2+} koncentracijos poveikis tirtos PL aktyvumui buvo priešingas – nustatytas ~11 % fermento aktyvumo sumažėjimas.

Kiti metalų jonai, kurių įtaka PL47 PGA skaidymo aktyvumui buvo įvertinta, pasižymėjo slopinančiu poveikiu. 1 mM Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} ir Sn^{2+} koncentracija pektinazės aktyvumą slopino 20-35 %, o 1 mM Ba^{2+} bei Fe^{3+} koncentracija charakterizuotos liazės aktyvumą slopino apytiksliai dviem trečdaliais. rPL47 aktyvumą labiausiai slopino Zn^{2+} – esant 1 mM Zn^{2+} koncentracijai PL47 aktyvumas siekė tik ~11 % PGA skaidymo aktyvumo.

Pasirinktų metalų jonų įtaka rPL47 aktyvumui panaši nustatyta aprašant $PL47_{Bsp.TS47}$. Šių pektato liazių aktyvumą išreikštai slopino Ba^{2+} ir Zn^{2+} jonai, o Mn^{2+} bei Cu^{2+} turėjo mažesnę slopinantį efektą. Na^+ ir K^+ jonai nekeitė šių fermentų PGA skaidymo aktyvumo. Ni^{2+} bei Co^{2+} jonai, mažinę PL47 aktyvumą ~20 %, nekeitė natyvios $PL47_{Bsp.TS47}$ aktyvumo. Bioinformatinė analizė parodė, jog PL47 makromolekulė koordinuoja kalcio katijoną, ir tai patvirtino 1 mM Ca^{2+} koncentracija, beveik du kartus didinusi rPL47 PGA skaidymo aktyvumą. Iki 10 mM padidinta Ca^{2+} koncentracija, kaip būdinga nuo kalcio jonų priklausomoms PL (101), slopino fermento aktyvumą. Tipiniu atveju Ca^{2+} koncentracija, užtikrinanti maksimalų PL aktyvumą, svyruoja

tarp 0,4-1(2) mM (101, 118). Vertinant kalcio jonų įtaką PL aktyvumui visais atvejais stebima, jog šie katijonai liazių aktyvumą didina (236). Visgi skirtingų PL aktyvumą kalcio jonai veikia nevienodai. *B. tequilensis* SV11 pektato liazės aktyvumą 1 mM Ca²⁺ padidino ~15 % (107), kai 0,5 mM Ca²⁺ koncentracija *Paenibacillus* sp. 0602 PeIN pektato liazės aktyvumą padidino daugiau nei septynis kartus (236).

14 lentelė. Metalų jonų įtaka rekombinantinės PL47 PGA skaidymo aktyvumui

Metalo druska	Koncentracija	Santykinis aktyvumas, %
Kontrolė	-	100*
LiCl	1 mM	105,93 ± 0,14
NaCl		101,08 ± 0,35
	50 mM	99,66 ± 0,72
MgCl₂	1 mM	111,42 ± 0,90
KCl		99,61 ± 0,67
	50 mM	99,75 ± 1,29
CaCl₂	1 mM	287,67 ± 1,38
	10 mM	82,14 ± 2,55
MnCl₂	1 mM	76,02 ± 1,43
FeCl₃		32,88 ± 3,06
CoCl₂		87,50 ± 2,44
NiCl₂		80,78 ± 0,99
CuCl₂		64,09 ± 1,19
ZnCl₂		10,35 ± 1,63
SnCl₂		78,00 ± 3,42
BaCl₂		36,16 ± 1,81

*100 % savitasis fermentinis aktyvumas optimaliomis PL47 aktyvumui sąlygomis – 611,9 ± 0,012 U/mg.

Reduktorių, chaotropikų, detergentų bei tirpiklių įtakos HIS+SP-PL47 PGA skaidymo aktyvumui įvertinimo rezultatai pateikti 15 lentelėje. Reduktorių DTT, TCEP bei β-ME 1 mM koncentracija rPL47 aktyvumo nekeitė. 100 mM karbamido bei 1 mM guanidino-HCl ~10 % slopino PL47 aktyvumą. Visgi, taikius 4 M karbamido koncentraciją, rPL47 prarado daugiau nei 60 % aktyvumo. 0,1 ir 1 % (masė/tūris) NDS koncentracija tiriamą liažę visiškai inaktyvavo. Taikytos 0,1 ir 1 % (tūris/tūris) detergentų Triton X-100 ir Triton X-305 koncentracijos slopino PL47 aktyvumą. Tween detergentų 1 % (tūris/tūris) koncentracijos poveikis PL47 buvo gana panašus – slopinimo efektas siekė 20–30 %, o taikius 0,1 % (tūris/tūris) Tween detergentus, PL47 aktyvumas priklausė nuo Tween tipo: Tween 20 bei 40 aktyvino PL47 ~20 %, o Tween 60 bei 80 statistiškai reikšmingos įtakos PL47 aktyvumui neturėjo.

15 lentelė. Reagentų įtaka rekombinantinės PL47 PGA skaidymo aktyvumui

Reagentas	Koncentracija	Santykinis aktyvumas, %
Kontrolė	-	100*
Ditiotreitolis	1 mM	100,22 ± 1,02
Tris(2-karboksietil)fosfinas		99,76 ± 0,67
β-merkaptioetanolis		99,52 ± 2,11
Karbamidas	0,1 M	89,17 ± 1,30
	4 M	32,04 ± 4,25
Guanidino HCl	1 mM	90,83 ± 0,74
NDS	0,1 %	ND**
	1 %	
DMSO	0,1 %	106,52 ± 1,85
	1 %	114,37 ± 2,01
Metanolis		99,70 ± 0,37
	5 %	97,11 ± 0,84
Etanolis	1 %	100,25 ± 0,59
	5 %	93,58 ± 1,23
Etilenglikolis	0,1 %	99,09 ± 2,40
	1 %	101,43 ± 4,86
Glicerolis	0,1 %	105,66 ± 1,35
	1 %	103,74 ± 1,63
Triton X-100	0,1 %	92,53 ± 1,26
	1 %	87,12 ± 3,56
Triton X-305	0,1 %	65,78 ± 3,12
	1 %	48,64 ± 2,33
Tween 20	0,1 %	114,98 ± 4,34
	1 %	82,47 ± 3,59
Tween 40	0,1 %	120,88 ± 3,21
	1 %	73,73 ± 2,60
Tween 60	0,1 %	98,39 ± 2,86
	1 %	70,42 ± 2,19
Tween 80	0,1 %	96,87 ± 2,07
	1 %	69,50 ± 2,61
Brij 35	1 mM	97,49 ± 1,94
Brij 58		93,61 ± 2,73

*100 % savitasis fermentinis aktyvumas optimaliomis PL47 aktyvumui sąlygomis – 611,9 ± 0,012 U/mg; **ND – nedetektuotas PGA skaidymo aktyvumas.

1 mM Brij 35 ir Brij 58 koncentracija nežymiai slopino rPL47 aktyvumą. Net padidintos tirpiklių koncentracijos rPL47 aktyvumo beveik nekeitė. 0,1 % ir 1 % (tūris/tūris) DMSO koncentracijos tiriamą PL aktyvino atitinkamai ~5 % ir ~15 %. Glicerolio 0,1 % (tūris/tūris) koncentracija tiriamos liazės aktyvumą

didino beveik 5 %, o padidinta iki 1 % (tūris/tūris) glicerolio koncentracija PL47 PGA skaidymo aktyvumą didino vos 3 %.

Dažnai biotechnologiniuose procesuose taikomų reagentų įtaka aprašytu PL aktyvumui tirta fragmentiškai. *B. tequilensis* SV11 pektato liažę β -ME slopino (107). Pastarąją pektato liažę bei Pel168 (PelA) iš *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 visiškai inaktyvavo taikytos NDS koncentracijos (231). 0,5 % (tūris/tūris) Tween 80 koncentracija Pel168 aktyvumą didino ~7 %, o identiška DMSO koncentracija minėtos PL aktyvumą didino ketvirtadaliu (232). Statistiškai reikšmingos metanolio, etanolio bei izopropanolio įtakos *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 Pel168 (PelA) aktyvumui nenustatyta (231). Taikius 0,5 % (tūris/tūris) detergentų (Triton X-100 ir Tween 20) koncentracijos įtakos *Paenibacillus* sp. 0602 PelN pektato liažei nenustatyta (236). Tirtos PL47 biotechnologinio pritaikymo galimybes pažymi aukštas PL47 aktyvumas veikiant tirpikliais bei detergentais.

3.3.7. PL47 aktyvumas ir substratinis savitumas

rPL47 pektato liažė skaidė PGA, pektiną bei OI pektiną (16 lentelė), t.y. PS, kurių polimerinei sandarai būdingos α -1,4-glikozidinės jungtys. Tirtas fermentas optimaliomis aktyvumui sąlygomis (ir net fermentinę reakciją inkubuojant iki 960 min.) neskaidė karboksimetilceliuliozės, natrio alginato ar ksilano (nepateikti rezultatai). Pažymėtina, jog substratu naudojant OI pektino preparatą, nepaveiktą lakaze, PL47 aktyvumo nedemonstravo (nepateikti rezultatai). Optimaliomis fermentinės reakcijos sąlygomis $HIS+SP$ -PL47 efektyviausiai skaidė PGA, o šio fermento pektinolizinis aktyvumas substratais naudojant pektiną bei OI pektiną buvo reikšmingai mažesnis, atitinkamai ~35 % bei ~65 %. Tris kartus prailginus fermentinę reakciją (960 min.), optimaliomis sąlygomis $HIS+SP$ -PL47 demonstravo ~18 % didesnę PGA skaidymo intensyvumą. Reikšmingai prailginus fermentinių reakcijų inkubavimą $HIS+SP$ -PL47 taip pat demonstravo pektinolizinio aktyvumo padidėjimą substratais naudojant pektiną bei OI pektiną, atitinkamai ~17 % ir ~16 %, lyginant su fermento PGA skaidymu reakciją inkubavus 240 min. Nustatytas aukštas PL47 aktyvumas, prailginus fermentinę reakciją, netiesiogiai patvirtina, jog substratais naudoti PS reikšmingai didino PL47 termostabilumą.

Trombino katalizuojama proteolize pašalinus 6HisIn, įvertintas rPL47 substratinis savitumas ir aktyvumas (16 lentelė). $HIS-SP$ -PL47 demonstravo nežymiai didesnę aktyvumą visų substratų atžvilgiu. Optimaliomis sąlygomis, nepriklausomai nuo fermentinės reakcijos laiko, $HIS-SP$ -PL47 PGA, pektino ir OI pektino preparato skaidymo aktyvumas padidėjo 3-5 %. Taigi $HIS-SP$ -PL47 PGA skaidymo bei pektinolizinio aktyvumo skirtumas reikšmingai nepakito:

16 lentelė. Rekombinantinės PL47 substratinis savitumas

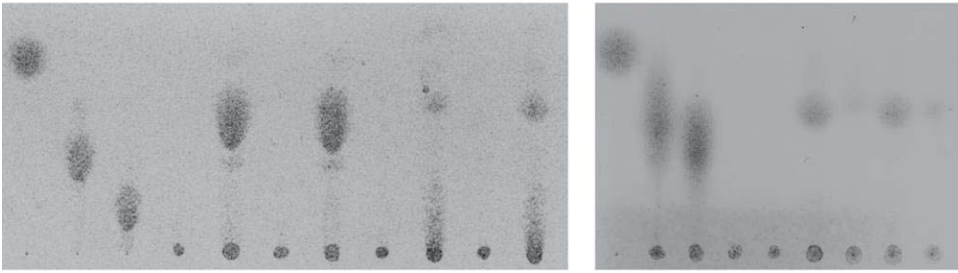
			Santykinis aktyvumas, %					
			PGA		pektinas		obuolių išspaudų pektino preparatas	
			240 min.	960 min.	240 min.	960 min.	240 min.	960 min.
PL47 ekspresuota <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	PL47 su histidino giminingumo inkaru	neimobilizuota PL47	100*	118	65,5	82	34,1	50,2
		PL47 imobilizuota ant Sepabeads EC-HA/M	61,6	76,4	ND**	10	30,6	38,8
		PL47 imobilizuota ant Sepabeads EC-EP/M	73,6	87,7	ND	18,4	33,2	40,7
		PL47 imobilizuota ant kalcio alginato	55,2	69,2	ND	6,2	16,9	28
	PL47 be histidino giminingumo inkaro	neimobilizuota PL47	103,7	122,1	68	87,7	40,6	43,1
	PL47 sekretuota <i>Pichia pastoris</i> SMD1163	neimobilizuota PL47	104	122,5	67,9	80,9	-***	-

*100 % savitasis fermentinis aktyvumas optimaliomis PL47 aktyvumui sąlygomis – $611,9 \pm 0,012\text{U/mg}$; **ND – nedetektuotas ir *** “–”, – nevertintas fermentinis aktyvumas.

HIS-SP-PL47 pektinolizinis aktyvumas, skaidant pektiną ir OI pektino preparatą, atitinkamai ~35 % bei ~57 %, mažesnis nei fermentui skaidant PGA. Sekretine produkcija iš *P. pastoris* SMD1163 gautos SP-PL47 substratinis savitumas identiškas HIS-SP-PL47 substratiniam savitumui, kaip ir abiejų fermentų PGA bei pektino skaidymo aktyvumai taip pat beveik identiški.

Plonasluoksne chromatografija išskirsčius PGA, pektino bei OI pektino preparato skaidymo PL47 reakcijų mišinius, įvertinti gauti OS (20 pav.). Taikius PGA liazės aktyvumui optimalias sąlygas, HIS+SP-PL47 minėtus substratus skaidė iki digalakturono rūgšties, tačiau susidarant ir trigalakturono rūgščiai bei ilgesniems ir skirtingo grandinės ilgio OS. HIS-SP-PL47 bei SP-PL47 , gautos sekretine produkcija iš *P. pastoris* SMD1163, PGA ir pektino skaidymo

G1 G2 G3 1 2 3 4 5 6 7 8 G1 9 10 11 12 13 14 15 16



20 pav. Rekombinantinės PL47 polisacharidų skaidymo produktų oligosacharidinės grandinės ilgio įvertinimas plonasluoksne chromatografija. Takeliai (užnešta 5 μ L mėginio): 1,3,11 – PGA*; 2 – PGA skaidymo neimobilizuota PL47 produktai; 4 – PGA skaidymo neimobilizuota PL47 produktai, fermentinei reakcijai taikius 3 μ g rekombinantinės PL47, pH 7, reakciją inkubavus 240 min., esant 30 $^{\circ}$ C; 9 – PGA skaidymo neimobilizuota PL47 produktai, fermentinei reakcijai taikius 3 μ g rekombinantinės PL47, pH 9, reakciją inkubavus 240 min., esant 50 $^{\circ}$ C; 10 – PGA skaidymo neimobilizuota PL47 produktai, fermentinei reakcijai taikius 3 μ g rekombinantinės PL47, pH 6, reakciją inkubavus 240 min., esant 50 $^{\circ}$ C; 5, 7 – pektinas; 6 – pektino skaidymo neimobilizuota PL47 produktai; 8 – pektino skaidymo neimobilizuota PL47 produktai, fermentinei reakcijai taikius 3 μ g rekombinantinės PL47, pH 9, reakciją inkubavus 240 min., esant 40 $^{\circ}$ C; 12 – obuolių išspaudų pektino preparatas; 13 – obuolių išspaudų pektino preparato skaidymo neimobilizuota PL47 produktai; 14 – obuolių išspaudų pektino preparato skaidymo ant kalčio alginato imobilizuota PL47 produktai; 15 – obuolių išspaudų pektino preparato skaidymo ant Sepabeads EC-EP/M imobilizuota PL47 produktai; 16 – obuolių išspaudų pektino preparato skaidymo ant Sepabeads EC-HA/M imobilizuota PL47 produktai. M – sacharidų mišinys (kiekvieno koncentracija 10 mg/mL): G1 – galakturono rūgštis, G2 – digalakturono rūgštis, G3 – trigalakturono rūgštis.

*kiekvieno substrato kontrolės koncentracija 10 mg/mL.

reakcijų produktų ilgio ir įvairovės nustatymo rezultatai identiški, gautiems charakterizuojant $_{HIS+SP}$ -PL47.

Vertinant PL47 biotechnologinio taikymo galimybes buvo atliktas pirminis pektato liazės aktyvumo moduliavimas, kuriuo siekta nustatyti, ar $_{HIS+SP}$ -PL47 neoptimaliomis fermentinės reakcijos sąlygomis geba skaidyti PGA, pektiną ar OI pektino preparatą iki ilgos grandinės OS. Sudarant neoptimalias PL47 pektinoliziniui aktyvumui sąlygas, kartu sumažinant fermento kiekį reakcijoje ir/ar reakciją inkubuojant trumpiau nei 240 min., gautų pektino OS įvairovė bei ilgis nesiskyrė nuo nustatytų OS, kuomet PL47 skaidė substratus optimaliomis sąlygomis (nepateikti rezultatai). Visgi neoptimaliomis sąlygomis $_{HIS+SP}$ -PL47 skaidė PGA iki ilgesnės nei trigalakturono rūgšties grandinės OS, kai naudotas sumažintas rPL47 kiekis (≤ 4 μ g), inkubuota 240 min., palaikant 40-60 $^{\circ}$ C ir pH 5-6 ar pH ≥ 8 . Visgi pažymėtina, jog rūgštinėje aplinkoje PL47 PGA skaidė į ilgesnius OS.

PL47 aktyvumo bei substratinio savitumo įvertinimo rezultatai patvirtino šio fermento *in silico* priskyrimą pektato liazėms. PL47 skaidė PGA α -1,4-glikozidines jungtis β -eliminacijos mechanizmu, suformuojant oligogalakturonidą, kurio neredukuojančio galo atžvilgiu susidaro 4,5-nesočioji

jungtis. PL47, veikdama kaip endopoligalakturonato transeliminazė, skaido PGA grandinę atsitiktinai α -1,4-glikozidinių jungčių atžvilgiu. Tirtos PL gebėjimą katalizuoti β -eliminacijos reakciją patvirtino galimybė detektuoti PGA OS vertinant sugerties padidėjimą bangos ilgiui esant 235 nm. Detektuoti ilgesni nei digalakturono rūgšties grandinės pektino OS patvirtino PL47 priskirtinumą endopoligalakturonato transeliminazėms. Tipiniu atveju egzo- bei endogalakturonato transeliminazių katalizuojamų PGA ar pektino skaidymo reakcijų galutinis produktas yra digalakturono rūgštis (56, 63), tačiau bakterijų egzo- bei endogalakturonato transeliminazės, skaidančios PGA ar pektiną iki trigalakturonato, irgi yra žinomos (118, 237). Tik viena a.r. nuo PL47 besiskirianti PL47_{Bsp.TS47} – taip pat endopoligalakturonato transeliminazė, substratus skaidanti iki digalakturono rūgšties (234).

Pektato liazių aktyvumas atvirkščiai proporcingas substrato metilinimo laipsniui (104, 236). Tipiškai pektato liazėms rPL47 efektyviausiai skaidė nemetilintą PGA, o pektiną bei OI pektino preparatą skaidė nevienodai intensyviai, tikėtina, dėl skirtingo minėtų substratų metilinimo laipsnio. PL neskaido pektino, jei jo metilinimo laipsnis ~90 %, o metilinimo laipsniui svyruojant tarp 30-50 %, nustatomas reikšmingai mažesnis, lyginant su PGA skaidymo, PL aktyvumas (63). Pektiną, kurio metilinimo laipsnis neviršija 20 %, bei PGA dažnai PL skaido vienodai intensyviai (236). PL47_{Bsp.TS47} būdingas neišreikštas protopektinazinis aktyvumas, užtikrinantis vandenyje tirpių pektino fragmentų susidarymą iš netirpaus pektino (162), tačiau tiriant PL47 aktyvumą protopektinazinio aktyvumo patvirtinti nepavyko, nes organinių tirpiklių pėdsakai, likę atskyrus OI pektino preparato protopektiną (netirpi frakcija) nuo tirpios pektino frakcijos, visiškai slopino PL47 aktyvumą. Minėtų frakcijų atskyrimo optimizavimas, siekiant sumažinti likusių tirpiklių koncentracijas, nebuvo sėkmingas (nepateikti rezultatai). Visgi PL47 protopektinazinis aktyvumas išlieka pagrįstai tikėtiniu. PL protopektinazinis aktyvumas nėra tipiškas, bet nustatytas tiriant *Bacillus* spp. pektato liazes (9, 251). PL47 aktyvumą taip pat išreikštai slopino augalinės kilmės polifenoliai – liazė skaidė tik lakaze veiktą OI pektino preparatą. Polifenolių šalinimas iš gamtinės žaliavos, siekiant pektinazių dėka iš pektino gauti OS, yra tipiška žaliavos ruošimo būtinybė (252).

6HisIn, kurio seka klonuojant papildyta rPL47 seka, nežymiai slopino liazės aktyvumą bei nekeitė substratinio savitumo. Trombino katalizuojama proteolize pašalinus 6HisIn, rPL47, tikėtina, gebėjo įgyti erdvinę struktūrą, artimą/identišką natyviai, nes _{HIS-SP}-PL47 aktyvumas buvo beveik identiškas PL47, gautos sekrecine produkcija iš *P. pastoris* SMD1163, aktyvumui. Heterologinei raiškai *P. pastoris* SMD1163 PL47 seka nebuvo papildyta

giminingumo inkarų sekomis. Nustatytas HIS-SP-PL47 bei PL47, gautos sekrecine produkcija iš *P. pastoris* SMD1163, aktyvumo bei substratinio savitumo tapatumas netiesiogiai patvirtino, jog rPL47 heterologinė raiška *E. coli* BL21(DE3) ar *P. pastoris* SMD1163 užtikrina rekombinantinio fermento tapatų erdvinį susilankstymą. PL47_{Bsp.TS47} klonuota nepapildant giminingumo inkarų sekomis ir heterologinė raiška vykdyta *Bacillus subtilis* MI112 (162, 172). rPL47_{Bsp.TS47} charakteristikos buvo identiškos nustatytoms charakterizuojant natyvų fermentą (163).

PL47 – nuo kalcio jonų priklausoma PL, tačiau fermentas demonstravo aktyvumą fermentinių reakcijų nepapildžius kalcio jonais. Visgi PL47 buvo beveik du kartus aktyvesnė naudojant 1 mM Ca^{2+} koncentraciją, taigi *in silico* patikimai nuspėta liazės sąveika su kalcio jonais patvirtinta. PL47 sąveikos su kalcio jonais svarba fermento kataliziniam aktyvumui taip pat netiesiogiai patvirtinta nustačius, jog aukšta Ca^{2+} koncentracija (10 mM) PL47 aktyvumą slopina. Kaip būdinga metalo fermentams (104), Mg^{2+} iš dalies gebėjo katalizinio tipo sąveikoje PL47 makromolekulėje pakeisti Ca^{2+} . Kalcio jonai dažniausiai reikšmingai didina PL aktyvumą. Visgi daugelis PL *in vitro* demonstruoja katalizinį aktyvumą fermentinių reakcijų nepapildžius Ca^{2+} tuo atveju, jei fermentas nebuvo veiktas EDTA ar kitais chelatoriais (101, 235, 252). Kaip jau minėta, natyvos PL47_{Bsp.TS47} aktyvumą Ca^{2+} reikšmingai didino, tačiau natyvi ar rekombinantinė PL47_{Bsp.TS47} demonstravo katalizinį aktyvumą fermentinių reakcijų nepapildant žemomis kalcio jonų koncentracijomis (162).

Pirminis rPL47 aktyvumo moduliavimo įvertinimas patvirtino prielaidą, jog tikslingai optimizavus fermentinės reakcijos sąlygas PL47 substratus gali skaidyti iki ilgos grandinės OS. Pastarieji rezultatai pažymi fermento biotechnologinio taikymo galimybes. PL47 yra endoliazė, todėl pradiniais fermentinės reakcijos etapais, kaip endogalakturonato transeliminazės (104), PGA ar pektiną skaido atsitiktinai iki skirtingo grandinės ilgio OS. Moduliuojant PL47 aktyvumą, tolesnis ilgos grandinės OS skaidymas iki digalakturono rūgšties iš dalies sėkmingai ribotas. Charakterizuotų pektato liazių aktyvumo moduliavimo galimybės anksčiau tikslingai nebuvo vertintos.

3.3.8. Imobilizavimo įtaka PL47 aktyvumui ir stabilumui

Siekiant charakterizuoti PL47 biotechnologinio taikymo galimybes, įvertinta imobilizavimo įtaka pektato liazės aktyvumui ir substratiniam savitumui bei termostabilumui. Anksčiau *Geobacillus* spp. pektato liazės nebuvo imobilizuotos.

Ant pasirinktų nešiklių imobilizuotos HIS+SP-PL47 aktyvumas bei substratinis savitumas pakito (16 lentelė). Imobilizuota PL47 neskaidė

pektino net fermentinę reakciją prailginus iki 960 min., o optimaliomis PL47 aktyvumui sąlygomis liazė PGA bei OI pektino preparatą skaidė įprastai, iki digalakturono rūgšties (20 pav.). PL47 imobilizavimas, nepriklausomai nuo nešiklio, reikšmingai mažino PL47 aktyvumą (16 lentelė). Lyginant su neimobilizuotos PL47 demonstruotu aktyvumu, inkubuojant 240 min., imobilizuotos PL47 PGA skaidymo aktyvumas sumažėjo 27-45 %, o inkubuojant 960 min. – 12-30 %. Imobilizuotos PL47 OI pektino preparato skaidymo intensyvumas po 240 min. inkubavimo sumažėjo 3-50 %, o po 960 min. – 1-30 %. Kartu pažymėtina, jog ant Sepabeads EC-HA/M imobilizuota rPL47, taikant 960 min. reakcijos inkubavimą, OI pektino preparatą skaidė beveik vienodai aktyviai kaip neimobilizuota PL47 (20 pav.). Sepabeads tipo nešikliai lyginant su kalcio alginatu palankesni rPL47 – imobilizuotas ant minėtų nešiklių fermentas išliko aktyvesnis. Lyginant Sepabeads EC-EP/M ir Sepabeads EC-HA/M, pastarasis nešiklis rPL47 imobilizavimui tiko labiau. Tai patvirtina imobilizuotos PL47 aktyvumo įvertinimas, nepriklausomai koks substratas ar fermentinės reakcijos inkubavimo laikas taikyti (16 lentelė).

Imobilizavimas $HIS+SP$ -PL47 termostabilumą didino, tačiau tai akivaizdžiai priklausė nuo naudoto nešiklio (17 pav.). PL47, imobilizuota ant Sepabeads EC-EP/M, 50-80 °C demonstravo 8-16 % didesnę termostabilumą nei $HIS-SP$ -PL47 ir net 40-50 % didesnę termostabilumą lyginant su $HIS+SP$ -PL47. Sepabeads EC-HA/M bei kalcio alginatą taikius $HIS+SP$ -PL47 imobilizavimui, pektato liazės termostabilumas ne mažiau trečdaliu mažesnis nei $HIS-SP$ -PL47. Visgi ant Sepabeads EC-HA/M ar kalcio alginato imobilizuota PL47 buvo nežymiai termostabilesnė lyginant su neimobilizuota PL47. Lyginant su neimobilizuotos PL47 termostabilumu galima teigti, jog tirtos liazės termostabilumas nežymiai didesnis imobilizuojant ant kalcio alginato nei ant Sepabeads EC-HA/M nešiklio. Imobilizavimas ant kalcio alginato $HIS+SP$ -PL47 termostabilumą 70 °C didino 31 %, lyginant su nustatytu minėta temperatūra 60 min. veikus neimobilizuotą $HIS+SP$ -PL47.

Charakterizuotos įvairių organizmų pektinazės sėkmingai imobilizuotos ant skirtingos prigimties nešiklių (253), bet visgi imobilizavimo įtaka PL išlieka mažai tirta (254, 255, 256). PL imobilizavimui naudotos modifikuotos geležies oksido dalelės (255) bei kalcio alginatas (256, 257). Sepabeads tipo nešikliai anksčiau PL imobilizavimui nebuvo naudoti. Pastarojo tipo nešikliai, nors ir mažino $HIS+SP$ -PL47 aktyvumą, buvo tinkamesni tirtos liazės imobilizavimui nei kalcio alginatas. Polisacharidų hidrolazės, imobilizuotos ant Sepabeads tipo nešiklių, tipiniu atveju išliko efektyviai aktyvios bei demonstravo padidėjusį termostabilumą (188, 258). PL47 išliko aktyvesnė imobilizuota ant Sepabeads EC-EP/M dėka sudarytų jungčių su nešiklio

oksirano (epoksi) grupėmis nei ant Sepabeads EC-HA/M su amino (heksametilenamino) grupėmis. Taigi HIS+SP-PL47 termostabilumui akivaizdi nešiklių jungčių įtaka. Reikšminga nešiklio bei imobilizavimo jungčių įtaka nustatyta tiriant pektinazes (253) bei pektato liazes (188, 258). Priešingai nei tikėtasi, stebint teigiamą Ca^{2+} įtaką PL aktyvumui (259), PL47 imobilizavimas ant kalcio alginato, liazei sudarant jungtis tarp amino grupių bei nešiklio karboksi grupių, nedidino fermento aktyvumo ir termostabilumo, nors dažnai ant kalcio alginato imobilizuotų PL aktyvumas ir termostabilumas padidėja (255, 256, 257). *Bacillus subtilis* AKPSYP pektato liazė, imobilizuota ant anglies pluošto kalcio alginatu dengtų mikrovamzdelių, 80 °C tapo 15 kartų termostabilesnė, o šios imobilizuotos liazės, aktyviausios 10 °C, aktyvumas padidėjo 5 % (256). Ant kalcio alginato dalelių imobilizuota *Bacillus megaterium* AK2 pektato liazė demonstravo reikšmingai padidėjusį aktyvumą bei tapo net 9 kartus stabilesnė 90 °C (257).

Imobilizuota ant Sepabeads EC-EP/M ar kalcio alginato rPL47 neprarado termostabilumo, o Sepabeads EC-HA/M nešiklis fermento stabilumą reikšmingai didino ir tai pažymi tirtos liazės imobilizavimo tikslingumą. Ant pasirinktų nešiklių sėkmingai imobilizuota rPL47 patvirtina galimą biotechnologinį fermento pritaikymą.

3.4. *Geobacillus* sp. PA-3 genomo nuskaitymas bei anotavimas

3.4.1. *Geobacillus* sp. PA-3 taksonominė padėtis ir genomo ypatybės

Geobacillus sp. PA-3 kamienas išskirtas iš dirvos mėginio PEK, kultivuojant aerobinėmis sąlygomis terpėje su 0,5 % (masė/tūryje) pektino, palaikant 60 °C (16). PA-3 izoliatas – aerobinė, termofilinė, gramteigiama bakterija, gebanti formuoti endosporas bei pasižyminti gebėjimu augti aktyviai įsisavinant pektiną. Pradinis izoliato genotipinis charakterizavimas atliktas naudojant BOX-PGR metodą (16), kuriuo, lyginant su likusiais 7 iš PEK mėginio išskirtais izoliatais, PA-3 izoliatas išskirtas į atskirą grupę. Izoliato priskyrimas rūšiai atliktas remiantis 16S rRNR genų filogenetine analize (16), kuria nustatytas PA-3 16S rRNR geno sekos 99,9 % identiškumas *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 16S rRNR geno sekai (DDBJ DQ243788.1). Taip pat PA-3 kamieno filogenetinis giminingumas minėtai rūšiai patvirtintas sudarant filogenetinį evoliucinį medį, lyginant *Geobacillus* genties rūšių tipinių kamienų ir PA-3 kamieno 16S rRNR genų sekas.

Geobacillus sp. PA-3 deponuotas Vilniaus universiteto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros Mikroorganizmų kolekcijoje (Vilnius, Lietuva) bei DSMZ kolekcijoje (Braunšveigas, Vokietija). PA-3 kamieno giminingumas

17 lentelė. *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 chromosomos charakteristikos

Ilgis, bp	3646477
G + C kiekis, %	48,86
Nuspėti ASR	3638
rRNR regionai	10
tRNR regionai	92

Geobacillus thermodenitrificans rūšiai patvirtintas deponavus kamieną DSMZ, kur PA-3 kamienui suteiktas identifikacinis numeris DSM 101594 (260).

G. thermodenitrificans DSM 101594 kamieno genomas nuskaitytas naudojant naujos

kartos sekoskaitą (BaseClear, Leidenas, Nyderlandai). Gauti 1317704 nuskaityti sekos fragmentai *in silico* apjungti į 183 nuoseklius sekos fragmentus, kurie tarpusavyje surinkti (191) sudarė *G. thermodenitrificans* DSM 101594 chromosomos 3646477 bp seką (17 lentelė) pasiekiant vidutinį 58,5 kartų sekos dengimą. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 chromosomos sekai būdingas G+C kiekis siekia 48,86 %. *Geobacillus* spp. chromosomų ilgis svyruoja tarp 3,5-3,9 Mbp, o G+C kiekis – tarp 45-55 % (3). Atliktas genomo anotavimas *in silico* leido nuspėti 3638 atviro skaitymo rėmelius (ASR), iš kurių 10 sudarė rRNR ir 92 tRNR regionai. *Geobacillus* spp. genomuose nuspėtų ASR skaičius svyruoja 3400-4000 (261, 262), o *Bacillus* spp. genomuose ASR skaičius dažniausiai viršija 4000 (134). *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome anotuotas rRNR bei tRNR regionų skaičius tipiškas *Geobacillus*, nes pastarosios genties kamienų genomuose rRNR bei tRNR atitinkamai koduoja 9-11 bei ~80-90 operonai (134, 140).

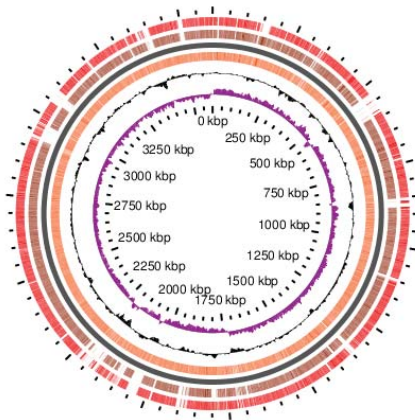
Gautų sekų analizė taip pat patvirtino, jog *G. thermodenitrificans* DSM 101594 būdinga ilgos grandinės sekos (50-55 kbp) plazmidė, kurios sekoje G+C kiekis siekia ~44 %. Visgi nustatytos plazmidės sekos dengimas buvo nepakankamas patikimam sekos surinkimui, todėl į *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genomo pirminę versiją plazmidės seka nebuvo įtraukta ar pateikta GenBank duomenų bazei. Ilgos grandinės plazmidės *Geobacillus* kamienuose sutinkamos neretai, bet dažniausiai būdinga viena ilgos grandinės plazmidė (263). *G. thermodenitrificans* DSM 101594 kamienui filogenetiškai artimiems kamienams būdingos ~45-55 kbp ilgio plazmidės, kurių sekose G+C kiekis svyruoja tarp 40-44 % (134, 140).

Nuskaityto genomo filogenetinė analizė patvirtino PA-3 kamieno pirminio taksonominio charakterizavimo rezultatus. *Geobacillus* sp. PA-3 priskirtinas *Geobacillus thermodenitrificans* rūšiai yra filogenetiškai artimiausias *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T bei *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (21 pav.). Lyginant chromosomų sekas, *G. thermodenitrificans* DSM 101594 priskirtinas 'thermodenitrificans' grupei (nepateikti rezultatai) – filogenetiškai homogeniškai *G. thermodenitrificans* kamienų, išskirtų iš

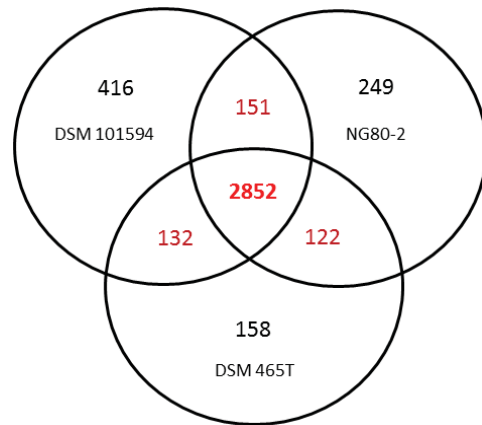
įvairių ekonišų (264), grupei, kuri artima 'kaustophilus' grupei (139).

G. thermodenitrificans DSM 101594, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T bei *G. thermodenitrificans* NG80-2 genomuose identifikuotų, tikėtina baltymus koduojančių genų skaičiaus bei įvairovės palyginimas parodė, jog *G. thermodenitrificans* DSM 101594 šerdiniam genomui galima priskirti 2432 genus. Tarpusavyje lygintų *G. thermodenitrificans* kamienų šerdinio genomo genai sutinkami 95 % tikimybe. *Geobacillus* kamienų (nepriklausomai nuo jų priskirtinumo rūšiai) šerdinio genomo genų skaičius artimas 1860 (13). Lyginant *G. thermodenitrificans* DSM 101594, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T bei *G. thermodenitrificans* NG80-2 genomus, nustatyti 2852 tapatūs genai, kurių skaičius patvirtina pastarųjų genomų artimą filogenetinį giminingumą (22 pav.). Ir *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome koduojami 416 genai nesutinkami minėtų kamienų genomuose. Lyginant skirtingų *Geobacillus* rūšių kamienų genų įvairovę, genų rinkiniai dažniausiai išsiskiria apie 600 genų (265). Lyginant *Geobacillus* ir *Bacillus* kamienų genų rinkinius, nustatomas nesutapimas siekia apie 800 genų (134).

G. thermodenitrificans DSM 101594, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T bei *G. thermodenitrificans* NG80-2 tikėtina baltymus koduojančių ASR palyginimas parodė, jog *G. thermodenitrificans* DSM 101594 koduojamų baltymų įvairovė (pagal skirtingas funkcinės svarbos grupes) panaši į kamienui giminingiausių

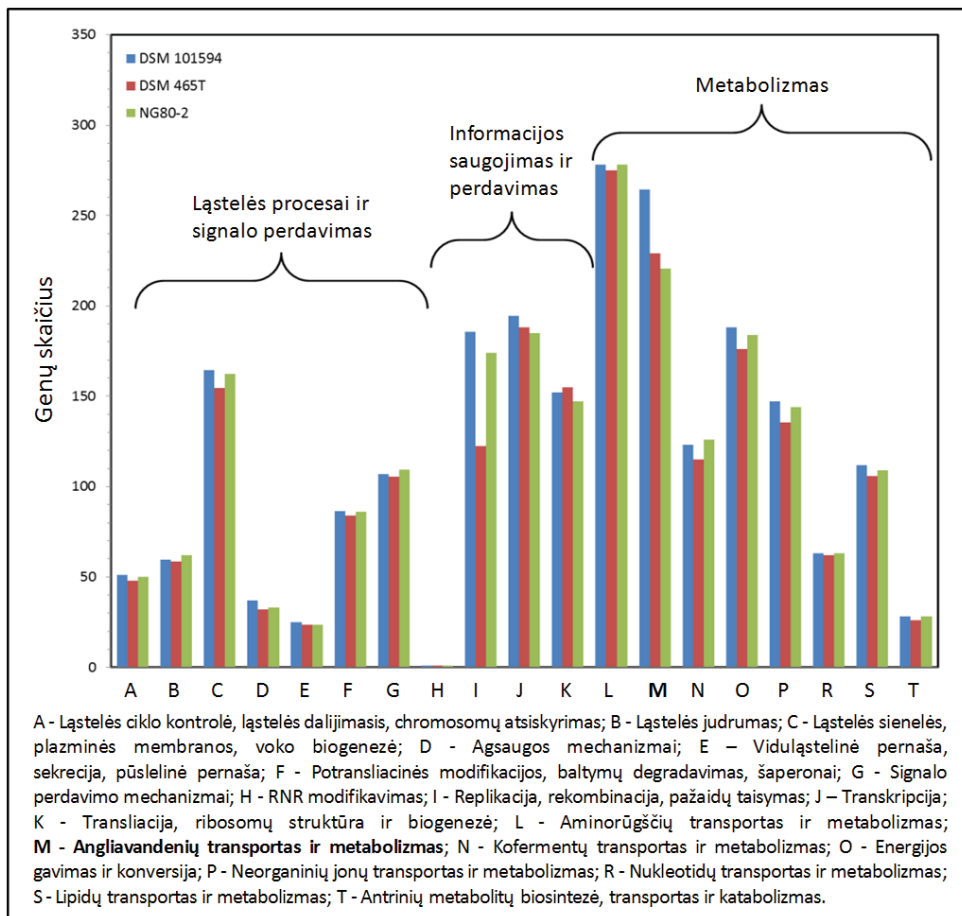


21 pav. *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 genomo (GenBank LIDX00000000.1) (genominiame atlase oranžinė spalva) schematinis palyginimas su *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T genomu (GenBank AYKT01000000) (ruda spalva) ir *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 genomu (GenBank CP000557) (raudona spalva) bei G+C kiekis (juoda spalva) ir G+C nuokrypis (violetinė spalva).



22 pav. *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T (Veno diagramoje – DSM 465T) genomo (GenBank AYKT01000000) ir *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (NG80-2) genomo (GenBank CP000557) sulyginimas su anototu *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 (DSM 101594) genomu (GenBank LIDX00000000.1). Veno diagramoje skaitine išraiška pateiktas sulygintuose genomuose sutampančių genų skaičius bei genų skaičius, kuriuo genomai skiriasi.

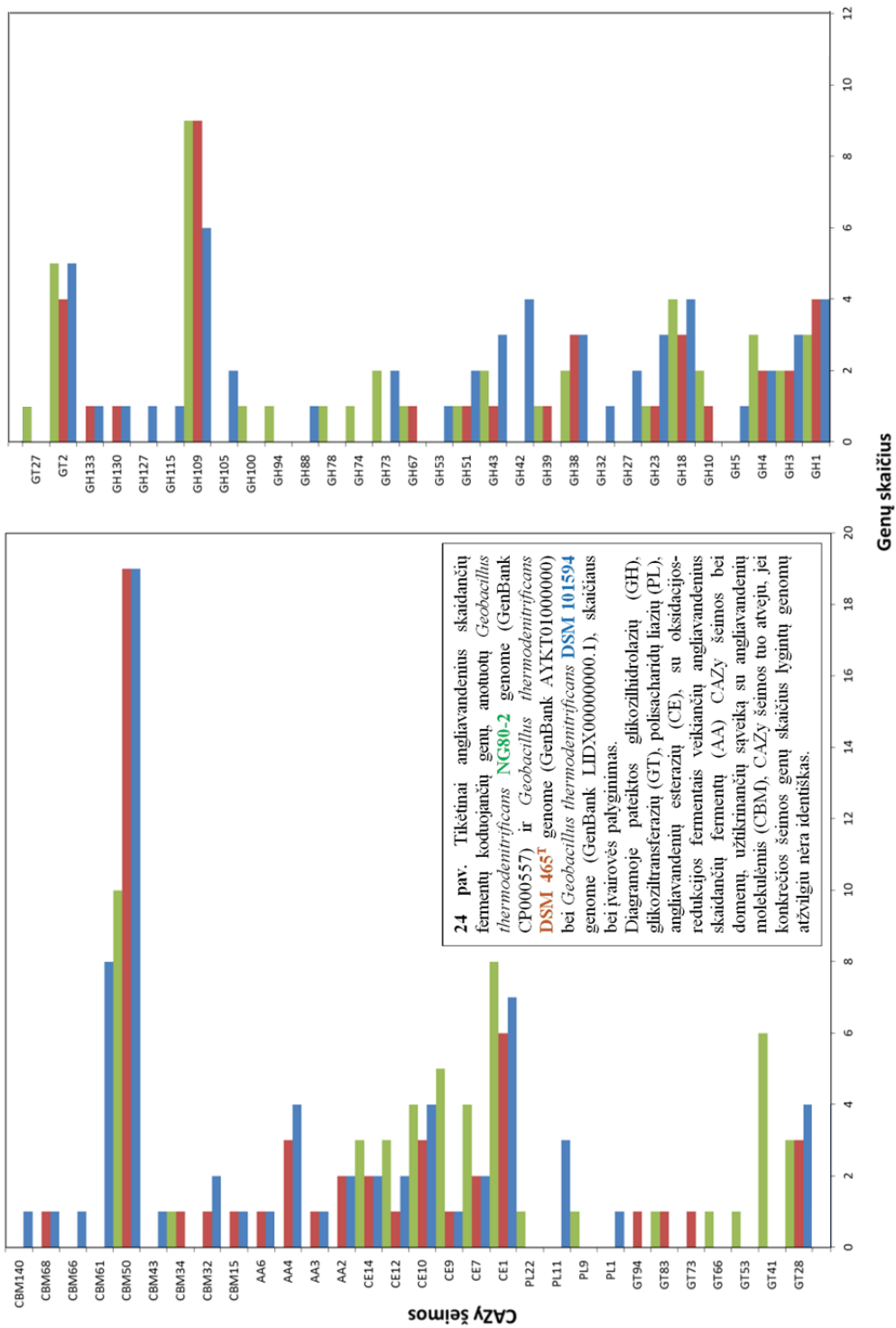
Geobacillus koduojamų baltymų įvairovę (23 pav.). Visgi *G. thermodenitrificans* DSM 101594 koduoja didesnę su angliavandenių transportu ir metabolizmu sietinų baltymų skaičių nei *G. thermodenitrificans* DSM 465^T ar NG80-2 kamienai, nors ASR skaičius, kurių koduojamų baltymų funkcinė svarba *in silico* negali būti nustatyta, tarp genomų reikšmingai nesiskiria. Angliavandenių transporto ir metabolizmo kategorijai priskirti *G. thermodenitrificans* DSM 101594 geno 265 ASR, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T – 229, *G. thermodenitrificans* NG80-2 – 221 (23 pav.). *Geobacillus* bakterijos išgyvena įvairiose ekonomišose išsivindamos skirtingus anglies ir/ar energijos šaltinius (14). Angliavandenių skaidymo atžvilgiu *Geobacillus* būdingas adaptacinis plastiškumas (3), todėl su angliavandenių išsavinimu sietinų



23 pav. Tikėtinai baltymus koduojančių genų ontologijos palyginimas tarp *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 (DSM 101594), *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T (DSM 465T) bei *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (NG80-2) kamienų. Palyginti tik genai, kurių koduojamų baltymų funkcinė svarba *in silico* galėjo būti patikimai nuspėta. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome iš 3561 nuspėtų genų 1294 koduojamų baltymų funkcinė svarba negali būti nuspėta, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T genome iš 3266 – 1169, tuo tarpu *G. thermodenitrificans* NG80-2 genome iš 3266 – 1257.

baltymų genų skaičius šios genties genomuose ženkliai varijuoja (13). Tik apie 100 su angliavandenių metabolizmu ir transportu sietinų baltymų genų priskiriama *Geobacillus* šerdinio genomo genų rinkiniui (13). Su angliavandenių įsisavinimu sietinų baltymų genų skaičius *G. thermodenitrificans* kamienų genomuose, ir *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome, sutinkamas didesnis nei tipiškai būdinga kitų rūšių *Geobacillus* kamienams (266, 267).

Remiantis CAZy duomenų baze, *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome *in silico* identifikuoti 150 angliavandenių katabolizmo fermentus koduojantys genai, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T genome – 128, *G. thermodenitrificans* NG80-2 – 134 genai. Minėtuose *Geobacillus* kamienų genomuose lyginant angliavandenių katabolizmo genų įvairovę, 14 CAZy šeimų atžvilgiu identifikuotas genų skaičius sutapo: GH2, GH36, GH52, GH120, GT5, GT8, GT19, GT26, GT35 identifikuotas 1 genas; GT51, CE3 – 3 genai; CE4 – 6 genai; GH13 – 7 genai; GT4 – 9 genai. Šiuose *Geobacillus* genomuose taip pat nustatyta po 2 genus, kurių sekoms būdingi CAZy CBM42 šeimos jungimosi su angliavandeniais domenai. Lyginant *G. thermodenitrificans* DSM 101594 angliavandenių katabolizmo fermentų įvairovę su *G. thermodenitrificans* DSM 465^T ir *G. thermodenitrificans* NG80-2, tiriamas kamienas išsiskiria GH27, GH42 šeimų fermentų gausa bei su pektino ir pektato įsisavinimu sietinų fermentų, priskirtinų PL1, PL11, GH88 bei GH105 šeimoms, gausa (24 pav.). GH27, GH42 šeimų fermentai, atitinkamai α ir β -galaktozidazės, atspindi išreikštą *G. thermodenitrificans* DSM 101594 kamieno polinkį efektyviai skaidyti OS ląstelės citoplazmoje, tačiau šių šeimų fermentų funkcijos su pektino įsisavinimu gali būti siejamos tik netiesiogiai (12, 268). Tuo tarpu kartu su PL1 šeimai priskirtinos PL47 pektato liazės genu (GenBank WP_060475609.1) *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome identifikuoti net 3 PL11 šeimos pektato liazių genai (GenBank WP_060475617.1, WP_060475621.1, LIXD01000041.1). Kaip minėta, *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome taip pat identifikuoti 2 genai (GenBank WP_060475632.1, WP_060475634.1), koduojantys GH105 šeimos nesočiųjų α -galakturonidų hidrolazės, bei GH88 šeimos nesočiųjų β -gliukuronidų hidrolazės genas (GenBank WP_060975610.1). Pektato OS skaidymui ląstelės citoplazmoje šie fermentai yra būtini (268). *G. thermodenitrificans* DSM 465^T (tipinio *G. thermodenitrificans* rūšies kamieno) genome sietini su pektino įsisavinimu genai nenustatyti, o *G. thermodenitrificans* NG80-2 koduoja PL9 šeimos pektato liazę (GenBank WP_008880226.1) bei PL22 šeimos oligogalakturonato liazę (GenBank WP_011887041.1), taigi, greičiausiai geba įsisavinti pektiną. *Geobacillus* PL9, PL11 bei PL22 šeimų pektato liazės nėra tirtos (12), aprašytos tik iš



mezofilinių *Bacillus* spp. (268, 269, 270), patvirtinant šių liazių gebėjimą ląstelės aplinkoje skaidyti pektiną iš įvairių gamtinių šaltinių (12, 268). *Geobacillus* koduojamos nesočiųjų pektato OS hidrolazės iš GH88 ir GH105 šeimų irgi nėra tirtos (12), o tiriant minėtas *Bacillus* hidrolazes, nustatytas šių fermentų substratinis savitumas bei ląstelės citoplazmoje vykdomas sinergistinis pektato OS skaidymas (168, 271). Lyginant *G. thermodenitrificans* DSM 101594 ir *G. thermodenitrificans* NG80-2 pektinolizinį potencialą, akivaizdu, jog pastarojo kamieno pektinolizinis potencialas nėra išreikštas – jo genome nustatytas tik vienas PL genas, o su pektino OS skaidymu, nenustačius nesočiuosius pektato OS skaidančių hidrolazių genų, galima sieti tik oligogalakturonato liazės funkcinę svarbą. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 koduojamų pektato liazių genai, taigi ir PL47 genas, nėra priskirtini kamieno šerdiniam genomui. Pažymėtina, jog *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome identifikuoti GH88 ir GH105 šeimos nesočiųjų pektato OS hidrolazių genai kamieno šerdiniam genomui taip pat nepriklauso. Pastarieji rezultatai netiesiogiai pažymi, jog *G. thermodenitrificans* DSM 101594 gebėjimas efektyviai įsisavinti pektiną yra evoliucijos metu įgyta kamieno prisitaikymo prie užimamos ekonišos strategija.

CAZy GH13 šeimos fermentus *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome koduoja 7 genai, tarp kurių identifikuotas ir AmyA1 homologo genas (GenBank WP_060476117.1). I tipo pululanazę, homologišką AmyA1 pululanazei, koduojantis genas priskirtinas *G. thermodenitrificans* DSM 101594 šerdiniam genomui, kuriame taip pat anotuotas II tipo pululanazės genas (GenBank LIDX01000042.1). I ir II tipo pululanazės pululaną skaido sinergistiškai (4). *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome identifikuoti pululanazių genai patikimai priskirti šerdiniam kamieno genomo genų rinkiniui, todėl pululano įsisavinimą galima laikyti viena esminių kamieno mitybinių strategijų.

Atliktas pirminis *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genomo palyginimas su filogenetiškai giminingiausiais *Geobacillus* kamienų genomais (21 pav.) taip pat leido numatyti tiriamo kamieno genomo regionus, tikėtinai patekusius dėka HGP, kurie vėliau buvo patvirtinti bioinformatine analize (18 lentelė). *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genomo sekoje *in silico* nustatyta šešiolika HGP regionų, kurių didžioji dalis identifikuoti ir *Geobacillus thermoleovorans* kamienų genomuose, sutampantys sekų ilgiu bei vieta genomo sekos atžvilgiu. Visgi *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genomo regionai – 522533...552245 bei 1873132...1931228, tikėtinai į kamieno genomą patekę dėka HGP, nėra būdingi *Geobacillus*, kurių genomų sekos nuskaitytos. Bioinformatinės analizės rezultatai rodo, jog *Geobacillus*

genomuose nustatomas sąlyginai didelis HGP būdu patekusių regionų skaičius ir pati HGP tarp šios genties kamienų yra labai dažna (13, 139). *Geobacillus* ir *Bacillus* genomų palyginimai taip pat patvirtino neretą genų pernašą tarp pastarųjų genčių (13). Manoma, jog HGP lėmė *Geobacillus* genties divergenciją nuo *Bacillus* genties bei skirtingų *Geobacillus* kamienų adaptacinių plastiškumą (13, 139). Visgi genų pernaša iš filogenetiškai tolimesnio giminingumo bakterijų į *Geobacillus* taip pat yra nustatyta (3, 13).

G. thermodenitrificans DSM 101594 geno regiono 1873132...1931228, tikėtinai patekusio dėka HGP, sekos ilgis viršija 58 kbp. Šioje sekoje *in silico* nustatyta 111 ASR (18 lentelė), kurių dauguma koduoja hipotetinius baltymus, nehomologiškus žinomų funkcijų baltymams. Tuo tarpu 522533...552245 regione, kurio ilgis beveik 30 kbp, taip pat tikėtinai patekusiame dėka HGP, dominuoja su angliavandenių katabolizmu bei transportu sietinus baltymus koduojantys ASR. Tarp 29 pastarojo regiono ASR (18 lentelė) sutinkami koduojantys PL1 šeimai priskirtiną PL47 pektato liažę ir PL11 šeimos pektato liazes bei GH88 ir GH105 šeimų hidrolazes koduojantys genai. *G. thermodenitrificans* NG80-2 fermentų, sietinų su pektino katabolizmu, genai nenustatyti HGP regionuose (140). Kaip jau minėta, *G. thermodenitrificans* DSM 101594 geno regionas 522533...552245, tikėtinai į kamieno genomą patekęs dėka HGP, anksčiau nebuvo identifikuotas *Geobacillus* genomuose, tačiau pastarojo geno regionui būdinga genų santalka taip pat nėra nustatyta kitų MO genomuose.

18 lentelė. Horizontalios genų pernašos dėka į *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 chromosomą tikėtinai patekę regionai

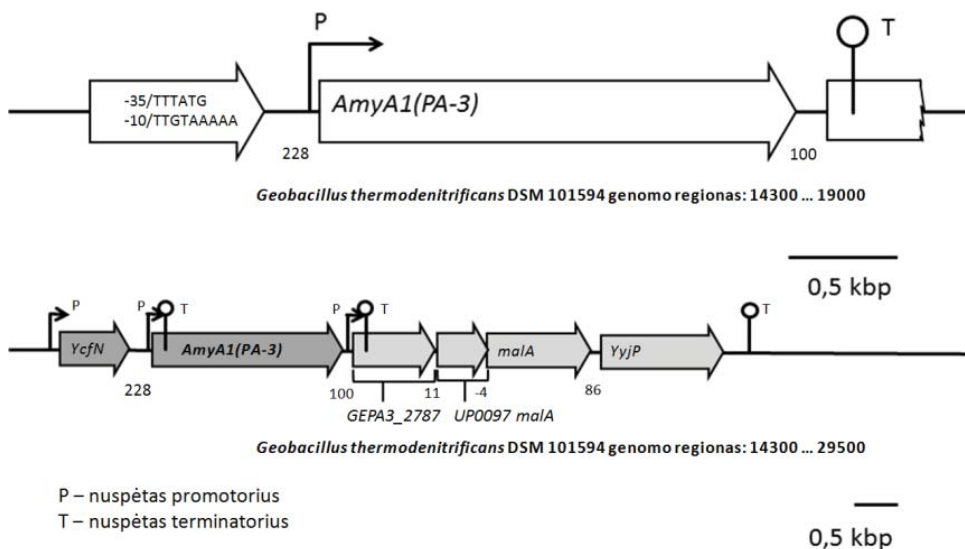
Genomo regionas	Regiono ilgis, bp	Nuspėti ASR
311868 ... 357575	45707	44
443278 ... 468838	25560	27
522533 ... 552245	29712	29
563067 ... 589091	26024	23
851461 ... 882605	31144	28
1665630 ... 1723734	58104	56
1873132 ... 1931228	58096	111
1984869 ... 1989342	4473	4
2026768 ... 2032902	6134	10
2027046 ... 2061862	34816	40
2164216 ... 2234506	70290	73
2922822 ... 2938266	15444	22
2949149 ... 2973018	23869	46
3066436 ... 3090775	24339	46
3292762 ... 3299215	6453	8
3362007 ... 3403999	41992	41

Visgi pavieniai aptarto regiono genų santalkoje nustatyti ASR anotuoti mezofilinių *Bacillus* kamienų genomuose (nepateikti rezultatai). Taigi tikėtina, jog *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genomo regionas 522533...552245 į kamieno genomą HGP būdu pateko iš *Bacillus* genties. *Geobacillus* koduojami angliavandenių metabolizmo genai nepriskirti šerdinio genomo genų rinkiniui ir dažnai *in silico* nustatomi regionuose, kurie tikėtinais pernešti HGP dėka (13, 139). Tai paaiškina išreikštą *Geobacillus* kamienų adaptyvumą aplinkos mitybiniais šaltiniais (13). Dažnai HGP į *Geobacillus* genomus patenka angliavandenių įsisavinimą užtikrinančių genų santalkos, talpinančios net kelias dešimtis genų (3, 264). Taip pat *in silico* nustatytos ir heteropolisacharidų skaidymo genų santalkos, patekusios į *Geobacillus* genomus (3). Daugelio HGP perneštų su angliavandenių katabolizmu sietinų genų santalkų organizacija nėra konservatyvi (264), tačiau *Geobacillus* kamienuose yra nustatytų ir konservatyvios organizacijos santalkų (3).

G. thermodenitrificans DSM 101594 genome identifikuotas AmyA1 homologišką I tipo pululanazę koduojantis genas ir genome sutinkamas II tipo pululanazės genas; abu koduojami genome ne HGP regionuose. Pastarasis rezultatas buvo tikėtinas atsižvelgus, jog *G. thermodenitrificans* DSM 101594 pululanazes koduojantys genai priskirtini kamieno šerdinio genomo genų rinkiniui.

3.4.2. AmyA1 homologo ir PL47 operoninė organizacija *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594

G. thermodenitrificans DSM 101594 genome anotuota, tirtai AmyA1 99,2 % homologiška I tipo pululanazė (GenBank KQB92233.1) (246), *in silico* nepriskirta operonui. Bioinformatinė analizė parodė, jog *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome AmyA1 homologo geno promotorius nuo fermento polipeptido pirmojo metioniną koduojančio kodono nutolęs 73 bp, o transkripcijos terminatorius už AmyA1 homologo geno sekos terminacinio kodono nutolęs ~150 bp (25 pav.). Taigi, pastarojo geno iRNR sintezė gali būti nuo ρ veiksnio nepriklausomu būdu terminuojama atsietai nuo supančių genų. Prieš AmyA1 homologo geną sutinkamas cholino kinazės ycfN (GenBank KQB92232.1) genas, taip pat nepriskirtas operonui. Už AmyA1 homologo geno anotuoti hipotetinio baltymo (GenBank KQB92234.1), UP0097 malA 3'-regiono baltymo (GenBank KQB92235.1), maltozės permeazės (GenBank KQB92236.1) bei dipeptidazės YyjP (GenBank KQB92237.1) genai sudaro operoną. AmyA1 homologų genus *G. thermodenitrificans* DSM 465 (262) ir *G. thermodenitrificans* NG80-2 (140) genomuose supa identiškai genai, kaip



25 pav. AmyA1 homologo (GenBank KQB92233.1) geno *AmyA1(PA-3)*, anotuoto *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 genome, transkripcijos valdymo elementų bei priskirtinumo operonui nustatymas *in silico*. Schemoje: *YcfN* – cholino kinazės *YcfN* genas (GenBank KQB92232.1), *GEPA_2787* – hipotetinio baltymo genas (GenBank KQB92234.1), *UP0097 malA* – malA 3'-regiono baltymo UP0097 genas (GenBank KQB92235.1), *malA* – maltozės permeazės genas (GenBank KQB92236.1), *YyjP*– dipeptidazės *YyjP* genas (GenBank KQB92237.1); genai, *in silico* nepriskirti operonams, pažymėti tamsiai pilkai, o *YcfN*, *GEPA_2787*, *UP0097 malA*, *malA* bei *YyjP* *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome sudarantys tikėtiną operoną pažymėti šviesiai pilkai.

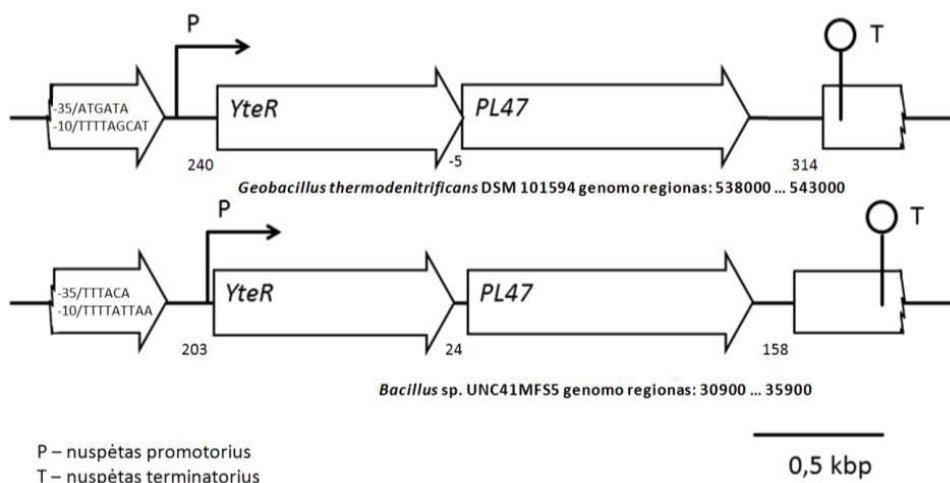
G. thermodenitrificans DSM 101594 genome (246), taip pat nepriskirti operonams, o juos supančių genų operoninė organizacija identiška nustatytai *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome. AmyA1 homologų, koduojamų *Geobacillus*, transkripcijos valdymas nėra tirtas. Vienintelė, biocheminiais metodais yra tirta, AmyA1 homologiška, *G. thermoleovorans* US105 PULUS105 I tipo pululanazė, tačiau jos geno raiškos valdymas netirtas (200), o kamieno genomas nenukaitytas. Anotuotose *Geobacillus* genomuose AmyA1 homologus koduojantys genai nėra nustatomi geno mo regionuose, kuriuose būtų susitelkę su angliavandenių transportu ir/ar metabolizmu sietinų baltymų genai (139, 262, 272). Kaip jau minėta, *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome, netoli AmyA1 homologo geno, sutinkama maltozės permeazė, svarbi maltozės transportui per plazminę membraną (273). Šis baltymas netiesiogiai gali būti sietinas su AmyA1 homologo funkicine reikšme *G. thermodenitrificans* DSM 101594 citoplazmoje – pululano hidrolize iki maltotriozės. Visgi šių baltymų genų transkripcija tiriamo kamieno genome valdoma nepriklausomai, kadangi pastarieji genai *in silico* nepriskirti vienam operonui, ir genus skiria hipotetinį baltymą ir malA 3'-regiono baltymą UP0097 koduojantys genai. I tipo pululanazių genų, homologišku AmyA1, priskyrimas maltozės regulonui yra patvirtintas *Streptococcus* bei *in silico* nuspėtas *Bacillus*

gentyje (274), tačiau atliktos bioinformatinės analizės rezultatų nepakanka AmyA1 geną priskirti minėtam regulonui.

Analizuojant PEK dirvos mėginio (iš kurio išskirtas *G. thermodenitrificans* DSM 101594 kamienas) sukaupiamosios kultūros ekstraląstelių baltymų frakcijos amilolizinį aktyvumą, AmyA1 homologo aktyvumas nebuvo detektuotas (4 lentelė). AmyA1 bei pululanazės homologai yra viduląsteliniai fermentai, nes šių fermentų genų sekose SP koduojančios sekos *in silico* nenuspėtos. Kadangi sukaupiamųjų kultūrų bakterijų viduląstelių baltymų frakcijos amilolizinis aktyvumas nebuvo vertintas, todėl *Geobacillus* AmyA1 homologai nedetektuoti, o natyvi AmyA1 sėkmingai aptikta A1 dirvos mėginio sukaupiamosios kultūros ekstraląstelių baltymų preparate dėka taikytomis sukaupiamosios kultūros kultivavimo sąlygomis vykusios *Geobacillus* ląstelių (auto)/lizės. Bakterijų pululanazių genų transkripciją dažnai indukuoja fermentų substrato molekulės (4), o aukšta gliukozės koncentracija ląstelėse slopina (275). Pululanazių genų transkripciją gali keisti ir metalų jonų koncentracijos pokyčiai (276). I tipo pululanazių operoninė organizacija skirtinguose bakterijų taksonuose įvairuoja, bet dažniausiai minėti genai kartu su polisacharidų transportui ir metabolizmui svarbių baltymų genais priskiriami operonams (4).

G. thermodenitrificans DSM 101594 genome anotavus (2015 m. vasario mėn.) tirtos PL47 geną, buvo patvirtinta, jog *Geobacillus* gentis taip pat gali koduoti PL, homologiškas mezofilinių *Bacillus* bakterijų PL (167, 277). Vėliau (2017 m.) PL47 homologą (GenBank OQP12861.1) koduojantis genas anotuotas *Geobacillus thermocatenulatus* SURF-114 genome (278). PL47 ir PL47 homologo iš minėto kamieno homologiškumas siekia 87,2 %. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 bei *G. thermocatenulatus* SURF-114 – vieninteliai *Geobacillus* kamienai, kuriuose nustatyti PL genai. Kaip jau minėta, PL47 seka beveik visiškai (99,8 %) identiška išsamiai aprašytai *Bacillus* sp. TS47 pektato liazei, o *Bacillus* genties genomuose anotuoti pektato liazių genai ~50-65 % identiški PL47 geno sekai.

PL47 genas, anotuotas *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome, *in silico* patikimai priskirtas *YteRPL47* operonui (26 pav.). Nuspėta operoną, kartu su PL47 genu, sudaro *YteR* nesočiųjų gliukuronidų hidrolazės (GenBank KQB94502.1) genas, kuris anotuotas prieš PL47 geną, genų sekoms persidengiant 5 bp. Promotorius nuspėtas tik 182 bp prieš *YteR* geną, o operono genų transkripcija gali būti nuo ρ veiksnio nepriklausomu būdu terminuojama ~400 bp už PL47 geno sekos. Nustačius *YteRPL47* operono struktūrą, akivaizdu, jog operono genų transkripcija negali būti valdoma atsietai. *YteR* nesočiųjų gliukuronidų hidrolazę mezofilinės *Bacillus* gentys



26 pav. *YteRPL47* operonų, *in silico* nustatytų *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 bei *Bacillus* sp. UNC41MFS5 genomuose, sandaros palyginimas. Schemoje: *YteR* – *YteR* nesočiųjų gliukuronidų hidrolazės genas *G. thermodenitrificans* DSM 101594 (GenBank KQB94502.1) bei *Bacillus* sp. UNC41MFS5 (GenBank WP_026565424.1), *PL47* – *PL47* pektato liazės genas *G. thermodenitrificans* DSM 101594 (GenBank KQB94501.1) bei *Bacillus* sp. UNC41MFS5 (GenBank WP_026565423.1).

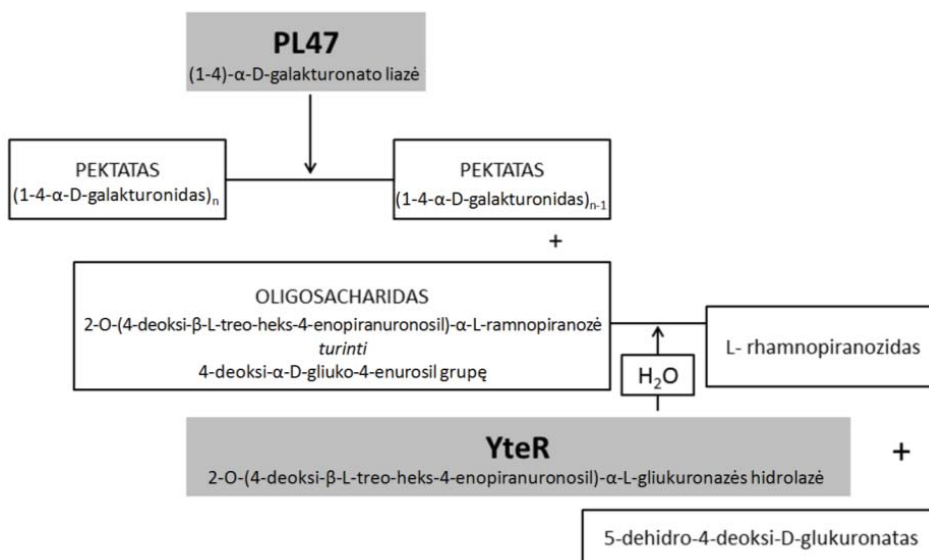
koduoja dažnai (148, 167), o *Geobacillus* gentyje *YteR* genas pirmą kartą nustatytas tik *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome. Taip pat *G. thermocatenulatus* SURF-114 genomo anotavimo rezultatai (278) rodo, jog pastarasis kamienas koduoja *YteR* nesočiųjų gliukuronidų hidrolazę (GenBank OQP12862.1). Palyginus *G. thermodenitrificans* DSM 101594 ir *G. thermocatenulatus* SURF-114 koduojamas *YteR*, nustatytas 92 % poli-peptidų sekų identiškumas. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 *YteR* sekos identiškumas *Bacillus* koduojamoms (278, 279, 280) nesočiųjų gliukuronidų hidrolazių sekoms svyruoja tarp ~45-65 %. Kadangi *Bacillus* sp. TS47 genomas nenuskaitytas, nėra galimybės patvirtinti/paneigti pagrįstai tikėtiną prielaidą, jog *Bacillus* sp. TS47 taip pat koduoja *YteR*. Taip pat lieka nenustatyta pastarojo kamieno produkuojamos pektato liazės operoninė organizacija.

YteRPL47 operonas leidžia *G. thermodenitrificans* DSM 101594 įsisavinti heteropolisacharidus. Operone koduojami esminiai pektato katabolizmo fermentai, kurie sudaro dviejų, tiesioginio eiliškumo pakopų katabolinę kaskadą (27 pav.). Sekretuojama *PL47*, veikdama kaip endopolipektato transeliminazė, bakterijų aplinkoje prieinamą stambiamolekulinį pektiną skaido iki skirtingo grandinės ilgio OS, kurie transportuoti į ląstelės citoplazmą įsisavinami veikiant *YteR* nesočiųjų gliukuronidų hidrolazei. Pasiūlytą katabolinės kaskados veikimo modelį netiesiogiai patvirtina *in silico* nuspėta *YteR* viduląstelinė lokalizacija – SP pastarojo fermento peptidinėje grandinėje nenuspėtas. Kaip tikėtasi, tiriamo kamieno genome anotuotoje *YteR* sekoje

¹⁴A---T³⁵⁹ identifiкуotas 88 glikozidų hidrolazių šeimos domenai (pfam07470 (175)), leidžiantis hidrolazę priskirti minėtai (CAZy GH88) hidrolazių šeimai (12). Pektato ar kitų heteropolisacharidų liazės yra substratui saviti fermentai (4), o nesočiųjų gliukuronidų hidrolazės – hidrolizuojamai jungčiai ir jos lokalizacijai OS grandinėje, tačiau GH88 hidrolazės nėra išreikštai savitos OS sekai (220, 269, 270). Taigi YteR svarba *G. thermodenitrificans* DSM 101594 mitybai negali būti sietina vien su pektato OS skaidymu – citoplazmoje fermentas tikėtinai užtikrina skirtingų PS liazių generuotų OS tolesnį įsisavinimą.

Mezofilinių *Bacillus* genties bakterijų PL47 ir YteR homologų genai dažnai priskirti vienam operonui (3, 139), kurio struktūra analogiška *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome nustatytam *YteRPL47* operonui (26 pav.). Visgi *Bacillus* genomuose taip pat nustatytas *PL47YteR* operonas, kuriame YteR homologo geno seka yra už PL47. Pastarasis sąlyginai retas PL47 ir YteR homologų genų operono variantas nustatytas *Bacillus novalis* NBRC 102450 genome (281).

G. thermodenitrificans DSM 101594 genome *YteRPL47* operonas nustatytas regione, kuris, kaip jau minėta, į kamieno genomą tikėtinai pateko horizontalios genų pernašos dėka bei kuriame stebimas su angliavandenių transportu ir/ar metabolizmu sietinų baltymų genų sąlyginis susitelkimas (nepateikti rezultatai).



27 pav. *Geobacillus* bei *Bacillus* genčių vykdomą pektato skaidymą užtikrinanti katabolinė kaskada, suformuota PL47 pektato liazės (CAZy PL1) bei YteR nesočiųjų gliukuronidų hidrolazės (CAZy GH88).

Bacillus genomuose *YteRPL47* arba *PL47YteR* operonai nustatyti analogiškuose genomų regionuose (3, 13, 139). Visgi *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genomo regione, kuriame nustatytas *YteRPL47* operonas, su angliavandenių transportu ir/ar metabolizmu sietinų baltymų genų susitelkimas labiau išreikštas (nepateikti rezultatai) lyginant su *Bacillus* genties regionais, kuriuose nustatyti *YteRPL47* arba *PL47YteR* operonai. Dažniausia bakterijų pektinazės nėra priskiriamos operonams (101, 236), net tuo atveju, jei bakterijos chromosomoje stebimas su pektino skaidymu sietinų baltymų genų regionas, pektinazių genų transkripcija valdoma atsietai (282).

Geobacillus ir *Bacillus* genomuose anotuotų PL47 bei YteR genų, taigi ir pastarųjų genų sudaromų operonų, transkripcija ar transkripcijos valdymas nėra tirti. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 geba konstitutyviai sekretuoti natyvią PL47 pektato liažę. Pastarasis rezultatas, kartu atsižvelgus į *YteRPL47* operono struktūrą (26 pav.), netiesiogiai patvirtina, jog *YteRPL47* operonas, taigi ir YteR hidrolazės genas, konstitutyviai transkribuojami. Nors skirtingų bakterijų pektinolizinių fermentų genų transkripciją valdo skirtingi aktyvatoriai bei represoriai (275), dažniausiai pektatą skaidančių fermentų genai transkribuojami induktyviai (275, 283). Heteropolisacharidų skaidymo produktai – dažniausi pektinolizinių fermentų genų transkripcijos induktoriai (275), o bakterijų pektinolizinių fermentų genų raiška slopinama dėka katabolinės represijos ar esant azoto trūkimui (275, 283).

4. APIBENDRINIMAS

Termoaktyvių bei termostabilių, amiloliziniu arba pektinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų atranka buvo sėkminga. Tinkamas trąšios dirvos ekonišų, kurioms būdinga nuolatinė heteropolisacharidų gausa, pasirinkimas leido detektuoti sąlyginai didelę krakmolą arba pektiną skaidžiusių fermentų įvairovę. Siekiant nustatyti fermentų, leidžiančių dirvožemio MO įsisavinti krakmolą bei pektiną, visumą, heteropolisacharidus skaidančių fermentų išskirimui taikyta dvejojama strategija. Kultivuojamų termofilinių MO produkuojami amilolizinio arba pektinolizinio substratinio savitumo fermentai išskirti iš sukaupiamųjų kultūrų supernatanto, o nekultivuojamų dirvos MO produkuoti minėtų substratinių savitumų fermentai tiesiogiai išskirti iš dirvos mėginių. Sukaupiamųjų kultūrų metodui nereikalingas dirvos ekonišų praturtinimas *in situ* krakmolu arba pektinu, tad šis metodas leido išskirti natūraliai, dėka efektyvaus PS įsisavinimo, dirvos ekonišose įsivyravusias MO bendrijas bei iš dirvos mėginių išskirti natūraliomis aplinkos sąlygomis MO išskirtus fermentus. Nors, kaip tikėtasi, natyvių amiloliziniu arba pektinoliziniu aktyvumu pasižymėjusių fermentų išskirti kiekiai nebuvo dideli, tačiau taikyta tiesioginės fermentų katalizinio aktyvumo detekcijos bei identifikavimo MS strategija buvo efektyvi. Optimizavus baltymų išskyrimo eigą, natyvių fermentų molekulės buvo apsaugotos nuo galimos denatūracijos ir/ar degradacijos, o taikytas zimografijos metodas optimizuotomis sąlygomis leido detektuoti netgi labai mažus išskirtų natyvių fermentų kiekius. Detektuotų fermentų polipeptidų identifikavimas MS tiesiogiai išskyrus natyvius fermentus iš zimogramų mėginių, leido patikimai aptikti netgi mažais kiekiais išskirtus fermentus. Detektuoti krakmolą arba pektiną skaidę fermentai MS buvo identifikuoti negryninti, vėlgi siekiant išvengti natyvių fermentų kiekio praradimo. Visgi objektyviais bioinformatiniais kriterijais pagrįstas detektuotų fermentų katalizinio aktyvumo *in silico* susiejimas su konkrečia polipeptido seka iš patikimai MS identifikuotų polipeptidų sekų rinkinio išliko priklausomas nuo identifikuotų polipeptidų homologijos nustatytų funkcijų baltymų sekoms.

Sukaupiamųjų kultūrų kultivavimą vykdžius sąlygomis, atkartojančiomis esmines gamtinės aplinkos, iš kurios buvo surinkti trąšios dirvos mėginiai, charakteristikas, iš sukaupiamųjų kultūrų sėkmingai atrinkti du fermentai, demonstravę amilolizinį bei trys – pektinolizinį aktyvumą. Fermentų, atrinktų iš sukaupiamųjų kultūrų, polipeptidai homologiški *Geobacillus* bei *Bacillus* genčių bakterijų tikėtinų fermentų arba necharakterizuotos funkcijos baltymų sekoms. Dirvos mėginių metaproteominė analizė leido sėkmingai

atrinkti fermentą, demonstravusį amilolizinį, bei tris fermentus, demonstravusius pektinolizinį aktyvumą. Iš dirvos mėginių atrinktų fermentų polipeptidai taip pat homologiški *Geobacillus* tikėtinų fermentų arba necharakterizuotos funkcijos baltymų sekoms. Taigi, skirtingai nei tikėtasi, nekultivuojamų dirvos bakterijų heteropolisacharidus skaidančių fermentų atrinkti nepavyko. Visgi iš dirvos taip pat atrinkti *Geobacillus* produkuojamiems baltymams homologiški fermentai, kurie nebuvo nustatyti sukaupiamųjų kultūrų supernatanto mėginiuose. Lyginant iš sukaupiamųjų kultūrų ir iš dirvos mėginių atrinktų heteropolisacharidus skaidančių fermentų įvairovę, nustatytas dalinis fermentų sutapimas, patvirtinantis taikytos fermentų atrankos strategijos efektyvumą bei objektyvumą.

Taikant pasirinktą heterologinės raiškos strategiją, keturių iš septynių atrinktų fermentų katalizinį aktyvumą pavyko patvirtinti *in vitro*, o fermentai, kurių aktyvumo patvirtinti nepavyko, *in vitro* agregavo. Būtinybė rekombinantinių baltymų agregatus veikti aukštomis karbamido koncentracijomis riboja galimybę objektyviai įvertinti rekombinantinių baltymų fermentinį aktyvumą, nes netgi pašalinus chaotropiką baltymai galėjo nebeįgyti erdvinės struktūros, artimos natyviai. Termoaktyvių bei termostabilių, amiloliziniu arba pektinoliziniu aktyvumu pasižymėjusių fermentų atrankos rezultatai leido pagrįsti dviejų krakmolą bei dviejų pektiną skaidžiusių fermentų charakterizavimo bei funkcinės svarbos nustatymo svarbą. Tirtos amilazė AmyA1 bei pektato liazė PL47 yra artimai (>80 % identiškumo) homologiškos charakterizuotiems fermentams, o aptikti amilolizinį aktyvumą demonstravęs hGK2898 baltymas bei pektiną skaidęs P12 baltymas charakterizuotų funkcijų baltymams nehomologiški.

AmyA1 bei PL47 savybės *in vitro* buvo išsamiai charakterizuotos. Tirtų heteropolisacharidus skaidančių fermentų charakterizavimas leido nustatyti rekombinantinių fermentų katalizinio aktyvumo moduliavimo galimybes bei pagrįsti fermentų biotechnologinį pritaikomumą. Sėkmingai klonavus AmyA1 bei PL47 genus, fermentų heterologinė raiška vykdyta *E. coli*. Taikyta rAmyA1 raiškos strategija sėkmingai leido raiškos kamieno citoplazmoje vidutiniška išėiga gauti tirpų rekombinantinį baltymą. Didelę rPL47 išėigą užtikrinusi taikyta raiškos strategija buvo sėkminga iš dalies, nes rekombinantinis fermentas raiškos kamieno citoplazmoje agregavo. Nors nedidele išėiga, tačiau tirpi rPL47 sėkmingai buvo gauta sekrecine produkcija, naudojant *P. pastoris* bei *K. lactis* kamienus. Ekspresuoti *E. coli* rAmyA1 bei rPL47 buvo išgryninti taikant optimizuotas gryninimo strategijas. rPL47, gauta dėka sekrecinės produkcijos pasitelkus mieliagrybius, negryninta, nes mieliagrybių kamienų pasirinkimas užtikrino

rekombinantinio fermento funkcinį grynumą, artimą visiškam homogeniškumui.

Produkuojama *Geobacillus*, tirta pululanazė AmyA1 – viduląstelinė termoaktyvi bei termostabili α -1,6-glikozidinių jungčių hidrolazė. AmyA1, atsižvelgus į charakterizuotą fermento katalizinį aktyvumą, priskirtina I tipo pululanazėms. Remiantis CAZy duomenų bazės klasifikacija, fermentas priskirtinas CAZy GH13 šeimos 14 pošeimiui. Charakterizuotos AmyA1 polipeptido seka reikšmingai (17 % identiškumo) skiriasi nuo polipeptido seka panašiausios charakterizuotos pululanazės. Charakterizuojant *in vitro* naują pululanazę, nustatytas savitas charakteristikų derinys. rAmyA1 termoaktyvumas nėra išreikštas, nes fermentas aktyviausias esant 60 °C. Tipiškai *Geobacillus* ir *Bacillus* pululanazėms, rAmyA1 buvo aktyviausia pH 6. rAmyA1, demonstravusi efektyvų aktyvumą (≥ 40 %) pH 5-9, esant 40-80 °C, išsiskiria iš termofilų I tipo pululanazių tarpo, nes termofilų pululanazės efektyviai aktyvios reikšmingai siauresniuose pH bei temperatūros intervaluose. Rekombinantinei pululanazei būdingas aktyvumo priklausomybės nuo pH poslinkis į silpnai šarminę pusę taip pat nebūdingas pululanazėms, kurių pH optimumas nustatytas esant rūgštiniam pH. rAmyA1 termostabilumas patvirtintas, tačiau nėra išreikštas. Tirta pululanazė demonstravo stabilumą sąlyginai siaurame pH 6-8 intervale. Metalų jonų įtaka rAmyA1 aktyvumui tipiška lyginant su nustatyta charakterizuojant pululanazes iš *Geobacillus* bei *Bacillus* genčių. Visgi nustatytas Mg^{2+} bei Mn^{2+} stimuliacinis efektas rAmyA1 aktyvumui nėra tipiška pululanazių charakteristika. Ca^{2+} , kaip tikėtasi, reikšmingai didino pululanazės aktyvumą, tačiau *in vitro* šis katijonas nebuvo būtinas rAmyA1 aktyvumo užtikrinimui. rAmyA1 išliko efektyviai aktyvi veikiant reduktoriais, detergentais, chaotropikais bei tirpikliams. Tiriant rAmyA1 aktyvumą bei substratinį savitumą, patvirtintas fermento pululanolizinis aktyvumas bei gebėjimas efektyviai skaidyti glikogeną ir tirpų krakmolą. rAmyA1 termostabilumą, kaip įprasta polisacharidų hidrolazėms, didino substratai.

Produkuojama *Geobacillus*, tirta pektato liazė PL47 – sekretuojama, termoaktyvi bei termostabili α -1,4-glikozidinių jungčių liazė, veikianti β eliminacijos mechanizmu. Veikiant PL47, oligogalakturnido neredukuojančio galo atžvilgiu susidaro 4,5-nesočioji jungtis. Tirta liazė efektyviai skaido substratus iki digalakturno rūgšties. PL47, atsižvelgus į charakterizuoto fermento katalizinį aktyvumą, priskirtina endopoligalakturnato transeliminazėms. Remiantis CAZy duomenų bazės klasifikacija, fermentas priskirtinas CAZy PL1 šeimos 6 pošeimiui. Tirtos PL47 polipeptido seka tik viena aminorūgštimi skiriasi nuo išsamiai aprašytos

Bacillus sp. TS-47 pektato liazės PL47_{Bsp.TS47} – tai atitinka 0,2 % minėtų pektato liazių polipeptidų sekų skirtumą. Visgi PL47 *in vitro* demonstravo iš dalies skirtingas charakteristikas nei būdingos natyviai ar rekombinantinei PL47_{Bsp.TS47}, taigi PL47 būdingas savitas charakteristikų derinys. rPL47 buvo aktyviausia esant 60 °C. Nustatytas fermento temperatūrinis optimumas patvirtino liazės termoaktyvumą bei atitiko daugumai charakterizuotų *Bacillus* pektato liazių būdingus temperatūrinius optimumus. Tiriant rPL47, nustatyta fermento aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros atitiko būdingą PL47_{Bsp.TS47}, tačiau PL47_{Bsp.TS47} aktyviausia buvo esant 70 °C. rPL47 demonstravo pH 7-8 optimumą, taigi PL47 ir PL47_{Bsp.TS47} pH optimumai sutampa. *Bacillus* PL dažniausiai aktyvesnės labiau šarminėje aplinkoje, o rPL47 demonstravo efektyvų aktyvumą (≥40 %) pH 7-8, esant 30-70 °C. PL47_{Bsp.TS47} efektyviai aktyvi identiško pH intervalo atžvilgiu, tačiau esant 40-60 °C. rPL47 demonstravo efektyvų aktyvumą, būdingą *Bacillus* pektato liazėms, siaurame pH intervale, tačiau rPL47 efektyviai aktyvi buvo viename plačiausių temperatūros intervalų, kada nors nustatytų charakterizuojant pektato liazes. rPL47 termostabilumas patvirtintas 60-90 °C sąlygomis, o PL47_{Bsp.TS47} termostabili 40-60 °C. Taigi PL47 termostabilumas labiau išreikštas. Tirta PL47 – viena termostabiliausių PL iš nuosaikių termofilų. Skirtingai nei būdinga *Bacillus* pektato liazėms, rPL47 išliko stabili plačiame pH 4-9 intervale, kaip ir PL47_{Bsp.TS47}. Visgi, rPL47 nežymiai mažiau stabili šarminėje aplinkoje nei PL47_{Bsp.TS47}. Metalų jonų įtaka rPL47 bei PL47_{Bsp.TS47} aktyvumui beveik identiška. Kalcio jonas *in vitro* nebuvo būtinas efektyviam rPL47 ar PL47_{Bsp.TS47} aktyvumui, tačiau naudojant žemas Ca²⁺ koncentracijas pastarųjų PL aktyvumas reikšmingai didėjo. Metalų jonai bakterijų PL aktyvumą veikia skirtingai, tačiau išreikštas Ca²⁺ stimuliacinis efektas dažnai nustatomas charakterizuojant bakterijų PL. Mg²⁺, reikšmingai didinęs rPL47 aktyvumą, PL47_{Bsp.TS47} neturėjo įtakos. Ni²⁺ bei Co²⁺ jonai, taip pat nekeitę PL47_{Bsp.TS47} aktyvumo, reikšmingai slopino rPL47. rPL47 išliko efektyviai aktyvi veikiant reduktoriais bei tirpikliais. Tirtos liazės aktyvumą chaotropikai bei detergentai slopino mažiau nei daugelį kitų pektato liazių. Tiriant rPL47 aktyvumą bei substratinį savitumą, patvirtintas fermento pektinolinis aktyvumas bei gebėjimas efektyviai skaidyti OI pektiną. Tipiškai bakterijų pektato liazėms, PL47 pektinolinis aktyvumas mažėjo didėjant pektino metilinimo laipsniui. rPL47 *in vitro* demonstravo aktyvumą bei substratinį savitumą identišką nustatytam charakterizuojant natyvią ar rekombinantinę PL47_{Bsp.TS47}. Tirtos liazės termostabilumą, kaip įprasta polisacharidų liazėms, didino substratai.

Nustatyti rAmyA1 bei rPL47 – heteropolisacharidus skaidančių fermentų – charakteristikų deriniai palankūs charakterizuotų fermentų biotechnologiniam taikymui. Tai patvirtino jau pirminis fermentų aktyvumo moduliavimo įvertinimas. rAmyA1 aktyviai hidrolizavo pululaną iki maltotriozės, bet esant fermento aktyvumui neoptimalioms sąlygoms – iki ilgos grandinės oligosacharidų. rPL47 skaidė PGA iki digalakturono rūgšties, o neoptimaliomis fermento aktyvumui sąlygomis – iki ilgesnės nei trigalakturono rūgšties grandinės oligosacharidų. Ilgos grandinės oligosacharidai plačiai taikomi biotechnologijoje, todėl fermentų, galinčių užtikrinti šių oligosacharidų gavimą iš sąlyginai pigios žaliavos ((hetero)polisacharidų), biotechnologinio pritaikomumo potencialas nekelia abejonių. Siekiant visapusiškai įvertinti rAmyA1 bei rPL47 pritaikomumą, analizuota imobilizavimo įtaka minėtų fermentų aktyvumui bei termostabilumui. Kovalentinė rAmyA1 imobilizacija ant Sepabeads nešiklių reikšmingai didino hidrolazės pululanolizinį aktyvumą bei termostabilumą. Imobilizuota rPL47 demonstravo sumažėjusį aktyvumą bei iš dalies prarado gebėjimą skaidyti pektiną, tačiau kovalentiškai imobilizuota pektato liazė išliko efektyviai aktyvi ir termostabilė. Apibendrinant galima teigti, jog rAmyA1 bei rPL47 imobilizavimas yra galimas ir tikslingas. Šie rezultatai vėlgi patvirtina charakterizuotų fermentų biotechnologinio pritaikomumo galimybes.

Atrinkti AmyA1 bei PL47 – *Geobacillus* koduojami fermentai, todėl analizuojant jų funkcinę svarbą atliktas potencialaus kamieno producento genomo charakterizavimas. Iš dirvos išskirtas kamienas PA-3, nustačius jo gebėjimą augti įsisavinant pektiną bei konstitutyviai sekretuoti pektato liazę PL47, atlikus taksonominį charakterizavimą patikimai priskirtas *Geobacillus thermodenitrificans* rūšiai. Atlikus nuskaityto *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genomo analizę, nustatytos bendrosios kamieno genomo charakteristikos atitiko tipiškai būdingas *Geobacillus* bei nustatytas anotavus *G. thermodenitrificans* rūšies kamienus.

G. thermodenitrificans DSM 101594 genome anotuota ~3600 ASR, iš kurių ~400 ASR nenustatyti filogenetiškai artimiausių *G. thermodenitrificans* rūšies kamienų genomuose. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genų ontologijos analizės rezultatai leidžia teigti, jog lyginant su filogenetiškai artimais kamienais *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genomas išsiskiria genų, sietinų su angliavandenių transportu ir metabolizmu, gausa. Detali pastarosios kategorijos genų analizė leido patikimai su angliavandenių katabolizmu susieti 150 genų. Filogenetiškai artimi kamienai su angliavandenių katabolizmu sietinų genų koduoja mažiau nei *G. thermodenitrificans* DSM 101594, kuris išsiskiria CAZy GH27 bei GH42 šeimų oligogalakturonidų

hidrolazių gausa bei koduoja pektato/pektino įsisavinimą užtikrinančius fermentus. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 įsisavina pektiną kamieno genome koduojamoms liažėms veikiant kartu su oligosacharidų hidrolazėmis katabolinėje kaskadoje. Kamienas koduoja pektato liažę PL47, priskiriamą CAZy PL1 šeimai, bei tris ramnogalakturono endoliazes, priskiriamas CAZy PL11 šeimai. Pektino oligosacharidus *G. thermodenitrificans* DSM 101594 citoplazmoje toliau skaido dvi CAZy GH 105 šeimos α -galakturonidų hidrolazės bei YteR β -gliukuronidų hidrolazė, priskiriama CAZy GH 88 šeimai. Tiesiogiai su pektino katabolizmu sietini *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genai *in silico* nepriskirti kamieno šerdinio genomo genų rinkiniui bei anotuoti genomo regione, kuris tikėtinai į genomą pateko dėka HGP. *Geobacillus* genomams būdinga sąlyginė genomo regionų, patekusių HGP dėka, gausa. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome identifikuota 16 HGP regionų, iš kurių du regionai *Geobacillus* genomuose anksčiau nebuvo identifikuoti. Viename minėtų regionų (522533...552245) anotuota su pektino katabolizmu sietinų genų santalka. Analogiškos sandaros santalkos nenustatytos anoduojant mikroorganizmų genomus, tačiau atskiri identifikuotai santalkai būdingi sandaros elementai būdingi mezofilinių *Bacillus* genomams. Pagrįstai tikėtina, jog į *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genomą su pektino katabolizmu sietinų fermentų genų santalka HGP pateko iš *Bacillus* genomų. Santalkoje anotuotas PL47 genas kartu su YteR β -gliukuronidų hidrolazės genu sudaro *YteRPL47* operoną. *Bacillus* genomuose dažnas *YteRPL47* operonas retai sutinkamas *Geobacillus* genomuose. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 konstitutyviai sekretuoja PL47, todėl *YteRPL47* operono konstitutyvi transkripcija pagrįstai tikėtina.

AmyA1 homologo genas anotuotas *G. thermodenitrificans* DSM 101594 kamieno šerdinio genomo genų rinkinyje, tačiau ne su angliavandenių katabolizmu sietinų fermentų genų santalkoje. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 koduojamas AmyA1 homologo genas taip pat nepriskirtas operonui. II tipo pululanazė/neopululanazė *G. thermodenitrificans* DSM 101594 taip pat šerdinio genomo genų rinkinyje koduoja II tipo pululanazę, kuri tikėtinai ląstelės citoplazmoje veikia sinergistiškai su AmyA1 ir bakterijai užtikrina efektyvų pululano ir/ar krakmolo įsisavinimą.

G. thermodenitrificans DSM 101594 genomo anotavimas, leidęs kamieno genome identifikuoti AmyA1 homologo geną bei patvirtinti kamieno gebėjimą koduoti pektato liažę PL47, kartu užtikrino galimybę *in silico* charakterizuoti pastarųjų fermentų operoninę organizaciją bei apibrėžti AmyA1 ir PL47 funkcinę svarbą. Anotuoto *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genų rinkinio sudėtis patvirtino išreikštą nuosaikaus termofilo

adaptyvumą mitybai įsisavinti angliavandenius. Ši kamieno savybė užtikrinama fermentų, į kamieno genomą patekusių HGP. AmyA1 homologo funkcinė svarba gali būti siejama su viena esmine tirtu kamieno mitybos strategija – induktyviu pululano ir/ar krakmolo įsisavinimu. Tuo tarpu PL47 funkcinė svarba sietina su *G. thermodenitrificans* DSM 101594 konstitutyviai užtikrinamu gebėjimu įsisavinti pektiną – kamieno evoliucijos metu fiksuota prisitaikymo prie užimamos ekonišos strategija.

IŠVADOS

1. Dirvos mikroorganizmų produkuotų amilazių ir pektinazių nustatymo efektyvumą bei patikimumą užtikrina zimografija detektuotų fermentų tiesioginis identifikavimas iš zimogramų mėginių masių spektrometrija.
2. Dirvos mikroorganizmų sukaupiamųjų kultūrų ir/ar dirvos metaproteominiuose mėginiuose nustatytos *Geobacillus* spp. produkuotos amilazės AmyA1 ir hGK2898 bei pektinazės PL47 ir P12.
3. Viduląstelinė AmyA1 – termoaktyvi bei termostabili monomerinė I tipo pululanazė stabilizuojama kalcio jonų.
4. AmyA1 skaidė glikogeną ir krakmolą bei aktyvumui neoptimaliomis sąlygomis pululaną iki ilgos grandinės oligosacharidų. Imobilizavimas didino AmyA1 pululanolizinį aktyvumą bei termostabilumą.
5. Konstitutyviai sekretuojama PL47 – termoaktyvi bei termostabili monomerinė endopoligalakturonato transeliminazė, stabilizuojama kalcio jonų.
6. PL47 skaidė pektiną bei aktyvumui neoptimaliomis sąlygomis PGA iki ilgos grandinės oligosacharidų. Imobilizavimas mažino PL47 aktyvumą, tuo tarpu didino termostabilumą.
7. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome anotuota genų, koduojančių fermentus, sietinus su pektino bei oligosacharidų skaidymu, santalka į kamieno genomą pateko dėka horizontalios genų pernašos.
8. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 koduojamo AmyA1 homologo geno transkripcija valdoma nepriklausomai, tuo tarpu PL47 genas su YteR β -gliukuronidų hidrolazės genu sudaro *YteRPL47* operoną. AmyA1 homologas ir PL47 funkcionuodami katabolinėse kaskadose svarbūs heteropolisacharidų įsisavinimui.

BENDRADARBIAVIMAS



IBPT

Institut für Bioverfahrenstechnik
und Pharmazeutische Technologie

prof. dr.-ing. Peter Czermak

Bioprocėsų inžinerijos ir farmacinių
technologijų institutas,
Vidurinėsios Heseno žemės
Taikomųjų mokslų universitetas
(Gysenas, Vokietija)



prof. dr. Alexander Goesmann

Bioinformatikos ir Sistemų biologijos grupė
Justus-Liebig universitetas
(Gysenas, Vokietija)

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Karaki N, Aljawish A, Humeau C, Muniglia L, Jasniewski J. 2016. Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, properties, and potential applications: A review. *Enzyme Microb Technol* 90:1-18.
2. Ruijssenaars HJ, Hartmans S. 2001. Plate screening methods for the detection of polysaccharase-producing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:143-149.
3. Brumm PJ, De Maayer P, Mead DA, Cowan DA. 2015 Genomic analysis of six new *Geobacillus* strains reveals highly conserved carbohydrate degradation architectures and strategies. *Front Microbiol* 6:430.
4. Doman-Pytka M, Bardowski J. 2004. Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Crit Rev Microbiol* 30:107-121.
5. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Shevchik VE. 2014. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environ Microbiol Rep* 6:427-440.
6. Berlemont R, Martiny AC. 2015. Genomic potential for polysaccharide deconstruction in bacteria. *Appl Environ Microbiol* 81:1513-1519.
7. Ufarte L, Potocki-Veronese G, Laville E. 2015. Discovery of new protein families and functions: new challenges in functional metagenomics for biotechnologies and microbial ecology. *Front Microbiol* 6:563.
8. Singh A, Kaur A, Dua A, Mahajan R. 2015. An efficient and improved methodology for the screening of industrially valuable xylano-pectino-cellulolytic microbes. *Enzyme Res* 2015:725281.
9. Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ. 1993. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Adv Appl Microbiol* 39:213-294.
10. Fer M, Prechoux A, Leroy A, Sassi JF, Lahaye M, Boisset C, Nyvall-Collen P, Helbert W. 2012. Medium-throughput profiling method for screening polysaccharide-degrading enzymes in complex bacterial extracts. *J Microbiol Methods* 89:222-229.
11. Ghazala I, Haddar A, Ben Romdhane M, Ellouz-Chaanouni S. 2016. Screening and molecular identification of new microbial strains for production of enzymes of biotechnological interest. *Braz Arch Biol Technol* 59:e16150152.
12. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42:D490-D495.
13. Bezuidt OK, Pierneef R, Gomri AM, Adesioye F, Makhalanyane TP, Kharroub K, Cowan DA. 2016. The *Geobacillus* pan-genome: Implications for the evolution of the genus. *Front Microbiol* 7:723.
14. Zeigler DR. 2014. The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology* 160:1-11.
15. Benndorf D, Balcke GU, Harms H, von Bergen M. 2007. Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *ISME J* 1:224-234.
16. Geib SM, Tien M, Hoover K. 2010. Identification of proteins involved in lignocellulose degradation using in gel zymogram analysis combined with mass spectroscopy-based peptide analysis of gut proteins from larval Asian longhorned beetles, *Anoplophora glabripennis*. *Insect Sci* 17:253-264.

17. Peterson R, Grinyer J, Joss J, Khan A, Nevalainen H. 2009. Fungal proteins with mannanase activity identified directly from a Congo Red stained zymogram by mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 79:374-377.
18. Badel S, Laroche C, Gardarin C, Petit E, Bernardi T, Michaud P. 2011. A new method to screen polysaccharide cleavage enzymes. *Enzyme Microb Technol* 48:248-252.
19. Hanreich A, Schimpf U, Zakrzewski M, Schlüter A, Benndorf D, Heyer R, Rapp E, Pühler A, Reichl U, Klocke M. 2013. Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. *Syst Appl Microbiol* 36:330-338.
20. Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv* 24: 452-481.
21. Keiblinger KM, Wilhartitz IC, Schneider T, Roschitzki B, Schmid E, Eberl L, Riedel K, Zechmeister-Boltenstern S. 2012. Soil metaproteomics – Comparative evaluation of protein extraction protocols. *Soil Biol Biochem* 54:14-24.
22. van Elsas JD, Costa R, Jansson J, Sjöling S, Bailey M, Nalin R, Vogel TM, van Overbeek L. 2008. The metagenomics of disease-suppressive soils – experiences from the METACONTROL project. *Trends Biotechnol* 26:591-601.
23. Heiss-Blanquet S, Fayolle-Guichard F, Lombard V, Hebert A, Coutinho PM, Groppi A, Barre A, Henrissat B. 2016. Composting-like conditions are more efficient for enrichment and diversity of organisms containing cellulase-encoding genes than submerged cultures. *PLoS One* 11: e0167216.
24. Petriz BA, Franco OL. 2017. Metaproteomics as a complementary approach to gut microbiota in health and disease. *Front Chem* 5:4.
25. Zhu N, Yang J, Ji L, Liu J, Yang Y, Yuan H. 2016. Metagenomic and metaproteomic analyses of a corn stover-adapted microbial consortium EMSD5 reveal its taxonomic and enzymatic basis for degrading lignocellulose. *Biotechnol Biofuels* 9:243.
26. Leathers TD. 2005. Pullulan. *Biopolymers Online* 6.
27. Rekha MR, Chandra PS. 2007. Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: a perspective. *Trends Biomater Artif Organs* 20:124-130.
28. Corsaro MM, de Castroa C, Evidenteb A, Lanzettaa R, Molinaroa A, Parrillia M, Sparapanoc L. 1998. Phytotoxic extracellular polysaccharide fractions from *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr strains. *Carbohydr Polym* 37:167-172.
29. Kimoto T, Shibuya T, Shiobara S. 1997. Safety studies of a novel starch, pullulan: chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity. *Food Chem Toxicol* 35:323-329.
30. Andrews JH, Harris F, Spear RN, Lau GW, Nordheim EV. 1994. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. *Can J Microbiol* 40:6-17.
31. Bardage SL, Bjurman J. 1998. Adhesion of waterborne paints to wood. *J Coat Technol* 70:39-47.
32. Kuriki T, Imanaka T. 1989. Nucleotide sequence of the neopullulanase gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J Gen Microb* 135:1521-1528.
33. Saha BC, Shen GJ, Srivastava CK, Lecureux LW, Zeikus JG. 1989. New thermostable α -amylase-like pullulanase from thermophilic *Bacillus* sp. 3183. *Enzyme Microb Technol* 11:760-764.
34. Bertoldo C, Antranikian G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 6:151-160.

35. Yamashita M, Matsumoto D, Murooka Y. 1997. Amino acid residues specific for the catalytic action towards α -1,6-glucosidic linkages in *Klebsiella* pullulanase. *J Ferment Bioengin* 84:283-294.
36. Takizawa N, Murooka Y. 1985. Cloning of the pullulanase gene and overproduction of pullulanase in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. *Appl Environ Microbiol* 49:294-301.
37. Ganghofner D, Kellermann J, Staudenbauer W, Bronnenmeier K. 1998. Purification and properties of an amylopullulanase, a glucoamylase, and a α -glucosidase in the amylolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thermosaccharoliticum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:302-308.
38. Matuschek M, Burchhardt G, Sahm K, Bahl H. 1994. Pullulanase of *Thermoanaerobacterium thermosulfuri* genes EM1 (*Clostridium thermosulfurigenes*): molecular analysis of the gene, composite structure of the enzyme, and a common model for its attachment to the cell surface. *J Bacteriol* 176:3295-3302.
39. Arnosti C, Repeta DJ. 1994. Extracellular enzyme activity in anaerobic bacteria cultures: evidence of pullulanase activity among mesophilic marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 60:840-846.
40. Doman M, Czerniec E, Tatgofiski Z, Bardowski J. 2000. Production and genetic regulation of an amylase in *Lactococcus lactis*. *Food Biotechnol* 67:458-462.
41. Kamitori S, Abe A, Ohtaki A, Kaji A, Tonozuka T, Sakano Y. 2002. Crystal structures and structural comparison of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase 1 (TVAI) at 1.6 Å resolution and alpha-amylase 2 (TVAIL) at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* 318:443-453.
42. Sakano Y. 1995. Comparison of primary structures and substrate specificities of two pullulan-hydrolyzing α -amylase, TVAI and TVAIL, from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47. *Biochim Biophys Acta* 1252:35-43.
43. Takata H, Kuriki T, Okada S, Takesada Y, Izuka M, Minamiura N, Imanaka T. 1999. Action of neopullulanase. *J Biol Chem* 267:18447-18452.
44. Aoki H, Sakano Y. 1997. Molecular cloning and heterologous expression of the isopullulanase gene from *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Biochem J* 323:757-764.
45. Leather TD. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:468-473.
46. Renard CM, Weightman RM, Thibault JF. 1997. The xylose-rich pectins from pea hulls. *Int J Biol Macromol* 21:155-162.
47. Yoshitake ST, Numata T, Katsuragi T, Hours RA, Sakai T. 1994. Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. *J Ferment Bioeng* 77:370-375.
48. Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol* 77:215-227.
49. Chanliaud E, Gidley MJ. 1999. In vitro synthesis and properties of pectin *Acetobacter xylinus* cellulose composites. *Plant J* 20:25-35.
50. Willats WG, Limberg G, Buchholt HC, van Alebbek GJ, Benen J, Christensen TM, Visser J, Voragen A, Mikkelsen JD, Knox JP. 2000. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydr Res* 327: 309-320.
51. Wen F, Zhu Y, Hawes MC. 1999. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell* 11:1129-1140.

52. Rogers LM, Kim YK, Guo W, Gondzalez-Candelas L, Li D, Kolattukudy PE. 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 97:9813-9818.
53. Yadav PK, Singh VK, Yadav S, Yadav KD, Yadav D. 2009. In silico analysis of pectin lyase and pectinase sequences. Biochemistry(Mosc) 74:1049-1055.
54. Whitaker JR. 1991. Microbial pectolytic enzymes. Applied Science: 133-176.
55. Soriano M, Diaz P, Pastor FI. 2005. Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin. Curr Microbiol 50:114-118.
56. Tardy F, Nasser W, Robert-Baudouy J, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. 1997. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. J Bacteriol 179: 2503-2511.
57. Ali S, Sondergaard CR, Teixeira S, Pickersgill RW. 2015. Structural insights into the loss of catalytic competence in pectate lyase activity at low pH. FEBS Lett 589(21):3242-6.
58. Jenkins J, Shevchik VE, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Pickersgill RW. 2004. The crystal structure of pectate lyase Pel9A from *Erwinia chrysanthemi*. J Biol Chem 279: 9139-9145.
59. Davies GJ, Sinnott ML. 2008. Sorting the diverse: the sequence-based classifications of carbohydrate-active enzymes. J Biochem 416(3): 26-32.
60. Seyedarabi A, To TT, Ali S, Hussain S, Fries M, Madsen R, Clausen MH, Teixeira S, Brocklehurst K, Pickersgill RW. 2010. Structural insights into substrate specificity and the anti beta-elimination mechanism of pectate lyase. Biochemistry 49(3):539-46.
61. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Blot N, Reverchon S. 2001. Identification of TogMNAB, an ABC transporter which mediates the uptake of pectic oligomers in *Erwinia chrysanthemi* 3937. Mol Microbiol 41(5):1113-23.
62. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Robert-Baudouy J. 1982. Determination of the transcription direction of the exuT gene in *Escherichia coli* K-12: divergent transcription of the exuT-uxaCA operons. J Bacteriol 151(1):480-4.
63. Chen JS, Reddy B, Chen JH, Shlykov MA, Zheng WH, Cho J, Yen MR, Saier MR. 2011. Phylogenetic characterization of transport protein superfamilies: superiority of Superfamily Tree programs over those based on multiple alignments. J Mol Microbiol Biotechnol 21: 83-96.
64. Zhao Q, Yuan S, et al. 2007. Expression, purification and characterization of pectate lyase A from *Aspergillus nidulans* in *Escherichia coli*. World J Microbiol Biotechnol 23:1057-1064.
65. <http://pec.biodbs.info/listofMicroorganisms.html>
66. Wattad C, Dinoor A, Prusky D. 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 7:293-297.
67. Rao MN, Kembhavi AA, Pant A. 1996. Role of lysine, tryptophan and calcium in the beta-elimination activity of a low-molecular-mass pectate lyase from *Fusarium moniliformae*. Biochem J 319:159-164.
68. Crawford MS, Kolattukudy PE. 1987. Pectate lyase from *Fusarium solani* f. sp. *pisi*: purification, characterization, in vitro translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity. Arch Biochem Biophys 258:196-205.

69. Yoshitake S, Numata T, Katsuragi T, Hours RA, Sakai T. 1994. Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. J Ferment Bioeng 77:370-375.
70. Alana, A., I. Alkorta, et al. 1990. Pectin Lyase Activity in a *Penicillium italicum* Strain. Appl Environ Microbiol 56:3755-3759.
71. Minussi, RC, Baracat-Pereira MC, Coelho JLC, Silva DO. 1997. Methyl-xanthenes as inducers of pectin lyase in *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. Appl Microbiology 24:369-372.
72. Olsson L, Christensen TM, Hansen KP, Palmqvist EA. 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.
73. Starr MP, Moran F. 1962. Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot bacteria. Science 135:920-921.
74. Bruhlmann F. 1995. Purification and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp. Appl Environ Microbiol 61:3580-3585.
75. Bekri MA, Desair J, Keijers V, Proost P, Vanderleyden J, Vande Broek A. 1999. *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. J Bacteriol 181:2440-2447.
76. Zhai C, Cao J, Wang Y. 2003. Cloning and expression of a pectate lyase gene from *Bacillus alcalophilus* NTT33. Enz Microbial Technol 33: 173-178.
77. Berensmeier S, Singh SA, Meens J, Buchholz K. 2004. Cloning of the pelA gene from *Bacillus licheniformis* 14A and biochemical characterization of recombinant, thermostable, high-alkaline pectate lyase. Appl Microbiol Biotechnol 64:560-567.
78. Klug-Santner BG, Schnitzhofer W, Vrsanska M, Weber J, Agrawal PB, Nierstrasz VA, Guebitz GM. 2006. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. J Biotechnol 121:390-401.
79. Nasser W, Chalet F, Robert-Baudouy J. 1990. Purification and characterization of extracellular pectate lyase from *Bacillus subtilis*. Biochimie 72:689-695.
80. Liao CH, Wells JM. 1986. Properties of *Cytophaga johnsonae* strains causing spoilage of fresh produce at food markets. Appl Environ Microbiol 52:1261-1265.
81. Tamaru Y, Doi RH. 2001. Pectate lyase A, an enzymatic subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. Proc Natl Acad Sci U S A 98:4125-4129
82. Macmillan JD, Vaughn RH. 1964. Purification and properties of a polygalacturonic acid-trans-eliminase produced by *Clostridium multif fermentans*. Biochemistry 3:564-572.
83. Si Si H, Kikuta T, Sakka M, Kimura T. 2006. Enzymatic properties of two catalytic modules of *Clostridium stercoarium* pectate lyase Pel9A. Biosci Biotechnol Biochem 70:667-671.
84. Starr MP, Moran F. 1962. Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot bacteria. Science 135:920-921.
85. Van Gijsegem F. 1986. Analysis of the pectin-degrading enzymes secreted by three strains of *Erwinia chrysanthemi*. J General Microbiology 132:617-624.
86. Gardner JM, Kado CI. 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 127:451-460.
87. Chatterjee AK, Buchanan GE, Behrens MK. 1979. Synthesis and excretion of polygalacturonic acid trans-eliminase in *Erwinia*, *Yersinia*, and *Klebsiella* species. Can J Microbiol 25:94-102.

88. Walker MJ, Pemberton J. 1987. Construction of a transposon containing a gene for polygalacturonate *trans*-eliminase from *Klebsiella oxytoca*. Arch Microbiol 146:390-395.
89. Brown IE, Mallen MH, Charnok SJ, Davies GJ, Black GW. 2001. Pectate lyase 10A from *Pseudomonas cellulosa* is a modular enzyme containing a family 2a carbohydrate-binding module. Biochem J 355:155-165.
90. Zucker M, Hankin L. 1970. Regulation of Pectate Lyase Synthesis in *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia carotovora*. J Bacteriol 104:13-18.
91. Liao CH, Fett W, Tzean SS, Hoffman G. 2006. Detection and sequence analysis of an altered pectate lyase gene in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and related bacteria. Can J Microbiol 52:1051-1059.
92. Liao CH, Hung HY, Chatterjee AK. 1988. An extracellular pectate lyase is the pathogenicity factor of the soft-rotting bacterium *Pseudomonas viridiflava*. Molecular Plant-Microbe Interactions 1:199-206.
93. Sato M, Kaji A. 1975. Purification and properties of pectate lyase produced by *Streptomyces fradiae* IFO3439. Agric. Biol. Chem. 39:819-824.
94. Walker SG, Ryan ME. 2003. Cloning and expression of a pectate lyase from the oral spirochete *Treponema pectinovorum* ATCC 33768. FEMS Microbiol Lett 226:385-390.
95. Nasuno S, Starr MP. 1967. Polygalacturonic Acid *trans*-Eliminase of *Xanthomonas campestris*. Biochem J 104:178-185.
96. Antranikian G, Konings WN. 1996. Extremophiles. FEMS Microbiol Rev 18:89-285.
97. Dosanjh NS, Hoondal GS. 1996. Production of constitutive, thermostable, hyper active exo-pectinase from *Bacillus* CK-8. Biotechnology letters 18:1435-1438.
98. Kobayashi T, Hatada Y, Higaki N, Lusterio D, Ozawa T, Koike K, Kawai S, Ito S. 1999. Enzymatic properties and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. Biochim Biophys Acta 1427:145-154.
99. Kobayashi T, Koike K, Yoshimatsu T, Higaki N, Suzumatsu A, Ozawa T, Hatada Y, Ito S. 1999. Purification and properties of a low-molecular-weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. Biosci Biotechnol Biochem 63:65-72.
100. Hatada Y, Higaki N, Saito K, Ogawa A, Sawada K, Ozawa T, Hakamada Y, Kobayashi T, Ito S. 1999. Cloning and sequencing of a high-alkaline pectate lyase gene from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. Biosci Biotechnol Biochem 63:998-1005.
101. Soriano M, Blanco A, Díaz P, Pastor FI. 2000. An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. Microbiol 146:89-95.
102. Kashyap DR, Chandra S, Kaul A, Tewari R. 2000. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. World Journal of Microbiology & Biotechnology 16:277-282.
103. Kapoor M, Beg QK, Bhushan B, Singh K, Dadhich KS, Hoondal GS. 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.
104. Sukhumsirchart W, Kawanishi S, Deesukon W, Chansiri K, Kawasaki H, Sakamoto T. 2009. Purification, characterization, and overexpression of thermophilic pectate lyase of *Bacillus* sp. RN1 isolated from a hot spring in Thailand. Biosci Biotechnol Biochem 73:268-273.

105. Dave BA, Vaughn RH. 1971. Purification and properties of an polygalacturonic acid trans-eliminase produced by *Bacillus pumilus*. J Bacteriol 108:166-174.
106. Soriano M, Diaz P, Pastor FI. 2006. Pectate lyase C from *Bacillus subtilis*: a novel endo-cleaving enzyme with activity on highly methylated pectin. Microbiology 152:617-625.
107. Zhuge B, Du GC, Shen W, Zhuge J, Chen J. 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 29:405-410.
108. Xiao Z, Bergeron H, Grosse S, Beauchemin M, Garron ML, Shaya D, Sulea T, Cygler M, Lau PCK. 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 74:1183-1189.
109. Hatada Y, Kobayashi T, Ito S. 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 5:127-133.
110. Karbassi A, Vaughn RH. 1980. Purification and properties of polygalacturonic acid trans-eliminase from *Bacillus stearotherophilus*. Can J Microbiol 26:377-384.
111. Spinnler HE, Lavigne B, Blachere H. 1986. Pectinolytic activity of *Clostridium thermocellum*: Its use for anaerobic fermentation of sugar beet pulp. Appl Microbiol Biotechnol 23:434-437.
112. Wiegel J, Ljungdahl LG, Rawson JR. 1979. Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*. J Bacteriol 139:800-810.
113. Shink B, Zeikus JG. 1983. Characterization of pectinolytic enzymes of *Clostridium thermosulfurogenes*. FEMS Microbiol Lett 17:295-298.
114. Miyairi K, Ogasawara A., Tonouchi A, Hosaka K. 2004. Low-molecular-weight pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*. J Appl Glycosci 51:1-7.
115. Niranjana RR, Dhala SA. 1981. Endo polygalacturonase lyase of *Streptomyces thermovulgaris* CR42. J. Food Sci. Technology 18:171-175.
116. Kozianowski G, Canganella F, Rainey FA, Hippe H, Antranikian G. 1997. Purification and characterization of thermostable pectate-lyases from a newly isolated thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter italicus* sp. nov. Extremophiles 1:171-182.
117. Stutzenberger FJ. 1987. Inducible thermoalkalophilic polygalacturonate lyase from *Thermomonospora fusca*. J Bacteriol 169:2774-2780.
118. Kluskens LD, van Alebeek GJWM, Voragen AGJ, de Vos WM, van der Oost J. 2003. Molecular and biochemical characterization of the thermoactive family 1 pectate lyase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. Biochem J 370:651-659.
119. Kluskens LD, van Alebeek GJ, Walther J, Voragen AG, de Vos W, van der Oost J. 2005. Characterization and mode of action of an exopolygalacturonase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. FEBS J 272(21): 5464-5473.
120. Jayani RS, Saxena S, Gupta R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Proc Biochem 40:2931-2944.
121. Nicemol J. Pectinolytic enzymes. 2009. Biotechnology for agro-industrial residues utilization. p. 383-396.
122. Thomson NR, Nasser W, McGowan S, Sebahia M, Salmond GP. 1999. *Erwinia carotovora* has two KdgR-like proteins belonging to the IciR family of

- transcriptional regulators: identification and characterization of the RexZ activator and the KdgR repressor of pathogenesis. *Microbiology* 145:1531-45.
123. Pissavin C, Robert-Baudouy J, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. 1996. Regulation of *pelZ*, a gene of the *pelB-pelC* cluster encoding a new pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* 178:7187-7196.
 124. Godfrey A. 1985. Production of industrial enzymes and some applications in fermented foods. *Microbiology of Fermented Foods* 1:345-373.
 125. West S. 1996. Olive and other edible oils. *Industrial Enzymology*: 293-300.
 126. Bruhlmann F, Kim KS, Zimmerman W, Fiechter A. 1994. Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Appl Environ Microbiol* 60:2107-212.
 127. Cao J, Zheng L, 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.
 128. Reid II, Ricard M. 2000. Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. *Enzyme Microb Technol* 26:115-123.
 129. Horikoshi K. 1990. Enzymes of alkalophiles. *Microbial Enzymes and Biotechnology*: 275-294.
 130. Tanabe H, Yoshihara K, Tamura K, Kobayashi Y, Akamatsu I, Niyomwan N, Footrakul P. 1987. Pretreatment of pectic wastewater from orange canning process by an alkalophilic *Bacillus* sp. *J Fermentation Technol.* 65:243-246.
 131. Canteri-Schemin MH, Fertoni HCR, Waszczynskyj N, Wosiacki G. 2005. Extraction of pectin from apple pomace. *Braz Arch Biol Technol* 48:259-266.
 132. Funami T, Nakauma M, Ishihara S, Tanaka R, Inoue T, Phillips GO. 2011. Structural modifications of sugar beet pectin and the relationship of structure to functionality. *Food Hydrocolloids*: 25:221-229.
 133. Nilsen-Nygaard J, Hattrem MN, Draget KI. 2016. Propylene glycol alginate (PGA) gelled foams: A systematic study of surface activity and gelling properties as a function of degree of esterification. *Food Hydrocolloids*: 57:80-91.
 134. Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol* 13:202-206.
 135. Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:433-446.
 136. de Champdore M, Staiano M, Rossi M, D'Auria S. 2007. Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *J R Soc Interface* 4:183-191.
 137. Taylor MP, Eley KL, Martin S, Tuffin MI, Burton SG, Cowan DA. 2009. Thermophilic ethanologenesis: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends Biotechnol* 27:398-405.

138. Kuisiene N, Raugalas J, Chitavichius D. 2009. Phylogenetic, inter, and intraspecific sequence analysis of *spo0A* gene of the genus *Geobacillus*. *Curr Microbiol* 58:547-553.
139. Studholme DJ. 2015. Some(bacilli) like it hot: genomics of *Geobacillus* species. *Microb Biotechnol* 8:4-48.
140. Feng L, Wang W, Cheng J, Ren Y, Zhao G, Gao C, Tang Y, Liu X, Han W, Peng X, Liu R, Wang L. 2007. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5602-5607.
141. Donk PJ. 1920. A highly resistant thermophilic organism. *J Bacteriol* 5:373-374.
142. Dereková A, Sjøholm C, Mandeva R, Michailova L, Kambourova M. 2006. Biosynthesis of a thermostable gellan lyase by newly isolated and characterized strain of *Geobacillus stearothermophilus* 98. *Extremophiles* 10:321-326.
143. Takaku H, Kodaira S, Kimoto A, Nashimoto M, Takagi M. 2006. Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches. *J Biosci Bioeng* 101:42-50.
144. Marchant R, Banat IM, Rahman TJ, Berzano M. 2002. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environ Microbiol* 4:595-602.
145. Rahman TJ, Marchant R, Banat IM. 2004. Distribution and molecular investigation of highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments. *Biochem Soc Trans* 32:209-213.
146. Ryckeboer J, Mergaert J, Vaes K, Klammer S, de Clercq D, Coosemans J, Insam H, Swings J. 2003. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann Microbiol* 53:349-410.
147. Blanc M, Marilley L, Beffa T, Aragno M. 1997. Rapid identification of heterotrophic, thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot composts. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1246-1248.
148. Ronimus RS, Parker LE, Turner N, Poudel S, Ruckert A, Morgan HW. 2003. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *Int J Food Microbiol* 85:45-61.
149. Zeigler DR. 2005. Application of a *recN* sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1171-1179.
150. Hirata H, Fukazawa T, Negoro S, Okada H. 1986. Structure of a beta-galactosidase gene of *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* 166:722-727.
151. Solomon V, Teplitsky A, Shulami S, Zolotnitsky G, Shoham Y, Shoham G. 2007. Structure specificity relationships of an intracellular xylanase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 63:845-859.
152. Gerasimova J, Kuisiene N. 2012. Characterization of the novel xylanase from the thermophilic *Geobacillus thermodenitrificans* JK1. *Microbiology* 81:418-424.
153. Choi ID, Kim HY, Choi YJ. 2000. Gene cloning and characterization of alpha-glucuronidase of *Bacillus stearothermophilus* no.236. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:2530-2537.
154. Brūx C, Ben-David A, Shallom-Shezifi D, Leon M, Niefind K, Shoham G, Shoham Y, Schomburg D. 2006. The structure of an inverting GH43 beta-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residue. *J Mol Biol* 359:97-109.

155. Shallom D, Belakhov V, Solomon D, Shoham G, Baasov T, Shoham Y. 2002. Detailed kinetic analysis and identification of the nucleophile in alpha-L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family51 glycosidehydrolase. *J Biol Chem* 277:43667-43673.
156. Mok SC, The AH, Saito JA, Najimudin N, Alam M. 2013. Crystal structure of a compact alpha-amylase from *Geobacillus thermoleovorans*. *Enzyme Microb Technol* 53:46-54.
157. Camacho C. 2013. BLAST+ release notes. In BLAST help, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD.
158. Shulami S, Gat O, Sonenshein AL, Shoham Y. 1999. The glucuronic acid utilization gene cluster from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *J Bacteriol* 181:3695-3704.
159. de Maayer P, Brumm PJ, Mead DA, Cowan DA. 2014. Comparative analysis of the *Geobacillus* hemicellulose utilization locus reveals a highly variable target for improved hemicellulolysis. *BMC Genomics* 15:836.
160. Shulami S, Raz-Pasteur A, Tabachnikov O, Gilead-Gropper S, Shner I, Shoham Y. 2011. The L-arabinan utilization system of *Geobacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* 193:2838-2850.
161. Studholme DJ, Jackson RA, Leak DJ. 1999. Phylogenetic analysis of transformable strains of thermophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* 172:85-90.
162. Takao M, Nakaniwa T, Yoshikawa K, Terashita T, Sakai T. 2000. Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:2360-2367.
163. Takao M, Nakaniwa T, Yoshikawa K, Terashita T, Sakai T. 2001. Molecular cloning, DNA sequence, and expression of the gene encoding for thermostable pectate lyase of thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:322-329.
164. Nakaniwa T, Tada T, Ishii K, Takao M, Sakai T, Nishimura K. 2003. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a thermostable pectate lyase PL 47 from *Bacillus* sp. TS 47. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59:341-342.
165. Rose PW, Prlic A, Altunkaya A, Bi C, Bradley AR, Christie CH, di Costanzo L, Duarte JM, Dutta S, Feng Z, Green RK, Goodsell DS, Hudson B, Kalro T, Lowe R, Peisach E, Randle C, Rose AS, Shao C, Tao YP, Valasatava Y, Voigt M, Westbrook JD, Woo J, Yang H, Young JY, Zardecki C, Berman HM, Burley SK. 2017. The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Res* 45:D271-D281.
166. Mori S, Akao S, Nankai H, Hashimoto W, Mikami B, Murata K. 2003. A novel member of glycoside hydrolase family 88: overexpression, purification, and characterization of unsaturated beta-glucuronyl hydrolase of *Bacillus* sp. GL1. *Protein Expr Purif* 29:77-84.
167. Itoh T, Hashimoto W, Mikami B, Murata K. 2006. Substrate recognition by unsaturated glucuronyl hydrolase from *Bacillus* sp. GL1. *Biochem Biophys Res Commun* 344:253-262.
168. Itoh T, Akao S, Hashimoto W, Mikami B, Murata K. 2004. Crystal structure of unsaturated glucuronyl hydrolase, responsible for the degradation of glycosaminoglycan, from *Bacillus* sp. GL1 at 1.8 Å resolution. *J Biol Chem* 279:31804-31812.

169. Murase A, Yoneda M, Ueno R, Yonebayashi K. 2003. Isolation of extracellular protein from green soil. *Soil Biol Biochem* 35:733-736.
170. Al-Qodah Z. 2006. Production and characterization of thermostable α -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Biotechnol J* 1:850-857.
171. Rosenberg IM. 2005. Electroforesis techniques, p 63-138. *In* Protein analysis and purification, Benchtop techniques, 2th ed. Birkhäuser, Boston.
172. Yin Y, Mao X, Yang JC, Chen X, Mao F, Xu Y. 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res* 40:W445-W451.
173. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH. 2014. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 43: D222-D226.
174. Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, LiW, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn AF, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong SY, Lopez R, Hunter S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30:1236-1240.
175. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer ELL, Tate J, Punta M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42:D222-D230.
176. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785-786.
177. Stothard P. 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104.
178. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729.
179. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JP, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
180. Atlas RM. 2010. Media, alphabetical, p 934. *In* Handbook of microbiological media, 4th ed, CRC Press, Boca Raton.
181. Spohner SC, Müller H, Quitmann H, Czermak P. 2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 202:118-134.
182. Spohner SC, Zahn D, Schaum V, Quitmann H, Czermak P. 2015. Recombinant α -l-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of α -l-rhamnose from steviol glycosides. *J Mol Catal B Enzym* 122:248-254.
183. Atlas RM. 2010. Media, alphabetical, p 1108. *In* Handbook of microbiological media, 4th ed, CRC Press, Boca Raton.
184. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
185. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31:426-428.
186. Ryan SM, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2006. Screening for and identification of starch, amylopectin, and pullulan degrading activities in bifidobacterial strains. *Appl Environ Microbiol* 72:5289-5296.
187. Nawani N, Singh R, Kaur J. 2006. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: the effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electron J Biotechnol* 9:156:172.

188. Pessela BCC, Mateo C, Carrascosa AV, Vian A, García JL, Rivas G, Alfonso C, Guisan JM, Fernández-Lafuente R. 2003. One-step purification, covalent immobilization and additional stabilization of a thermophilic poly-His-tagged β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 by using novel heterofunctional chelate-epoxy Sepabeads. *Biomacromolecules* 4:107-113.
189. Roy I, Gupta MN. 2004. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. *Enzyme Microb Technol* 34:26-32.
190. Blom J, Kreis J, Spänig S, Juhre T, Bertelli C, Ernst C, Goesmann A. 2016. EDGAR 2.0: an enhanced software platform for comparative gene content analyses. *Nucleic Acids Res* 44:W22-W28.
191. Meyer F, Goesmann A, McHardy AC, Bartels D, Bekel T, Clausen J, Kalinowski J, Linke B, Rupp O, Giegerich R, Pühler A. 2003. GenDB – an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res* 31:2187-2195.
192. Petkau A, Stuart-Edwards M, Stothard P, van Domselaar G. 2010. Interactive microbial genome visualization with GView. *Bioinformatics* 26:3125-3126.
193. Bertelli C, Laird MR, Williams KP, Simon Fraser University Research Computing Group, Lau BY, Hoard G, Winsor GL, Brinkman FS. 2017. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res*.
194. Solovyev V, Salamov A. 2011. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences, p 61-78. *In* Li RW (ed), *Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies*, Nova Science Publishers, New York.
195. Macke TJ, Ecker DJ, Gutell RR, Gautheret D, Case DA, Sampath R. 2001. RNA Motif, an RNA secondary structure definition and search algorithm. *Nucleic Acids Res* 29:4724-4735.
196. Dehal PS, Joachimiak MP, Price MN, Bates JT, Baumohl JK, Dylan C, Friedland GD, Huang KH, Keller K, Novichkov PS, Dubchak IL, Alm EJ, Arkin AP. 2010. MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic Acids Res* 38:D396-D400.
197. Taboada B, Ciria R, Martinez-Guerrero CE, Merino E. 2012. ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. *Nucleic Acids Res* 40:D627-D631.
198. Petkauskaitė R. 2011. Thermostable pectin-degrading enzymes: analysis of pectinolytic of some *Geobacillus*. Master thesis. Vilnius University, Vilnius.
199. Higdon R, Kolker E. 2007. A predictive model for identifying proteins by a single peptide match. *Bioinformatics* 23:277-280.
200. Ben Messaoud E, Ben Ammar Y, Mellouli L, Bejar S. 2002. Thermostable pullulanase type I from new isolated *Bacillus thermoleovorans* US105: cloning, sequencing and expression of the gene in *E. coli*. *Enzym Microb Technol* 31:827-832.
201. Khannous L, Jrad M, Dammak M, Miladi R, Chaaben N, Khemakhem B, Gharsallah N, Fendri I. 2014. Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions. *Lipids Health Dis* 13:9.
202. Patil NP, Patil KP, Chaudhari BL, Chincholkar SB. 2012. Production, purification of exo-polygalacturonase from soil isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and its application. *Indian J Microbiol* 52:240-246.

203. Martínez M, Newbold CJ, Wallace RJ, Moyano FJ. 2002. Effects of high-molecular-mass substrates on protein migration during sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 23:1-7.
204. Bertoldo C, Armbrecht M, Becker F, Schäfer T, Antranikian G, Lieb W. 2004. Cloning, sequencing, and characterization of a heat-and alkali-stable type I pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*. *Appl Environ Microbiol* 70:3407-3416.
205. Zouari Ayadi D, Ben Ali M, Jemli S, Ben Mabrouk S, Mezghani M, Ben Messaoud E, Bejar S. 2008. Heterologous expression, secretion and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* US105 type I pullulanase. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:473-781.
206. Dubey AK, Yadav S, Kumar M, Singh VK, Sarangi BK, Yadav D. 2010. *In silico* characterization of pectate lyase protein sequences from different source organisms. *Enzyme Res* 2010:950230.
207. Kang J, Park KM, Choi KH, Park CS, Kim GE, Kim D, Cha J. 2011. Molecular cloning and biochemical characterization of a heat-stable type I pullulanase from *Thermotoga neapolitana*. *Enzyme Microb Technol* 48:260-266.
208. Tomiyasu K, Yato K, Yasuda M, Tonozuka T, Ibuka A, Sakai H. 2001. Cloning and nucleotide sequence of the pullulanase gene of *Thermus thermophilus* HB8 and production of the enzyme in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:2090-2094.
209. Sun S, Lu F, Song H, Xu J, Jiang N, Zhang Y, Li L, Ming T, Zheng W. 2011. Cloning, expression and characterization of a thermostable pullulanase from newly isolated thermophilic *Geobacillus* sp. LM14-3. *J Biomed Eng Inform*.
210. Kuriki T, Park JH, Okada S, Imanaka T. 1988. Purification and characterization of thermostable pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and molecular cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 54:2881-2883.
211. Kusano S, Nagahata N, Takahashi SI, Fujimoto D, Sakano Y. 1988. Purification and properties of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. *Agric Biol Chem* 52:2293-2298.
212. Suzuki Y, Hatagaki K, Oda H. 1991. A hyperthermostable pullulanase produced by an extreme thermophile, *Bacillus flavocaldarius* KP 1228, and evidence for the proline theory of increasing protein thermostability. *Appl Microbiol Biotechnol* 34:707-714.
213. Nisha M, Satyanarayana T. 2016. Characteristics, protein engineering and applications of microbial thermostable pullulanases and pullulan hydrolases. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:5661-5679.
214. Kim CH, Nashiru O, Ko JH. 1996. Purification and biochemical characterization of pullulanase type I from *Thermus caldophilus* GK-24. *FEMS Microbiol Lett* 138:147-152.
215. Kriegshäuser G, Liebl W. 2000. Pullulanase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: purification by β -cyclodextrin affinity chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 737:245-251.
216. Kim CH, Choi HI, Lee DS. 1993. Pullulanase of alkaline and broad pH range from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. S-1 and *Micrococcus* sp. Y-1. *J Ind Microbiol* 12:48-57.
217. Brown SH, Kelly RM. 1993. Characterization of amylolytic enzymes, having both α -1,4 and α -1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Appl Environ Microbiol* 59:2614-2621.

218. Bibel M, Brettl C, Gossler U, Kriegshäuser G, Liebl W. 1998. Isolation and analysis of genes for amylolytic enzymes of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. FEMS Microbiol Lett 158:9-15.
219. Freydanck AC, Brandt W, Dräger B. 2008. Protein structure modelling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. Proteins 72:173-183.
220. Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM. 2008. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. J Biol Inorg Chem 13:1205-1218.
221. Albertson GD, McHale RH, Gibbs MD, Bergquist PL. 1997. Cloning and sequence of a type I pullulanase from an extremely thermophilic anaerobic bacterium, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Biochim Biophys Acta 1354:35-39.
222. BeMiller JN. 2008. Polysaccharides: occurrence, significance, and properties p1413-1435. In Fraser-Reid B, Thiem TK. (ed.), Glycoscience, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
223. Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. 2013. Overview of affinity tags for protein purification. Curr Protoc Protein Sci 73: Unit–9.9.
224. Ali G, Dulong V, Gasmi SN, Rihouey C, Picton L, Le Cerf D. 2015. Covalent immobilization of pullulanase on alginate and study of its hydrolysis of pullulan. Biotechnol Prog 31:883-889.
225. Kuroiwa T, Shoda H, Ichikawa S, Sato S, Mukataka S. 2005. Immobilization and stabilization of pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* by a multipoint attachment method using activated agar gel supports. Process Biochem 40:2637-2642.
226. Long J, Wu Z, Li X, Xu E, Xu X, Jin Z, Jiao A. 2015. New method for the immobilization of pullulanase onto hybrid magnetic (Fe₃O₄-κ-carrageenan) nanoparticles by electrostatic coupling with pullulanase/chitosan complex. J Agric Food Chem 63:3534-3542.
227. Mateo C, Abian O, Fernandez-Lorente G, Pedroche J, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Tam A, Daminati M. 2002. Epoxy sephabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. Biotechnol Prog 18:629-634.
228. Kusano S, Shiraishi T, Takahashi SI, Fujimoto D, Sakano Y. 1989. Immobilization of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase and properties of the immobilized pullulanases. J Ferment Bioeng 68:233-237.
229. Kimura T, Yoshida M, Oishi K, Ogata M, Nakakuki T. 1989. Immobilization of exo-maltotetrahydrolase and pullulanase. Agric Biol Chem 53:1843-1848.
230. Goh KM, Chan KG, Yaakop AS, Chan CS, Ee R, Tan WS, Gan HM. 2015. Draft genome sequence of *Jeotgalibacillus soli* DSM 23228, a bacterium isolated from alkaline sandy soil. Genome Announc 3:e00512-15.
231. Nasser W, Awade AC, Reverchon S, Robert-Baudouy J. 1993. Pectate lyase from *Bacillus subtilis*: molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme. FEBS Lett 335:319-326.
232. Kamen DE, Griko Y, Woody RW. 2000. The stability, structural organization, and denaturation of pectate lyase C, a parallel β-helix protein. Biochemistry 39:15932-15943.
233. Pickersgill R, Jenkins J, Harris G, Nasser W, Robert-Baudouy J. 1994. The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. Nat Struct Biol 1:717-723.

234. Wang H, Fu L, Zhang X. 2011. Comparison of expression, purification and characterization of a new pectate lyase from *Phytophthora capsici* using two different methods. *BMC Biotechnol* 11:32.
235. Basu S, Ghosh A, Bera A, Saha MN, Chattopadhyay D, Chakrabarti K. 2008. Thermodynamic characterization of a highly thermoactive extracellular pectate lyase from a new isolate *Bacillus pumilus* DKS1. *Bioresour Technol* 99:8088-8094.
236. Li X, Wang H, Zhou C, Ma Y, Li J, Song J. 2014. Cloning, expression and characterization of a pectate lyase from *Paenibacillus* sp. 0602 in recombinant *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol* 14:18.
237. Berensmeier S, Singh SA, Meens J, Buchholz K. 2004. Cloning of the *pelA* gene from *Bacillus licheniformis* 14A and biochemical characterization of recombinant, thermostable, high-alkaline pectate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:560-567.
238. Kumar S, Jain KK, Singh A, Panda AK, Kuhad RC. 2015. Characterization of recombinant pectate lyase refolded from inclusion bodies generated in *E. coli* BL21(DE3). *Protein Expr Purif* 110:43-51.
239. Matsumoto T, Katsura D, Kondo A, Fukuda H. 2002. Efficient secretory overexpression of *Bacillus subtilis* pectate lyase in *Escherichia coli* and single-step purification. *Biochem Eng J* 12:175-179.
240. Liu Y, Chen G, Wang J, Hao Y, Li M, Li Y, Hu B, Lu F. 2012. Efficient expression of an alkaline pectate lyase gene from *Bacillus subtilis* and the characterization of the recombinant protein. *Biotechnol Lett* 34:109-115.
241. Zhang C, Yao J, Zhou C, Mao L, Zhang G, Ma Y. 2013. The alkaline pectate lyase PEL168 of *Bacillus subtilis* heterologously expressed in *Pichia pastoris* is more stable and efficient for degumming ramie fiber. *BMC Biotechnol* 13:26.
242. Bin Z, Guo-Cheng D, Wei S, Jian Z, Jian C. 2008. Expression of a *Bacillus subtilis* pectate lyase gene in *Pichia pastoris*. *Biochem Eng J* 40:92-98.
243. Bio-Rad. 2008. Chemical compatibilities, p 4. *In* Profinity IMAC resins. Instruction manual, Bio-Rad Laboratories, Hercules.
244. Hamilton S, Odili J, Pacifico MD, Wilson GD, Kupsch JM. 2003. Effect of imidazole on the solubility of a his-tagged antibody fragment. *Hybrid Hybridomics* 22:347-535.
245. Zou M, Li X, Shi W, Guo F, Zhao J, QuY. 2013. Improved production of alkaline polygalacturonate lyase by homologous overexpression *pelA* in *Bacillus subtilis*. *Process Biochem* 48:1143-1150.
246. Petkauskaitė R, Blom J, Goesmann A, Kuisiėne N. 2016. Draft genome sequence of pectic polysaccharide-degrading moderate thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594. *Braz J Microbiol* 48:7-8.
247. Panek A, Pietrow O, Filipkowski P, Synowiecki J. 2013. Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermali*s. *Acta Biochim Pol* 60:163-166.
248. Boland WE, Henriksen ED, Doran-Peterson J. 2010. Characterization of two *Paenibacillus amylolyticus* strain 27C64 pectate lyases with activity on highly methylated pectin. *Appl Environ Microbiol* 76:6006-6009.
249. Xiao Z, Boyd J, Grosse S, Beauchemin M, Coupe E, Lau PC. 2008. Mining *Xanthomonas* and *Streptomyces* genomes for new pectinase-encoding sequences and their heterologous expression in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:973-981.

250. Tamaru Y, Doi RH. 2001. Pectate lyase A, an enzymatic subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. Proc Natl Acad Sci USA 98:4125-4129.
251. Sakamoto T, Hours RA, Sakai T. 1994. Purification, characterization, and production of two pectic transeliminases with protopectinase activity from *Bacillus subtilis*. Biosci Biotechnol Biochem 58:353-358.
252. Parmar I, Rupasinghe HP. 2012. Optimization of dilute acid-based pretreatment and application of laccase on apple pomace. Bioresour Technol 124:433-439.
253. Hiteshi K, Chauhan S, Gupta R. 2013. Immobilization of microbial pectinases: a review. CIBTech J Biotechnol 2:37-52.
254. Chakraborty S, Jagan Mohan Rao T, Goyal A. 2017. Immobilization of recombinant pectate lyase from *Clostridium thermocellum* ATCC-27405 on magnetic nanoparticles for bioscouring of cotton fabric. Biotechnol Prog 33:236-244.
255. Dutta N, Mukhopadhyay A, Dasgupta AK, Chakrabarti K. 2013. Nanotechnology enabled enhancement of enzyme activity and thermostability: study on impaired pectate lyase from attenuated *Macrophomina phaseolina* in presence of hydroxyapatite nanoparticle. PLoS ONE 8:e63567.
256. Mukhopadhyay A, Bhattacharyya T, Dasgupta AK, Chakrabarti K. 2015. Nanotechnology based activation-immobilization of psychrophilic pectate lyase: a novel approach towards enzyme stabilization and enhanced activity. J Mol Catal B Enzym 119:54-63.
257. Mukhopadhyay A, Dasgupta AK, Chattopadhyay D, Chakrabarti K. 2012. Improvement of thermostability and activity of pectate lyase in the presence of hydroxyapatite nanoparticles. Bioresour Technol 116:348-354.
258. Contesini FJ, de Alencar Figueira J, Kawaguti HY, de Barros Fernandes PC, de Oliveira Carvalho P, da Graça Nascimento M, Sato HH. Potential applications of carbohydrases immobilization in the food industry. Int J Mol Sci 14:1335-1369.
259. Dubey AK, Yadav S, Kumar M, Anand G, Yadav D. 2016. Molecular biology of microbial pectate lyase: a review. Brit Biotechnol J 13:1-26.
260. <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-101594.html>
261. Pore SD, Arora P, Dhakephalkar PK. 2014. Draft genome sequence of *Geobacillus* sp. strain FW23, isolated from a formation water sample. Genome Announc 2:e00352-14.
262. Yao N, Ren Y, Wang W. 2013. Genome sequence of a thermophilic bacillus, *Geobacillus thermodenitrificans* DSM465. Genome Announc 1:e01046-13.
263. Stuknyte M, Guglielmetti S, Mora D, Kuisiene N, Parini C, Chitavicius D. 2008. Complete nucleotide sequence of pGS18, a 62.8-kb plasmid from *Geobacillus stearothermophilus* strain 18. Extremophiles 12:415-429.
264. Marchant R, Banat IM. 2010. The genus *Geobacillus* and hydrocarbon utilization, p1887-1896, In Timmis N. (ed.), Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
265. Zheng B, Zhang F, Chai L, Yu G, Shu F, Wang Z, Su S, Xiang T, Zhang Z, Hou D, She Y. 2014. Permanent draft genome sequence of *Geobacillus thermocatenulatus* strain GS-1. Mar Genomics 18:129-131.
266. Brumm PJ, Land ML, Mead DA. 2016. Complete genome sequences of *Geobacillus* sp. WCH70, a thermophilic strain isolated from wood compost. Stand Genomic Sci 11: 33.
267. Brumm PJ, Land ML, Mead DA. 2015. Complete genome sequence of *Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93, a novel biomass degrader isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park. Stand Genomic Sci 10:73.

268. Abbott DW, Gilbert HJ, Boraston AB. 2010. The active site of oligogalacturonate lyase provides unique insights into cytoplasmic oligogalacturonate β -elimination. *J Biol Chem* 285:39029-39038.
269. Akita M, Suzuki A, Kobayashi T, Ito S, Yamane T. 2001. Crystal structure of pectate lyase from *Bacillus* sp. strain KSM-P15. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57:1786-1792.
270. Ochiai A, Yamasaki M, Itoh T, Mikami B, Hashimoto W, Murata K. 2006. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the rhamnogalacturonan lyase YesW from *Bacillus subtilis* strain 168, a member of polysaccharide lyase family 11. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62: 438-440.
271. Collen PN, Jeudy A, Sassi JF, Groisillier A, Czjzek M, Coutinho PM, Helbert W. 2014. A novel unsaturated α -glucuronyl hydrolase involved in Ulvan degradation unveils the versatility of stereochemistry requirements in family GH105. *J Biol Chem* 289:6199-6211.
272. Suzuki H, Yoshida K, Ohshima T. 2013. Polysaccharide-degrading thermophiles generated by heterologous gene expression in *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Appl Environ Microbiol* 79:5151-5158.
273. Yang P, Kumar S, Hernandez RL, Jones SE, Cadle KM, Smith KP, Varela MF. 2009. Evidence for the transport of maltose by the sucrose permease, CscB, of *Escherichia coli*. *J Membr Biol* 228:79-88.
274. Afzal M, Shafeeq S, Manzoor I, Kuipers OP. 2015. Maltose-dependent transcriptional regulation of the mal regulon by MalR in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* 10:e0127579.
275. Doman-Pytka M, Renault P, Bardowski J. 2004. Gene-cassette for adaptation of *Lactococcus lactis* to a plant environment, p 33-37. *In* Le Lait84 (1-2), INRA Editions, Paris.
276. Zou C, Duan X, Wu J. 2016. Magnesium ions increase the activity of *Bacillus deramificans* pullulanase expressed by *Brevibacillus choshinensis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:7115-7123.
277. Hashimoto W, Kobayashi E, Nankai H, Sato N, Miya T, Kawai S, Murata K. 1999. Unsaturated glucuronyl hydrolase of *Bacillus* sp. GL1: novel enzyme prerequisite for metabolism of unsaturated oligosaccharides produced by polysaccharide lyases. *Arch Biochem Biophys* 368:367-374.
278. http://genome.jgi.doe.gov/BacspUNC41MFS5_FD/BacspUNC41MFS5_FD.info.html
279. Liu G, Liu B, Wang J, Che JM, Zhu YJ, Chen QQ, Ruan CQ. 2015. Genome sequence of *Paenibacillus* sp. strain FJAT-28004 for the genome sequencing project for genomic taxonomy and phylogenomics of *Bacillus*-like bacteria. *Genome Announc* 3:e00863-15.
280. Itoh T, Ochiai A, Mikami B, Hashimoto W, Murata K. 2006. Structure of unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase complexed with substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 347:1021-1029.
281. <https://gold.jgi.doe.gov/project?id=75758>.
282. Pissavin C, Robert-Baudouy J, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. 1996. Regulation of pelZ, a gene of the pelB-pelC cluster encoding a new pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* 178:7187-7196.
283. Cnossen-Fassoni A, Bazzolli DM, Brommonschenkel SH, Fernandes de Araujo E, de Queiroz MV. 2013. The pectate lyase encoded by the pecC11 gene is an important determinant for the aggressiveness of *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Microbiol* 51:461-470.

SUMMARY

Introduction

Polysaccharides – most abundant biopolymers in biosphere are produced by different organisms from all domains of life (1). Modular organization of polysaccharides based on the ability of carbohydrates to form polymeric chain in different ways as well as combinations ensures remarkable structural variety of polysaccharides (2). Starch and pectin are almost ubiquitous biopolymers in biosphere demonstrating key functional importance for organisms. Starch serves as an energy and organic carbon storage compound, while pectin is one of the most important polymer ensuring plant structural organization integrity. Without any doubt starch as well as pectin are one of the most biotechnologically important heteropolysaccharides (1).

Starch and pectin functions for organisms could not be ensured without effective degradation of these polymers. Usage of starch and pectin for biotechnological/industrial purposes is also often directly connected with need to degrade these biopolymers. The abundance of these heteropolysaccharides in biosphere indirectly led to emergence of substantial variety of polysaccharide-active enzymes (3). Even though the arsenal of characterized amylases and pectinases is considerable, however the increasing demand of amylases and pectinases with certain sets of characteristics in context with biotechnology needs is far from satisfaction yet (4). Thermoactive and/or thermostable polysaccharide-degrading enzymes remain especially valuable for biotechnology (5).

Soil microorganisms typically demonstrate high starch and pectin utilization potential, what makes soil microorganisms one of the most perspective sources of undescribed amylases as well as pectinases. The variety of heteropolysaccharide degrading enzymes produced by uncultured soil microorganisms remain only fragmentary described (6). The optimization and improvement of enzyme extraction, detection as well as identification also remains important tasks as the enzyme detection effectiveness is directly connected with possibility to expand variety of characterized enzymes as a result of characterization of new enzymes.

Aim of dissertation

To perform screening of heteropolysaccharide degrading enzymes produced by soil microorganisms as well as characterize pullulanase AmyA1 and pectate lyase PL47 produced by geobacilli defining functional importance of enzymes.

Goals of dissertation

1. Applying culture enrichment as well as metaproteomic methods extract starch or pectin degrading enzymes from soil samples and identify enzymes detected by zymography with mass spectrometry.
2. Characterize recombinant pullulanase AmyA1 *in vitro* and evaluate hydrolases biotechnological applicability potential.
3. Characterize recombinant pectate lyase PL47 *in vitro* and evaluate lyases biotechnological applicability potential.
4. Annotate *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome characterizing operonic organization of AmyA1 homologue and PL47 genes as well as *in silico* describing functional importance of enzymes.

Scientific novelty

Screening of heteropolysaccharide-degrading enzymes produced by cultivable and/or uncultivable soil microorganisms was performed applying quantitatively new, innovative enzyme extraction, detection and identification strategy that ensured effective determination of enzymes. Direct identification of enzymes demonstrating amylolytic or pectinolytic activity with mass spectrometry from zymogram samples previously was never performed. Enzymes extraction under conditions preventing proteins from denaturation and/or degradation was previously never performed metaproteome analysis of soil niches. Performed screening of heteropolysaccharide-degrading enzymes enabled to successfully detect not only amylases and pectinases homologous to characterized enzymes, but also led to possibility to detect new enzymes homologous only to hypothetical proteins.

Characterization of pullulanase AmyA1 and pectate lyase PL47 from geobacilli enabled to detect distinct sets of characteristics of new enzymes confirming biotechnological applicability. PL47 ability to degrade pectin from apple pomade was successfully confirmed. AmyA1 and PL47 genes were successfully cloned. Recombinant enzymes were expressed in *Escherichia coli*. A possibility of secretory production of recombinant PL47 applying yeast for heterologous expression was also evaluated. During *in vitro* characterization of recombinant enzymes possibility to modulate enzymes activity under suboptimal reaction conditions was analysed. The impact of recombinant AmyA1 and PL47 immobilization to main characteristics of enzymes was successfully determined. Activity modulation of amylase/pullulanase as well as pectate lyase encoded by geobacilli has been never

evaluated previously. Immobilization of characterized amylase/pullulanase and pectate lyase encoded by geobacilli has been never attempted previously.

In order to *in silico* describe AmyA1 and PL47 functional importance *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome was successfully sequenced and annotated. Analysis of newly sequenced *G. thermodenitrificans* strains genome ensured not only successful determination of genome main characteristics but also description of strains ability to utilize different carbohydrates. Interestingly, annotation of *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome led to identification of two gene locuses previously undetected in annotated genomes of geobacilli. *In silico* analysis of locuses suggests that they were transmitted to *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome as a result of horizontal gene transfer. One of analysed locuses is consisting of clusters of genes encoding enzymes connected with heteropolysaccharide as well as oligosaccharide utilization. The analysis of locus structural similarity did not reveal any locuses with similar structure in annotated genomes of microorganisms. Annotation of pectate lyase PL47 in *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome confirmed the hypothesis that geobacilli encodes pectate lyase. Meanwhile, *in silico* characterization of PL47 operonic organization confirmed supposition that geobacilli utilizes pectin using catabolic cascade identical to pectin utilization cascade typical for mesophilic bacilli. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome annotation ensured possibility to determine functional importance of AmyA1 and PL47 for strains nutritional adaptivity as well as adaptation to econiches.

Scientific significance

The screening strategy of heteropolysaccharide-degrading enzymes could be successfully applied for carbohydrate catabolism enzymes determination from different econiches. Successfully selected enzymes which were only partially characterized *in vitro* could be further characterized as well as evaluated in context of enzyme applicability possibilities. AmyA1 as well as PL47 characterization results enables to carry on further enzyme introduction into biotechnological processes and/or apply protein engineering strategies in order to modify enzyme characteristics. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome annotation results enables to use sequence data for geobacilli phylogeny and/or taxonomy research as well as use annotated genome for selected enzymes/proteins sequence mining. *In silico* defined AmyA1 and PL47 functional importance ensures better understanding of nutritional adaptivity of geobacilli as well as adaptive mechanisms of these moderate thermophiles to econiche.

METHODS

1. Enzyme extraction, detection and identification with mass-spectrometry

Total protein fraction from soil samples was extracted according to (7) with slight modifications. 200 g of soil sample were resuspended in 500 mL of 67 mM phosphate buffer (pH 6/RT) and stirred 100 rpm at 25 °C. Obtained samples homogenized by ultrasound sonication (cycle: 5 s pulse/55 s pause, 40 cycles, 20 kHz, 20 % amplitude) maintaining 4 °C. Homogenates were centrifugated 7000×g for 15 min at 4 °C. Supernatant solutions were filtrated. Proteins precipitated with ammonium sulphate (80 % saturation). Precipitates were collected by centrifugation 12000×g for 40 min at 4 °C. Protein fraction was resuspended and dialysed against buffer 50 mM MES-NaOH buffer (pH 6/RT). Enrichment culture inoculums using soil samples for inoculation (1 g) were obtained according to (8) and (9) using starch, pectin, pectin from apple pomace as well as polygalacturonic acid as substrates maintaining media pH 6, 7 or 8. After 24 h of cultivation with shacking 180 rpm at 60 °C, 1 mL of prepared inoculum was used for inoculation of fresh media. Inoculated enrichment cultures were cultivated for 24 h under same cultivation parameters as inoculums. Culture growth was monitored by colony forming unit (cfu) estimation on solidized media. Culture was isolated from solidized media supplemented with starch or pectin performing cultivation at 60 °C. Proteins from enrichment culture cultural fluid were precipitated by ammonium sulphate as stated previously. Protein fraction was resuspended and dialysed against buffer 50 mM MES-NaOH buffer (pH 6/RT) or 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 7, 8/RT).

Amylolytic or pectinolytic activity of enzymes from total protein fraction extracted from soil samples as well as enrichment cultures cultural fluids was detected by zymography. Proteins were fractionated according to molecular weight with SDS-PAGE (10) with polymerized 0.1 % (w/v) soluble starch from potatoes (Sigma-Aldrich) or 0.05 % (w/v) pectin from apples (Sigma-Aldrich) or polygalacturonic acid (Alfa-Aesar). SDS was washed from zymographic gels with 2.5 % (v/v) Triton X-100. Zymographic gels were incubated 2-3 h in 50 mM TRIS-HCl buffer pH 6, 7 or 8 at 60 °C. Amylolytic activity of enzymes was visualized by staining zymographic gels with iodine, while pectinolytic activity was visualized by staining zymographic gels with ruthenium red.

Detected enzymes were identified by mass-spectrometry of proteins extracted from zymograms slices corresponding to visualized activity zones. Polypeptide sequences were fractionated by liquid chromatography integrated

with mass spectrometry (LC-MS/MS) using nanoAcquity (Waters) chromatography system and Orbitrap Velos (Thermo Electron Corp.) mass spectrometer. Protein identification was performed at Polish Science Academy Biochemistry and Biophysics Institute Mass spectrometry laboratory (Warsaw, Poland). Pure native enzymes subjected to mass spectrometry identification were purified by hydrophobic interaction chromatography following general recommendations in context of selected chromatography technique. Identified protein polypeptide sequences were analysed applying bioinformatic analysis using servers and tools: NCBI BLAST (11) and NCBI CDD 3, MEGALIGN from LASERGENE 6 (DNASTAR), dbCAN (12), InterProScan (13), Pfam 28 (14) as well as SignalP 4 (15).

2. Amplification and cloning of genes of identified enzymes

Primers for genes of identified enzymes amplification as well as cloning were constructed using PrimerSelect from LASERGENE 6 (DNASTAR) additionally evaluating primer pair sequences with PCR Primer Stats (16). Motifs recognized by restriction endonucleases were introduced to primer sequences if need, while primers used for gene amplification for cloning were constructed in correspondence to vector architectures. Primers were synthesized at Metabion International (Planegg, Germany). Total DNA from soil samples was extracted using ZR Soil Microbe DNA MicroPrep (Zymo Research) and PureLink Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen) kits. Genome DNA was extracted from microorganism biomass after cultivation on solidized media with GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). DNA was fractionated by agarose gel electrophoresis. Nucleic acids were visualized by staining with ethidium bromide. Concentration of DNA was estimated spectrophotometrically at 260 nm of wavelength. Gene amplification performed by PCR using DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific). 10 ng of DNA template was used for amplification. PCR products analysed after sequencing at VU LSC Biotechnology Institute Sequencing centre (Vilnius, Lithuania).

Enzyme genes were cloned into pET-28c(+) (Novagene) protein expression vector. Expression constructs were validated by sequencing. Gene encoding PL47 pectate lyase codon optimized for gene transcription in yeast variant was also cloned into yeast vectors pLacZ-Kan and pKLacZ-Kan (17) ensuring gene integration into yeast protein production strains. PL47 gene integration in selected yeast expression strains *Pichia pastoris* SMD1163 and *Kluyveromyces lactis* G7799 was confirmed by colony PCR method.

3. Production of cloned enzymes

Escherichia coli BL21(DE3) strain was used for heterologous overexpression of recombinant target enzymes. Expression strain transformed with expression constructs were cultivated on solidified LB media supplemented with 30 µg/mL of kanamycin 12-14 h at 37 °C. Inoculums were prepared in LB media cultivating inoculum culture 180 rpm at 37 °C. Inoculation was performed after 12 h of inoculum cultivation. Cultures for protein production were inoculated up to 1 % (v/v) and cultivated under same parameters as inoculums. Protein expression was induced when culture growth reached OT_{600} 0.5 with 1 mM of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 h. Expression of AmyA1 and PL47 in *E. coli* BL21(DE3) was optimized. PL47 secretory production was obtained in *P. pastoris* SMD1163 and *K. lactis* G7799 cultivating enzyme production cultures in YPD media 250 rpm for 72 h at 30 °C. Yield, solubility as well as localization of recombinant target proteins were evaluated by NDS-PAGE and zymography analysing protein extracts as well as concentrated protein production cultures cultural fluids.

4. Purification of recombinant enzymes

Recombinant proteins were purified from *E. coli* BL21(DE3) intracellular protein fraction. Recombinant AmyA1 and PL47 were purified after protein production at 1 L scale, while other recombinant amylases or pectinases were purified after protein production at 200 mL scale. After recombinant protein induction termination expression strain cells were separated from culture cultural fluid by centrifugation 7000×g for 15 min at 4 °C. Cells were homogenized by ultrasound sonication (cycle: 5 s pulse/55 s pause, 15 cycles, 20 kHz, 20 % amplitude) maintaining 4 °C. Lysate was separated by centrifugation 12000×g for 40 min at 4 °C. Heteropolysaccharide-degrading enzymes were purified combining nickel affinity and anion exchange chromatography techniques. Enzymes were purified using BioLogic DuoFlow 40 (Bio-Rad) low pressure chromatography system at RT. 1 mL Bio-Scale Mini Profinity IMAC (Bio-Rad) column was used for nickel affinity purification using 20 mM TRIS-HCl pH 7/RT buffer supplemented with 250 mM NaCl. Enzymes were binding to resin in presence of 10 mM of imidazole, unspecifically bounded proteins were washed with 25 mM of imidazole, while proteins were eluted by imidazole gradient from 25 to 250 mM of imidazole at flowrate of 1 mL/min. UNO Q1 or UNO Q6 (Bio-Rad) columns were used for anion exchange purification using 20 mM TRIS-HCl buffer adjusting buffer pH/RT according to protein isoelectric point. Proteins

were eluted by NaCl gradient from 0 to 1 M of NaCl at flowrate of 3 mL/min. If needed, protein solubility during purification was maintained by (2)4-6 M of urea. Purified protein samples were dialysed against 50 mM TRIS-HCl (pH 7/60 °C) or 50 mM MES-NaOH (pH 6/60 °C) buffers. Urea was dialysed from protein samples stagewise – decreasing urea concentration by 2 M/dialysis stage. His-tag was removed by proteolysis using Thrombin Cleavage Capture Kit (Novagen). Recombinant PL47 secretory production by *P. pastoris* SMD1163 was performed at 1 L scale. Cultural fluid from yeast cells was separated by centrifugation 7000×g for 15 min at 4 °C, then concentrated and dialysed against 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 7/60 °C). Enzyme purity and stability were analysed by SDS-PAGE. Enzyme activity was determined by starch and pectin zymography. Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) was used for protein concentration determination. Pure enzyme concentrations were determined spectrophotometrically at 280 nm of wavelength using protein extinction coefficients for protein concentration estimation.

5. Characterization of AmyA1 and PL47 properties

Quantitatively amylase/pullulanase and pectinase enzymatic activity was evaluated incubating enzymatic reaction for 10 min at 60 °C with dinitro-salicylic acid (DNS) method (18) spectrophotometrically estimating concentration of reducing sugars. Pullulanolytic activity was evaluated in 200 µL 50 mM MES-NaOH buffer (pH 6/60 °C) using 0.24 % (w/v) pullulan (Sigma-Aldrich) and 2 µg pullulanase. Pectinolytic activity was evaluated in 215 µL 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 7/60 °C) using 1.4 % (w/v) polygalacturonic acid (Alfa Aesar) and 9,45 µg pectinase. One unit (U) of pullulanase or pectinase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 µmol reducing sugars (with maltotriose or monogalacturonic acid as the standard) per min under the assay conditions specified.

Characterized enzymes enzymatic reaction product variety according to chain length as well as relative concentration was estimated by thin-layer chromatography using Silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck). Chromatography was performed following general recommendation (19). Visualization of AmyA1 enzymatic reaction products was performed with 20 % (v/v) sulfuric acid in ethanol solution. 3 % (w/v), while phosphomolybdic acid solution in 10 % (v/v) sulfuric acid in ethanol was used for visualization of PL47 enzymatic reaction products.

Temperature influence on rAmyA1 and rPL47 activity was evaluated in 4-95 °C interval at pH (6), 7, (8). Thermostability of characterized enzymes

was analysed incubating protein samples for 30, 60, 210, 270, 340 and 960 min at (50), 60, 70, 80 and (90) °C, pH 6 and 7. Influence of 1 and 10 mM calcium ions for rAmyA1 thermostability was also evaluated. Evaluation of pH influence on AmyA1 and PL47 activity was performed using different buffers pH 4-10 at 60 °C. Influence of pH on characterized enzymes stability was evaluated after incubating protein samples pH 4-10 for 60 min at 60 °C. Effect of metal ions as well as different biotechnologically relevant reagents on AmyA1 and PL47 activity was determined after 60 min incubation at 60 °C, pH 6 or 7.

Substrate specificity of AmyA1 and PL47 was determined using different substrates incubating enzymatic reactions for 10 as well as 960 min at 60 °C, pH (6), 7, (8). Influence of AmyA1 activity was estimated using pullulan from *Aureobasidium pullulans* (Sigma-Aldrich), glycogen from bovine liver (Sigma-Aldrich) and amylopectin (Carl Roth) as substrates, while PL47 activity was estimated using polygalacturonic acid, pectin and carboxymethyl cellulose (Fluka), sodium alginate (Carl Roth), xylan from *Betula pendula* (Sigma-Aldrich) as well as xylan extracted from apple pomace, that was pre-treated with 10 U/100 mL laccase from *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich). Influence of 1 and 10 mM calcium ions for rAmyA1 substrate specificity was also evaluated. rPL47 enzymatic activity on PGA was also estimated spectrophotometrically at 235 nm of wavelength. Evaluation of AmyA1 and PL47 activity modulation possibilities was performed analysing enzymatic activity of characterized enzymes under suboptimal reaction conditions in different combinations. Recombinant AmyA1 and PL47 were immobilized on carriers: Sepabeads EC-HA/M (Resindion) (20), Sepabeads EC-P/M (Resindion) (21) and calcium alginate (Carl Roth) (22). Immobilization effect on enzyme activity as well as substrate specificity and thermostability was determined as previously stated.

6. *Geobacillus* sp. PA-3 genome sequencing, annotation and characterization

Geobacillus sp. PA-3 was cultivated in Difco Nutrient Broth (BD Diagnostics) 200 rpm at 60 °C for 8 h. Total DNA was extracted using GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Total DNA integrity was estimated by agarose gel electrophoresis. Concentration of DNA was estimated spectrophotometrically at 260 nm of wavelength. A draft of whole-genome sequence was obtained using the next-generation sequencing paired-end 100 cycles sequence reads were generated using Illumina HiSeq2500 system (BaseClear). FASTQ sequence reads were generated using IlluminaCasava 1.8 pipeline. Reads were assembled using SPAdes Genome

Assembler 3.1 software. Automated genome annotation was carried out by using GenDB software (23). The direct manual genome annotation was performed using InterProScan (13), Pfam 28 (14) and NCBI CCD 3 (24) servers. Determined genome sequence was compared using EDGAR 8 software (25) with the genome sequences of other *Geobacillus* species strains, including the phylogenetically closest strains. *Geobacillus* sp. PA-3 genome graphical comparison with phylogenetically closest strains representation was prepared using GView 1.7 (26). Carbohydrate catabolism enzymes in *Geobacillus* sp. PA-3 genome were identified using dbCAN server (12) on the basis of CAZy database (27). Horizontal gene transfer gene regions in *Geobacillus* sp. PA-3 genome were identified and annotated using IslandViewer 4 (28) and NCBI BLAST (11) servers.

7. Characterization of operonic organization of AmyA1 homologue and PL47 genes

Characterization of operonic organization of AmyA1 homologue gene and PL47 gene was based on *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 genome annotation results. Promoters predicted by BPROM Softberry (29) – terminators FindTerm Softberry (29) and ARNold (30). Gene attribution to operons estimated using FGENESB Softberry (29) and MicrobesOnline (31) as well as Prokaryotic Operon Database (32).

8. Statistical analysis

All measurements were repeated $n=3-12$. Average means are presented \pm standard deviation. Data were considered as statistically significant for p values of 0.05 or more.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Starch and pectin degrading enzyme selection

Samples of fertile soil from Botanical Garden of Vilnius University (Vilnius, Lithuania): D1; D2; D3; D4; D5; D6; PEK (March, 2010) and grasslands near to Rubinavas village (Šilales district, Lithuania): A1; A2; DSP1; IK; J1; J2; J3; J4; KO1; KO2; KO3; KO4; KO5; Komp; OP; poL; poLLac; PS1; PS2; PSP1; RP1; RP2 (November, 2011) we collected in order to select polysaccharide-degrading enzymes. Enzyme screening strategy consisted of two simultaneously exploited approaches – enzyme detection in protein extracts obtained from enrichment cultures as well as detection in protein extracts directly obtained from soil samples. Detected enzymes were identified by mass spectrometry. Enzyme screening strategy was validated by detection of enzyme activity *in vitro*.

Screening of microorganisms (using 1 g of soil sample for inoculation), which are able to utilize starch or/and pectin, was successfully performed exploiting culture enrichment approach. Starch (1 % (w/v)), pectin 0.375 % (w/v) or apple pomace (1 % (w/v)) serving as sole organic carbon as well as energy source ensured selective conditions of liquid media used for culture enrichment. Utilization of polysaccharide was considered as relevant if enrichment culture biomass growth increase was reaching $\geq 2.5 \times 10^3$ cfu/mL.

Enrichment cultures from soil samples A1 and RP2 were obtained as a result of starch utilization at pH 6 (Table 1). Pectin as well as pectin from apple pomace at pH 7 were utilized by microorganisms from enrichment cultures: DSP1; PEK; poL; PS2 and PSP1, while microorganisms from enrichment cultures KO4 and KO5 demonstrated ability to utilize pectin only at pH 8. Enrichment cultures Komp and OP were utilizing only pectin from apple pomace at pH 6 and 7. Only enrichment culture PEK were utilizing pectin as well as pectin from apple pomace at pH 7 and 8 (Table 1).

Starch zymography enabled to detect two thermoactive as well as thermo-stable amylolytic enzymes ~83 kDa and ~110 kDa in extracellular fraction of enrichment cultures A1 and RP2 (Fig. 1). Zymography using polygalacturonic acid as a substrate enabled to detect pectinolytic enzymes in extracellular protein fraction of nine enrichment cultures (Table 1). Enrichment cultures Komp, OP, PEK, poL, PS2 and PSP1 produced ~50 kDa pectinase at comparatively high yield (Fig. 2). Three pectinolytic enzymes: ~30, ~55(60) as well as ~85 kDa were detected in extracellular fraction of enrichment cultures KO4 and KO5. Microorganisms from enrichment culture DSP1 were producing highly thermoactive ~50 and ~75 kDa pectinases at comparatively low yield.

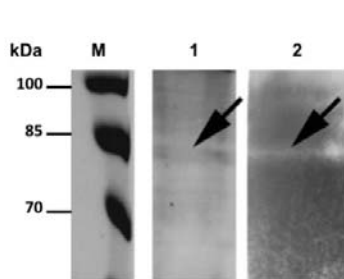


Fig. 1. Native AmyA1 activity detection and evaluation of native enzyme production efficiency in sample of extracellular proteins of thermophilic starch enrichment culture A1. Lanes: 1 – SDS-PAGE profile of enrichment culture A1 extracellular proteins; 2 – starch zymogram; M – marker PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Arrows indicate native AmyA1.

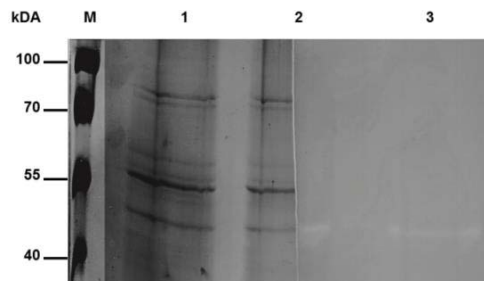


Fig. 2. Native PL47 activity detection and evaluation of native enzyme production efficiency in sample of extracellular proteins of thermophilic enrichment culture PEK. Lanes: 1 – SDS-PAGE profile of enrichment culture PEK extracellular proteins; 2 – native PL47 identification in SDS-PAGE profile of enrichment culture PEK extracellular proteins by direct comparison with PL47 activity zone PEKpek; 3 – PGA zymogram visualizing PEKpek activity zone; M – marker PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Detected polysaccharide-degrading enzymes were identified by mass spectrometry in total protein fraction samples directly extracted from zymograms. Enzymatic activity was putatively attributed to five identified proteins from eight total protein fraction samples analysed with mass spectrometry (Table 1). Protein polypeptide was considered as identified if at least two oligopeptides marking protein polypeptide sequence were detected at high reliability (33). Overall numbers of reliably identified polypeptides in total protein fraction samples were varying from 9 to 37 (Table 1). All identified polypeptides were analysed *in silico* determining sequence homology to biochemically characterized protein as well as conserved sequence elements. Protein oligomerization possibility was also evaluated. Prediction of signal peptide sequence as also performed in context of all identified polypeptides.

Amylolytic activity detected in extracellular fraction of A1 and RP2 was attributed to different proteins (Table 1). AmyA1 activity zone was attributed to type I pullulanase, that is homologous (83 % similarity) to characterized type I pullulanase from *G. thermoleovorans* US105 (EMBL CAC85704.1 (34)). RP2amy activity zone was attributed to hypothetical protein designated hGK2898, that is almost identical (99 % similarity) to hypothetical protein GK2898 from *G. kaustophilus* HTA426 (DDBJ BAD77183.1). Analysis of mass spectrometry data enabled to attribute detected pectinolytic activity to three different proteins (Table 1). DSDpek-2, KO5pek-2, PEKpek and

Table 1. Zymographic detection and identification with mass spectrometry of enzymes demonstrating amylolytic and/or pectinolytic activity extracted from enrichment cultures

Enrichment culture*	Zones of amylolytic** (amy) or pectinolytic*** (pek) activity detected by zymography	Number of proteins identified with mass-spectrometry****	Protein demonstrating enzymatic activity in zymogram (abbreviation of target protein)	Molecular mass of protein demonstrating enzymatic activity, M _r	Number of identified oligopeptides/ Cover, %/ Score
A1 (pH 6; starch)	A1 amy zone at ~83 kDa	37	I type pullulanase homologous to geobacilli putative pullulanases (AmyA1)	81698	3/4/60
DSP1 (pH 7; pectin, apple pomace)	DSDpek-1 zone at ~75 kDa	33	protein homologous to hypothetical conservative protein DI43_5 from <i>Geobacillus</i> sp. G11MC16 (P11)	17161x4*****	4/35/161
KO4 (pH 8; pectin, apple pomace)	DSDpek-2 zone at ~50 kDa	27	pectate lyase homologous to pectate lyase from <i>Bacillus</i> sp. TS47 (PL47)	50197	8/19/1578
	KO4pek-1 zone at ~85 kDa	-			
	KO4pek-2 zone at ~55 kDa	-			
KO5 (pH 8; pectin, apple pomace)	KO4pek-3 zone at ~30 kDa	-			
	KO5pek-1 zone at ~85 kDa	9	pectinolytic activity was not attributed to any protein by bioinformatic analysis of reliably identified proteins	-	
	KO5pek-2 zone at ~60 kDa	32	pectate lyase homologous to pectate lyase from <i>Bacillus</i> sp. TS47 (PL47)	50197	11/33/429
Komp (pH 6,7; apple pomace)	KO5pek-3 zone at ~30 kDa	17	protein homologous to hypothetical protein GWCH70_0582 from <i>Geobacillus</i> sp. WCH70 (P10)	13819x2	6/27/122
	Kompepek zone at ~50 kDa	-			

OP (pH 6, 7; apple pomace)	OPpek zone at ~50 kDa	-				
PEK (pH 7, 8; pectin, apple pomace)	PEKpek zone at ~50 kDa	21	pectate lyase homologous to pectate lyase from <i>Bacillus</i> sp. TS47 (PL47)	50197		204/44/11963
poL (pH 7; pectin, apple pomace)	poLpek zone at ~50 kDa	-				
PS2 (pH 7; pectin, apple pomace)	PS2pek zone at ~50 kDa	14	pectate lyase homologous to pectate lyase from <i>Bacillus</i> sp. TS47 (PL47)	50197		15/27/395
PSP1 (pH 7; pectin, apple pomace)	PSP1pek zone at ~50 kDa	-				
RP2 (pH 6; starch)	RP2amy zone at ~110 kDa	22	hypothetical protein homologous to hypothetical protein GK2898 from <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 (hGK2898)	53056x2		8/23/546

*abbreviation of enrichment culture is presented outlining culture pH and compound that served as carbon source;
**starch zymography was used for amylolytic activity detection of enzymes extracted from enrichment culture fluid after cultivation under pH 6 at 60°C applying media supplemented with starch;
***if not stated otherwise, PGA zymography was used for pectinolytic activity detection of enzymes extracted from enrichment culture fluid after cultivation under pH 7 at 60°C applying media supplemented with pectin;
****protein was considered positively identified if ≥ 2 unique peptides within a single protein were reliable detected (38);
*****₃,x4⁺— enzyme detected as homotetramer, respectively ₃,x2⁻ – homodimer.

PS2pek activity zones were attributed to identified pectate lyase, that is almost identical (99 % similarity) to characterized pectate lyase PL47 secreted by *Bacillus* sp. TS47 (EMBL BAB40336.1 (9)). Pectinolytic activity DSDpek-1 and KO5pek-3 zones were attributed to two low molecular weight pectinases designated P11 and P10, respectively, that are homologous to hypothetical proteins annotated in *Geobacillus* genomes. Protein P11, that is almost identical (99 % similarity) to hypothetical protein DI43_5 from *Geobacillus* sp. G11MC16 (GenBank EDY066831.1), was active as homotetramer. Protein P10, that is almost identical (99 % similarity) to hypothetical protein GWCH70_0582 from *Geobacillus* sp. WCH70 (GenBank EDY066831.1) and also homologous (68 % similarity) to polysaccharide-degrading amylase from *Bacillus thermoamylovorans* 1A1 (EMBL CEE03027.1), was active as homodimer.

Total protein extracts from all soil samples used for inoculation of enrichment cultures were extracted in order to directly detect starch or pectin degrading enzymes produced by soil microorganisms. Using for protein extraction (7) cooling at ~4 °C as well as stable pH ensured prevention of protein denaturation. Performed protein extraction from soil samples enabled successfully to prepare total protein extract from all samples. Protein amount in obtained extracts varied from 387 to 1608 µg.

Amylolytic activity was detected in RP2 sample protein extract, while pectinolytic enzymes were identified in D4, IK and RP1 sample protein extracts (Table 2). Detected enzymes were identified with mass spectrometry. Overall numbers of reliably identified polypeptides in total protein fraction extracted from zymogram samples were varying from 2 to 44 (Table 2). Identified polypeptides were analysed *in silico*. Enzymatic activity was putatively attributed to four identified proteins from seven total protein fraction samples analysed with mass spectrometry (Table 2). RP2amy activity zone was attributed to hypothetical protein hGK2898 (Table 2), active as homodimer, that was already detected and identified in RP2 soil sample (Table 1). Pectinolytic activity of proteins directly extracted from IK soil sample was attributed to three enzymes (Table 2). IKpek-2 and IKpek-3 activity zones were attributed to homologous proteins designated X17 and X16, respectively, that are homologous to putative polysaccharide-degrading amylases annotated in *Geobacillus* genomes. Protein X17 is almost identical (99 % similarity) to putative amylase GTNG_3182 from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (GenBank ABO68527.1). Protein X16, that is almost identical (99 % similarity) to putative amylase GWCH70_3172 from *Geobacillus* sp. WCH70 (GenBank ACS25830.1), was active as homodimer.

Table 2. Zymographic detection and identification with mass spectrometry of enzymes demonstrating amylolytic and/or pectinolytic activity extracted from soil samples

Soil sample	Zones of amylolytic** (amy) or pectinolytic*** (pek) activity detected by zymography	Number of proteins identified with mass-spectrometry****	Protein demonstrating enzymatic activity in zymogram (abbreviation of target protein)	Molecular mass of protein demonstrating enzymatic activity, M _r	Number of identified oligopeptides/Cover, %/Score
D4	D4pek zone at ~35 kDa	2	pectinolytic activity was not attributed to any protein by bioinformatic analysis of reliably identified proteins	-	
IK	IKpek-3 zone at ~80 kDa	34	hypothetical protein homologous to polysugar degrading enzyme GWCH70_3172 from <i>Geobacillus</i> sp. WCH70 (X16)	37687x2****	11/18/141
	IKpek-2 zone at ~40 kDa	29	hypothetical protein homologous to polysugar degrading enzyme GTNG_3182 from <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2 (X17)	37646	8/15/153
	IKpek-1 zone at ~25 kDa	41	hypothetical protein homologous to hypothetical protein GTNG_0378 from <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2 (P12)	22498	4/12/54
RP1	RP1pek-2 zone at ~50 kDa	7	pectinolytic activity was not attributed to any protein by bioinformatic analysis of reliably identified proteins	-	
	RP1pek-1 zone at ~35 kDa	4		-	
RP2	RP2amy zone at ~110 kDa	44	hypothetical protein homologous to hypothetical protein GK2898 from <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 (hGK2898)	53056x2	7/5/67

*starch zymography under pH 6 at 60°C was used for amylolytic activity detection of enzymes extracted from soil samples;

**PGA zymography under pH 7 at 60°C was used for pectinolytic activity detection of enzymes extracted from soil samples;

***protein was considered positively identified if ≥2 unique peptides within a single protein were reliable detected (38);

****,x2'- enzyme detected as homodimer.

Pectinolytic activity IKpek-1 zone was attributed to pectinase designated P12, that is almost identical (99 % similarity) to hypothetical protein GTNG_0378 from *G. thermodenitrificans* NG80-2 (GenBank ABO65760.1).

Enzyme screening strategy was based on minimization of possible loss of native polysaccharide-degrading enzymes during extraction as well as enzyme detection and identification (35), as typically enzymes are produced by microorganisms in comparatively low amount (36, 37). Implementation of screening strategy minimization was also necessary as it was also aimed to detect starch or pectin degrading enzymes from uncultivated microorganisms. Detection applying zymography and identification of unpurified native enzymes as well as attribution of identified proteins to detected activity after in-depth *in silico* analysis, however, not directly were methodology factors that could affect overall precision of enzyme screening strategy. Starch or pectin degrading enzyme selection was validated by performing enzymatic activity *in vitro* confirmation of detected and identified enzymes (Table 1 and 2).

Selected polysaccharide-degrading enzymes were cloned into pET series protein expression vector with T7 promoter. Total DNA extracts from enrichment cultures as well as soil samples were used as templates for target gene amplification. Target genes were cloned without coding sequences of predicted signal peptide. Expression constructs were validated by sequencing. Successfully cloned target enzymes were expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) following general recombinant protein heterologous overexpression strategy under typically recommended expression parameters.

Recombinant starch or pectin degrading enzymes were successfully overexpressed. PL47, hGK2898 and P10 were expressed at high yield, AmyA1, P11 and P12 – at moderate yield, while X17 expression yield was low (Table 3). AmyA1 and hGK2898 remained soluble in expression strains cytoplasm. Pectinases P11 and P12 were moderately soluble in expression strains cytoplasm, while PL47, P10 and X17 were only detected in as insoluble in expression strains cytoplasm (Table 3.). Soluble expressed recombinant enzymes were purified to near homogeneity successfully combining nickel affinity and anion exchange chromatography techniques. In order to confirm enzymatic activity of recombinant enzymes zymography was applied using starch or polygalacturonic acid as substrates. Enzymatic activity confirmation was performed using 50 µg of recombinant pure enzyme for zymography.

Recombinant AmyA1 and hGK2898 amylolytic activity was successfully confirmed *in vitro*. hGK2898 was active only as homodimer. Recombinant PL47 and P12 pectinolytic activity was successfully confirmed *in vitro* as well, while recombinant P10, P11 and X17 were not enzymatically active under

Table 3. Cloning of putative amylases and pectinases determined from enrichment cultures or soil samples and enzymatic activity confirmation of cloned enzymes

Protein/ Gene length, bp	Gene amplification primers/Length of amplificon, bp	Gene cloning primers/Length of amplificon used for cloning, bp	Recombinant protein expression efficiency*/Localization of target protein**	Enzymatic activity of recombinant enzyme***
AmyA1, 2181	AmyA1-F/R; 2196	GEOPUL-F/R; 2194	medium efficiency/lysate soluble protein fraction	amylolytic activity
PL47, 1326	P-1/2/3-PL47-F/R; 1344	PL47-s-F2 and PL47-R, 1271 (PL47 gene sequence without signal peptide encoding sequence)	high efficiency/lysate soluble protein fraction	pectinolytic activity
hGK2898, 1521	RP2-2F/2R, 1525	RP2-2-F2 and RP-2-R, 1476 (hGK2898 gene sequence without signal peptide encoding sequence)	high efficiency/lysate soluble protein fraction	amylolytic activity of homodimer
P10, 387	P10-F/R, 406	P10-s-F2 and P12-R, 351 (P10 gene sequence without signal peptide encoding sequence)	high efficiency/lysate insoluble protein fraction	enzymatic activity not detected
P11, 483	P11-F/R, 505		medium efficiency/lysate soluble and insoluble protein fractions	enzymatic activity not detected
P12, 561	P12-s-F2 and P12-R, 525 (P12 peptide encoding sequence)	P12 gene sequence without signal	medium efficiency/ lysate soluble and insoluble protein fractions	pectinolytic activity
X17, 1008	X17-F/R, 1029	X17sigft-F and X17-R, 951 (X17 gene sequence without signal peptide encoding sequence)	low efficiency/ lysate insoluble protein fractions	enzymatic activity not detected

*heterologous expression efficiency of recombinant protein reached under initial expression condition was evaluated with SDS-PAGE using 50 µg of total protein extract for electrophoretic analysis;

**target protein localization was evaluated with SDS-PAGE using total protein extracts of expression strains lysate soluble and insoluble protein fractions as well as expression strains culture concentrated secretome protein extract;

***enzymatic activity was evaluated using starch and PGA zymography at 30 °C and 60 °C using 50 µg of purified recombinant enzyme.

activity assay conditions. Enzyme screening strategy was independently validated by successful detection and identification of native pectate lyase PL47 purified from extracellular protein fraction of enrichment cultures PEK and PS2 (Fig. 2).

Starch and pectin degrading enzyme selection results enabled to prioritize detected and identified AmyA1 amylase/pullulanase and PL47 pectinase/pectate lyase for detailed characterization and biotechnological potential evaluation. In order to describe native PL47 production control as well as genomic and operonic organization of gene encoding this pectate lyase genome sequencing and annotation of PA-3 strain was prioritized. PA-3 was isolated (38) from PEK soil sample. According to 16S rRNA gene phylogenetic analysis PA-3 strain belongs to *Geobacillus* genus. PA-3 produces secreted thermoactive/thermostable pectate lyase which molecular weight corresponds to molecular weight of native PL47 (38).

2. Thermoactive and thermostable AmyA1 pullulanase

Pullulanase AmyA1 gene was 2181 bp in length (GenBank accession no: KF192948.1) coding protein of 726 amino acids in length (GenBank accession no: AGW21593.1). Molecular weight was calculated to be 81.7 kDa. Enzyme gene was amplified using total DNA extract from enrichment culture of A1 soil sample as template. AmyA1 are homologous to type I pullulanases from *Geobacillus*. Similarity of 99.2 and 99.3 % was determined when AmyA1 sequence was compared with putative pullulanases from *G. thermodenitrificans* NG80-2 (GenBank ABO68076.1) and *Geobacillus* sp. G11MC16 (GenBank EDY05272.1). AmyA1 sequence was 82.9 % similar to characterized PULU105 pullulanase from *G. thermoleovorans* US105 (EMBL CAC85704.1 (34)). Conserved sequence motifs and regions indicates that AmyA1 is an active glycoside hydrolase (identified catalytic residues: D280, E286 and E306) of CAZy family GH13 subfamily 14 (pfam00128 (14)). Family GH13 consists of pullulanases as well as amylolytic glycoside hydrolases (27). AmyA1 conservative motifs also enable to predict that AmyA1 is not secreted (signal peptide was not identified in AmyA1 sequence) type I calcium-dependent (identified calcium ion coordinating residues: D280, E286 and E306) pullulanase.

Recombinant AmyA1 (rAmyA1) was successfully soluble expressed by *E. coli* BL21 (DE3) at moderate yield. Obtained yield as well as observed solubility of recombinant protein corresponds to typical results of recombinant pullulanases heterologous overexpression (39, 40). rAmyA1 molecular weight corresponded to calculated, while oligomerization of recombinant

protein as typical for type I pullulanases from *Bacillus* and *Geobacillus* (40) was not determined. Recombinant pullulanase was purified 29-fold to near homogeneity successfully combining nickel affinity and anion exchange chromatography techniques. Purification was performed using buffers supplemented with 0.5 mM EDTA in order to inhibit expression strain proteases. Approximately 2.1 mg of purified AmyA1 pullulanase with a specific activity of 134.3 U/mg was obtained.

rAmyA1 was active in the temperature range of 4-95 °C. Optimum temperature was determined to be 60 °C with 87.11 % and 81.36 % of activity at 50 and 70 °C, respectively (Fig. 3). 13.94 and 9.45 % of activity were detected at 4 and 95 °C, respectively. AmyA1 was effectively active (≥ 40 % activity) in temperature range 40-80 °C, what characterizes AmyA1 as pullulanase with one of the widest temperature range observed (41). The curve of temperature influence on rAmyA1 pullulanolytic activity measured at pH 6 and 7 demonstrated slightly sharper decrease of enzymatic activity above 60 °C (Fig. 3), as typical characteristic for type I pullulanases from *Geobacillus* as well as other thermophiles (41, 42). Observed AmyA1 temperature optimum confirmed thermoactivity of characterized type I pullulanase, however AmyA1 temperature optimum is one of the lowest between type I pullulanases from thermophiles (41). Characterized PULUS105 pullulanase from *G. thermoleovorans* US105 was most active at 75 °C (34). rAmyA1 was thermostable at 60 °C for 340 min showing 84.54 % residual activity (Fig. 4). At 70 °C, only 24.73 % of activity was detected after incubation for 30 min. The enzyme was not stable at 80 °C, complete inactivation was recorded after 15 min of incubation (data not shown). It

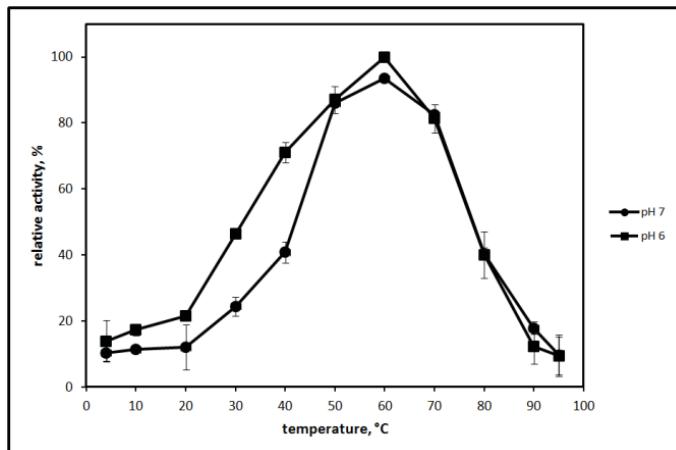


Fig. 3. Effect of temperature on AmyA1 pullulanolytic activity. The effect was assayed at temperatures ranging from 4 to 95°C under pH 6 and 7. 100 % specific activity – 134.3 ± 0.003 U/mg.

should be noted that 1 and 10 mM of Ca^{2+} had no effect on thermostability of rAmyA1 (Fig. 4). This is in contrast with PULUS105 as well as most of thermoactive/thermostable pullulanases which typically require Ca^{2+} for its stability at high temperatures (34). Thermostability of AmyA1 was moderate if compared with characterizes thermoactive type I pullulanases (42, 43). PULUS105 pullulanase from *G. thermoleovorans* US105 had half-life duration of 4 hours at 70 °C (34).

Pullulanolytic activity of rAmyA1 was observed pH 4-10 (Fig. 5). Optimum pH was determined to be pH 6 – determined pH optimum is typical for type I bacterial pullulanases including those of *Geobacillus* (41). AmyA1 was demonstrating slight shift to more alkaline part of pH range. ~26 % of rAmyA1 activity was retained at pH 4 and 10 (Fig. 5). Characterized pullulanase was effectively active (≥ 40 % activity) in pH range of pH 5-9 demonstrating one of the widest pH range of activity determined for characterized pullulanase from thermophiles (42). Pullulanase AmyA1 was stable in pH range of pH 6-8 for 60 min at 60 °C. 12-19 % of activity was retained at pH 4-5 and 9-10 (Fig. 6). rAmyA1 was slightly more stable in alkaline part of pH range, what corresponds to observed AmyA1 higher enzymatic condition under slightly alkaline conditions. Determined AmyA1 higher activity/stability at slightly alkaline conditions was not expected as most of characterized pullulanases demonstrating activity pH optimum pH 6-7 typically tend to be more active at slightly acidic conditions (41, 42).

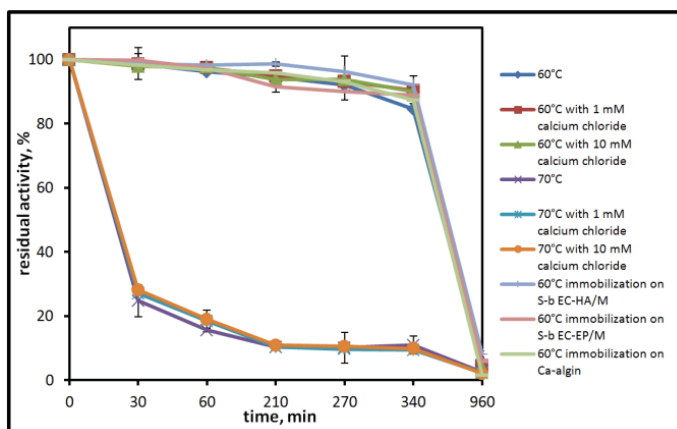


Fig. 4. Effect of temperature on AmyA1 stability and influence of calcium ions or immobilization on pullulanases thermostability. The thermostability of recombinant pullulanase free or immobilized was investigated after incubation of the enzyme solutions in absence of a substrate for 30, 60, 210, 270, 340 and 960 min at 60 or 70°C under pH 6. Influence of calcium ion to AmyA1 thermostability was investigated by adding 1 or 10 mM of calcium chloride to enzyme solution. 100 % residual activity – 134.3 ± 0.003 U/mg. Abbreviations: S-b EC-HA/M – Sepabeads EC-HA/M immobilization support, S-b EC-EP/M – Sepabeads EC-EP/M immobilization support, Ca-algin – calcium alginate.

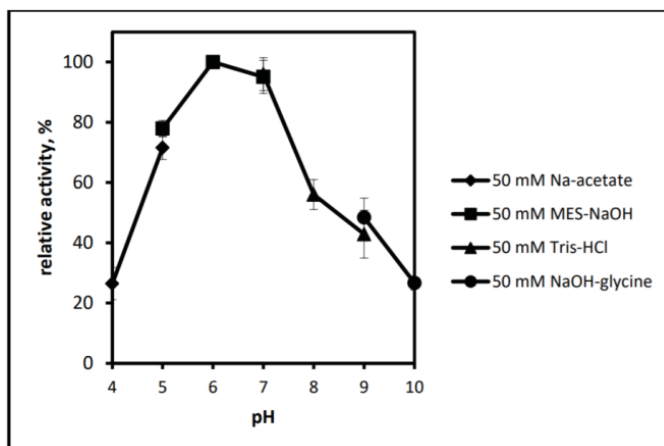


Fig. 5. Effect of pH on AmyA1 pullulanolytic activity. The effect was assayed using different buffers at 60°C for 10 min at pH ranging from pH 4 to 10. 100 % specific activity – 134.3 ± 0.003 U/mg.

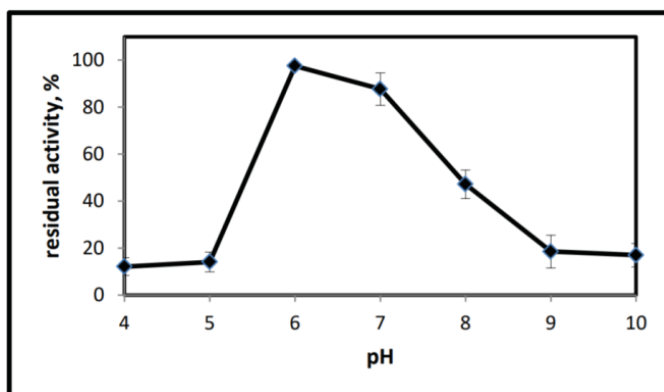


Fig. 6. Effect of pH on AmyA1 stability. The effect was assayed at 60°C for 10 min at pH ranging from pH 4 to 10. Residual AmyA1 pullulanolytic activity at pH 6 was 97.55 % – 131 ± 0.004 U/mg.

The effects of different metal ions and other reagents on the recombinant pullulanase are shown in Table 4 and 5, respectively. The presence of Na⁺ and K⁺ at a concentration of 1 and 50 mM did not affect activity of the recombinant pullulanase as typical for glycoside hydrolases (44). Addition of Li⁺, Ba²⁺ and Ca²⁺ had also no effect. Typically, type I pullulanases are significantly stimulated *in vitro* by Ca²⁺ ions (45). Pullulanolytic activity of PULUS105 pullulanase from *G. thermoleovorans* US105 was increased by 44 % in presence of Ca²⁺ ions. Calcium ions typically has stimulating effect on activity of thermoactive type I pullulanases as a result of calcium ion role in structural stabilization of pullulanase structural integrity, especially, at high temperatures (46). Addition of divalent cations: Co²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Sn²⁺, Zn²⁺ as well as trivalent cation Fe³⁺, at a concentration of 1 mM, reduced the pullulanase activity by more than 44 %. Outlined metal ions typically reduced enzymatic activity of pullulanases (46). Divalent cations Mg²⁺ and Mn²⁺, known to have stimulating effect on pullulanases (41), as well as Brij 35, Brij 58 and glycerol (at a concentration of 0.1% (v/v)) had a stimulating effect on AmyA1 enzymatic activity. Incubation in the presence of surfactants Tween-20, Tween-40, Tween-60 and Tween-80 as well as Triton-X100 reduced activity

Table 4. Influences of metal ions on AmyA1 pullulanolytic activity

Metal salt	Concentration	Relative activity, %
Control	-	100*
LiCl	1 mM	100.37 ± 0.46
NaCl	1 mM	103.99 ± 1.04
	50 mM	99.65 ± 1.93
MgCl ₂	1 mM	113.82 ± 0.53
KCl	1 mM	101.63 ± 2.41
	50 mM	99.07 ± 1.79
CaCl ₂	1 mM	102.93 ± 0.19
	10 mM	99.50 ± 2.02
MnCl ₂	1 mM	139.48 ± 1.97
FeCl ₃		22.43 ± 1.79
CoCl ₂		55.13 ± 1.87
NiCl ₂		41.95 ± 2.48
CuCl ₂		18.45 ± 2.31
ZnCl ₂		16.16 ± 1.63
SnCl ₂		52.92 ± 3.77
BaCl ₂		101.26 ± 0.25

*100 % AmyA1 specific activity at optimal reaction conditions – 134.3 ± 0.003 U/mg.

of AmyA1. Enzyme activity was completely eliminated by SDS and 1 % Triton-X305. Typically, pullulanases are less active in presence of detergents than AmyA1 (39). Out of reducing reagents, only DTT had positive effect on AmyA1 activity, while both TCEP and 2-mercaptoethanol had no effect on AmyA1 enzymatic activity. Reductors typically stimulate pullulanases activity (47). AmyA1 had exceptional stability during incubation in presence of 0.1 and 4 M urea as well as 0.1 M guanidine-HCl when compared with other type I pullulanases from thermophiles (48). PULUS105 pullulanase from *G. thermoleovorans* US105 demonstrated only 10 % of activity in presence of 10 mM urea (34). Solvents reduced AmyA1 activity moderately. 0.1 and 1 % (v/v) glycerol had no significant effect on characterized pullulanase activity. Comparatively high activity in presence of most tested reagents outlines AmyA1 biotechnological potential.

Pullulanase AmyA1 was active against pullulan, glycogen and soluble starch (Table 6). Outlined substrates have α -1,6 glycosidic linkages in their structure (4). Characterized pullulanase was not hydrolysing amylopectin (data not shown). The highest activity was determined for pullulan, and the lowest activity was observed for starch. Removal of His-tag from the recombinant enzyme enhanced the activity against all substrates, however had no effect on AmyA1 substrate specificity. Although Ca²⁺ did not affect activity of His-tagged AmyA1, it stimulated activity of the enzyme after

Table 5. Influences of different reagents on AmyA1 pullulanolytic activity

Reagent	Concentration	Relative activity, %
Control	-	100*
Dithiothreitol	1 mM	116.36 ± 0.47
Tris(2-carboxyethyl)phosphine		99.62 ± 0.28
β-mercaptoethanol		97.52 ± 3.02
Urea	0.1 M	91.15 ± 0.56
	4 M	88.85 ± 1.74
Guanidine HCl	1 mM	91.50 ± 2.67
SDS	0.1 %	ND**
	1 %	
DMSO	0.1 %	94.63 ± 2.5
	1 %	81.23 ± 3.07
Methanol	1 %	91.51 ± 0.59
	5 %	87.57 ± 0.52
Ethanol	1 %	97.41 ± 0.43
	5 %	91.87 ± 0.9
Ethylene glycol	0.1 %	96.56 ± 1.05
	1 %	95.96 ± 0.92
Glycerol	0.1 %	109.39 ± 0.85
	1 %	98.74 ± 1.06
Triton X-100	0.1 %	95.71 ± 2.91
	1 %	89.85 ± 2.78
Triton X-305	0.1 %	41.74 ± 4.6
	1 %	ND
Tween 20	0.1 %	77.11 ± 1.99
	1 %	70.45 ± 2.04
Tween 40	0.1 %	53.07 ± 2.38
	1 %	45.68 ± 2.82
Tween 60	0.1 %	53.95 ± 1.67
	1 %	52.95 ± 2.6
Tween 80	0.1 %	73.24 ± 3.85
	1 %	51.29 ± 2.42
Brij 35	1 mM	113.11 ± 0.74
Brij 58		112.10 ± 0.49

*100 % AmyA1 specific activity at optimal reaction conditions – 134.3 ± 0.003 U/mg;

**ND – not detected.

removal of His-tag against all substrates. Comparing stimulating effect of 1 mM Ca²⁺ on AmyA1 without His-tag with stimulating effect of 10 mM Ca²⁺ on enzymes activity dependence close to linear was observed (Table 6). Products of enzymatic degradation of polysaccharides used for AmyA1 substrate specificity determination were analysed by TLC (Fig. 7). Results of hydrolysis reaction fractionation by TLC confirmed complete conversion of pullulan to maltotriose by AmyA1, while long chain oligosaccharides were

detected when AmyA1 was hydrolysing glycogen and starch at optimal reaction conditions. Biotechnological potential of AmyA1 was also confirmed by successful enzyme pullulanolytic activity modulation – AmyA1 was able to hydrolyse pullulan to long chained oligosaccharides under suboptimal reaction conditions. Substrate specificity determined for AmyA1 fully confirmed enzymes ability to catalyse hydrolysis only α -1,6 glycosidic linkages, while remaining inert in context of α -1,4 glycosidic linkages. AmyA1 specificity towards α -1,6 glycosidic linkages confirms *in silico* predicted AmyA1 attribution to type I pullulanases (27). Confirmed AmyA1 debranching activity in context of glycogen as well as starch is also typical for type I pullulanases and could be exploited for biotechnology (4).

HIS^+ AmyA1 immobilization stimulated enzymatic activity. Characterized enzyme immobilized on Sepabeads EC-HA/M and Sepabeads EC-EP/M carriers demonstrated activity 27.13 % and 8.43 % higher, respectively. Immobilization on calcium alginate increased AmyA1 activity, however stimulating effect was weak – only 2.4 %. Positive effect, varying between

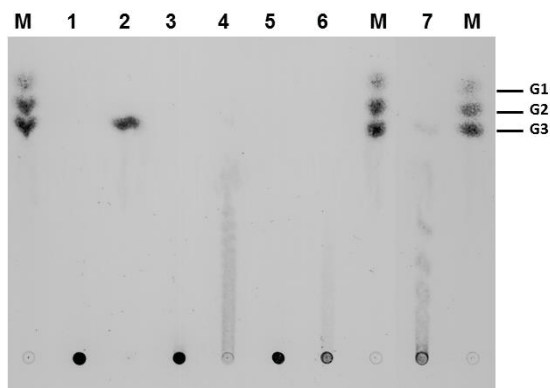


Fig. 7. TLC analysis of AmyA1 hydrolysis products. Lanes (applying 5 μ L of sample): 1 – pullulan*; 2 – products of pullulan hydrolysis** with AmyA1; 3 – glycogen; 4 – products of glycogen hydrolysis with AmyA1 after reaction incubation for 960 min; 5 – starch; 6 – products of starch hydrolysis with AmyA1 after reaction incubation for 960 min; 7 – products of pullulan hydrolysis with 0.8 μ g of AmyA1 after reaction incubation for 5 min under pH 9 at 60°C; M – mixture of standards (10 mg/mL each); G1 – glucose, G2 – maltose, G3 – maltotriose. *10 mg/mL; **applying optimal reaction conditions.

~3-22 %, of His-tag removal on enzymatic activity was also observe while comparing pullulanolytic activity of HIS^+ AmyA1 with HIS^- AmyA1 immobilized on same carrier. Immobilization moderately increased AmyA1 thermostability (Fig. 4). Sharp loss of thermostability of immobilized AmyA1 was observed at temperature above 70 °C. Immobilization effect on thermoactive / thermostable pullulanases was analysed only sporadically, typically immobilization was substantially increasing thermostability of immobilized pullulanases and

was reducing enzymatic activity of these glycoside hydrolases (49, 50). Even though immobilization did not increase AmyA1 thermostability, however characterized pullulanases activity was even stimulated by immobilization what outlined AmyA1 biotechnological potential.

Table 6. Substrate specificity of AmyA1 and influence of Ca²⁺ on enzymatic activity against different substrates

	Substrate	Relative activity, %					
		10 min	960 min	10 min 1 mM CaCl ₂	960 min 1 mM CaCl ₂	10 min 10 mM CaCl ₂	960 min 10 mM CaCl ₂
AmyA1 with His-tag	Pullulan	100*	-**	102.93	-	99.50	-
	Glycogen	34.51	43.59	32.55	43.36	31.92	43.13
	Soluble starch	ND***	21.60	ND	19.73	ND	19.04
AmyA1 after removal of His-tag	Pullulan	105.44	-	113.14	-	121.12	-
	Glycogen	48.13	50.40	53.49	57.08	56.54	59.65
	Soluble starch	ND	24.35	ND	28.78	ND	32.05

*100 % AmyA1 specific activity at optimal reaction conditions – 134.3 ± 0.003 U/mg;

** “-”, – not determined; ***ND – not detected.

3. Thermoactive and thermostable PL47 pectate lyase

Pectate lyase PL47 gene was 1326 bp in length (GenBank accession no: WP_060475609.1) coding protein of 441 amino acids in length (GenBank accession no: KQB94501.1). Molecular weight was calculated to be 50.2 kDa. Enzyme gene was amplified using total DNA extract from *G. thermodenitrificans* DSM 101594 culture as template. PL47 is almost identical (99.8 % similarity) to secreted pectate lyase PL47_{Bsp.TS47} from *Bacillus* sp. TS47 (EMBL BAB40336.1 (9)). Compared enzyme polypeptide sequences differ only by one amino acid – R30 is determined in PL47 sequence, while H30 is found in PL47_{Bsp.TS47} sequence (9). Pectinases homologous to PL47 are not annotated in *Geobacillus* genomes. Putative pectate lyases in *Bacillus* genomes are annotated, however outlined putative enzymes are only 45-60 % similar to PL47. Characterized pectate lyase PL47 was 54.2 % similar to pectate lyase Pel168 (PelA) from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168 (GenBank CAB12585.1 (51)). Conserved sequence motifs and regions indicates that PL47 is an active polysaccharide lyase (identified catalytic residues: K260, R288 and R296) of CAZy family PL1 subfamily 6 (pfam00544 (14)). PL47 conservative motifs also enable to predict that PL47 is secreted (signal peptide was identified in PL47 sequence) calcium-dependent (identified calcium ion coordinating residues: D214, D254 and D258) thermostable and thermoactive pectinase.

Conserved sequence residues: A40, G45, I86, V88, T91, I92, R186, I266, F316 typical for thermoactive and thermostable CAZy PL1 family pectate lyases (52) were confirmed in PL47 sequence. *sp*.PL47 molecular weight was calculated to be 47.3 kDa.

sp.PL47 was heterologously overexpressed by *E. coli* BL21(DE3) at high yield. Unfortunately, recombinant enzyme was observed only in insoluble fraction. PL47 expression optimization was not successful as no tested conditions ensured soluble expression of recombinant enzyme in *E. coli* BL21(DE3). Aggregation completely eliminated PL47 enzymatic activity. Recombinant *sp*.PL47 molecular weight corresponded to calculated. Expressed enzyme was not demonstrating oligomerization. Characterized PL47_{Bsp.TS47} is also monomeric pectate lyase (53). Pectate lyases heterologously overexpressed in *E. coli* as well as *Bacillus* expression strains typically remain soluble in cytoplasm of expression strains (54, 55). Secretory production in bacteria as well as in yeast was also successfully exploited for recombinant pectinase production (56). Recombinant PL47_{Bsp.TS47} was secreted from *Bacillus subtilis* expression strain MI112 at moderate yield (53). PL47 secretory production was successful using yeast expression strains. *Pichia pastoris* SMD1163 and *Kluyveromyces lactis* G7799 at moderate yield secreted recombinant *sp*.PL47 (Table 7). Characterized enzyme expressed in yeast was stable and soluble demonstrating molecular weight corresponding to calculated. PL47 expressed in yeast was not demonstrating oligomerization. Recombinant PL47 secretory production yield directly depended not only from used yeast expression strain, but also from composition of integratory cassette with PL47 gene (Table 7). Outlined results were expected as sequence architecture of integratory cassette directly influences incorporation efficiency of target protein gene into yeast expression strain genome (17). PL47 secretory production yield were comparatively low if compared with native PL47 secretion from *G. thermodenitrificans* DSM 101594 or secretory production in yeast of other characterized pectate lyases (56, 57).

PL47 expressed by *E. coli* BL21(DE3) was solubilized with 6 M urea. Out of tested solubilization agents only 6-8 M urea as well as 0.5 M imidazole was effectively solubilizing recombinant enzyme. Recombinant lyase was purified 22-fold to near homogeneity successfully combining nickel affinity and anion exchange chromatography techniques. Purification was performed using buffers supplemented with 2-6 M urea in order to maintain recombinant enzyme soluble. Dialysis against sample buffer supplemented with 7 mM imidazole was performed after purification. Pure pectinase remained soluble after dialysis. Used imidazole concentration selected as a result of buffer

Table 7. Efficiency of PL47 secretory production in yeast

Expression strain	Integration cassette structure	Secretory production yield*, U/mL	Relative secretory production yield, %
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> DSM 101594 (native PL47 secretion)	-	1.27	28.4
<i>Pichia pastoris</i> SMD1163	optimized PL47 sequence without signal peptide	3.44	76.9
	optimized PL47 sequence without signal peptide with N-terminally attached sequence of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> α factor and sequence recognized by keksin protease (Kex2)	4.47	100
<i>Kluyveromyces lactis</i> G7799	optimized PL47 sequence without signal peptide with N-terminally attached sequence of <i>S. cerevisiae</i> α factor and Kex2 sequence	2.78	62.2
	optimized PL47 sequence without signal peptide with N-terminally attached optimized sequence of <i>S. cerevisiae</i> α factor and Kex2 sequence	1.21	27
	optimized PL47 sequence without signal peptide with N-terminally attached sequence of <i>Kluyveromyces lactis</i> α factor and 2xKex2 sequence	1.14	25.5

*Efficiency of PL47 secretory production was evaluated performing cultivation of indicated strain cultures using 500 mL of media. Evaluation of native PL47 secretion efficiency by *G. thermodenitrificans* DSM 101594 was performed when culture reached OD₆₀₀ 0.7, what corresponds to late exponential culture growth phase. Evaluation of PL47 secretory production in yeast was performed when cultures reached OD₆₀₀ 50-60 (late exponential growth phase).

condition optimization (data not shown) effectively ensured recombinant protein solubility but had not measurable impact on pectate lyase activity (data not shown). Approximately 20.9 mg of purified PL47 pectate lyase with a specific activity of 611.9 U/mg was obtained. Recombinant PL47 expressed in yeast was not purified: PL47 secretory production from *P. pastoris* SMD1163 ensured recombinant enzyme purity near to homogeneity. Secreted pectate lyase was stable and soluble. Functional purity of secreted PL47 was also successfully confirmed. Approximately 3.8 mg of pure PL47 pectate lyase with a specific activity of 593.4 U/mg was obtained by secretory production.

rPL47 was active in the temperature range of 20-80 °C. Determined temperature influence on pectate lyase PGA degradation and pectinolytic activity was corresponding. Optimum temperature was determined to be 60 °C

(Fig. 8a). Observed temperature optimum is 10 °C lower than characterized for native PL47 as well as recombinant PL47_{Bsp.TS47} (53). Characterized pectate lyase from *Bacillus*, homologous to PL47, is most active 50-70 °C (58). Temperature influence on rPL47 activity characteristics corresponds to PL47_{Bsp.TS47} as well as was observed for thermoactive pectate lyases from *Bacillus subtilis* WSHB04-02 and *Bacillus tequilensis* SV11 (59). Characterized PL47 pectate lyase was effectively active ($\geq 40\%$ activity), combining temperature influence on PGA degradation and pectinolytic activity results, in temperature range 30-60(70) °C, at pH 7 and 30(40)-60 °C, at pH 8 (Fig. 8a and 8b), what characterizes PL47 as pectate lyase with one of the widest temperature range observed (27). PL47_{Bsp.TS47} demonstrated effective activity at narrow temperature range – 60-75 °C (53). Pectinases from *Bacillus* typically demonstrate effective activity at temperature range not exceeding 20 °C (60). Temperature influence on enzymatic activity of _{SP}PL47 expressed in yeast was similar (data not shown). His-tag sequence significantly reduced rPL47 thermostability (Fig. 9). _{HIS+SP}PL47 lost more than 40 % of PGA degradation activity after incubation for 60 min at 60 °C. Recombinant enzyme activity was completely eliminated after 60 min incubation at 90 °C (Fig. 9). When His-tag sequence was removed by thrombin proteolysis _{SP}PL47 *in vitro* demonstrated thermostability fully

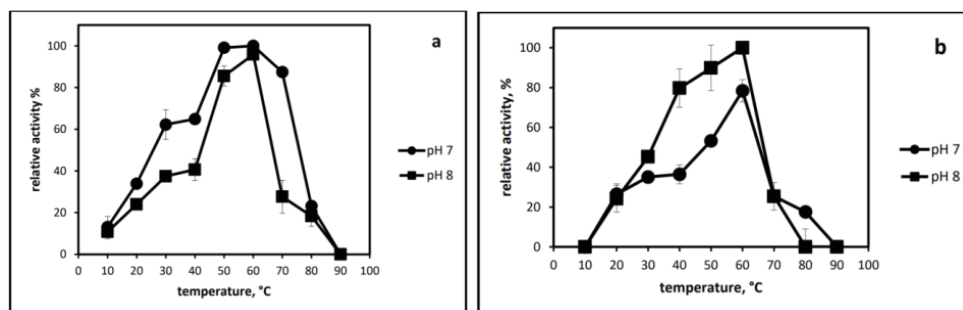


Fig. 8. Effect of temperature on PL47 PGA (a) and pectin (b) degradation activity. The effect was assayed at temperatures ranging from 10 to 90°C under pH 7 and 8. 100 % specific activity – 611.9 ± 0.012 U/mg.

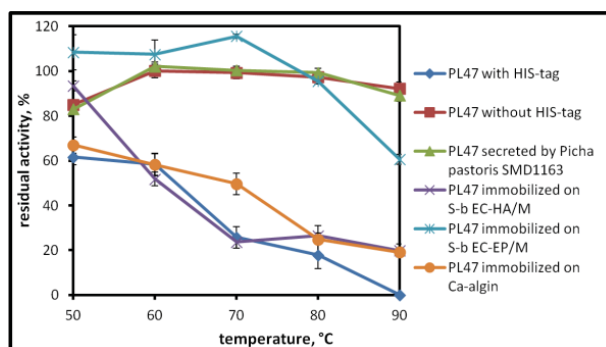


Fig. 9. Effect of temperature on PL47 stability and influence of His-tag sequence or immobilization on pectate lyases thermostability. 100 % residual activity – 611.9 ± 0.012 U/mg. Abbreviations: S-b EC-HA/M – Sepabeads EC-HA/M immobilization support, S-b EC-EP/M – Sepabeads EC-EP/M immobilization support, Ca-algin – calcium alginate.

corresponding to *G. thermodenitrificans* DSM 101594 optimal growth temperature (38). Negative influence of affinity tag sequences on thermostability was reported but is not typical (61). PL47 is substantially more thermostable than PL47_{Bsp.TS47} (53). *sp*.PL47 is most thermostable among characterized pectate lyases from mesophiles as well as moderate thermophiles, however, is less thermostable than pectinases from hyperthermophilic bacteria (62).

rPL47 degraded PGA pH 4-9 and demonstrated pectinolytic activity pH 6-9 (Fig. 10a and 10b). Characterized PL47 PGA degradation optimum pH was determined to be pH 7, while optimum pH for pectinolytic activity was determined to be pH 8. Determined PL47 activity pH optimum corresponds to native PL47_{Bsp.TS47} (53). Typically, pectate lyase from *Bacillus* as well as *Geobacillus* are most active at pH 9-10 (63). Characterized pectinase was

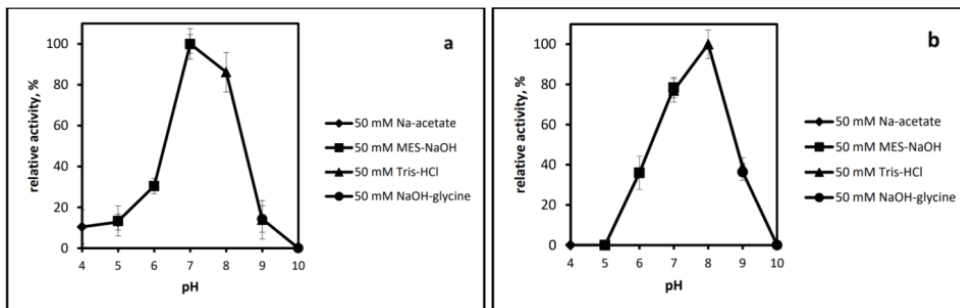


Fig. 10. Effect of pH on PL47 PGA (a) and pectin (b) degradation activity. The effect was assayed using different buffers at 60°C for 240 min at pH ranging from pH 4 to 10. 100 % specific activity – 611.9 ± 0.012 U/mg.

effectively active (≥40 % activity) pH range of pH 7-8, what also fully corresponds to effective activity range of PL47_{Bsp.TS47} (53). Comparatively narrow effective activity pH range is typical for *Bacillus* pectate lyases (56). Influence of pH on enzymatic activity of *HIS+SP*.PL47 and *SP*.PL47 was almost identical – His-tag sequence was not influencing enzymes PGA degrading or pectinolytic activity dependence on pH (data not shown). Pectate lyase PL47 was stable in pH range of pH 4-9 for 60 min at 60 °C. Determined PL47 fully corresponds to PL47_{Bsp.TS47} pH stability (53). His-tag sequence significantly influenced enzymes pH stability – *HIS+SP*.PL47 was stable only in pH range of pH 6-7 for 60 min at 60 °C (Fig. 11). *HIS-SP*.PL47 stability in acidic as well as in alkaline part of pH range was similar, while *HIS+SP*.PL47 was slightly more stable under acidic conditions.

The effect of different metal ions and other reagents on the *HIS+SP*.PL47 is shown in Table 8 and 9, respectively. The presence of Na⁺ and K⁺ at a concentration of 1 and 50 mM did not affect activity of the recombinant lyase,

while Li^+ slightly increased rPL47 enzymatic activity. Divalent cations Ca^{2+} and Mg^{2+} at concentration 1 mM had a significant stimulating effect on PL47 activity – 190 and 11 %, respectively. However, 10 mM of Ca^{2+} reduced PL47 activity by 11 %. Addition of divalent cations: Ba^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Sn^{2+} as well as trivalent cation Fe^{3+} , at a concentration of 1 mM, reduced the pectate lyase activity by 20-70 %. Zn^{2+} almost completely eliminated activity of characterized pectate lyase, determined enzymatic activity in presence of 1 mM of outlined cation was only 11 %. Different metal ions were affecting PL47 activity similarly as described for PL47_{Bsp.TS47} (53). Calcium-ion significant stimulating effect on PL47 activity *in vitro* was expected as *in silico* analysis was indicating PL47 as calcium-dependent pectate lyase. Moderate inhibitory effect of Ca^{2+} at oversaturating concentrations is also typical for calcium-dependent pectate lyases (59). Optimal Ca^{2+} concentration for activity

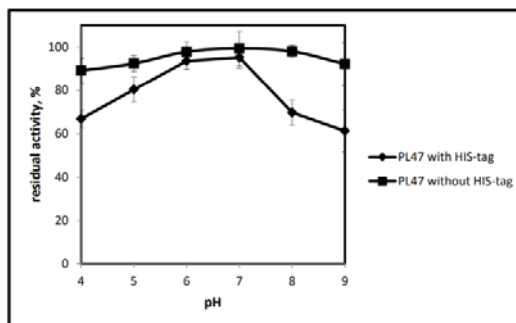


Fig. 11. Effect of pH on PL47 stability and impact of His-tag sequence on enzyme pH stability. The effect was assayed at 60°C for 240 min at pH ranging from pH 4 to 9. Residual PL47 without His-tag PGA degradation activity at pH 7 was $99.35\% - 607.9 \pm 0.011 \text{ U/mg}$.

Table 8. Influence of metal ions on PL47 PGA degradation activity

Metal salt	Concentration	Relative activity, %
Control	-	100*
LiCl	1 mM	105.93 ± 0.14
NaCl		101.08 ± 0.35
	50 mM	99.66 ± 0.72
MgCl ₂	1 mM	111.42 ± 0.90
KCl		99.61 ± 0.67
	50 mM	99.75 ± 1.29
CaCl ₂	1 mM	287.67 ± 1.38
	10 mM	82.14 ± 2.55
MnCl ₂	1 mM	76.02 ± 1.43
FeCl ₃		32.88 ± 3.06
CoCl ₂		87.50 ± 2.44
NiCl ₂		80.78 ± 0.99
CuCl ₂		64.09 ± 1.19
ZnCl ₂		10.35 ± 1.63
SnCl ₂		78.00 ± 3.42
BaCl ₂		36.16 ± 1.81

*100 % PL47 specific activity at optimal reaction conditions – $611.9 \pm 0.012 \text{ U/mg}$.

Table 9. Influences of different reagents on PL47 PGA degradation activity

Reagent	Concentration	Relative activity, %
Control	-	100*
Dithiothreitol	1 mM	100.22 ± 1.02
Tris(2-carboxyethyl) phosphine		99.76 ± 0.67
β-mercaptoethanol		99.52 ± 2.11
Urea	0.1 M	89.17 ± 1.30
	4 M	32.04 ± 4.25
Guanidine HCl	1 mM	90.83 ± 0.74
SDS	0.1 %	ND**
	1 %	
DMSO	0.1 %	106.52 ± 1.85
	1 %	114.37 ± 2.01
Methanol		99.70 ± 0.37
	5 %	97.11 ± 0.84
Ethanol	1 %	100.25 ± 0.59
	5 %	93.58 ± 1.23
Ethylene glycol	0.1 %	99.09 ± 2.40
	1 %	101.43 ± 4.86
Glycerol	0.1 %	105.66 ± 1.35
	1 %	103.74 ± 1.63
Triton X-100	0.1 %	92.53 ± 1.26
	1 %	87.12 ± 3.56
Triton X-305	0.1 %	65.78 ± 3.12
	1 %	48.64 ± 2.33
Tween 20	0.1 %	114.98 ± 4.34
	1 %	82.47 ± 3.59
Tween 40	0.1 %	120.88 ± 3.21
	1 %	73.73 ± 2.60
Tween 60	0.1 %	98.39 ± 2.86
	1 %	70.42 ± 2.19
Tween 80	0.1 %	96.87 ± 2.07
	1 %	69.50 ± 2.61
Brij 35	1 mM	97.49 ± 1.94
Brij 58		93.61 ± 2.73

*100 % PL47 specific activity at optimal reaction conditions – 611.9 ± 0.012 U/mg;

**ND – not detected.

stimulation of pectate lyases varies between 0.4-1(2) mM (59). Different divalent metal ions effect activity of thermoactive and thermostable pectate lyases quite differently even if characterized pectinases are homologous (64). Reductors had no influence on PL47 activity. 1 mM Brij 35, Brij 58 concentration slightly reduced PL47 activity. 100 mM urea as well as 1 mM guanidine-HCl ~10 % inhibited PL47 enzymatic activity. 4 M urea significantly reduced enzymes activity by almost 70 %, while NDS completely

eliminated PL47 activity. Incubation in the presence of surfactants Tween-20, Tween-40, Tween-60 and Tween-80 as well as Triton-X100 and Triton-X305 reduced activity of PL47. Solvents had no effect on PL47 activity even at higher tested concentration. DMSO significantly reduced PGA degrading activity of PL47. Characterized enzyme activity was not reduced by 0.1 or 1 % (v/v) glycerol. Lower tested concentration of glycerol even slightly stimulated PL47 activity. Influence of reagents on thermoactive and thermostable pectinases has been analysed sporadically (64). Comparatively high activity in presence of most tested reagents outlines PL47 biotechnological potential.

rPL47 degraded PGA, pectin and pectin from apple pomace (Table 10). Characterized enzyme was not active against carboxymethyl cellulose, calcium alginate and xylan (data not shown). _{HIS+SP}PL47 demonstrated highest activity when PGA was used as a enzymatic reaction substrate, while pectate lyase degraded pectin and pectin from apple pomace ~35 % and ~65 %, respectively, less effectively. Different methylation level of pectin and pectin from apple pomace resulted in significant enzyme activity efficiency difference comparing pectin and pectin from apple pomace disruption. Typically, pectate lyases are less active against highly methylated pectin from raw biomass (64). Comparison of enzyme activity results determined at prolonged enzymatic reaction incubation times confirmed that polysaccharide substrates effectively stabilize PL47 at high temperatures. PL47 activity and substrate specificity characterization confirmed *in silico* attribution of enzyme to pectate lyases. Characterized enzyme degraded α -1,4-glicoside linkages via β -elimination mechanism. Typically, endopolylgalacturonate transeliminases disrupt PGA chain randomly in context of α -1,4-glicoside linkages (59). Detection of longer than digalacturonic acid oligosaccharides in PL47 enzymatic reactions mixtures confirmed, that PL47 disrupts PGA randomly attacking glycosidic linkages. PL47_{Bsp.TS47} is also endopolylgalacturonate transeliminase degrading substrates to digalacturonic acid (53). Expected PL47 protopectinase activity was not confirmed. Possibly traces of organic solvents used for pectin fraction extraction from natural biomass eliminated PL47 ability produce soluble pectin fraction from raw insoluble pectin fraction. PL47_{Bsp.TS47} demonstrates highly efficient protopectinase activity (53). PL47 was completely inhibited by polyphenols – enzyme was not disrupting pectin from apple pomace if raw pectin fraction was initially not pre-treated with laccase (data not shown). Even though PL47 was active without enzymatic reaction supplementation with calcium ions, characterized enzyme is calcium-dependent pectate lyase as was confirmed

Table 10. Substrate specificity of PL47 and influence of heterologous production strategy as well as immobilization to enzyme activity

			Relative activity, %					
			PGA		pectin		pectin from apple pomace	
			240 min	960 min	240 min	960 min	240 min	960 min
PL47 expressed by <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	PL47 with His-tag	PL47	100*	118	65.5	82	34.1	50.2
		PL47 immobilized on Sepabeads EC-HA/M	61.6	76.4	ND**	10	30.6	38.8
		PL47 immobilized on Sepabeads EC-EP/M	73.6	87.7	ND	18.4	33.2	40.7
		PL47 immobilized on calcium alginate	55.2	69.2	ND	6.2	16.9	28
	PL47 after removal of His-tag	PL47	103.7	122.1	68	87.7	40.6	43.1
PL47 secreted by <i>Pichia pastoris</i> SMD1163		PL47	104	122.5	67.9	80.9	-***	-

*100 % PL47 specific activity at optimal reaction conditions – 611.9 ± 0.012 U/mg;

**ND – not detected;

*** “-”, not determined.

analysing calcium ion effect on PL47 activity. His-tag sequence was reducing PL47 enzymatic activity, but had no impact on enzyme substrate specificity. Enzymatic activity as well as substrate specificity of PL47 secreted by *P. pastoris* SMD1163 were almost identical as observed for recombinant enzyme expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Results of enzymatic reaction fractionation by TLC enabled to determine that PL47 degrades substrates to digalacturonic acid. PL47 enzymatic activity also generates minor amounts of trigalacturonic acid as well as variety of longer oligosaccharides. Pectate lyase PL47 biotechnological potential was evaluated by analysing PL47 activity modulation possibilities. PL47 activity modulation was limited as enzyme under suboptimal reaction condition was remaining highly active and enzymatic reaction equilibrium was not significantly shifted to production of

long chained oligosaccharides from PGA as well as pectin (Fig. 12). However, in depth optimization of PL47 activity modulation are possible leading to direct biotechnological exploitation of rPL47 for long chain oligosaccharide production from natural biomass rich in pectin.

Immobilization affected $_{\text{HIS+SP-PL47}}$ activity as well as substrate specificity (Table 10). Characterized pectate lyase was not able to degrade pectin, however degraded PGA as well as pectin from apple pomace to digalacturonic acid (Fig. 12). Immobilization substantially reduced PL47 activity. Immobilized PL47 degraded PGA 27-45 % less active, while pectin from apple pomace was degraded 3-50 % less actively comparing PL47 immobilization effect on different carriers. Immobilization increased PL47 thermostability, however carrier type directly influenced thermostability of immobilized enzyme. rPL47 immobilized on Sepabeads EC-EP/M or calcium alginate demonstrated thermostability comparable with *in vitro* observed for rPL47, while enzyme immobilization on Sepabeads EC-HA/M significantly increased PL47 thermostability (Table 10). Typically, pectate lyases immobilization on calcium alginate is not affecting enzymes activity and substantially increases enzymes thermostability (65, 66). PL47 immobilization on calcium alginate was expected to be beneficially affecting activity of pectate lyase as calcium ions were significantly stimulates enzyme activity *in vitro*.

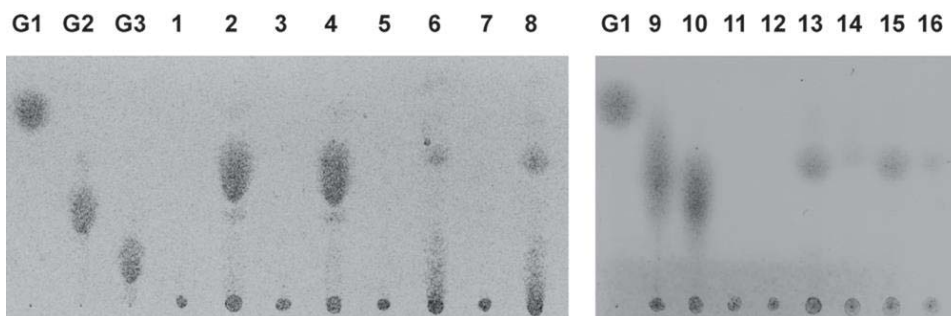


Fig. 12. TLC analysis of PGA and pectin degradation by PL47. Lanes (applying 5 μL of sample): 1, 3, 11 – PGA*; 2 – products of PGA degradation** with PL47; 4 – products of PGA degradation with 3 μg of PL47 after reaction incubation for 240 min under pH 7 at 30°C; 9 – products of PGA degradation with 3 μg of PL47 after reaction incubation for 240 min under pH 9 at 50°C; 10 – products of PGA degradation with 3 μg of PL47 after reaction incubation for 240 min under pH 6 at 50°C; 5, 7 – pectin; 6 – products of PGA degradation with PL47; 8 – products of pectin degradation with 3 μg of PL47 after reaction incubation for 240 min under pH 9 at 40°C; 12 – pectin from apple pomace; 13 – products of pectin from apple pomace degradation with PL47; 14 – products of pectin from apple pomace degradation with PL47 immobilized on calcium alginate; 15 – products of pectin from apple pomace degradation with PL47 immobilized on Sepabeads EC-EP/M; 16 – products of pectin from apple pomace degradation with PL47 immobilized on Sepabeads EC-HA/M. G1-G3 standards (10 mg/mL each): G1 – galacturonic acid, G2 – digalacturonic acid, G3 – trigalacturonic acid.

*10 mg/mL; **applying optimal reaction conditions.

Sepabeads, previously not used for immobilization of pectinases, were more suitable than calcium alginate for rPL47 immobilization. Polysaccharide hydrolases immobilized on Sepabeads carriers typically remain effectively active and demonstrate thermostability increase (67). PL47 successful immobilization outlines biotechnological potential of this enzyme.

4. *Geobacillus* sp. PA-3 genome sequencing, annotation and analysis

Geobacillus sp. PA-3 strain was isolated from soil sample PEK, cultivating aerobically in media supplemented with 0.5 % (w/v) pectin at 60 °C (38). The isolate PA-3 – aerobic, thermophilic, gram-positive endospore-forming bacteria demonstrating ability to grow effectively utilizing pectin. Initial taxonomic characterization of PA-3 was performed by the BOX-PGR method (68) as well as by the phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence (68) enabled to outline this isolate as a separate strain and attribute to *Geobacillus* genus. Observed 16S RNA gene sequence (DDBJ DQ243788.1) similarity (99.9 % similarity) enabled to attribute PA-3 strain to *Geobacillus thermodenitrificans* species. The attribution was confirmed by full phylogenetical analysis of PA-3 strain 16S rRNA gene sequence with annotated 16S rRNA gene sequences of *Geobacillus* spp. Taxonomical attribution of PA-3 strain to *G. thermodenitrificans* was confirmed after strain deposition to Leibniz Institute German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ (Braunschweig, Germany) encumbering native PA-3 strain as *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 (69).

Draft of whole-genome sequence of PA-3 was obtained using the next-generation sequencing (BaseClear, Leiden, The Netherlands). Paired-end 100 cycles sequence reads were generated using Illumina HiSeq2500 system. FASTQ sequence reads were generated using Illumina Casava pipeline. 1,317,704 read pairs covering 213,468,048 bases were assembled using SPAdes GenomeAssembler software resulting in 208 contigs of which 25 contigs shorter than 200 bp were discarded. The final assembly (Table 11) consisted of 3,646,477 bp with an average coverage of 58.5x. Automated genome annotation was carried out by using GenDB software.5. The automated gene prediction identified 3,638 coding sequences, 10 rRNA regions, and 92 tRNA regions (Table 11). The direct manual annotation was performed using Pfam, InterProScan, and NCBI BLAST. Comparison performed with EDGAR software of *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome with genome sequences of other *Geobacillus* spp., including the phylogenetically closest nearest strains *G. thermodenitrificans* NG80-2 and *G. thermodenitrificans* DSM465^T revealed that *G. thermodenitrificans* DSM 101594 chromosome

most general characteristics (Table 11) corresponds to genomic characteristics typical to *Geobacillus* species chromosomes. Analysis of sequencing data enabled to identify 50-55 kbp plasmid *G. thermodenitrificans* DSM 101594. G+C content in sequence of detected plasmid – ~44 %. The plasmid sequence was not included in *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome draft version as overall coverage of plasmid sequence was comparatively low (data

Table 11. Chromosome features of *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594

Feature	Chromosome
Length, bp	3,646,477
G + C content, %	48.86
ORFs	3638
rRNR regions	10
tRNR regions	92

not shown). Long-chain plasmids are not rare in *Geobacillus* strains (70). The comparative analysis of *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome sequence fully confirmed results of initial phylogenetic as well as taxonomical analysis. Phylogenetically closest strains of *G. thermo-*

denitrificans DSM 101594 are *G. thermodenitrificans* DSM 465^T and *G. thermodenitrificans* NG80-2 (Fig. 13). The comparison of chromosomes (data not shown) enabled to attribute *G. thermodenitrificans* DSM 101594 to 'thermodenitrificans' clade consisting of all taxonomically characterized *G. thermodenitrificans* strains (71).

The comparative analysis of putatively proteins encoding genes identified in genomes of *G. thermodenitrificans* DSM 465^T, *G. thermodenitrificans* DSM 101594 and *G. thermodenitrificans* NG80-2 enabled to attribute 2432 genes annotated in *G. thermodenitrificans* DSM 101594 chromosome, to core genome of this strain. Core genomes of *Geobacillus* strains consist of approximately 1860 genes (72). *G. thermodenitrificans* DSM 101594, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T and *G. thermodenitrificans* NG80-2 are phylogenetically close strains as 2852 genes are found in all three compared genomes (Fig. 14). However, 416 genes annotated in *G. thermodenitrificans* DSM 101594 chromosome was not annotated in chromosomes of mentioned *Geobacillus* strains. Determined difference in gene set between compared strains corresponds to genetic distance typical between *Geobacillus* strains (73). Even though the gene diversity of *G. thermodenitrificans* DSM 101594, comparing functionality groups of predicted proteins encoded by the annotated gene diversity, is close to phylogenetically closest *Geobacillus* strains, however *G. thermodenitrificans* DSM 101594 encodes significantly more genes encoding proteins functionally important for carbohydrate transport and metabolism (Fig. 15). *Geobacillus* strains are able to grow by

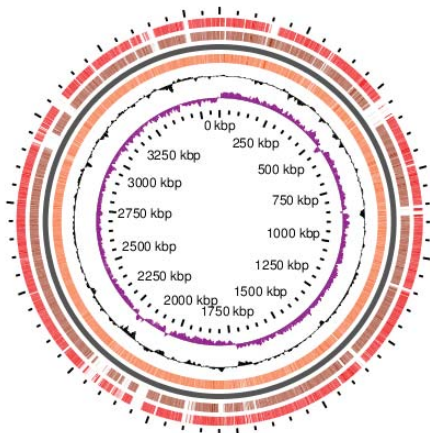


Fig. 13. Schematic circular comparison of *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 genome (GenBank LIDX00000000.1) (represented in orange) with *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T genome (GenBank AYKT01000000) (brown) and *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 genome (GenBank CP000557) (red). Circular comparison also represents G + C content (black) and G + C skew (purple).

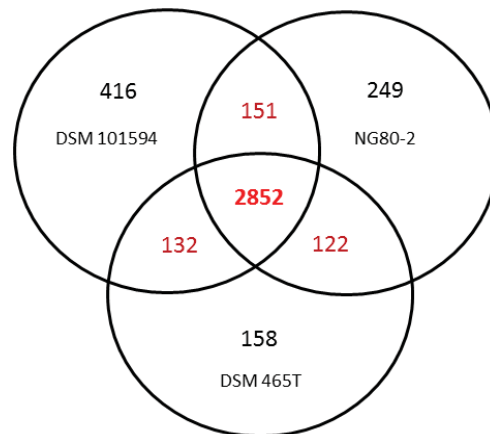


Fig. 14. *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T (abbreviated as DSM 465T in Venn diagrams) genome (GenBank AYKT01000000) and *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (NG80-2) genome (GenBank CP000557) comparative analysis with annotated *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 (DSM 101594) genome (GenBank LIDX00000000.1). Numbers inside the Venn diagrams indicate the number of genes found to be shared among the indicated genomes.

utilizing variety of different carbon and/or energy sources demonstrating the adaptive plasticity to occupy different niches (72). The total amount of proteins functionally important for carbohydrate transport and metabolism varies quite notably between different *Geobacillus* species (74) – only approximately 100 genes encoding proteins with outlined functional importance are attributed to *Geobacillus* core genome (75). The total amount, above average then typical for *Geobacillus* species, genes encoding proteins directly necessary for carbohydrate utilization was typically annotated in genomes of *G. thermodenitrificans* strains (72).

The comparison of variety of carbohydrate catabolism enzyme genes between *G. thermodenitrificans* DSM 101594 and *G. thermodenitrificans* DSM 465^T, *G. thermodenitrificans* NG80-2 revealed, that *G. thermodenitrificans* DSM 101594 encodes approximately 20 enzymes of carbohydrate catabolism more than other closest strains. All three strains encode homologous enzymes from CAZy families: GH2, GH13, GH36, GH52, GH120, GT4, GT5, GT8, GT19, GT26, GT35, GT51, CE3 as well as CE4. Two genes encoding CAZy CBM42 domains were also annotated in compared *Geobacillus* strain genomes. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 encodes enzymes attributed to CAZy GH27 and GH42 families as well as enzymes necessary for pectin and pectate utilization attributed to CAZy families PL1, PL11, GH88 and GH105,

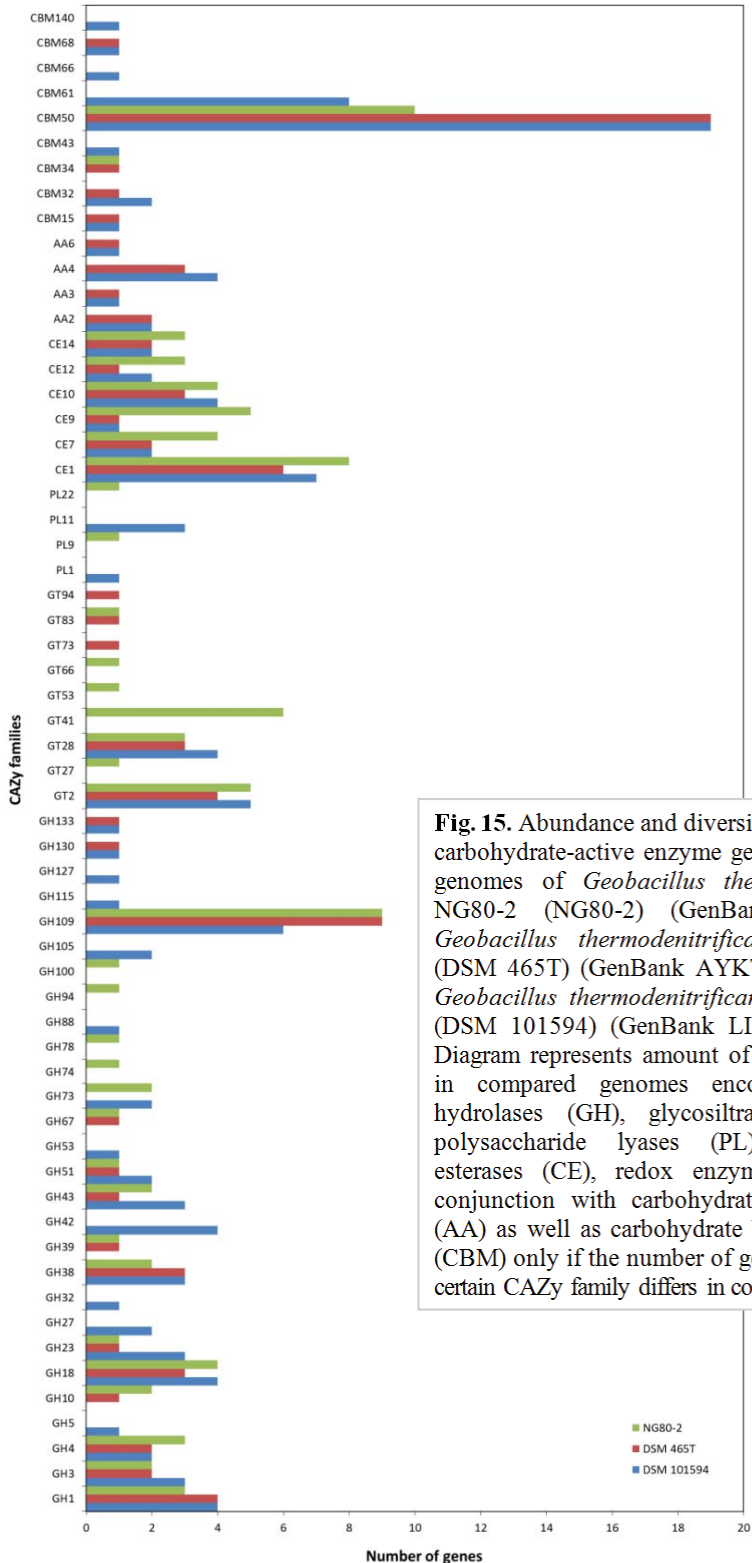


Fig. 15. Abundance and diversity comparison of carbohydrate-active enzyme genes annotated in genomes of *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (NG80-2) (GenBank CP000557), *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T (DSM 465T) (GenBank AYKT01000000) and *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 (DSM 101594) (GenBank LIDX00000000.1). Diagram represents amount of genes annotated in compared genomes encoding glycoside hydrolases (GH), glycosyltransferases (GT), polysaccharide lyases (PL), carbohydrate esterases (CE), redox enzymes that act in conjunction with carbohydrate-active enzyme (AA) as well as carbohydrate binding modules (CBM) only if the number of genes attributed to certain CAZy family differs in compared genomes.

that are not found in genomes of *Geobacillus* strains phylogenetically close to *G. thermodenitrificans* DSM 101594 (Fig. 15). GH27 and GH42 enzymes are necessary for the effective utilization of oligosaccharide intracellularly (76). *G. thermodenitrificans* DSM 101594 encodes four pectate lyases – 3 attributed to PL11 family (GenBank WP_060475617.1, WP_060475621.1, LIXD01000041.1) as well as PL47 pectate lyase attributed to PL1 family (GenBank WP_060475609.1). The ability of pectin utilization is also confirmed in *G. thermodenitrificans* DSM 101594 by identification of genes (GenBank WP_060475632.1, WP_060475634.1) encoding GH105 family non-saturated α -galacturonide hydrolases as well as gene (GenBank WP_060975610.1) encoding GH88 family non-saturated β -glucuronide hydroxylase. These outlined enzymes ensure final steps of pectin utilization in cell cytoplasm (77). Genes encoding enzymes that potentially ensure *G. thermodenitrificans* DSM 101594 ability to utilize pectin are not attributed to core genome. It shows, that *G. thermodenitrificans* DSM 101594 ability of pectin utilization was evolutionary fixated as a result of adaptation to econiche(s).

G. thermodenitrificans DSM 101594 encodes 7 CAZy GH13 family enzymes, among which homologue of AmyA1 was also annotated (GenBank WP_060476117.1). Type I pullulanase encoding gene was attributed to core genome of *G. thermodenitrificans* DSM 101594. Type II pullulanase encoding gene (GenBank LIDX01000042.1), attributed to strains core genome, was also annotated in genome of *G. thermodenitrificans* DSM 101594. Type I and II pullulanases demonstrated synergistically effect resulting in pullulan disruption during utilization of this polysaccharide (4). *G. thermodenitrificans* DSM 101594 ability to utilize pullulan could be considered as one of most essential microorganism survival strategy as all enzymes of pullulan utilization catabolic cascade are attributed to strains core genome.

The analysis of sequenced genome of *G. thermodenitrificans* DSM 101594 as well as performed annotated genome comparison with genomes of other *Geobacillus* strains enabled to detect genome regions obtained as a result of the horizontal gene transfer. 16 regions in *G. thermodenitrificans* DSM 101594 chromosome was *in silico* identified as obtained as a result of horizontal gene transfer. All these regions were previously identified in other strains of *G. thermodenitrificans* except two – chromosome genome region 522533...552245 and 1873132...1931228.

G. thermodenitrificans DSM 101594 chromosome region 1873132...1931228 encodes 111 open reading frames. This genome region mostly consists of genes of hypothetical proteins. Meanwhile, the chromosome region 522533...552245

consists of 29 genes encoding predominantly proteins functionally important for carbohydrate transport and metabolism. Genes encoding pectate lyases attributed to PL1 and PL11 families as well as glycoside hydrolases attributed to GH88 and GH105 families were annotated in outlined genome region. Genome regions similar to 522533...552245 region annotated in chromosome of *G. thermodenitrificans* DSM 101594 were previously not identified in *Geobacillus* genomes (data not shown). Possibly outlined genome region was obtained as a result of the horizontal gene transfer from *Bacillus* genomes. Genes encoding enzymes functionally important for carbohydrate metabolism are typically obtained by *Geobacillus* species as a result of horizontal gene transfer and do not belong to core genome of particular *Geobacillus* strain (72). Comparatively high abundance of regions obtained as by horizontal gene transfer explains high adaptive plasticity of *Geobacillus* genus to nutrient sources (72, 75).

The annotation of *G. thermodenitrificans* DSM 101594 chromosome sequence revealed presence of pullulanase (GenBank KQB92233.1) gene encoding enzyme homologous (99.2 % similarity) to AmyA1 pullulanase. The transcription of AmyA1 homologue gene is regulated independently from surrounding genes (Fig. 16). The analysis *in silico* confirmed, that AmyA1 homologue should not be assigned to an operon. According to the genome annotation, upstream of AmyA1 homologue gene, there is a gene encoding choline kinase YcfN (GenBank KQB92232.1), that was not assigned to an operon as well. While downstream of AmyA1 homologue gene an operon was detected consisting of genes encoding hypothetical protein (GenBank KQB92234.1), UP0097 malA 3'-region protein (GenBank KQB92235.1), maltose permease (GenBank KQB92236.1) and dipeptidase YyjP (GenBank KQB92237.1) (Fig. 16). *G. thermodenitrificans* DSM 465^T (78) and *G. thermodenitrificans* NG80-2 (79) encoded homologues of AmyA1 pullulanase are not assigned to operons. Genome regions with genes of AmyA1 homologues in chromosomes of strains phylogenetically close to *G. thermodenitrificans* DSM 101594 were identical by genomic as well as operonic organization as described in genome of *G. thermodenitrificans* DSM 101594. AmyA1 as well as AmyA1 homologues are not encoded in genome regions rich in genes encoding proteins important for carbohydrate metabolism and transport (80). The transcription regulation of AmyA1 homologue genes annotated in *Geobacillus* strains was never analysed. Genes encoding type I pullulanases are typically annotated in operons with genes encoding proteins important for maltose metabolism. AmyA1 homologue genes were assigned to the maltose regulon in *Streptococcus* as well as *in silico* predicted to be members of outlined regulon in *Bacillus* genus (81).

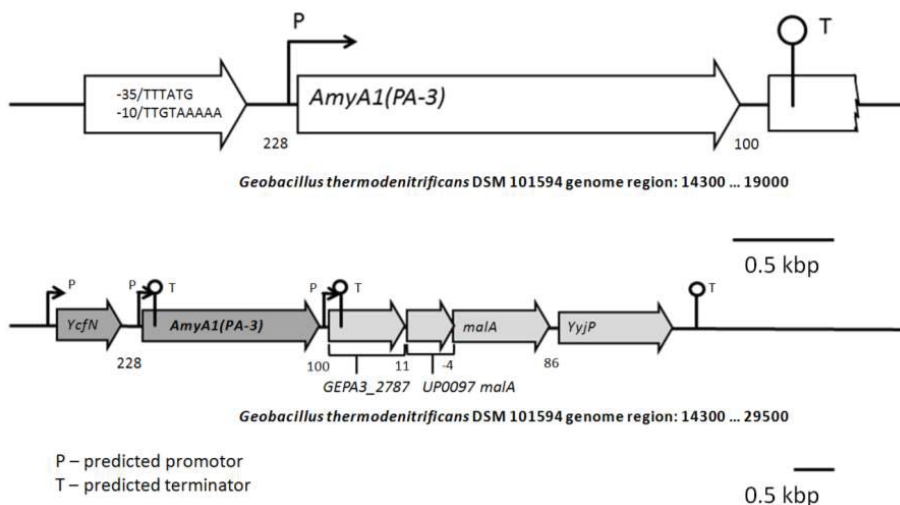


Fig. 16. AmyA1 homologue (GenBank KQB92233.1) gene *AmyA1(PA-3)* annotated in *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 genome transcription regulation and operonic organization characterization *in silico*. Abbreviations: *YcfN* – gene encoding YcfN putative choline kinase (GenBank KQB92232.1), *GEPA_2787* – gene encoding hypothetical protein (GenBank KQB92234.1), *UP0097 malA* – gene encoding UP0097 putative malA 3'-region protein (GenBank KQB92235.1), *malA* – gene encoding maltose permease (GenBank KQB92236.1), *YyjP* – gene encoding putative dipeptidase YyjP (GenBank KQB92237.1); genes *in silico* not attributed to operons marked in dark grey, while *YcfN*, *GEPA_2787*, *UP0097 malA*, *malA* as well as *YyjP* *in silico* attributed to operon *G. thermodenitrificans* DSM 101594 marked in light grey.

The annotation of PL47 gene in *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome confirmed that *Geobacillus* genus is able to produce pectate lyases homologous to pectate lyases from *Bacillus* species (82). The PL47 homologue (GenBank OQP12861.1) was annotated in *Geobacillus thermocatenulatus* SURF-114 (83) genome confirming *Geobacillus* ability to utilize pectin as a result of activity of pectate lyase homologue to pectinases from mesophiles. PL47 gene was assigned to the *YteRPL47* operon, together with a gene encoding non-saturated glucuronide hydrolase YteR (GenBank KQB94502.1), which is localised upstream of PL47 gene (Fig. 17). The gene encoding YteR homologue (GenBank OQP12862.1) in *G. thermocatenulatus* SURF-114 genome was also annotated (83). Glucuronide hydrolases homologous to YteR are comparatively abundant in *Bacillus* genomes.

Genes of the *YteRPL47* operon encode enzymes which ensure *G. thermodenitrificans* DSM 101594 ability to utilize heteropolysaccharides. YteR and PL47 are essential enzymes for pectate catabolism and they are forming a catabolic cascade. Secreted PL47 acts as endopolypectate transeliminase disrupting high molecular weight pectin accessible in natural habitat of bacteria into oligosaccharides of different chain length which then are transported into cell cytoplasm. Intracellularly, YteR hydrolyses pectin

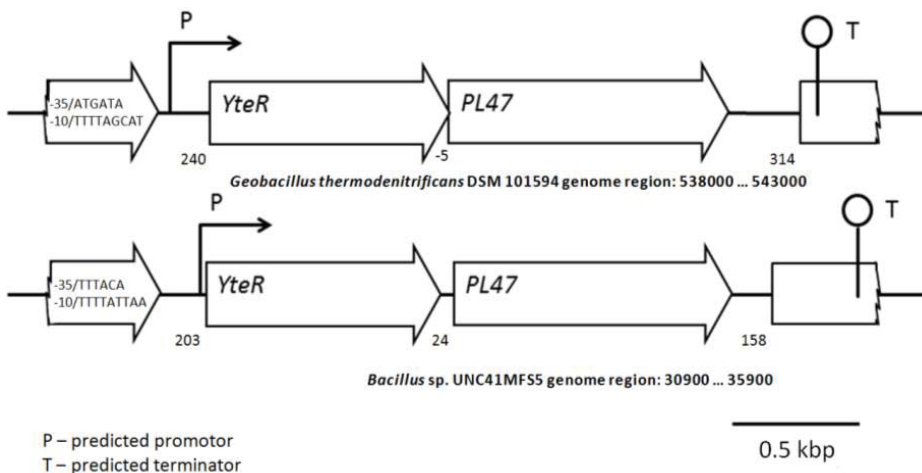


Fig. 17. Structure comparison of *YteRPL47* operon *in silico* determined in genomes of *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 and *Bacillus* sp. UNC41MFS5. Abbreviations: *YteR* – gene encoding *YteR* unsaturated glucuronyl hydrolase in *G. thermodenitrificans* DSM 101594 (GenBank KQB94502.1) and *B. sp. UNC41MFS5* (GenBank WP_026565424.1) genomes, *PL47* – gene encoding *PL47* pectate lyase in *G. thermodenitrificans* DSM 101594 (GenBank KQB94501.1) and *B. sp. UNC41MFS5* (GenBank WP_026565423.1) genomes.

oligosaccharides, which have been transported through plasmic membrane. Signal peptide was not predicted in sequence of *YteR*. Conserved sequence motifs and regions indicate that *YteR* is a non-saturated glucuronide hydrolase belonging to CAZy family GH88 (pfam07470 (14)). *YteR* attribution to the GH88 family indirectly confirms, that this enzyme is also important for utilization of oligosaccharides generated from other, then pectin, polysaccharides as well. GH88 hydrolases demonstrate a wide substrate specificity (77). *YteRPL47* operon as well as operon inverse variant – *PL47YteR* operon were identified in *Bacillus* species (84). *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome region in which *YteRPL47* operon was identified was obtained as a result of the horizontal gene transfer as also typical for *YteR* and *PL47* operons identified in *Bacillus* species (72).

Conclusions

1. Direct identification of amylases and pectinases produced by soil microorganisms combining zymography with mass spectrometry ensured enzyme determination efficiency as well as reliability.
2. Amylases AmyA1 and hGK2898 as well as pectinases PL47 and P12 produced by geobacilli were determined in soil microorganisms' enrichment cultures and/or soil metaproteome samples.
3. Intracellular AmyA1 is thermoactive and thermostable monomeric I type pullulanase stabilized by calcium ions.
4. AmyA1 degraded glycogen and starch as well as were able to degrade pullulan to long chain oligosaccharides under suboptimal reaction conditions. Immobilization increased AmyA1 pullulanolytic activity and thermostability.
5. Constitutively secreted PL47 is thermoactive and thermostable monomeric endopolygalacturonate transeliminases stabilized by calcium ions.
6. PL47 degraded pectin as well as were able to degrade PGA to long chain oligosaccharides under suboptimal reaction conditions. Immobilization decreased PL47 activity, but increased thermostability.
7. The pectin and oligosaccharides utilization locus was annotated in *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome. The annotated locus was obtained by strain as a result of horizontal gene transfer.
8. AmyA1 homologue gene in *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome is transcribed independently, while PL47 gene forms *YteRPLA7* operon with *YteR* glucuronyl hydrolase gene. AmyA1 homologue and PL47 functions in catabolic cascades ensuring utilization of heteropolysaccharides.

Reziumė

Polisacharidai – dažniausi biosferos polimerai. Viena svarbių polisacharidų grupių laikomi heteropolisacharidai. Pastarieji polimerai sudaromi skirtingos struktūros monomerų. Heteropolisacharidai plačiai paplitę gyvuosiuose organizmuose, nes geba efektyviai užtikrinti struktūrinę ir/ar fiziologines funkcijas. Biosferoje vieni dažniausių bei funkciškai svarbiausių heteropolisacharidų – krakmolas bei pektinas. Pastarųjų biopolimerų svarba biotechnologijai nekelia abejonių. Krakmolas – tipiška energijos bei anglies saugyklos funkcijas atliekantis heteropolisacharidas, tuo tarpu pektinas augalams tipiška užtikrina organizmų struktūrinę integralumą. Heteropolisacharų funkcionalumas *in vivo* bei pritaikomumas biotechnologijai neįmanomas be galimybės skaidyti šiuos polimerus. Heteropolisacharidus skaidančius fermentus produkuoja visų gyvybės domenų organizmai. Charakterizuota sąlyginai didelė amilazių ir pektinazių įvairovė, tačiau minėtų aktyvumų fermentų poreikis biotechnologijai išlieka nepatenkintu.

Siekus nustatyti naujas amilazes ir/ar pektinazes vykdyta dirvos mikroorganizmų produkuojamų amilolizinio ir/ar pektinolizinio aktyvumo fermentų detekcija bei identifikacija masių spektrometrija. Trašios dirvos ekonišų mikroorganizmų fermentų atranka vykdyta taikant sukauptųjų kultūrų metodą bei dirvos metaproteomiką. Zimografija detektuoti fermentai iš zimogramų detektuoti tiesiogiai. Nustatytų fermentų aktyvumas patvirtintas *in vitro*.

Iš atrinktų fermentų grupės detalai *in vitro* charakterizuotos *Geobacillus* genties produkuotos pululanazė AmyA1 bei pektato liazė PL47. Vidulastelinė I tipo pululanazė AmyA1 intensyviausiai skaidė pululaną bei efektyviai hidrolizavo glikogeną ir tirpų krakmolą. Konstitutyviai sekretuojama endopoligalakturonato transeliminazė PL47 intensyviausiai skaidė PGA bei efektyviai – pektiną ir obuolių išspaudų pektiną. Fermentų termoaktyvumas bei termostabilumas sėkmingai patvirtinti *in vitro*. Polinkio oligomerizuotis nedemonstruojančius fermentus stabilizavo kalcio jonai. Vertinant fermentų biotechnologinio pritaikomumo potencialą sėkmingai patvirtinta galimybė taikant neoptimalias fermentinės reakcijos sąlygas fermentus naudoti ilgos grandinės oligosacharidų gavimui iš heteropolisacharidų – krakmolo bei pektino. Charakterizuoti fermentai sėkmingai imobilizuoti taikant Sephabeads tipo nešiklius bei kalcio alginatą. Imobilizavimas didino AmyA1 aktyvumą, bet mažino PL47 aktyvumą. Charakterizuotų fermentų termostabilumą imobilizavimas didino.

Vykdyt AmyA1 ir PL47 fermentų funkcijų *in vivo* nustatymą charakterizuota fermentus koduojančių genų operoninė organizaciją bei *in silico* apibrėžta fermentų funkcinė svarba. Pastarieji aspektai charakterizuoti dėka *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594 sėkmingo genomo nuskaitymo bei anotavimo. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 išskirtas iš dirvos patvirtinant kamieno gebėjimą konstitutyviai sekretuoti PL47. Anotavus kamieno genomą charakterizuotos bendrosios genomo charakteristikos kartu nustatant išreikštą kamieno gebėjimą mitybai įsisavinti skirtingus polisacharidus bei oligosacharidus. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome nustatyti du geobacilų genomuose anksčiau neidentifikuoti genomo regionai patekę į kamieno genomą dėka horizontalios genų pernašos. Vieną minėtų regionų sudaro genų koduojančių fermentus sietinius su polisacharidų bei oligosacharidų santalkos. Pastarojoje santalkoje nustatytas PL47 genas su YteR β -gliukuronidų hidrolazės genu sudarantis *YteRPL47* operoną. AmyA1 homologo genas *G. thermodenitrificans* DSM 101594 genome nepriskirtinas operonui. AmyA1 homologas ir PL47 funkcionuodami katabolinėse kaskadose *G. thermodenitrificans* DSM 101594 svarbūs heteropolisacharidų įsisavinimui. *G. thermodenitrificans* DSM 101594 gebėjimas skaidyti krakmolą užtikrinamas AmyA1 homologo bei likusių kamieno koduojamų amilazių – viena esminių kamieno mitybinių strategijų, tuo tarpu kamieno gebėjimas įsisavinti pektiną įgytas dėka horizontalios genų pernašos atspindi kamieno prisitaikymą prie užimamos ekonišos.

References

1. Karaki N, Aljawish A, Humeau C, Muniglia L, Jasniewski J. 2016. Enzymatic modification of polysaccharides: mechanisms, properties, and potential applications: A review. *Enzyme Microb Technol* 90:1-18.
2. Ruijsenaars HJ, Hartmans S. 2001. Plate screening methods for the detection of polysaccharase-producing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:143-149.
3. Brumm PJ, De Maayer P, Mead DA, Cowan DA. 2015 Genomic analysis of six new *Geobacillus* strains reveals highly conserved carbohydrate degradation architectures and strategies. *Front Microbiol* 6:430.
4. Doman-Pytka M, Bardowski J. 2004. Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Crit Rev Microbiol* 30:107-121.
5. Berlemont R, Martiny AC. 2015. Genomic potential for polysaccharide deconstruction in bacteria. *Appl Environ Microbiol* 81:1513-1519.
6. UfarteL, Potocki-Veronese G, Laville E. 2015. Discovery of new protein families and functions: new challenges in functional metagenomics for biotechnologies and microbial ecology. *Front Microbiol* 6:563.
7. Murase A, Yoneda M, Ueno R, Yonebayashi K. 2003. Isolation of extracellular protein from green soil. *Soil Biol Biochem* 35:733-736.
8. Al-Qodah Z. 2006. Production and characterization of thermostable α -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Biotechnol J* 1:850-857.
9. Takao M, Nakaniwa T, Yoshikawa K, Terashita T, Sakai T. 2001. Molecular cloning, DNA sequence, and expression of the gene encoding for thermostable pectate lyase of thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:322-329.
10. Rosenberg IM. 2005. Electrophoresis techniques, p 63-138. In *Protein analysis and purification, Benchtop techniques*, 2th ed. Birkhäuser, Boston.
11. Camacho C. 2013. BLAST+ release notes. In *BLAST help*, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD
12. Yin Y, Mao X, Yang JC, Chen X, Mao F, Xu Y. 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res* 40:W445-W451.
13. Jones P, BinnsD, Chang HY, Fraser M, LiW, McAnullaC, McWilliamH, Maslen J, MitchellA, Nuka G, Pesseat S, Quinn AF, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong SY, LopezR, Hunter S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30:1236-1240.
14. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer ELL, Tate J, Punta M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42:D222-D230.
15. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785-786.
16. Stothard P. 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104.
17. Spohner SC, Müller H, Quitmann H, Czermak P. 2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 202:118-134.
18. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31:426-428.
19. Ryan SM, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2006. Screening for and identification of starch, amylopectin, and pullulan degrading activities in bifidobacterial strains. *Appl Environ Microbiol* 72:5289-5296.

20. Nawani N, Singh R, Kaur J. 2006. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: the effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electron J Biotechnol* 9.
21. Pessela BCC, Mateo C, Carrascosa AV, Vian A, García JL, Rivas G, Alfonso C, Guisan JM, Fernández-Lafuente R. 2003. One-step purification, covalent immobilization and additional stabilization of a thermophilic poly-His-tagged β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 by using novel heterofunctional chelate-epoxy Sepabeads. *Biomacromolecules* 4:107-113.
22. Roy I, Gupta MN. 2004. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. *Enzyme Microb Technol* 34:26-32.
23. Meyer F, Goesmann A, McHardy AC, Bartels D, Bekel T, Clausen J, Kalinowski J, Linke B, Rupp O, Giegerich R, Pühler A. 2003. GenDB – an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res* 31:2187-2195.
24. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH. 2014. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 43: D222-D226.
25. Blom J, Kreis J, Spänig S, Juhre T, Bertelli C, Ernst C, Goesmann A. 2016. EDGAR 2.0: an enhanced software platform for comparative gene content analyses. *Nucleic Acids Res* 44:W22-W28.
26. Petkau A, Stuart-Edwards M, Stothard P, van Domselaar G. 2010. Interactive microbial genome visualization with GView. *Bioinformatics* 26:3125-3126.
27. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42:D490-D495.
28. Bertelli C, Laird MR, Williams KP, Simon Fraser University Research Computing Group, Lau BY, Hoad G, Winsor GL, Brinkman FS. 2017. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res*.
29. Solovyev V, Salamov A. 2011. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences, p 61-78. In Li RW (ed), *Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies*, Nova Science Publishers, New York.
30. Macke TJ, Ecker DJ, Gutell RR, Gautheret D, Case DA, Sampath R. 2001. RNA Motif, an RNA secondary structure definition and search algorithm. *Nucleic Acids Res* 29:4724-4735.
31. Dehal PS, Joachimiak MP, Price MN, Bates JT, Baumohl JK, Dylan C, Friedland GD, Huang KH, Keller K, Novichkov PS, Dubchak IL, Alm EJ, Arkin AP. 2010. MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic Acids Res* 38:D396-D400.
32. Taboada B, Ciria R, Martinez-Guerrero CE, Merino E. 2012. ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. *Nucleic Acids Res* 40:D627-D631.
33. Higdon R, Kolker E. 2007. A predictive model for identifying proteins by a single peptide match. *Bioinformatics* 23:277-280.
34. Ben Messaoud E, Ben Ammar Y, Mellouli L, Bejar S. 2002. Thermostable pullulanase type I from new isolated *Bacillus thermoleovorans* US105: cloning, sequencing and expression of the gene in *E. coli*. *Enzym Microb Technol* 31:827-832.

35. Keiblinger KM, Wilhartitz IC, Schneider T, Roschitzki B, Schmid E, Eberl L, Riedel K, Zechmeister-Boltenstern S. 2012. Soil metaproteomics – Comparative evaluation of protein extraction protocols. *Soil Biol Biochem* 54:14-24.
36. Khannous L, Jrad M, Dammak M, Miladi R, Chaaben N, Khemakhem B, Gharsallah N, Fendri I. 2014. Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions. *Lipids Health Dis* 13:9.
37. Patil NP, Patil KP, Chaudhari BL, Chincholkar SB. 2012. Production, purification of exo-polygalacturonase from soil isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and its application. *Indian J Microbiol* 52:240-246.
38. Petkauskaitė R. 2011. Thermostable pectin-degrading enzymes: analysis of pectinolytic of some *Geobacillus*. Master thesis. Vilnius University, Vilnius.
39. Bertoldo C, Armbrrecht M, Becker F, Schäfer T, Antranikian G, Lieb W. 2004. Cloning, sequencing, and characterization of a heat-and alkali-stable type I pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*. *Appl Environ Microbiol* 70:3407-3416.
40. Sun S, Lu F, Song H, Xu J, Jiang N, Zhang Y, Li L, Ming T, Zheng W. 2011. Cloning, expression and characterization of a thermostable pullulanase from newly isolated thermophilic *Geobacillus* sp. LM14-3. *J Biomed Eng Inform*.
41. Kuriki T, Park JH, Okada S, Imanaka T. 1988. Purification and characterization of thermostable pullulanase from *Bacillus tearothermophilus* and molecular cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 54:2881-2883.
42. Tomiyasu K, Yato K, Yasuda M, Tonozuka T, Ibuka A, Sakai H. 2001. Cloning and nucleotide sequence of the pullulanase gene of *Thermus thermophilus* HB8 and production of the enzyme in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:2090-2094.
43. Kriegshäuser G, Liebl W. 2000. Pullulanase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: purification by β -cyclodextrin affinity chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 737:245-251.
44. Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM. 2008. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem* 13:1205-1218.
45. Albertson GD, McHale RH, Gibbs MD, Bergquist PL. 1997. Cloning and sequence of a type I pullulanase from an extremely thermophilic anaerobic bacterium, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biochim Biophys Acta* 1354:35-39.
46. Zouari Ayadi D, Ben Ali M, Jemli S, Ben Mabrouk S, Mezghani M, Ben Messaoud E, Bejar S. 2008. Heterologous expression, secretion and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* US105 type I pullulanase. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:473-781
47. Kang J, Park KM, Choi KH, Park CS, Kim GE, Kim D, Cha J. 2011. Molecular cloning and biochemical characterization of a heat-stable type I pullulanase from *Thermotoga neapolitana*. *Enzyme Microb Technol* 48:260-266.
48. Bertoldo C, Duffner F, Jorgensen PL, Antranikian G. 1999. Pullulanase type I from *Fervidobacterium pennavorans* Ven5: cloning, sequencing, and expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microbiol* 65:2084-2091.
49. Ali G, Dulong V, Gasmi SN, Rihouey C, Picton L, Le Cerf D. 2015. Covalent immobilization of pullulanase on alginate and study of its hydrolysis of pullulan. *Biotechnol Prog* 31:883-889.

50. Kusano S, Shiraishi T, Takahashi SI, Fujimoto D, Sakano Y. 1989. Immobilization of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase and properties of the immobilized pullulanases. *J Ferment Bioeng* 68:233-237.
51. Kamen DE, Griko Y, Woody RW. 2000. The stability, structural organization, and denaturation of pectate lyase C, a parallel β -helix protein. *Biochemistry* 39:15932-15943.
52. Dubey AK, Yadav S, Kumar M, Singh VK, Sarangi BK, Yadav D. 2010. In silico characterization of pectate lyase protein sequences from different source organisms. *Enzyme Res* 2010:950230.
53. Takao M, Nakaniwa T, Yoshikawa K, Terashita T, Sakai T. 2000. Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:2360-2367.
54. Li X, Wang H, Zhou C, Ma Y, Li J, Song J. 2014. Cloning, expression and characterization of a pectate lyase from *Paenibacillus* sp. 0602 in recombinant *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol* 14:18.
55. Berensmeier S, Singh SA, Meens J, Buchholz K. 2004. Cloning of the pelA gene from *Bacillus licheniformis* 14A and biochemical characterization of recombinant, thermostable, high-alkaline pectate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:560-567.
56. Bin Z, Guo-Cheng D, Wei S, Jian Z, Jian C. 2008. Expression of a *Bacillus subtilis* pectate lyase gene in *Pichia pastoris*. *Biochem Eng J* 40:92-98.
57. Zhang C, Yao J, Zhou C, Mao L, Zhang G, Ma Y. 2013. The alkaline pectate lyase PEL168 of *Bacillus subtilis* heterologously expressed in *Pichia pastoris* is more stable and efficient for degumming ramie fiber. *BMC Biotechnol* 13:26.
58. Itoh T, Akao S, Hashimoto W, Mikami B, Murata K. 2004. Crystal structure of unsaturated glucuronyl hydrolase, responsible for the degradation of glycosaminoglycan, from *Bacillus* sp. GL1 at 1.8 Å resolution. *J Biol Chem* 279:31804-31812.
59. Soriano M, Blanco A, Díaz P, Pastor FI. 2000. An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. *Microbiology* 146:89-95.
60. Itoh T, Akao S, Hashimoto W, Mikami B, Murata K. 2004. Crystal structure of unsaturated glucuronyl hydrolase, responsible for the degradation of glycosaminoglycan, from *Bacillus* sp. GL1 at 1.8 Å resolution. *J Biol Chem* 279:31804-31812.
61. Panek A, Pietrow O, Filipkowski P, Synowiecki J. 2013. Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. *Acta Biochim Pol* 60:163-166.
62. Kluskens LD, van Alebeek GJWM, Voragen AGJ, de Vos WM, van der Oost J. 2003. Molecular and biochemical characterization of the thermoactive family 1 pectate lyase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochem J* 370:651-659.
63. Tamaru Y, Doi RH. 2001. Pectate lyase A, an enzymatic subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4125-4129.
64. BeMiller JN. 2008. Polysaccharides: occurrence, significance, and properties 1413-1435. In Fraser-Reid B, Thiem TK. (ed.), *Glycoscience*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
65. Mukhopadhyay A, Bhattacharyya T, Dasgupta AK, Chakrabarti K. 2015. Nanotechnology based activation-immobilization of psychrophilic pectate lyase: a

- novel approach towards enzyme stabilization and enhanced activity. *J Mol Catal B Enzym* 119:54-63.
66. Mukhopadhyay A, Dasgupta AK, Chattopadhyay D, Chakrabarti K. 2012. Improvement of thermostability and activity of pectate lyase in the presence of hydroxyapatite nanoparticles. *Bioresour Technol* 116:348-354.
 67. Contesini FJ, de Alencar Figueira J, Kawaguti HY, de Barros Fernandes PC, de Oliveira Carvalho P, da Graça Nascimento M, Sato HH. Potential applications of carbohydrases immobilization in the food industry. *Int J Mol Sci* 14:1335-1369.
 68. Kuisiene N, Raugalas J, Chitavichius D. 2009. Phylogenetic, inter, and intraspecific sequence analysis of spo0A gene of the genus *Geobacillus*. *Curr Microbiol* 58:547-553.
 69. <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-101594.html>
 70. Stuknyte M, Guglielmetti S, Mora D, Kuisiene N, Parini C, Chitavichius D. 2008. Complete nucleotide sequence of pGS18, a 62.8-kb plasmid from *Geobacillus stearothermophilus* strain 18. *Extremophiles* 12:415-429.
 71. de Maayer P, Brumm PJ, Mead DA, Cowan DA. 2014. Comparative analysis of the *Geobacillus* hemicellulose utilization locus reveals a highly variable target for improved hemicellulolysis. *BMC Genomics* 15:836.
 72. Bezuidt OK, Pierneef R, Gomri AM, Adesioye F, Makhalanyane TP, Kharroub K, Cowan DA. 2016. The *Geobacillus* pan-genome: Implications for the evolution of the genus. *Front Microbiol* 7:723.
 73. Zheng B, Zhang F, Chai L, Yu G, Shu F, Wang Z, Su S, Xiang T, Zhang Z, Hou D, She Y. 2014. Permanent draft genome sequence of *Geobacillus thermocatenulatus* strain GS-1. *Mar Genomics* 18:129-131.
 74. Brumm PJ, Land ML, Mead DA. 2016. Complete genome sequences of *Geobacillus* sp. WCH70, a thermophilic strain isolated from wood compost. *Stand Genomic Sci* 11: 33.
 75. Brumm PJ, Land ML, Mead DA. 2015. Complete genome sequence of *Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93, a novel biomass degrader isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park. *Stand Genomic Sci* 10:73.
 76. Abbott DW, Gilbert HJ, Boraston AB. 2010. The active site of oligogalacturonate lyase provides unique insights into cytoplasmic oligogalacturonate β -elimination. *J Biol Chem* 285:39029-39038
 77. Collen PN, Jeudy A, Sassi JF, Groisillier A, Czjzek M, Coutinho PM, Helbert W. 2014. A novel unsaturated α -glucuronyl hydrolase involved in Ulvan degradation unveils the versatility of stereochemistry requirements in family GH105. *J Biol Chem* 289:6199-6211.
 78. Yao N, Ren Y, Wang W. 2013. Genome sequence of a thermophilic bacillus, *Geobacillus thermodenitrificans* DSM465. *Genome Announc* 1:e01046-13.
 79. Feng L, Wang W, Cheng J, Ren Y, Zhao G, Gao C, Tang Y, Liu X, Han W, Peng X, Liu R, Wang L. 2007. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5602-5607.
 80. Suzuki H, Yoshida K, Ohshima T. 2013. Polysaccharide-degrading thermophiles generated by heterologous gene expression in *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Appl Environ Microbiol* 79:5151-5158.
 81. Yang P, Kumar S, Hernandez RL, Jones SE, Cadle KM, Smith KP, Varela MF. 2009. Evidence for the transport of maltose by the sucrose permease, CscB, of *Escherichia coli*. *J Membr Biol* 228:79-88.

82. Hashimoto W, Kobayashi E, Nankai H, Sato N, Miya T, Kawai S, Murata K. 1999. Unsaturated glucuronyl hydrolase of *Bacillus* sp. GL1: novel enzyme prerequisite for metabolism of unsaturated oligosaccharides produced by polysaccharide lyases. *Arch Biochem Biophys* 368:367-374.
83. http://genome.jgi.doe.gov/BacspUNC41MFS5_FD/BacspUNC41MFS5_FD.info.html.
84. Studholme DJ. 2015. Some(bacilli) like it hot: genomics of *Geobacillus* species. *Microb Biotechnol* 8:4-48.

Curriculum vitae

Raimonda Petkauskaite

Vilnius University
Institute of Biosciences

Life Sciences Center, C 335
Sauletekio ave. 7
LT-10257 Vilnius, LITHUANIA

raimonda.petkauskaite@gf.vu.lt

telephone +370 677 16755

Date and place of birth	30.06.1986 Siauliai, Lithuania
Nationality	lithuanian
Languages	lithuanian (mother tongue), german, english, russian

Education

2016 - 2020	Bachelor studies, Physical therapy programme, Bachelor in rehabilitation Vilnius University
2011 - 2015	Doctoral studies, Biology programme Vilnius University
2009 - 2011	Master studies, Microbiology programme, Master in biology <i>Magna Cum Laude</i> diploma Vilnius University
2005 - 2009	Bachelor studies, Molecular biology programme, Bachelor in biology Vilnius University

Grants

2014	ERASMUS practice mobility scholarship Vilnius University
------	---

Articles

Petkauskaite R, Blom J, Goesmann A, Kuisiene N. 2017. Draft genome sequence of pectic polysaccharide-degrading moderate thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594. *Braz J Microbiol* 48:7-8.

Kieraite I, Petkauskaite R, Jasilionis A, Kuisiene N. 2015. Evaluation of the potential of free and immobilized thermophilic bacterial enzymes in the degradation of agro-industrial wastes. *Arch Biol Sci* 67:161-172.

Jasilionis A, Petkauskaite R, Kuisiene N. 2014. A novel type I thermostable pululanase isolated from a thermophilic starch enrichment culture. *Microbiology* 83:227-234.

Petkauskaite R, Lukosius D, Dębski J, Jasilionis A, Dadlez M, Kieraite I, Timonina A, Kuisiene N. 2014. Identification of proteins involved in starch and polygalacturonic acid degradation using LC/MC. *Centr Eur J Biol* 9:708-716.

Jomantiene R, Davis RE, Lee I-M, Zhao Y, Bottner-Parker K, Valiunas D, Petkauskaite R. 2010. Onion is host for two phytoplasma lineages, subgroups 16SrI-A and 16SrI-(B/L)L, in Lithuania: A *HinfI* site revealed a SNP marking divergent branches of evolution. *J Plant Pathol* 92:461-470.

Conference papers

Petkauskaite R, Kuisiene N. 2016. Characterization of the heteropolysaccharide utilization *YterRPL47* operon from *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594, abstr P-35. Abstr 3rd Congress of Baltic Microbiologists 2016 (CBM2016), Vilnius, Lithuania.

Kuisiene N, Petkauskaite R, Lukosius D, Jasilionis A. 2014. Liquid chromatography/mass spectrometry based identification, cloning and characterization of thermostable bacterial enzymes useful for the production of long-chain oligosaccharides from agro-industrial wastes. *N Biotechnol* 31(Suppl):S209-S210.

Petkauskaite R, Jasilionis A, Kieraite I, Kuisiene N. 2012. Screening of thermophilic polysaccharide-degrading enzymes using metaproteomics approach and mass spectrometry, abstr P-017. Abstr 6th International Congress on Biocatalysis (Biocat2012), Hamburg, Germany.

Petkauskaite R, Kieraite I, Timonina A, Jasilionis A, Gerasimova J, Kuisiene N. 2012. Functional food ingredients for gut health: identification of thermophilic enzymes useful for the production of long-chain oligosaccharides, abstr P-204, p 128. Abstr 8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology. INRA-Rowett, Clermont-Ferrand, France.

Petkauskaite R, Kuisiene N. 2012. Screening and initial characterization of microorganisms producing thermostable pectin-degrading enzymes. *Science in Faculty of Natural Sciences: Articles of the 7th scientific conference*, 5 October 2012. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 7:82-94.

Teaching activities

spring semester /2016 – 2019	Laboratory exercises in microbiology, bachelor studies Vilnius University Institute of Biosciences
autumn semester /2015 – 2019	Biology of pathogenic microorganisms, bachelor studies Vilnius University Institute of Biosciences
autumn semester /2016 – 2018	Medical microbiology, master studies Vilnius University Faculty of Natural Sciences

Academic work experience

from /2016	Teaching assistant Vilnius University, Institute of Biosciences
2015	Junior research associate Vilnius University, Institute of Biosciences
2014	Lecturer Vilnius University, Faculty of Natural Sciences, Department of Microbiology and Biotechnology
2011 – 2013	Junior research associate Vilnius University, Faculty of Natural Sciences, Department of Microbiology and Biotechnology
2010 – 2012	Molecular biology specialist National Public Health Surveillance Laboratory

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR JŲ KOPIJOS

1. Petkauskaite R, Blom J, Goesmann A, Kuisiene N. 2017. Draft genome sequence of pectic polysaccharide-degrading moderate thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594. *Braz J Microbiol* 48(1):7-8.
2. Kieraite I, Petkauskaite R, Jasilionis A, Kuisiene N. 2015. Evaluation of potential of free and immobilized thermophilic bacterial enzymes in the degradation of agro-industrial wastes. *Arch Biol Sci* 67:161-172.
3. Jasilionis A, Petkauskaite R, Kuisiene N. 2014. A novel type I thermostable pululanase isolated from a thermophilic starch enrichment culture. *Microbiology* 83:227-234.
4. Petkauskaite R, Lukosius D, Dębski J, Jasilionis A, Dadlez M, Kieraite I, Timonina A, Kuisiene N. 2014. Identification of proteins involved in starch and polygalacturonic acid degradation using LC/MS. *Centr Eur J Biol* 9:708-716.

**Draft genome sequence of pectic
polysaccharide-degrading moderate thermophilic bacterium
Geobacillus thermodenitrificans DSM 101594**

Raimonda Petkauskaitė, Jochen Blom,
Alexander Goesmann, and Nomeda Kuisienė

**Evaluation of the potential of free and immobilized
thermophilic bacterial enzymes in the degradation
of agro-industrial wastes**

Ieva Kieraitė, Raimonda Petkauskaitė,
Andrius Jasilionis, and Nomeda Kuisienė

**A novel type I thermostable pullulanase
isolated from a thermophilic starch enrichment culture**

Andrius Jasilionis, Raimonda Petkauskaitė, and Nomeda Kuisienė

**Identification of proteins involved
in starch and polygalacturonic acid
degradation using LC/MS**

Raimonda Petkauskaitė, Dangiras Lukošius, Janusz Dębski, Andrius Jasilionis,
Michał Dadlez, Ieva Kieraitė, Ana Timonina, and Nomedra Kuisienė

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 12 egz.