

رسالة الروح من الروح



دانشکده مهندسی کشاورزی
رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی
پایان نامه کارشناسی ارشد

بیان پروتئین نو ترکیب پکتات لیاز از باکتری *Cohnella* sp.

نگارنده:

شقایق افراز

اساتید راهنما:

دکتر ناصر فرخی

دکتر سعید امین زاده

شهریور ۱۳۹۴

دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه کارشناسی ارشد خانم شقایق افراز

تحت عنوان : بیان پروتئین نو ترکیب پکتات لیاز از باکتری *Cohnella sp.*

در تاریخ..... توسط کمیته تخصص زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد مورد ارزیابی و با

درجه.....مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	استاد مشاور	امضاء	اساتید راهنما
			آقای دکتر ناصر فرخی
			آقای دکتر سعید امین زاده

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
			آقای دکتر شاهرخ قرنچیک
			آقای دکتر محمدرضا عامریان

تقدیم ہے:

پدر و مادر عزیز و مہربانم،

کہ ارزشمندترین دارایی ہامی من در این جہانند

و جانم بستہ بہ حضور سبز شان است و بس۔

تقدیم ہے:

تمام آنانی کہ بانہایت مہر و اخلاص مرا علم آموختند

و روح تشنہ نام را سیراب کردند۔

مشکر و قدردانی

بارها تورا پاس که در لحظه لحظه‌ی زیست‌م همیشه در کنارم بودی و یاریم نمودی تا در مسیر علم و دانش قدم بگذارم و از مصاحبت با بهرامانی بس دانشمند و نیکو کلام بهره‌مند کردم. از تومی خواهم که با لطف و رحمت بیکرانت قطره‌ی دانشی که از پیش، بخشدی را به دیماهای واضح و بی‌کران دانش لایتناهیتم متصل کردانی و یاریم‌گانی تا بهره‌ساز از آنچه که بر من ارزانی داشته‌ای باشم و راه‌نمایی در پیش‌کنم.

در ابتدا از بهرامانی، همیشگی‌ام، پدر و مادر عزیزم، که در تمام مراحل زندگی حامی و پشتیبان من بودند و دعای خیرشان، همواره بدرقه‌ی راهم بوده و دست‌صیانه‌ی مشکر و قدردانی می‌نایم. اگر چه بازیچ‌واژه‌ای نمی‌توانم کسرتوگی‌مهری که در این سالها شمارم کرده اند را به رشته‌ی تحریر در آورم.

پاسگزاری می‌کنم از زحمات بی‌شائبه و بی‌دیغ اساتید راه‌نمای ارجمند و بزرگوار، جناب آقای دکتر ناصر فرخی، که بی‌شک زنده‌تندار کسوت اسادی، که به عنوان انسانی عالم و بزرگوار از محضر ایشان بسیار آموختم و شاید بی‌حضور ایشان حرکتی نی‌یافتم که چگونه می‌توان در سلولی کوچک، عظمت بی‌بدلیل خالق هستی بخش را به نظاره نشست و این امر تنها بواسطه‌ی علم بی‌بدیل ایشان محقق گشت و بس. بدون شک، لطف، همراهی و راه‌نمایی‌های دل‌سوزانه و همیشگی، صبر و افر و ایده‌های بسیار خلاقانه ایشان در تمامی مراحل تحقیق، تدوین و نگارش این پایان‌نامه، مرادگام برداشتن در این مسیر دشوار، استوار و ثابت قدم نمود. جناب آقای دکتر سعید امین‌زاده، که حرکت لطف و مویبت حضور گرم و همراهی همیشگی‌شان را از خاطر نخواهم برد. ایشان در تمام مراحل انجام این تحقیق، با حسن خلق و روی‌گشاده، همواره پذیرای من و پرسش‌های فراوانم بودند و در این راه از هیچ کوششی فروگذار ننمودند. از ایشان به خاطر اینکه علیرغم وجود مشغله‌ی زیاد، همواره فرصت کافی برای راه‌نمایی اینجانب داشتند، قدردانی و پاسگزاری می‌نمایم. بی‌شک بدون تلاش‌های این بزرگواران، به‌شمر نشستن این تحقیق امری محال بود. همچنین از زحمات تمامی اساتید گرانقدرم، جناب آقایان دکتر شاهرخ قربچیک، دکتر محمد رضا عامریان و دکتر محبتی مرآبادی که از محضر ایشان بسیار آموختم، کمال‌مشکر را دارم. از تمامی کارکنان و کارشناسان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بهره‌یژه‌ی کارشناس و کارکنان محترم آزمایشگاه دام و آبریان که نیات مساعدت را جهت انجام این تحقیق نمودند، کمال‌مشکر را دارم. از دوستان ارجمند و گرانقدرم، سرکار خانم فاطمه زبردست، مریم رضانی، فاطمه فرزانه، مریم رشیدی‌فر، اناز فیمی، میترا شفیعی، زهرا کریمی، صدقه‌قریشی، نیره اشعار قدیم، مرضیه حسنی، وجهه‌غدیریان، سانه‌بنیان، فائزه حسنی و آقای میثم رضایی و تمامی دوستانی که نامشان در خاطر من نیست اما لطف و همراهی همیشگی‌شان همواره شامل حال اینجانب بوده است، کمال‌مشکر را دارم.

تعهد نامه

اینجانب شقایق افراز، دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بیان پروتئین نو ترکیب پکتات لیا از باکتری *Cohnella sp.* تحت راهنمایی آقایان دکتر ناصر فرخی و دکتر سعید امین زاده، متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
 - در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
 - مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
 - کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
 - حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
 - در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
 - در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .
- تاریخ:

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

آنزیم پکتات لیاز از انواع آنزیم‌های پکتیناز است که با عملکرد خود و انجام واکنش بتا الیمیناسیون، موجب کاتالیز برش حذفی اتصالات آلفا یک به چهار موجود در فقره‌ی پلی‌گالاکتورونیک اسید و تشکیل الیگوگالاکتورونات‌های غیر اشباع می‌شود. حضور این آنزیم تا کنون در گیاهان، میوه‌ها و میکروارگانیسم‌هایی نظیر قارچ‌ها و باکتری‌ها به اثبات رسیده است. از آنجائیکه این آنزیم نقش مهمی در تجزیه‌ی پکتات موجود در تیغه‌ی میانی گیاهان دارد، عمدتاً آن‌را به عنوان آنزیمی کلیدی و موثر در فرآیندهای زیستی مانند رشد و نمو و نیز نرمی و رسیدگی میوه‌ها در طول فرآیند بلوغ در نظر می‌گیرند. به‌علاوه حضور این آنزیم در اغلب میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، نقش مهمی را برای این آنزیم در مراحل ابتدایی نفوذ این جانداران به بافت میزبان، به اثبات رسانیده است. در این پایان نامه، ژن کد کننده‌ی آنزیم پکتات لیاز از باکتری بومی ترموفیل *Cohnella* sp.A01، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، جداسازی و همسانه سازی شد. همسانه سازی در وکتور بیانی pET26-b در میزبان پروکاریوتی BL21 (DE3) به انجام رسید و ژن مذکور با القا توسط IPTG بیان گردید. فرآیند خالص‌سازی پروتئین نوترکیب تولیدی با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل سفارز انجام شد و ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم خالص مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت به منظور مشاهده‌ی تاثیر آنزیم بر روی سوبسترا، زیست‌سنجی و نیز آزمون پلیت به انجام رسید. نتایج این پژوهش نشان داد که پروتئین نوترکیب پکتات لیاز دارای pH و دمای اپتیمم ۷ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد است و در این شرایط بیشترین فعالیت را دارد. همچنین این آنزیم در ۹-۶ pH و نیز دمای ۷۰-۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد از پایداری نسبتاً بالایی برخوردار است و از این‌رو می‌تواند گزینه‌ی مناسبی جهت استفاده در پیش‌تصفیه‌ی پساب‌های پکتیکی، صنایع نساجی و نیز فرآیند استخراج روغن باشد.

واژگان کلیدی: پکتات لیاز، همسانه‌سازی، پروتئین نوترکیب، ویژگی‌های بیوشیمیایی

همسانه سازی ژن کد کنندهی آنزیم پکتات لیاز از باکتری ترموفیل *Cohnella A01*

شقایق افراز، سعید امین زاده، ناصر فرخی

اولین کنگره بین المللی و سیزدهمین کنگره ژنتیک ایران - تهران (پوستر)

۳-۵ خردادماه ۱۳۹۳

بررسی بیوانفورماتیکی ویژگی های بیوشیمیایی پکتات لیاز L در میکروارگانیسیم های

باکتریایی و قارچی

شقایق افراز، ناصر فرخی، سعید امین زاده، فاطمه زبردست رودی

اولین کنگره بین المللی و سیزدهمین کنگره ژنتیک ایران - تهران (پوستر)

۳-۵ خردادماه ۱۳۹۳

تولید پروتئین نو ترکیب پکتات لیاز Coh01152 از باکتری *Cohnella A01*

شقایق افراز، سعید امین زاده، ناصر فرخی

اولین همایش الکترونیکی یافته های نوین در محیط زیست و اکوسیستم های کشاورزی - تهران (پوستر)

۳۰ آذر ۹۳

پیش بینی ساختار دوم آنزیم پکتات لیاز باکتری *CohnellaA01* با استفاده از نرم افزار

PSIPRED

شقایق افراز، سعید امین زاده، ناصر فرخی

اولین همایش بین المللی و نهمین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران

۳-۵ خرداد ۹۴

فهرست مطالب

مقدمه و کلیات

- ۱-۱ پکتین ۲
- ۲-۱ ساختار پکتین ۳
- ۳-۱ مصارف پکتین ۱۱
- ۴-۱ منابع پکتین و انواع روشهای استخراج آن ۱۷
- ۵-۱ آنزیمها ۲۲
- ۱-۵-۱ آنزیمهای پکتینولیتیک ۲۳
- ۲-۵-۱ تقسیم بندی پکتینازها ۲۴
- ۶-۱ لیازها ۲۹
- ۱-۶-۱ پکتات لیازها ۳۰
- ۲-۶-۱ ساختار پروتئینی پکتات لیاز ۳۴
- ۳-۶-۱ مکانیسم عمل پلی گالاکتورونات لیازها (پکتات لیاز) ۳۲
- ۵-۶-۱ منابع تولید آنزیم پکتات لیاز ۳۶
- ۶-۶-۱ پکتات لیازهای گیاهی ۳۸
- ۷-۶-۱ تولید پکتات لیازهای میکروبی به صورت نو ترکیب ۳۹

فصل دوم

- ۱-۲ مطالعات بیوانفورماتیکی ۴۴
- ۲-۲ مواد مورد استفاده در این پژوهش ۴۵
- ۳-۲ استخراج DNA ژنومی و تعیین کمیت و کیفیت آن ۴۵
- ۴-۲ تکثیر ژن پکتات لیاز مربوط به سویه بومی ایزوله شده ۴۶
- ۱-۴-۲ طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن پکتات لیاز ۴۶
- ۲-۴-۲ تکثیر ژن پکتات لیاز از DNA ژنومی الگو جهت استفاده در فرایند کلونینگ ۴۷
- ۳-۴-۲ تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) ۴۷
- ۵-۴-۲ مستعد کردن باکتری *E. coli* به روش استفاده از محلول $CaCl_2$ ۵۰

- ۶-۴-۲ ترانسفورم کردن محصول الحاق درون باکتری مستعد با استفاده از روش شوک حرارتی ۵۱
- ۷-۴-۲ تأیید کلنیهای نو ترکیب صحیح ۵۲
- الف- آزمایش اختلاف حرکت بر روی ژل آگارز ۵۲
- ب- روش هضم آنزیمی ۵۲
- ۸-۴-۲ هضم ناقل pET26b و الحاق ژن در وکتور بیانی ۵۳
- ۹-۴-۲ ترانسفورماسیون در میزبان بیانی ۵۵
- ۵-۲ فرآیند بیان ژن پکتات لیاز ۵۵
- ۶-۲ تهیه ژل SDS-PAGE جهت تأیید بیان ۵۶
- ۷-۲ لیز باکتریها با دستگاه اولتراسونیک (Sonifier) ۵۷
- ۸-۲ مراحل تخلیص پروتئین نو ترکیب تحت شرایط طبیعی ۵۸
- ۹-۲ بررسی فعالیت آنزیم پکتات لیاز و فاکتورهای مؤثر بر آن ۵۹
- روشهای سنجش فعالیت آنزیم پکتات لیاز ۵۹
- ۱۰-۲ تعیین غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد ۶۰
- ۱۱-۲ تعیین پارامترهای کینتیکی V_{max} و K_m ۶۱
- ۱۲-۲ تعیین ویژگیهای بیوشیمیایی آنزیم ۶۲
- ۱-۱۲-۲ مطالعه اثر pH بر روی فعالیت آنزیم و بدست آوردن pH بهینه (pH profile) ۶۳
- ۲-۱۲-۲ تأثیر دما روی فعالیت آنزیم (Temperature Profile) و بدست آوردن دمای اپتیمم ۶۴
- ۳-۱۲-۲ بررسی پایداری آنزیم نسبت به pH (pH Stability) ۶۴
- ۴-۱۲-۲ بررسی پایداری آنزیم نسبت به pH (pH Stability) در طول زمان ۶۴
- ۵-۱۲-۲ بررسی پایداری آنزیم در دماهای مختلف (Temperature Stability) ۶۴
- ۱۳-۲ انجام تست پلیت جهت نشان دادن خوردگی سوبسترا توسط آنزیم ۶۵
- ۱۴-۲ انجام سنجش زیستی جهت مشاهده فعالیت آنزیم ۶۶

فصل سوم

- ۱-۳ نتایج حاصل از مطالعات بیوانفورماتیکی ۶۸
- ۲-۳ تکثیر و همسانه سازی ژن پکتات لیاز ۷۲
- ۲-۲-۳ الحاق ژن در وکتور بیانی pET26b و ترانسفورماسیون در میزبان BL21 (DE3) ۷۲
- ۳-۳ بیان ژن پکتات لیاز و خالصسازی آن ۷۴
- ۴-۳ محاسبه پارامترهای V_{max} و K_m آنزیم ۷۴

۷۴	۵-۳ تعیین غلظت پروتئین
۷۷	۶-۳ تعیین ویژگیهای بیوشیمیایی آنزیم پکتات لیاز
۷۷	۷-۳ آزمون خوردگی سوبسترا توسط آنزیم
۸۰	۸-۳ زیست سنجی آنزیم بر روی برگ گیاه بنتامیانا

فصل چهارم

۸۴	بحث پیشنهادات
۹۳	ضمائم
۱۰۳	منابع

فصل اول

مقدمه و کلیات

مواد پکتیکی، خانواده‌ای از هتروپلی ساکاریدهای گلیکوزیدی پیچیده اسیدی و غنی از گالاکتورونیک اسید با پیوندهای کووالانت هستند که در تیغه میانی و دیواره سلولی اولیه گیاهان عالی و در نواحی اتصال میان سلول‌های دارای دیواره سلولی ثانویه شامل آوندچوب یافت می‌شوند (آلبرشایم و همکاران، ۱۹۹۶). پکتین سوبسترای آنزیم‌های پکتیناز می‌باشد. پکتینازها گروهی متنوع از آنزیم‌های وابسته به یکدیگر هستند که به هیدرولیز مواد پکتینی می‌پردازند. آنزیم‌های پکتینولیتیک به طور گسترده‌ای در گیاهان عالی و میکروارگانیسم‌ها دیده می‌شوند و با عمل خود در گیاهان موجب کمک به فرآیند رشد سلولی و نرم‌شدگی برخی بافت‌های گیاهی در طول فرآیند بلوغ و ذخیره‌ی مواد می‌شوند. پکتات لیازها (-EC4.2.2) که با نام پکتات ترانس الیمینازها هم شناخته می‌شوند، موجب کاتالیز برش حذفی پکتین دی‌استریفیه می‌شوند که ترکیب عمده‌ی موجود در دیواره‌های سلولی اولیه‌ی بسیاری از گیاهان عالی است. فعالیت آنزیم پکتات لیاز، اولین بار در کشت‌های *Erwinia carotovora* و *Bacillus polymyxa* مشاهده شد (استار و موران، ۱۹۶۲). تا کنون ژن‌های پکتات لیاز زیادی از منابع مختلف گیاهی، قارچی و باکتریایی جداسازی و همسانه‌سازی شده‌اند که با یکدیگر همولوژی اندکی نشان می‌دهند. در این پژوهش ژن پکتات لیاز از باکتری بومی ترموفیل *Cohnella* sp.A01 مورد مطالعه قرار گرفت. تا کنون گزارشی مبنی بر استخراج آنزیم پکتات لیاز از این باکتری به ثبت نرسیده است در این فصل به معرفی پکتین و ساختمان آن، آنزیم‌ها و مزایای استفاده از آنزیم‌های ترموفیل در صنعت، پکتینازها و انواع آن، پکتات لیازهای میکروبی و مصارف آن و همچنین باکتری کوهنلا، خواهیم پرداخت.

۱-۱ پکتین

خصوصیات ژله‌ای پکتین اولین بار توسط هنری براکونات (۱۸۵۲) توصیف شد و وی نام پکتین را از کلمه یونانی pektikos به معنای سفت‌شدن الهام گرفت (ویلاتس و همکاران، ۲۰۰۶). مواد پکتیکی، خانواده‌ای از هتروپلی ساکاریدهای گلیکوزیدی پیچیده اسیدی با وزن مولکولی بالا و غنی از

گالاکتورونیک اسید با پیوندهای کووالانسی هستند (رومبوتس، ۱۹۸۰، آلبرشایم و همکاران، ۱۹۹۶، آلکورتا، ۱۹۹۸) که حدود یک سوم از وزن خشک بافت گیاهان را به خود اختصاص می‌دهند (گوپتا و همکاران، ۲۰۰۳). پکتین در دیواره‌های سلولی تمامی گیاهان عالی و نیز دیواره‌های بازدانگان، سرخس‌ها و خزها یافت می‌شود (آنیل و همکاران، ۲۰۰۴). پکتین در نواحی خاصی از دیواره سلولی، مانند اطراف سلول‌های در حال رشد و تقسیم، بخش‌های نرم گیاه، تیغه‌ی میانی و کناره‌های سلول به وفور یافت می‌شود. پکتین همچنین در نواحی اتصال میان سلول‌هایی با دیواره سلولی ثانویه شامل آوندچوب و سلول‌های رشته‌ای موجود در این بافت حضور دارد.

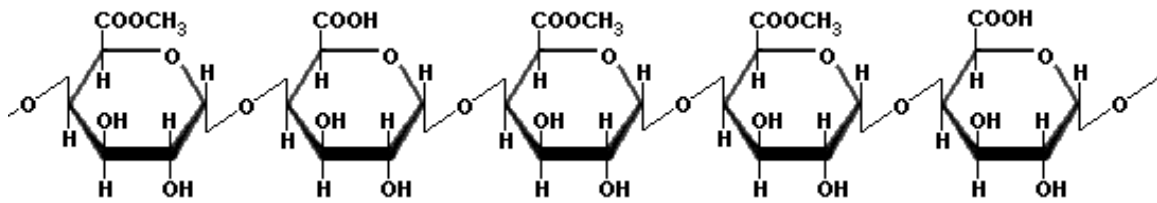
همبستگی موجود میان افزایش مقادیر پکتین در گیاهان آوندی و پیدایش گیاهانی سازگار با رشد در خشکی و گسترش دیواره‌های ثانویه چوبی شده در آنها، این فرض را قوت می‌بخشد که پکتین دارای نقش‌های کلیدی در رابطه با عملکرد و ساختار دیواره‌های اولیه و ثانویه است (مونن، ۲۰۰۸). شواهد متعددی نشان‌دهنده‌ی نقش پکتین در رشد، توسعه، ریخت‌زایی، دفاع، چسبیدن سلول به سلول، ساختار دیواره، پیام‌رسانی، گسترش سلولی، تخلخل دیواره، اتصال یون‌ها، فاکتورهای رشد و آنزیم‌ها، رشد لوله‌گرده، آبگیری بذور، ریزش برگ و نمو میوه‌ها می‌باشد (ریدلی و همکاران، ۲۰۰۱، ویلاتس و همکاران ۲۰۰۱).

۱-۲ ساختار پکتین

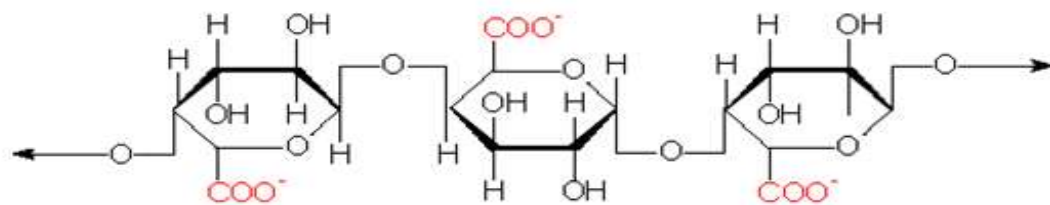
فقره اولیه مواد پکتیکی از واحدهای D-گالاکتورونیک اسید (۷۰٪ از حجم پکتین) تشکیل شده است. گروه‌های کربوکسیل موجود در هر واحد گالاکتورونیک اسید می‌توانند به صورت آزاد یا استریفیه شده با متانول وجود داشته باشند. در طبیعت بیش از ۸۰ درصد از این واحدها استریفیه شده‌اند. از منظر شیمیایی و بر اساس درصد متیلاسیون، پکتین‌ها به ۴ گروه عمده‌ی پروتوپکتین‌ها، پکتین‌ها، پکتات و پکتینات‌ها تقسیم می‌شوند. پروتوپکتین‌ها، مواد پکتیکی غیرمحلول در آب با وزن مولکولی بالا هستند که به سختی هیدرولیز می‌شوند و پکتین‌ها و پکتیک‌اسیدها را به وجود می‌آورند. و زنجیره‌های

ساختمانی آنها می‌تواند در ترکیب با Ca^{2+} ، پکتات‌ها را تولید نمایند. پکتین‌ها، پلی‌گالاکتورونات‌هایی هستند که حداقل ۷۵٪ از گروه‌های کربوکسیل واحدهای گالاکتورونات آنها با متانول، استریفیه شده است (شکل ۱-۱). پکتیک‌اسیدها (پکتات‌ها)، پلیمرهای محلول از گالاکتورونان‌ها هستند که دارای گروه‌های متوکسیل (کربوکسیل‌های متیل استریفیه شده) اندک و یا فاقد آن می‌باشند (شکل ۱-۲). اسیدهای پکتیکی شامل ۵ تا ۱۰۰ مولکول اسید گالاکتورونیک هستند. پکتینیک‌اسیدها (پکتینات‌ها)، پلی‌گالاکتورونات‌هایی هستند که کمتر از ۷۵٪ از گروه‌های کربوکسیل آن متیله شده‌اند (شکل ۱-۳) و حاوی ۱۰۰ تا ۲۰۰ مولکول اسیدگالاکتورونیک هستند.

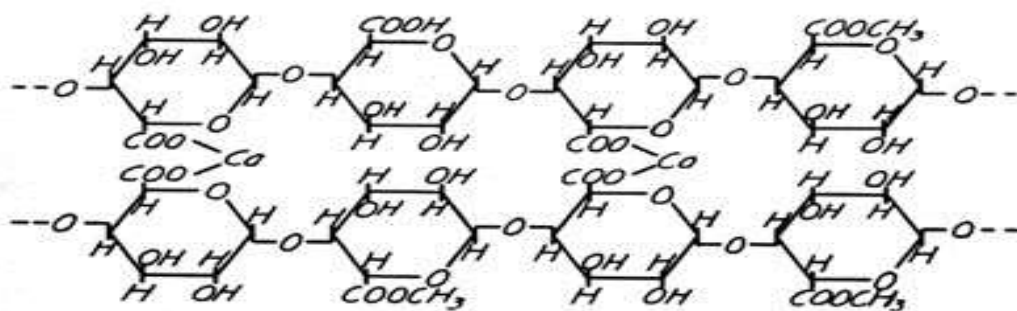
از منظر ساختاری پلی‌ساکاریدهای پکتیکی به سه گروه عمده هموگالاکتورونان (HM) ، رامنوگالاکتورونان I (RG-I) و رامنوگالاکتورونان II (RG-II)، تقسیم می‌شوند که هر سه از اجزای تشکیل دهنده‌ی پکتین هستند. هموگالاکتورونان (HG)، پلی‌ساکاریدی پکتیکی و هموپلیمری خطی متشکل از واحدهای دی‌گالاکتورونیک اسید (α -1,4-D-GalA) است که ۶۵٪ از حجم پکتین را به خود اختصاص می‌دهد (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵). هموگالاکتورونان عمدتاً دارای کربوکسیل متیل استریفیه شده در کربن ۶ و کربوکسیل استیله شده در اکسیژن ۲ یا ۳ است (شکل ۱-۴؛ انیل و همکاران، ۱۹۹۰) و ممکن است حاوی سایر استرها با ساختار نامعین باشد (مک کینون و همکاران، ۲۰۰۲، جکسون و همکاران، ۲۰۰۷).



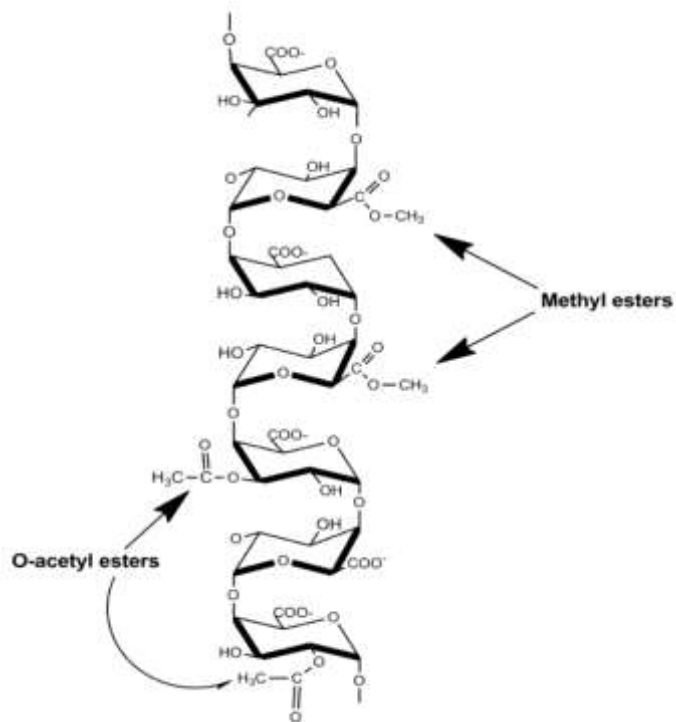
شکل ۱-۱. ساختار پلی گالاکتورونیک اسید. این مولکول از تکرار واحدهای D-گالاکتورونیک اسید بوجود آمده است که با پیوندهای گلیکوزیدی آلفا یک به چهار یه یکدیگر متصل شده‌اند و بیش از ۷۵٪ از گروه‌های کربوکسیل واحدهای گالاکتورونات آن، با متانول استریفیه شده است
(www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates2.html).



شکل ۱-۲. ساختار پکتات. این مولکول، پلی کالاکتوروناتی است که دارای گروه‌های متوکسیل (کربوکسیل‌های متیل استریفیه شده) اندک و یا فاقد آن می‌باشد.



شکل ۱-۳. ساختار پکتینات. پکتینیک اسیدها، پلی گالاکتورونات‌هایی هستند که کمتر از ۷۵٪ از گروه‌های کربوکسیل آن متیله شده‌اند و حاوی ۱۰۰ تا ۲۰۰ مولکول اسیدگالاکتورونیک هستند
(www.citrech.it/eng/Chemical%20Composition.html).



شکل ۱-۴. ساختار هموگالاکتورونان. این مولکول یک هموپلیمر خطی تشکیل شده از واحدهای دی گالاکتورونیک اسید (α -1,4-D-GalA) است که عمدتاً دارای کربوکسیل متیل استریفیه شده در کربن ۶ و کربوکسیل استیله شده در اکسیژن ۲ یا ۳ است (www.intechopen.com/books/polymerization/plant-cell-wall-polymers-) (function-structure-and-biological-activity-of-their-derivatives).

رامنوگالاکتورونان I (RG-I)، ۳۵-۲۰ درصد از حجم پکتین را به خود اختصاص می‌دهد و از تکرار واحدهای دی‌ساکاریدی رامنوگالاکتورونیک اسید $[1,4,6D-GalA-1,2-6L-Rha-1-4]_n$ به وجود می‌آید. واحدهای گالاکتورونیک اسید می‌توانند استیله شوند و هر واحد می‌تواند حامل زنجیره‌های جانبی از قندهای طبیعی خنثی همچون گالاکتوز، آرابینوفورانوز و زایلوز باشد و سطح تنوع بالایی به لحاظ نوع و تعداد قندها، الیگوساکاریدها و الیگوساکاریدهای منشعب متصل به فقره‌ی آن مشاهده می‌شود (شکل ۱-۵) (ریدلی و همکاران، ۲۰۰۱، ویلاتس و همکاران، ۲۰۰۱، گولمین و همکاران، ۲۰۰۵). بین ۲۰ تا ۸۰ درصد از واحدهای رامنوزیل موجود در فقره‌ی رامنوگالاکتورونان I دارای زنجیره‌های جانبی حاوی واحدهای منفرد، خطی یا منشعب β -D-Galp و α L-Araf هستند (ناکامورا و همکاران ۲۰۰۲). رامنوگالاکتورونان II (RG-II)، ساختاری به شدت منشعب و پیچیده دارد که ۱۰ درصد از حجم پکتین را به خود اختصاص می‌دهد (شکل ۱-۵؛ انیل و همکاران، ۲۰۰۴). RG-II در حقیقت شامل یک فقره‌ی هموگالاکتورونان متشکل از ۸ واحد (یا بیشتر) D- گالاکتورونیک اسید با زنجیره‌های جانبی کمپلکس حاوی ۱۲ نوع مختلف از قندها است. این مولکول در مقایسه با رامنوگالاکتورونان I منشعب‌تر و حاوی قندهای متنوع‌تری در محل انشعاب است (ویلاتس و همکاران، ۲۰۰۶).

واحدهای RG II در دیواره، توسط پیوندهای دی‌استری بُرات به صورت عرضی قرار گرفته‌اند (ایشی و همکاران ۱۹۹۹). ساختار رامنوگالاکتورونان II به میزان زیادی در میان گونه‌های گیاهی متیله و حفاظت شده است. RG-II معمولاً در دیواره‌های سلولی به صورت دایمر دیده می‌شود (انیل و همکاران، ۲۰۰۳). دایمریزه شدن واحدهای رامنوگالاکتورونان سبب به وجود آمدن شبکه‌ی ماکرومولکولی پکتینی مؤثر در رشد و نمو می‌شود (ماتوساگا و همکاران، ۲۰۰۴). به علاوه وجود اتصالات عرضی RG-II مانع افزایش تخلخل دیواره و در نتیجه افزایش مقاومت مکانیکی آن می‌شود (انیل، ۲۰۰۴).

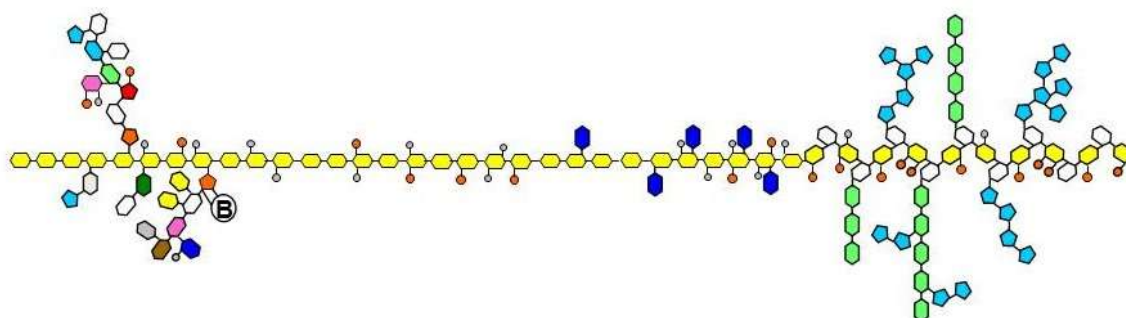
گالاکتورونان‌هایی با زنجیره‌های جانبی مانند زایلوگالاکتورونان (XGA) و آپیوگالاکتورونان (AP) نیز به صورت بسیار محدودتری در ساختار پکتین دیده می‌شوند (شکل ۱-۵). زایلوگالاکتورونان،

هموگالاکتورونانی است که در اکسیژن شماره ۳ با یک زایلوز جایگزین شده است (شکل ۱-۶؛ زاندلون و همکاران، ۲۰۰۶). حضور زایلوگالاکتورونان در بافت‌های تولیدمثلی مانند مادگی نسبت به سایر بافت‌ها متداول‌تر است. با این حال حضور آن در ساقه‌ها و برگ‌های آرابیدوپسیس نیز مشاهده شده است (زاندلون و همکاران، ۲۰۰۷). افزایش بیوسنتز زایلوگالاکتورونان در پاسخ به هجوم پاتوژن‌ها، این فرضیه را قوت می‌بخشد که حداقل برخی از هموگالاکتورونان‌های جانشین شده مانند زایلوگالاکتورونان ممکن است دارای عملکردی باشند که منجر به افزایش مقاومت هموگالاکتورونان در مقابل تجزیه توسط اندوپلی‌گالاکتورونازهای تولیدی توسط پاتوژن‌ها می‌شود (جنسن و همکاران، ۲۰۰۸). آپیوگالاکتورونان (AP)، هموگالاکتورونانی است که در اکسیژن ۲ یا ۳ با D-آپیوفورانوز شاخه‌دار شده است و در تک‌لپه‌ای‌های آبی چون *Lemna* یافت می‌شود (مونن، ۲۰۰۸).

غالباً اینگونه تصور می‌شود که پلی‌ساکاریدهای پکتیکی با پیوندهای کووالانت به یکدیگر متصل شده‌اند، چون جداسازی HG، RG-I و RG-II از یکدیگر و نیز از دیواره سلولی نیازمند تیمارهای شیمیایی قوی یا هضم با کمک آنزیم‌های تجزیه‌کننده پکتین است. اینکه بخش‌های مختلف هموگالاکتورونان، رامنوگالاکتورون I و رامنوگالاکتورون II چگونه سرهم می‌شوند و نحوه ارتباط آنها با سایر پلیمرهای موجود در دیواره به چه صورت است، چندان مشخص نیست. با این حال، اطلاعات موجود از مدلی حمایت می‌کند که فقره‌های هموگالاکتورونان، RG-I و RG-II در آن با برقراری پیوندهای کووالانت پلیمرهای مشترکی را تشکیل می‌دهند در آن این مولکول‌ها از طریق فقره‌هایشان به یکدیگر متصل شده‌اند (شالر و همکاران، ۲۰۰۷).

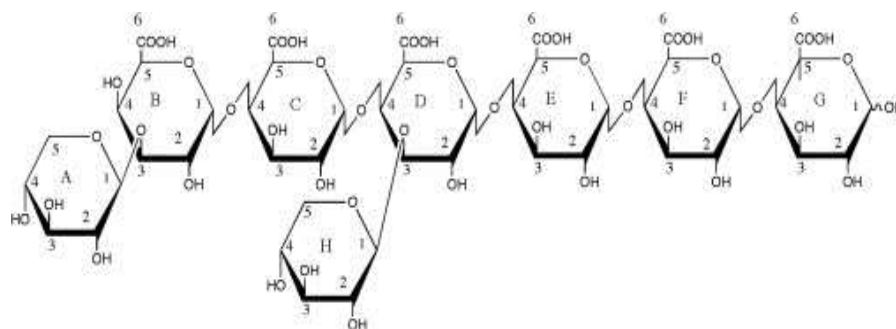
پکتین‌ها مشخصاً از شبکه‌های سست ژله‌ای پلیمرهای به شدت آبدار تشکیل می‌شوند و بخش‌های ژله‌ای میوه را تشکیل می‌دهند. در ژله‌های پکتینی گروه‌های کربوکسیل باردار (COO^-) زنجیره‌های

Rhamnogalacturonan II Homogalacturonan Xylogalacturonan Rhamnogalacturonan I



● = D-Galacturonic acid	● = L-Arabinose	● = D-Apiose	● = O-Acetyl
○ = L-Rhamnose	● = D-Galactose	● = L-Fucose	♀ = O-Methyl
● = D-Glucuronic acid	● = L-Aceric acid	● = D-Xylose	ⓑ = Borate
● = Kdo	○ = D-Dha	○ = L-Galactose	

شکل ۱-۵. ساختار اجزای تشکیل دهنده‌ی مولکول پکتین. رامنوگالاکتورونان I. واحدهای دی‌ساکارییدی رامنو گالاکتورونیک اسید موجود در فقره‌ی مولکول رامنوگالاکتورونان I می‌توانند استیله شوند و هر واحد می‌تواند حامل زنجیره‌های جانبی از قندهای طبیعی خنثی همچون گالاکتوز، آرابینوز و زایلوز باشد بین ۲۰ تا ۸۰ درصد از واحدهای رامنوزیل موجود در فقره‌ی رامنوگالاکتورونان I دارای زنجیره‌های جانبی حاوی واحدهای منفرد، خطی یا منشعب β -D-Galp و α -L-Araf هستند. رامنوگالاکتورونان II. این مولکول شامل یک فقره‌ی هموگالاکتورونان متشکل از ۸ واحد (یا بیشتر) -D- گالاکتورونیک‌اسید با زنجیره‌های جانبی کمپلکس حاوی ۱۲ نوع مختلف از قندهاست و در مقایسه با رامنوگالاکتورونان I منشعب‌تر و حاوی قندهای متنوع‌تری در محل انشعاب است. واحدهای RG II در دیواره، توسط پیوندهای دی‌استری بورات به صورت عرضی قرار گرفته‌اند. زایلوگالاکتورونان. این مولکول به صورت بسیار محدودی در ساختار پکتین دیده می‌شود و هموگالاکتورونانی است که در اکسیژن شماره ۳ با یک زایلوز جایگزین شده است (Scheller et al. 2007, Yadav et al. 2009).



شکل ۱-۶. ساختار زایلوگالاکتورونان. زایلوگالاکتورونان به صورت محدودی در ساختار پکتین دیده می‌شود است و هموگالاکتورونانی است که در اکسیژن شماره ۳ با یک زایلوز جایگزین شده است (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621508001559>).

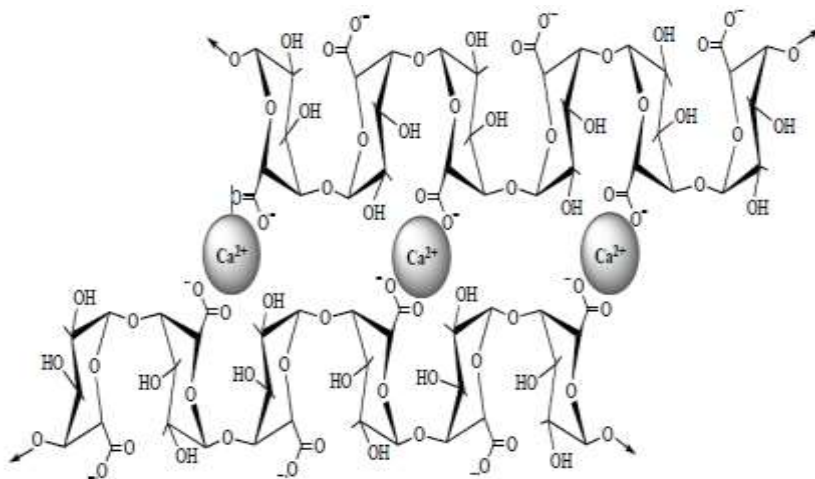
جانبی پکتین‌های مجاور از طریق یون‌های Ca^{2+} به یکدیگر متصل می‌شوند و ضمن تشکیل کمپلکس محکمی با پکتین موجب ایجاد شبکه‌ی بزرگی می‌شوند (شکل ۱-۷؛ وینکن و همکاران، ۲۰۰۳).

پکتین‌ها دچار تغییراتی می‌شوند که ممکن است شکل و پیوند آنها را در دیواره تغییر دهد. بسیاری از دنباله‌های اسیدی پکتین توسط گروه‌های متیل، استیل و سایر گروه‌ها طی بیوسنتز در دستگاه گلژی استری می‌شوند. این استری شدن^۱، گروه‌های کربوکسیل را می‌پوشاند و مانع از برقراری اتصالات کلسیمی مابین پکتین‌ها می‌شود. بنابراین حالت ژله‌ای و سخت پکتین‌ها کاهش می‌یابد (مک‌کان و همکاران، ۲۰۰۱).

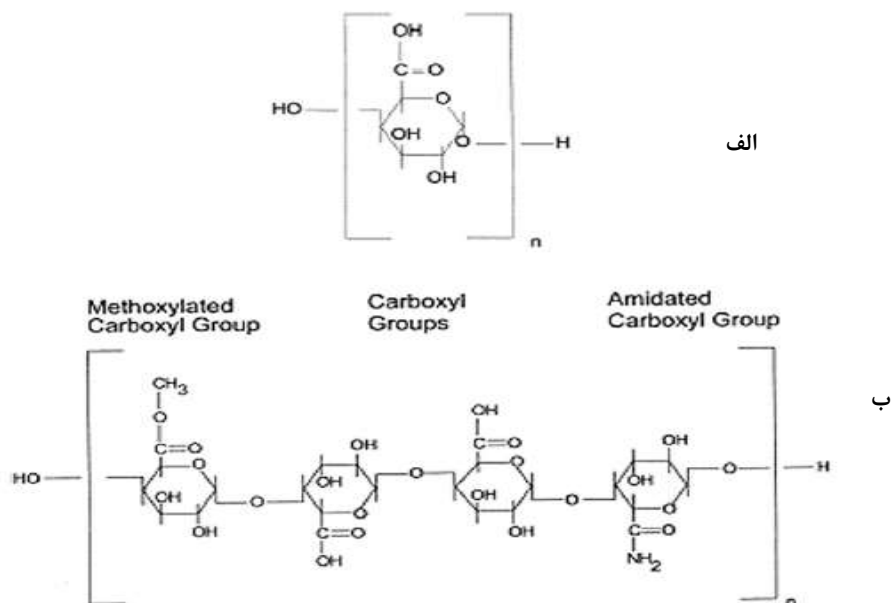
به محض ترشح پکتین به داخل دیواره، گروه‌های استری توسط پکتین استراژهای موجود در دیواره برداشته می‌شوند و با آزاد شدن گروه‌های کربوکسیل، توانایی پکتین در تشکیل ژل‌های سخت افزایش می‌یابد. در میوه‌های نرسیده، پکتین به عنوان ماده‌ی پکتیکی غیرمحلول در آب یافت می‌شود که به میکروفیبرهای سلولزی دیواره‌های سلولی متصل شده است. نرم‌شدگی میوه‌ها و تجزیه‌ی سایر بافت‌های گیاهی با افزایش مقادیر پکتین متیل استراژها همراه است که موجب هیدرولیز استرهای متیل در پکتین می‌شوند و پکتین را برای هیدرولیز بعدی توسط پکتینازها و آنزیم‌های وابسته آماده می‌سازد و موجب پدید آمدن مولکول‌های محلول‌تری از پکتین خواهند شد. وجود این تغییرات آنزیمی در دیواره‌ی سلول نشان می‌دهد که دیواره‌ها قابلیت تغییرات قابل توجهی را در حین نمو دارند (کاشیاب و همکاران، ۲۰۰۳).

گروه‌های متوکسیل، در حین استریفیکاسیون گروه‌های کربوکسیل با متانول به‌وجود می‌آیند. از سوی دیگر، گروه کربوکسیل آمیدی زمانی به‌وجود می‌آید که برخی از واحدهای گالاکتورونیک اسید با آمونیاک تبدیل به کربوکسیلیک آمید شوند (شکل ۱-۸؛ اسپیتیا و همکاران، ۲۰۱۴).

۱- در شیمی، استرها ترکیبات شیمیایی هستند که از اسیدها مشتق می‌شوند و در آنها حداقل یکی از گروه‌های هیدروکسیل با یک گروه آلکیل جایگزین شده است. معمولا استرها از واکنش میان کربوکسیلیک اسید و یک الکل به‌وجود می‌آیند



شکل ۱-۷. ساختمان پکتین، اتصال گروه‌های کربوکسیل باردار (COO^-) زنجیره‌های جانبی گالاکتورونوزیل موجود در دو فقره‌ی هموگالاکتورونان از طریق یون‌های Ca^{2+} و شکل‌گیری ساختمان پکتین (Vincken et al. 2003).



شکل ۱-۸. الف. ساختار شیمیایی پلی‌گالاکتورونیک اسید. ب. ساختار مولکول متوکسیل و کربوکسیل آمیدی. در مولکول پکتین برخی گروه‌های کربوکسیل متیل استریفیه می‌شوند و گروه‌های متوکسیل را به وجود می‌آورند. در مقابل تیمار پکتین با آمونیاک منجر به ایجاد واحدهای کربوکسیلیک اسید آمیدی می‌شود (White et al. 1999).

نسبت واحدهای متیل استریفیه شده 6-O-methyl- α D-GalpA از فقره‌ی هموگالاکتورونان به کل واحدهای کربوکسیلیک اسیدی که به فرم نمکی موجود هستند را درجه‌ی استریفیکاسیون^۱ می‌نامند (DE)؛ مانسور و همکاران، ۲۰۰۱). براساس درجه استریفیکاسیون، پکتین‌ها به دو گروه متوکسیل پایین^۳ (LMP, DE < 50%) و متوکسیل بالا^۴ (HMP, DE > 50%) تقسیم بندی می‌شوند و بر همین اساس ویژگی‌های متفاوتی را به نمایش می‌گذارند.

وزن مولکولی پکتین، درجه استریفیکاسیون و الگوهای استریفیکاسیون در طول زنجیره‌های پلی‌ساکارید تعیین کننده‌ی فرآیند ژله‌ای شدن است. به علاوه این صفات، ویژگی‌های ژل‌ها را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (سانگتونگ جین و همکاران، ۲۰۰۴). توجه به سایر پارامترها مانند دما، pH و حضور کاتیون‌های همراه و مهمتر از همه بر هم‌کنش میان یون‌های کلسیم و گروه‌های کربوکسیل آزاد (استریفیه نشده) نیز در ساخت ژل‌های پکتینی حائز اهمیت است. به علاوه الگوهای استریفیکاسیون زنجیره‌های پکتین می‌تواند براساس مواد فیزیکی و شیمیایی مورد استفاده در طول استخراج پکتین متغیر باشد، به نحوی که استرزدایی اسیدی باعث توزیع و پراکنش تصادفی گروه‌های متیل استر می‌شود در حالیکه تجزیه‌ی آنزیمی به واسطه‌ی پکتین استرازاها منجر به توزیع متعادل این گروه‌ها می‌شود (لوفگرمن و همکاران، ۲۰۰۵، بیسکارو و همکاران، ۲۰۰۹). مشخص شده است که این ویژگی‌ها به شدت بر روی ویژگی ژل‌های تشکیل شده اثرگذار است به علاوه دما، درجه استیلاسیون، میزان pH و مهمتر از همه بر هم‌کنش میان یون‌های کلسیم و گروه‌های کربوکسیل آزاد (استریفیه نشده) از دیگر عوامل تعیین کننده‌ی ویژگی‌های ژل‌های پکتینی هستند (بیسکارو و همکاران، ۲۰۰۹).

تیمار پکتین‌هایی با درصد متوکسیل بالا با آمونیاک موجب تولید پکتین‌های آمیدی با درصد متوکسیل پایین (LM) می‌شود (جاگ و همکاران، ۲۰۱۲). این پکتین‌ها در مقایسه با پکتین‌های غیر

2 – Degradation of esterification

3 – Low methoxyl pectin

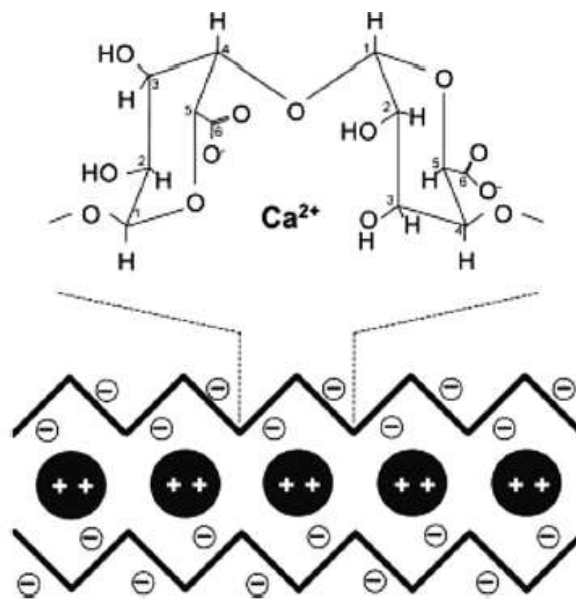
4 – High methoxyl pectin

آمیدی، نیازمند کلسیم کمتری جهت ژله‌ای شدن هستند و ژله‌هایی که تشکیل می‌دهند از نظر حرارتی برگشت‌پذیرند (تو و همکاران، ۲۰۰۵).

پکتین‌هایی با درصد متوکسیل پایین، قادرند ضمن تشکیل یک شبکه سه بعدی از طریق کاتیون‌های چند ظرفیتی و ایجاد پل‌های ارتباطی میان گروه‌های کربوکسیل از زنجیره‌های پکتینی متفاوت، به تشکیل ژل بپردازند که این فرآیند اصطلاحاً به مدل egg box شهرت دارد و ساختارهایی که در بین زنجیره‌های مجاور ایجاد می‌شوند به وسیله‌ی برهم‌کنش‌های واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی پایدار می‌شوند (شکل ۱-۹. فرای و همکاران، ۲۰۱۰).

تشکیل ژل‌های نامحلول در آب پکتین با درصد متیلاسیون پایین، در حضور یون‌های دوظرفیتی با بار مثبت در گستره‌ی وسیعی از اسیدیته و در حضور یا عدم حضور محلول‌های همراه به وقوع می‌پیوندد (فنگ و همکاران، ۲۰۰۸). به‌علاوه بارهای مثبت مورد نیاز جهت تشکیل ژل‌های پکتین با سطح متیلاسیون پایین می‌تواند از سایر پلی‌ساکاریدهای چند کاتیونی مانند کیتوزان به دست آید (بیگوسی و همکاران، ۲۰۰۸، هامان، ۲۰۱۰، کویمبرا و همکاران، ۲۰۱۱).

در مقابل پکتین‌هایی با درصد متیلاسیون بالا (دارا بودن بیش از ۵۰٪ از گروه‌های کربوکسیل متیل استریفیه شده (متوکسیل))، ژل‌های فیزیکی را در $pH < 3.5$ و با افزودن شکرهای مختلفی مثل ساکارز یا گلوکز تولید نمایند که این امر غالباً ناشی از شکل‌گیری شبکه پکتینی متخلخل، برهم‌کنش‌های هیدروفوبیک و پیوندهای هیدروژنی است (فیشمن و همکاران، ۲۰۰۷، ویدکوک و همکاران، ۲۰۱۱، میشر و همکاران، ۲۰۱۲). نتیجه‌ی افزایش درجه استریفیکاسیون (DE)، تشکیل بسیار سریعتر ژل‌هاست که در نتیجه‌ی تشکیل پیوندهای هیدروفوبیک متعددی میان گروه‌های متیل استر پکتین به وقوع می‌پیوندد (لوفگرم و همکاران، ۲۰۰۵).



شکل ۱-۹. مدل egg box. فرآیند ژله‌ای شدن پکتین با درصد متوکسیل پایین شامل برهم کنش‌های الکترواستاتیک مابین کاتیون‌ها و پلیمرهای با بار منفی که به مدل egg box شهرت دارد و ساختارهایی که در بین زنجیره‌های مجاور ایجاد می‌شوند به وسیله‌ی برهم کنش‌های واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی پایدار می‌شوند (Fraeye et al. 2010).

۱-۳ مصارف پکتین

استفاده از پکتین در تولید مرباهای شیرین به روش سنتی، شناخته شده ترین کاربرد آن است. مرباها و ژله های کم شکر نیز با پکتین های آمیدی با درصد متوکسیل پایین (LMP) تهیه می شوند که برای ژله ای شدن نیازی به شکر ندارند. چون پکتین در میوه ها وجود دارد و افزودن پکتین به آنها موجب ایجاد بافت مطلوب و مناسب در آنها می شود، ایجاد آب میوه بر روی سطح را محدود می کند و باعث توزیع یکسان میوه در محصول می شود، استفاده از آنها برای تهیه مربا و ژله با میزان شکر کم بهترین انتخاب است. در مقابل مرباهایی با میزان شکر بالا، با پکتین هایی با درصد متوکسیل بالا (HMP) تولید می شوند که جهت ژله ای شدن نیازمند مقادیر بیشتری از شکر هستند و نیز در مقابل پخته شدن مقاومند و از این رو می توانند در تهیه ی شیرینی های مربایی و شکر در شیرینی پزی به کار روند (کولین، ۱۹۹۰). پکتین دارای مصارف دیگری در صنایع لبنی نیز هست، پکتین با درصد متوکسیل بالا (HMP) قادر است از تجمع کازئین بر اثر حرارت در pH های پایین که موجب بروز مشکلاتی از قبیل ته نشینی در محصولات لبنی می شود جلوگیری نماید و بنابراین می تواند به عنوان پایدارکننده ای مناسب برای دوغ ها و محصولات لبنی و آب میوه ها به کار رود (لورنت و همکاران، ۲۰۰۳، جنسن و همکاران، ۲۰۱۰، ساها و همکاران، ۲۰۱۰). پکتین آمیدی (LMP) با عملکردی متفاوت موجب پایداری شیر سویای اسیدی و محصولات کشکی از طریق واکنش با کلسیم و تشکیل ژل می شود و از ته نشینی پروتئین های کشک جلوگیری می کند. در صنایع غذایی، هدف از پایداری سازی افزایش مدت- زمان نگهداری محصولات لبنی و فرآورده های گوشتی و بهبود مقاومت آنها نسبت به نوسانات دمایی از قبیل سیکل های فریز-انجماد زدایی می باشد.

شیر و سایر محصولات لبنی از جمله ماست های چکیده نیز می توانند با افزودن مقادیر بسیار کمی از پکتین آمیدی با درصد متوکسیل کم که حاوی کلسیم است، پیش از عمل آوری تغلیظ شوند. از جمله کاربردهای دیگر پکتین در صنایع غذایی می توان به نقش آن به عنوان عامل ایجاد بافتی منسجم در فرآورده های گوشتی به دلیل توانایی در اتصال به آب، بازدارندگی از تشکیل کریستال های یخ و شکر در

بستنی و شربت‌های شیرین، ممانعت از آب‌اندازی پنی‌عمل‌آوری شده و تغلیظ آب‌میوه‌ها اشاره نمود (سها و همکاران، ۲۰۱۰). پکتین همچنین به عنوان یک امولسیفایر مناسب در صنایع غذایی به کار می‌رود و به دلیل اینکه امولسیون‌ها سیستم‌هایی ناپایدار از لحاظ ترمودینامیکی هستند، کاربرد پکتین در پایدارسازی آنها می‌تواند مفید واقع شود. از پکتین مرکبات، با وزن مولکولی کم و درجه متوکسیلاسیون بالا می‌توان به عنوان پایدارکننده‌ی امولسیون‌هایی همچون سس مایونز استفاده نمود (بونو و همکاران، ۲۰۰۹).

از منظر کاربردهای پزشکی، چسبندگی پکتین به بافت مخاطی، می‌تواند موجب کنترل تحویل دارو در محیط گوارشی و تنفسی شود و از همین رو از پکتین در آماده‌سازی کپسول‌ها برای تحویل دارو استفاده می‌شود. قابلیت بالای پکتین در مقاوم ماندن نسبت به پروتئازها و آمیلازهای فعال در دستگاه گوارش، آنها را به مواد مناسبی جهت ساخت داروهای کولون مبدل ساخته است (پاهاریا و همکاران، ۲۰۰۷). پکتین همچنین می‌تواند مولکول‌های گالاکتین را که در مراحل مختلف سرطان درگیرند شناسایی نماید و از این رو ماده مناسبی جهت تشخیص تومورهای سرطانی و معالجات شیمی‌درمانی می‌باشد (گلینسکی و راز، ۲۰۰۹). از ژل‌های پکتینی نیز برای ترمیم زخم استفاده می‌شود. هنگامی که پکتین به زخم افزوده شود، به عنوان یک ماده‌ی اتصال‌دهنده عمل می‌کند و از فاکتورهای رشد در مقابل تجزیه‌شدن محافظت می‌کند و بنابراین سرعت پیشروی زخم کاهش می‌یابد و با افزایش سرعت تکثیر سلول‌های سالم روند ترمیم زخم سریع‌تر می‌شود (هریس و ناسی، ۲۰۰۸). در مهندسی بافت، استفاده از هیدروژل‌های پکتین سبب ارتقاء تشکیل فاز معدنی در هنگام تماس با محلول‌های فیزیولوژیکی مناسب می‌شود و همین مسئله به ساخت سازه‌های الگو گرفته از استخوان‌های طبیعی کمک می‌کند (مونارین و همکاران، ۲۰۱۲).

۱-۴ منابع پکتین و انواع روش‌های استخراج آن

پکتین‌ها در حدود ۳۰٪ از حجم دیواره‌های سلولی اولیه گیاهان را تشکیل می‌دهند (شله و همکاران، ۲۰۰۷). با این حال تنها تعداد کمی از گیاهان به منظور بدست آمدن پکتین‌های تجاری مورد فرآوری

قرار می‌گیرند و این میزان بر اساس مقدار محصول، زمان و هزینه فرآیند استخراج و میزان دسترسی به مواد خام متفاوت است (کندی و همکاران، ۲۰۰۶).

میزان مواد پکتیکی استخراجی از بافت‌های تازه یا خشک میوه‌ها و سبزیجات بین ۰/۱ تا ۳۰ درصد متغیر است و براساس منبع و روش‌های استخراج، پکتین با طیف گسترده‌ای از درجات استریفیکاسیون بدست می‌آید (جدول ۱-۱). پکتین عمدتاً از مواد زائد آب میوه، و بخش‌های آبدار پوست میوه‌ها و به‌ویژه سیب و مرکبات بدست می‌آید و این درحالیست که منابعی همچون ریشه‌های چغندر قند و طبق آفتابگردان از اهمیت کمتری برخوردارند (ساهاری و همکاران، ۲۰۰۳، جایانی و همکاران، ۲۰۰۵، یاپو و همکاران، ۲۰۰۷). به علاوه جداسازی پکتین از منابعی مانند پوست کاکائو (ورسمان و همکاران، ۲۰۱۱)، پوست سویا، تفاله هلو (فراوش و همکاران، ۲۰۰۸)، انبه و به (کوبالا و همکاران، ۲۰۰۸) و پوست سیر و پیاز نیز صورت گرفته است (جون و همکاران، اودو و همکاران، ۲۰۰۹). استخراج صنعتی پکتین معمولاً با تیمارهای اسیدی (۳-۱ pH) و در دماهای بالا (۷۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد) انجام می‌شود. ساختار شیمیایی پکتین، متحمل تغییرات ساختاری مهمی در طول فرآیند استخراج می‌شود. در مقایسه با پکتین طبیعی عصاره‌ها، حاوی مقادیر کمتری از گروه‌های متیل استر هستند (فمینا و همکاران، ۱۹۹۸، جیانگ و همکاران، ۲۰۰۲، مورا همکاران، ۲۰۰۴) در برخی موارد براساس نوع استخراج، درجه استیلاسیون پکتین‌های طبیعی می‌تواند پس از استخراج تغییر کند (ایشی و همکاران، ۱۹۹۷، ماری و همکاران، ۲۰۰۰).

پس از استخراج، استانداردسازی برای بدست آوردن نمونه‌هایی با ویژگی‌های پایدار مورد نیاز است. در این فرآیند، عصاره‌های پکتیکی مختلف باهم مخلوط می‌شوند و پس از رقیق شدن با افزودن شکر (ساکارز یا دکستروز) پکتین‌هایی با ویژگی‌های استاندارد حاصل می‌شود. در ادامه به برخی روش‌های معمول استخراج پکتین به اختصار پرداخته می‌شود که از آن جمله می‌توان به استخراج به‌واسطه‌ی آب داغ، امواج میکرو، ترکیبات کلاته‌کننده و استخراج آنزیمی اشاره نمود.

۱-۴-۱ استخراج با آب داغ

روش سنتی استخراج پکتین از دیواره‌های سلولی اولیه میوه‌ها و سبزیجات، به استخراج با آب داغ شهرت دارد (بیکر و کار، ۱۹۴۹، کرتز، ۱۹۵۱). در این روش استخراج، با مخلوط کردن مواد خام با اسیدهایی نظیر سیتریک، نیتریک، هیدروکلریک، سولفوریک یا فسفریک اسید (فیشمن و همکاران، ۲۰۰۶، اماگا و همکاران، ۲۰۰۸، مولئا و همکاران، ۲۰۰۸) یا ترکیبات قلیایی (غالباً NaOH) (زیکونیکا و همکاران، ۲۰۰۶) در غلظت‌های مختلف انجام می‌شود و pH محلول‌های آبی از ۱ تا ۱۰ متغیر است. عیب اصلی در استفاده از آب داغ برای استخراج، باقی ماندن مواد پکتینی در معرض یک دوره‌ی طولانی حرارت است که می‌تواند به از هم گسیختگی زنجیره‌های پکتین و کاهش درجه پلیمریزاسیون منجر شود و همین امر جداسازی پکتین از سایر مواد گیاهی موجود در محلول را دشوار می‌سازد. دپلیمریزاسیون زنجیره‌های پکتین می‌تواند سبب کاهش قابلیت تشکیل سیستم‌های شبکه‌ای توسط پکتین شود که در نتیجه آن ژلهایی با ویژگی‌های مکانیکی پایین که برای اهدافی همچون تحویل دارو و یا ترمیم بافت‌های نرم مناسب اما برای مهندسی بافت استخوان نامناسب هستند به وجود آید (مونارین و همکاران، ۲۰۱۲).

۱-۴-۲ استخراج با امواج میکرو (Micro wave)

تیمارهای اسیدی موجب خوردگی تجهیزات استخراج و نیز آلودگی آب می‌شود. در حالیکه استخراج قلیایی می‌تواند کاهش محتوای متیل و استیل و نیز کاهش طول زنجیره‌ی اصلی گالاکتورونیک اسید توسط واکنش β -الیمیناسیون شود (فرای و همکاران، ۲۰۰۷). برای غلبه بر این مشکلات، فیشمن و همکاران (۲۰۰۰، ۲۰۰۳ و ۲۰۰۶) دو راه‌کار برای کاهش زمان استخراج پیشنهاد کردند. زمان حرارت‌دهی با همراه کردن فرآیند استخراج با آب داغ با تیمارهای مقدماتی با امواج میکرو (Microwave)، کاهش یافت.

جدول ۱-۱. محصول و درجه استریفیکاسیون پکتین‌های استخراج شده از منابع گیاهی مختلف

Pectin source	Yield (%)	DE (%)	References
Aloe	5	3	(Yates et al. 1999, Bozzini et al. 2011)
Apple	2-19	22-80	(Canteri-Schemin et al. 2005, Garna et al. 2007, Kumar et al. 2010)
Banana	2-15	49-80	(Emaga et al. 2008)
Cacao pod husks	4-11	57	(Vriesmann et al. 2011)
Carrots	7-19	34-58	(Jayani et al. 2005, De Roeck et al. 2008)
Chicpea	8	67	(Urias-Orona et al. 2010)
Chicory roots	3-5	35-56	(Robert et al. 2008)
Citrus fruit	6-26	56-80	(Seggiani et al. 2009, Masmoudi et al. 2008/ Kratchanova et al. 2004)
Durian	2-10	>50	(Wai et al. 2010)
Grape fruit	13-32	75-76	(Bagherian et al. 2011)
Mango	9-29	49-86	(Srirangarajan et al. 1977, Koubala et al. 2008)
Passion fruit	4-70	10	(Kliemann et al. 2009, Kulkarni et al. 2010)
Peach	4-18	20-84	(Pagán et al. 2001, Faravash et al. 2008)
Potatoes	5-10	11	(Zhang et al. 2011)
Pumpkin	7-22	53-68	(Ptichkina et al. 2008)
Red dragon fruit	4-15	51-75	(Woo et al. 2010)
Soy hull	18-28	53-60	(Kalapathy et al. 2001)
Sugar beet pulp	4-16	14-48	(yapo et al. 2007)
Sunflower	10-11	34-39	(sahari et al. 2003)

۱-۴-۳ استخراج پکتین به کمک ترکیبات کلاته‌کننده

پکتین علاوه بر دیواره‌های سلولی اولیه، در تیغه‌ی میانی گیاهان نیز به فرم پکتات کلسیم یافت می‌شود. به منظور استخراج پکتین از تیغه‌ی میانی، از محلول‌های آبی سرد و گرم ترکیبات کلاته‌کننده کلسیم همانند اتیلن دی‌آمین تترا استات (*EDTA*) (حبیبی و همکاران، ۲۰۰۴)، بافر ایمیدازول (هاری و همکاران، ۲۰۰۰، ویتولتر و همکاران، ۲۰۰۳)، سدیم هگزا متا فسفات (یاپو و همکاران، ۲۰۰۳) یا آمونیوم اگزالات (سابیر، ۱۹۷۶، یاپو، ۲۰۱۱) استفاده می‌شود. این ترکیبات موجب حذف یون‌های کلسیم از پکتات کلسیم بدون آسیب به زنجیره‌های گالاکتورونیک اسیدی پکتین می‌شوند.

۱-۴-۴ استخراج آنزیمی

استخراج ویژه‌ی پکتین از طریق آنزیم‌ها نیز امکان‌پذیر است. پکتیناز، واژه‌ای عمومی است که برای آنزیم‌های مختلف تجزیه‌کننده‌ی پکتین که غالباً از میکروارگانیسم‌ها به دست می‌آید به کار می‌رود (آنتو و همکاران، ۲۰۰۱، پاتیل و دایاناند، ۲۰۰۶، آهلاوات و همکاران، ۲۰۰۷، آهلاوات و همکاران، ۲۰۰۹، فیسور و همکاران، ۲۰۰۹). تیمارهای آنزیمی منجر به از هم گسیختگی پیوندهای داخلی پکتین و بنابراین کاهش ویسکوزیته‌ی محلول‌ها و فراهم آمدن امکان فیلتراسیون و سانتریفیوژ آسانتر می‌شود. به علاوه در اثر تیماری‌های آنزیمی، آلودگی آبی کاهش و مواد زائد و مخرب زیست محیطی به میزان کمتری تولید می‌شود. بزرگترین عیب استفاده از آنزیم‌ها، هزینه‌ی تولید بالا و پیچیدگی فرآیندهای کاتالیزشده به واسطه‌ی آنهاست. اگر فرآیند استخراج به خوبی کنترل نشود، پکتین ممکن است توسط آنزیم‌ها تجزیه شود که همین امر منجر به از دست رفتن ویژگی‌های ژله‌ای آن می‌شود (مونارین و همکاران، ۲۰۱۲). به علاوه استخراج آنزیمی پکتین (راس و همکاران، ۱۹۹۶، بیسکارو و همکاران، ۲۰۰۹) سبب القای دپلیمریزاسیون زنجیره‌های پکتین و در نتیجه ایجاد زنجیره‌های منشعب

کوتاه‌تری می‌شود (سیلا و همکاران، ۲۰۰۶، مین و همکاران، ۲۰۱۱). در ادامه به نقش انواع آنزیم‌های پکتیناز و تاثیری که بر روی سوبستراهای پکتیکی دارند پرداخته شده است.

۱-۵ آنزیم‌ها

آنزیم‌ها پروتئین‌های تخصص یافته‌ای هستند که به‌عنوان بیوکاتالیزور عمل می‌نمایند یعنی بدون ایجاد تغییری در ثابت تعادل، واکنش‌های بیوشیمیایی را کاتالیز می‌کنند. آنزیم‌ها دارای ساختمان پروتئینی می‌باشند و به دلیل نقش مهم آنزیم‌ها در واکنش‌های سلولی و رابطه سنتز آنزیم با ژن مطالعات بسیاری در این زمینه در حال انجام است. آنزیم‌ها نه همانند افزایش دما، جنبش مولکولی را افزایش می‌دهند و نه مثل هم‌زدن شانس تصادم را بالا می‌برند بلکه ضمن کاستن از انرژی فعال‌سازی موجب می‌شوند، مولکول‌هایی با کمترین انرژی از سد انرژی عبور کنند و به محصول تبدیل شوند که این عمل با تشکیل کمپلکس آنزیم-سوبسترا (SE) که بالاترین سطح انرژی را دارد محقق می‌شود. در حین انجام واکنش، آنزیم‌ها موجب کاتالیز انتقال الکترون‌ها، اتم‌ها یا گروه‌های عملکردی می‌شوند و در پایان واکنش دست نخورده باقی می‌مانند. به‌علاوه تولید محصولات جانبی تولیدی در پایان واکنش توسط آنها بسیار اندک است. برای فعالیت کاتالیتیک، آنزیم‌ها ممکن است نیازمند مواد آلی (کوآنزیم‌هایی همچون فلاوین مونو نوکلئوتید FMN و تیامین پیروفسفات (TPP) و یا مواد غیرآلی (همچون Mg^{2+}) به عنوان کوفاکتور که می‌تواند یک فلز یا ترکیب غیرپروتئینی باشد که این مواد نیز مانند خود آنزیم در واکنش‌های کاتالیز شده مصرف نمی‌شوند (پناهی شبستری، ۱۳۸۴). بالغ بر ۴۰۰۰ آنزیم که هر یک واکنش‌های متفاوتی را کاتالیز می‌کنند در طبیعت برای میانجی‌گری فرآیندهای زیستی شناسایی شده است و آنها را بر حسب نوع واکنشی که تسهیل می‌نمایند به شش گروه اکسیدوردوکتازها (انتقال الکترون از یک مولکول سوبسترا به مولکول دیگر و کاتالیز واکنش‌های اکسیداسیون و احیا)، ترانسفرازها (انتقال گروه عملکردی (فسفات، آسیل، الکل و ...)) از یک مولکول سوبسترا به دیگری)، هیدرولازها (هیدرولیز پیوندهای بی‌آب شده‌ی اتری، استری، پپتیدی و... ضمن

انتقال گروه عملکردی از سوبسترا به آب)، لیاژها (افزودن عاملی به پیوندهای دوگانه و بریدن باند و یا حذف گروه عاملی از سوبسترا و تشکیل باند دوگانه)، ایزومراژها (تغییر موقعیت گروه‌ها در یک مولکول و تبدیل ایزومرها به یکدیگر) و لیگازها (افزودن گروه عملکردی به سوبسترا با مصرف ATP) تقسیم می‌کنند (سها و همکاران، ۲۰۰۹).

بسیاری از آنزیم‌ها به طور گسترده‌ای جهت تسهیل فرآیندهای صنعتی و تولید محصولات مورد استفاده قرار گرفته‌اند که با عنوان آنزیم‌های صنعتی شناخته می‌شوند. در میان آنزیم‌های صنعتی، هیدرولازها شامل پروتئازها و لیپازها نوع غالب آنزیم‌ها در صنعت هستند که به طور گسترده‌ای در صنایع شیمیایی، لبنیات و شوینده کاربرد دارند و کربوهیدازها مانند آمیلازها و سلولازها در مقام دوم هستند (کیرک و همکاران، ۲۰۰۲، شفر و همکاران، ۲۰۰۷، سها و همکاران، ۲۰۰۹). اغلب آنزیم‌های صنعتی امروزه توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و تعداد زیادی از فرآیندهای آنزیمی نوین هم‌اکنون با فرآیندهای شیمیایی متداول و مرسوم تولید آنزیم جایگزین شده است. به‌علاوه آنزیم‌های میکروبی امروزه به طور گسترده‌ای جایگزین آنزیم‌های مرسوم حاصله از منابع گیاهی و جانوری شده‌اند و غالباً به صورت نوترکیب تولید می‌شوند (سها و همکاران، ۲۰۰۹).

۱-۵-۱ آنزیم‌های پکتینولیتیک

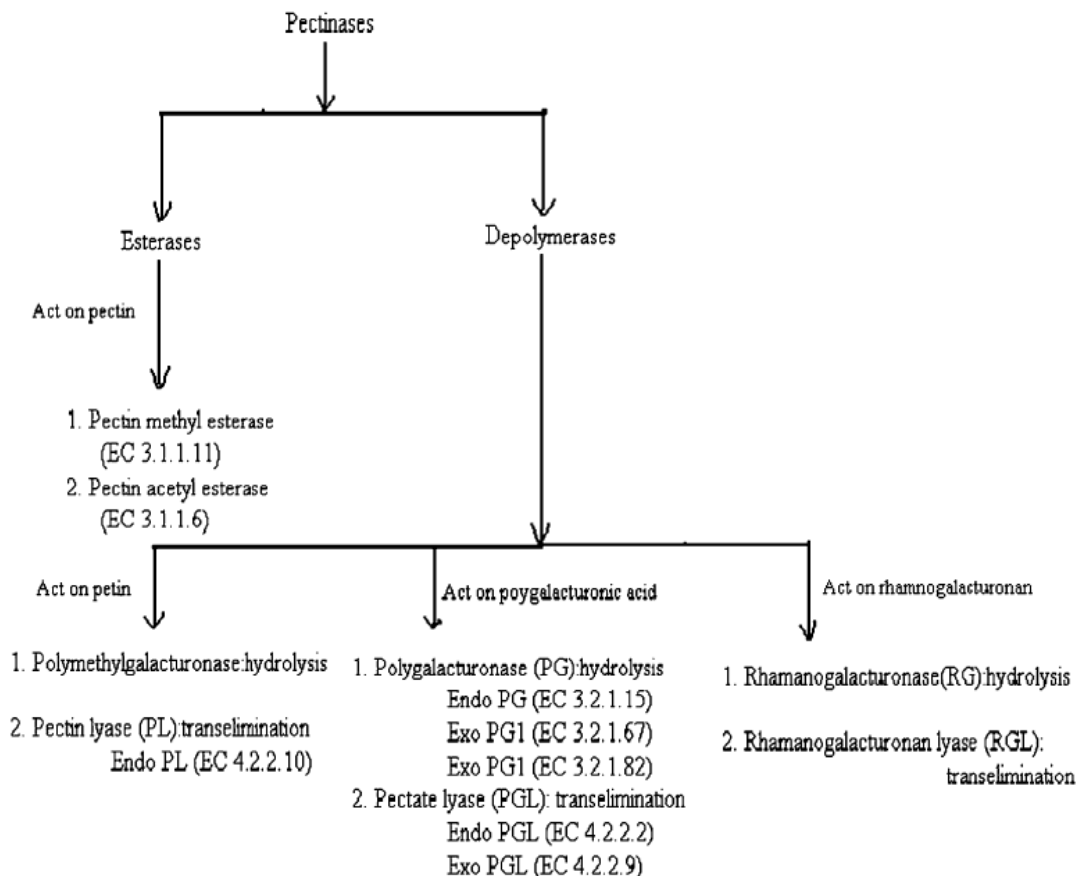
پکتینازها گروهی متنوع از آنزیم‌های همکار هستند (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵). آنزیم‌های پکتینولیتیک به طور گسترده‌ای در گیاهان عالی و میکروارگانیسم‌ها دیده می‌شوند (ویتاکر، ۱۹۹۱) و با عمل خود در گیاهان موجب کمک به فرآیند رشد سلول (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵) و نرم‌شدگی برخی بافت‌های گیاهی در طول فرایند بلوغ و ذخیره‌ی مواد می‌شوند (آگویلار و هورتون، ۱۹۹۰، ساکای، ۱۹۹۲).

۱-۵-۲ تقسیم‌بندی پکتینازها

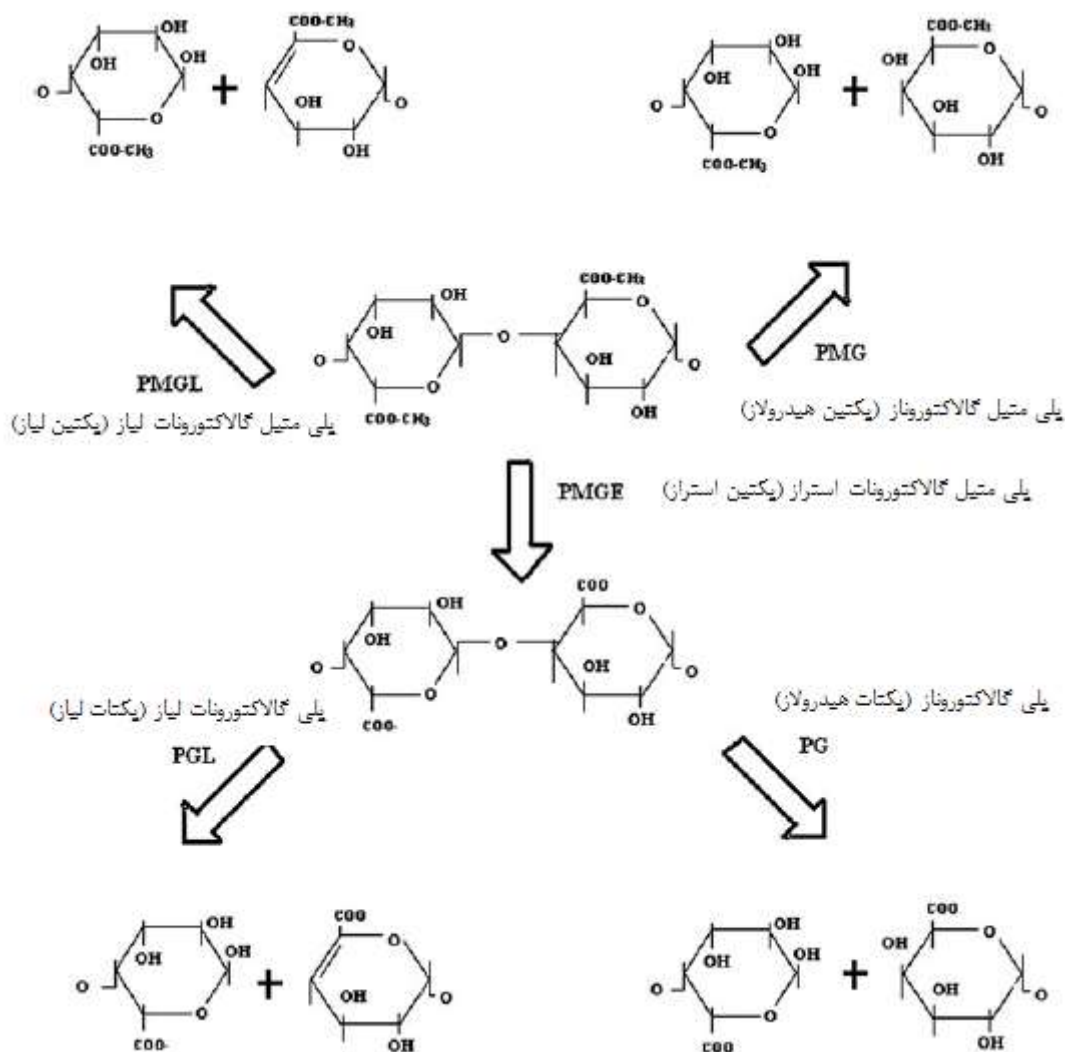
به طور کلی پکتینازها به دو گروه استرازها و دپلیمرازها (شکل ۱-۱۰) تقسیم بندی می‌شوند که گروه اول یعنی استرازها منحصر بر روی سوبسترای پکتین اثر می‌کنند و شامل پکتین متیل استراز PME (EC 3.1.1.11) و پکتین استیل استراز PAE (EC 3.1.1.-) می‌باشند. PME موجب کاتالیز دی-استریفیکاسیون گروه متوکسیل از پکتین و تشکیل پکتیک اسید و متانول می‌شود (شارما و همکاران، ۲۰۱۱). PAE نیز موجب هیدرولیز استیل‌استر از پکتین و تشکیل پکتیک اسید و استات می‌شود (ویسر و همکاران، ۲۰۰۴، یاداو و همکاران، ۲۰۰۹). عملکرد این آنزیم‌ها همیشه پیش از آغاز فعالیت آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز و پکتات لیاز است که نیازمند سوبسترهای استریفیه نشده یا کم استریفیه^۱ شده هستند (کاشیاب و همکاران، ۲۰۰۱).

گروه دوم یعنی دپلیمرازها، شامل هیدرولازها و لیازها هستند و به لحاظ نوع سوبسترایی که بر آن اثر می‌کنند، تنوع بیشتری دارند. هیدرولازها که عمدتاً توسط قارچ‌ها تولید می‌شوند، شامل پلی‌متیل گالاکتورونازها PMG (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵) و پلی‌گالاکتورونازها PG (EC 3.2.1.-) هستند (شکل ۱-۱۱) که تجزیه مواد پکتیکی را از طریق واکنش‌های دپلیمریزاسیون کاتالیز می‌کنند. هر دو گروه آنزیم‌های هیدرولاز می‌توانند به صورت خارجی یا داخلی عمل نمایند (رومبوتس و همکاران، ۱۹۸۰، کاشیاب و همکاران، ۲۰۰۱). اندوپلی‌گالاکتورونازها و اندوپکتین لیازها، هر دو موجب شکافتن زنجیره‌ی پکتین به صورت تصادفی می‌شوند. اگزوپلی‌گالاکتوروناز موجب آزاد شدن مرنومر یا دایمرهایی از انتهای کاهش نیافته‌ی زنجیره می‌شود، در حالیکه اگزوپکتین لیازها موجب آزاد شدن مونومر یا دایمرهایی از انتهای کاهش نیافته‌ی زنجیره می‌شود، در حالیکه اگزوپکتین لیازها موجب آزاد شدن دایمرهای غیر اشباع از انتهای کاهش یافته می‌شوند (مارتین و همکاران، ۲۰۰۴).

۱- استریفیکاسیون به واکنش یک الکل با کربوکسیلیک اسید می‌گویند که منجر به تولید ترکیبی شیمیایی به نام استر می‌شود. واکنش استری شدن واکنشی تعادلی است و با تولید آب همراه است



شکل ۱-۱۰. تقسیم‌بندی آنزیم‌های پکتیناز. به طور کلی پکتینازها به دو گروه استرازها و دپلیمرازها تقسیم بندی می‌شوند که گروه اول یعنی استرازها منحصر بر روی سوبسترای پکتین اثر می‌کنند و شامل پکتین متیل استراز و پکتین استیل استراز می‌باشند. گروه دوم یعنی دپلیمرازها، شامل هیدرولازها و لیازاها هستند و به لحاظ نوع سوبسترای که بر آن اثر می‌کنند، تنوع بیشتری دارند. تجزیه‌ی کامل سوبسترای پکتین در ادامه نیازمند عمل آنزیم‌هایی جهت برش زنجیره‌ی رامنوگالاکتورونان است. از جمله این آنزیم‌ها می‌توان به رامنوگالاکتورونازها و رامنوگالاکتورونان لیازاها اشاره نمود (Sharma et al. 2013).



شکل ۱-۱۱. محل اثر انواع آنزیم‌های پکتیناز و محصول تولیدی توسط آنها. آنزیم‌های پکتین لیاز و پکتین هیدرولاز بر روی سوبسترای پکتیکی متیله عمل می‌کنند. عمل آنزیم‌های پکتین استراز، موجب تولید پکتین با درجات کمتر استریفیکاسیون می‌شود. این مولکول‌های دی‌استریفیه که عموماً با نام پکتات شناخته می‌شوند، در ادامه توسط عمل آنزیم‌های پکتات هیدرولاز و پکتات لیاز تجزیه خواهند شد. واکنش‌های لیازی موجب تشکیل گالاکتورونات‌های غیر اشباع می‌شوند (sharma et al. 2013).

تجزیه‌ی کامل سوپسترای پکتین در ادامه نیازمند عمل آنزیم‌هایی جهت برش زنجیره‌ی رامنوگالاکتورونان است. از جمله این آنزیم‌ها می‌توان به رامنوگالاکتورونان رامنو هیدرولازها (EC 3.2.1.4) (موتر و همکاران، ۱۹۹۴)، رامنوگالاکتورونان گالاکتورونو هیدرولازها (EC 3.2.1.-) (موتر و همکاران، ۱۹۹۸) رامنو گالاکتورونان هیدرولاز (رومبوتس، ۱۹۸۰، آنترانیکیا و همکاران، ۱۹۹۲) رامنوگالاکتورونان لیاها (EC 4.2.2.-) (موتر و همکاران، ۱۹۹۶)، رامنوگالاکتورونان استیل استراز (EC 3.1.1.-) (سیرل و همکاران، ۱۹۹۲) و زابلوگالاکتورونان هیدرولازها (EC 3.2.1.-) (برگمن و همکاران، ۲۰۰۰) اشاره نمود.

۱-۵-۳ ویژگی و محل‌های حضور آنزیم‌های پکتیناز

آنزیم‌های پکتینولیتیک به طور طبیعی توسط بسیاری از ارگانیسم‌ها همچون باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، حشرات، نماتدها پروتوزواها تولید می‌شوند (فیاض و همکاران، ۲۰۰۳). پکتینازهای میکروبی در فرآیندهای فیتوپاتوژنیک، همزیستی میکروب و گیاه و تجزیه‌ی مواد گیاهی مرده حائز اهمیت هستند. این آنزیم‌ها به میزان زیادی توسط قارچ‌ها و باکتری‌های پاتوژن تولید می‌شوند که در ادامه منجر به تجزیه‌ی بافت گیاهی خواهد شد (گومادی و همکاران، ۲۰۰۳). حمله به گیاه توسط میکروارگانیسم‌های پاتوژن، معمولاً با ترشح آنزیم‌های پکتینولیتیک آغاز می‌شود، چون مواد پکتیکی نسبت به سایر فیبرهای موجود در بافت گیاهی در دسترس‌تر هستند (رومبوتس و همکاران، ۱۹۹۰، هوندال و همکاران، ۲۰۰۲). مطالعات متعدد انجام گرفته بر روی آنزیم‌های میکروبی، تولید فرم‌های چندگانه‌ای از پکتیناز با جرم مولکولی و ویژگی‌های کینتیکی متفاوت را نشان داده است (دوی و همکاران، ۱۹۹۶، مینجارسن و همکاران، ۱۹۹۷، نایدو و همکاران، ۲۰۰۳). تولید فرم‌های چندگانه از آنزیم‌ها، سبب بهبود قابلیت میکروارگانیسم در سازگاری با تغییرات محیطی می‌شود (ناسنس و همکاران، ۲۰۰۳). دیواره‌ی سلولی که جزء اولین خطوط دفاعی گیاهان است می‌تواند براساس سن و شرایط فیزیولوژیکی گیاه تغییر نماید.

از این رو در برخی موارد، میکروارگانیسم پاتوژن نیازمند تولید مجموعه‌ای از آنزیم‌ها جهت نفوذ مؤثر در بافت گیاهی است (دی‌لونز و همکاران، ۲۰۰۱، کارس و همکاران، ۲۰۰۵). به‌علاوه سطح استریفیکاسیون و توزیع واحدهای استریفیه شده در طول مولکول پکتینی می‌تواند براساس سیکل زندگی گیاه و نیز از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت باشد. بنابراین قابلیت برخی میکروارگانیسم‌های فیتوپاتوژن برای تولید طیف متنوعی از آنزیم‌های پکتینولیتیک که دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند می‌تواند آنها را جهت تجزیه‌ی پکتین کارآمدتر نماید و متعاقباً موجب آلودگی موفقیت‌آمیزتر بافت گیاهی شود (هرون و همکاران، ۲۰۰۰) و ترکیبات ساختاری مرتبط با این سوبسترا موجب القای تولید آنزیم‌های پکتیکی توسط میکروارگانیسم‌ها می‌شوند (کوپر و همکاران، ۱۹۸۳، فراسینت و همکاران، ۱۹۹۶).

حضور آنزیم‌های پکتیناز تاکنون در میکروارگانیسم‌هایی مانند *Phytophthora* (فاستر، ۱۹۸۸)، *Erwinia chrysanthemi* B 341 (پیتکانن و همکاران، ۱۹۹۲)، *Pseudomonas solanacearum* (شل و همکاران، ۱۹۹۴)، *Saccharomyces cerevisiae* (گینورس و همکاران، ۱۹۹۴)، *Aspergillus niger* (مالدونادو و همکاران، ۱۹۹۴، مالدونادو و ساد، ۱۹۹۸)، *Lachnospira pectinoschiza* (کورنیک و همکاران، ۱۹۹۴)، *Lactobacillus lactis* زیرگونه‌ی *Cremonis* (کرم و بلاربی، ۱۹۹۵)، *Penicillium frequentans* (کاوانو و همکاران، ۱۹۹۹)، *Bacillus* sp. BP-23 (سوریانو و همکاران، ۲۰۰۰)، *Bacillus* sp. TS47 (تاکائو و همکاران، ۲۰۰۱)، *Penicillium occitanis* (هاج و همکاران، ۲۰۰۲)، *A. japonicas* (سمنوا و همکاران، ۲۰۰۳)، *Rhodotorula* sp. (لیبکیند و همکاران، ۲۰۰۴)، *Bacillus licheniformis* (برنسمیر و همکاران، ۲۰۰۴)، *Thermotoga maritima* (لی و همکاران، ۲۰۰۹)، *Bacillus* sp. RN1 (سوخوم سیرچارت و همکاران)، *Bacillus* sp. N16-5 (لی و همکاران، ۲۰۱۰)، *Bacillus subtilis* (لیو و همکاران، ۲۰۱۲)، *Paenibacillus* sp. 0602 (لی و همکاران، ۲۰۱۴) یافت می‌شوند. به علاوه گزارشات متعددی حضور آنها را در گیاهان همچون *Carica papaya* (فیاض و همکاران، ۱۹۹۳، اینوکنز و همکاران، ۲۰۰۱)، *Lycopersicon esculentum* (واریلو

و همکاران، ۱۹۹۴)، *Prunus malus* (مکدونالد و اوانس، ۱۹۹۶)، *Vitis vinifera* (کوردیگ و همکاران، ۲۰۰۰)، *Citrus sp.* (آریاس و بونس، ۲۰۰۲)، *Pouteria sapota* (آرناس و همکاران، ۲۰۰۳) و *Malpighia glabral* (آسیس و همکاران، ۲۰۰۴) موجود است.

۱-۶ لیازا

در بیوشیمی، لیازا آنزیم‌هایی هستند که برش حذفی پیوندهای شیمیایی متنوعی را از طریق انجام واکنش‌های غیر هیدرولیتیک کاتالیز می‌کنند و در نهایت موجب تشکیل یک پیوند دوگانه و یا شکل-گیری یک ساختار حلقوی جدید می‌شوند (شکل ۱-۱۲). به‌علاوه این گروه آنزیمی قابلیت کاتالیز واکنش‌های معکوس را نیز دارا می‌باشند که در این شرایط، با افزودن گروه‌های عاملی به ساختمان سوبسترا موجب حذف پیوند دوگانه می‌شوند (شکل ۱-۱۳). تفاوت لیازا با سایر آنزیم‌ها در این است که آنها نیازمند تنها یک سوبسترا برای انجام واکنش‌های یک‌طرفه هستند اما جهت انجام واکنش‌های معکوس نیازمند حضور دو سوبسترا می‌باشند. لیازا/ ترانس الیمینازها، شامل پکتین لیازا (EC PNL 4.2.2.10) و پکتات لیازا (EC 4.2.2.2) PL می‌باشد که هر دو جزء خانواده‌ی ۱ پلی‌ساکاریدلیازها هستند. پلی‌ساکاریدلیازها (PLs) که شامل پکتات‌لیاز نیز هستند، هم‌اکنون براساس تشابهات توالی آمینو اسیدیشان در CaZy (www.cazy.org) به ۲۳ خانواده تقسیم‌بندی می‌شوند. در میان آنها خانواده‌های ۱، ۲، ۳، ۹ و ۱۰ شامل پکتات لیازا هستند (کرزا و همکاران، ۲۰۰۸).

پلی‌ساکارید لیازا، آنزیم‌هایی هستند که دپلیمریزاسیون پلی‌ساکاریدهای آنیونی را از طریق واکنش بتا الیمیناسیون کاتالیز می‌کنند و موجب برش غیر هیدرولیتیک پیوندهای گلیکوزیدی می‌شوند (لوگان و همکاران، ۲۰۱۳). پکتین لیازا، موجب کاتالیز برش تصادفی پکتین (ترجیحاً پکتین به شدت استریفیه شده) و تولید متیل‌الیگوساکاریدهای اشباع نشده از طریق ترانس الیمیناسیون اتصالات

گلیکوزیدی می‌شود. تاکنون تمامی پکتین‌لیازهای شناخته شده از نوع اندوپکتین‌لیاز (EC 4.2.2.10) بوده‌اند (سینیتسینا و همکاران، ۲۰۰۷).

پکتات لیاز، موجب برش اتصالات گلیکوزیدی پلی‌گالاکتورونیک اسید به صورت ترجیحی و تشکیل محصول اشباع‌نشده‌ی D-4,5-گالاکتورونات از طریق واکنش ترانس الیمیناسیون می‌شود. پکتات لیازها، خود به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول یعنی انواع اندوپکتات لیاز (EC 4.2.2.2)، از طریق شکستن تصادفی سوبسترا عمل می‌کند و موجب تولید الیگوگالاکتورونات‌های غیر اشباع می‌شوند و گروه دوم یعنی اگزوپکتات لیازها (EC 4.2.2.9) برش سوبسترا از انتهای کاهش یافته‌ی پکتات کاتالیز می‌کند و منجر به تولید دی‌گالاکتورونات‌های غیر اشباع می‌شود (رومبوتس و همکاران، ۱۹۸۰، پیت و همکاران، ۱۹۸۸).

۱-۶-۱ پکتات لیازها

پکتات لیازها (EC 4.2.2.-) که با نام پکتات ترانس الیمینازها هم شناخته می‌شوند، موجب کاتالیز برش حذفی پکتین دی‌استریفیه شده که ترکیب عمده‌ی موجود در دیواره‌های سلولی اولیه‌ی بسیاری از گیاهان عالی است، می‌شوند (کارپیتا و جیبو، ۱۹۹۳). تا مدت‌ها تصور بر این بود که پکتات لیازها تنها توسط پاتوژن‌های گیاهی ترشح می‌شوند و عملکرد این آنزیم در آنها موجب تحلیل بافت‌های گیاهی می‌شود. اما فراوانی توالی‌های مشابه پکتات لیاز در ژنوم‌های گیاهی (در حدود ۲۷ ژن در ژنوم آرابیدوپسیس که توالی‌های پروتئینی مشابه پکتات لیاز را کد می‌نمایند) قویاً نقش مهمی را برای این آنزیم‌ها در فرایندهای نموی مختلف گیاه پیشنهاد می‌کند (رودریگز و همکاران، ۲۰۰۲).

۱-۶-۲ ساختار پروتئینی پکتات لیاز

بررسی ساختارهای سه‌بعدی آنزیم‌های پکتات لیاز ما را قادر به درک اساس مولکولی مکانیسم‌های آنزیمی و نقش آمینواسیدهای موجود در جایگاه‌های فعال می‌سازد و همچنین موجب فراهم آمدن دلایل منطقی برای بیان تفاوت‌های ساختاری مابین آنزیم‌ها می‌شود که در ادامه به کسب شناخت ویژه‌ای از توالی‌های الیگوساکاریدی منحصر به فرد از ترکیب ناهمگون موجود در دیواره سلولی منجر خواهد شد (شارما و همکاران، ۲۰۱۳). ساختار سه‌بعدی پکتات لیازهای خارج سلولی متنوعی شامل pelC (یودر و همکاران، ۱۹۹۳، یودر و جورناک، ۱۹۹۵، هرون و همکاران، ۲۰۰۰)، pelE (لتیزک و همکاران، ۱۹۹۴) و pel9A (جنکینز و همکاران، ۲۰۰۴) از باکتری *E. chrysanthemi*, Bspel از *Bacillus subtilis* (پیکرسگیل و همکاران، ۱۹۹۴) و pelA (مایانس و همکاران، ۱۹۹۷)، pelB (ویتالی و همکاران، ۱۹۹۸) از *A. niger* یک پکتات لیاز به شدت قلیایی (آکیتا و همکاران، ۲۰۰۰)، pelA (توماس و همکاران، ۲۰۰۲)، pel9A (جنکینز و همکاران، ۲۰۰۴) از باکتری *E. chrysanthemi*، پکتات لیاز *Azospirillum irakense* (نوادا و همکاران، ۲۰۰۴)، pel2A از باکتری *Yerisinia enterocolitica* (آبوت و بوراستون، ۲۰۰۷)، پکتات لیاز Bsp165PelA از باکتری *Bacillus* sp. N165 (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۲)، پکتات لیاز باکتری بیوتروف *Acidovorax citrulli* (تانگ و همکاران، ۲۰۱۳) گزارش شده است. پکتات لیازها عموماً دارای یک بخش β هلیکس هم‌سو و یک ناحیه لوپ بزرگ هستند. بخش β هلیکس توسط رشته‌های هم‌سوی β که دور یک هلیکس بزرگ راست گرد می‌پیچند تشکیل می‌شود. رشته‌ی β خمیدگی‌های متوالی در کنار هم قرار می‌گیرند تا سه صفحه‌ی β هم‌سو با نام‌های PB1، PB2 و PB3 را تشکیل دهند (شکل ۱-۱۳). PB1، PB2 یک ساندویچ β ناهم‌سو را تشکیل می‌دهند، در حالیکه PB3 با حالتی نسبتاً عمودی در کنار PB2 قرار می‌گیرد. رشته‌های β عموماً کوتاه هستند به عنوان مثال، سه آمینواسید برای PB1، چهار یا پنج آمینواسید برای PB2 و سه تا پنج آمینواسید برای PB3 و موجب تشکیل هشت خمیدگی کامل از β هلیکس هم‌سو می‌شوند. در تمامی ساختارها، هر دو انتهای بخش β پوشیده شده است پایانه آمینی

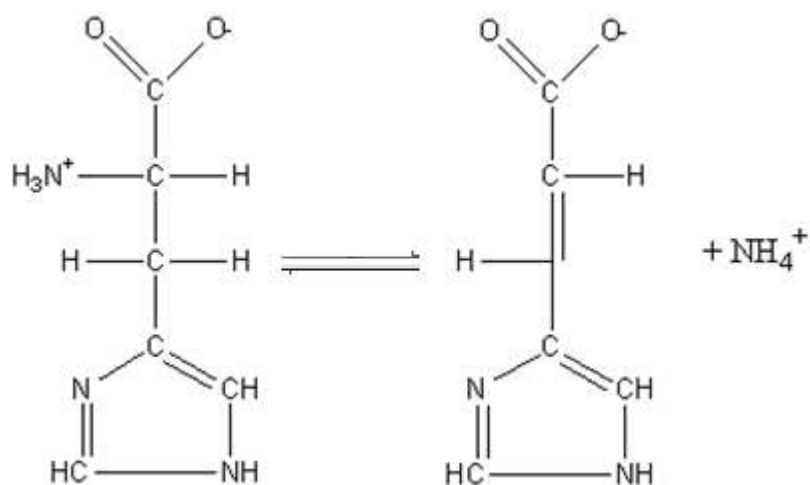
سیلندر توسط یک ماریچ α کوچک که به لحاظ ساختاری حفاظت شده است پوشیده می‌شود (شکل ۱-۱۳) و پایانه‌ی کربوکسیلی توسط یک زنجیره‌ی پلی‌پتیدی پوشیده شده است (مایانس و همکاران، ۱۹۹۷). در خمیدگی‌های میان صفحات T1, B از نوع کمان β است و دارای طول متغیر اما متوسطی است. خمیدگی T2 کوتاه است و در تنظیم فرم فضایی پروتئین نقش دارد. سه لوپ T3 معمولاً طویل هستند و ساختار پیچیده‌تری را که حاوی نواحی لوپ مانند بزرگی است به نمایش می‌گذارند.

۱-۶-۳ مکانیسم عمل پلی‌گالاکتورونات لیازها (پکتات لیاز)

تمامی پروتئین‌های موجود در خانواده پلی‌گالاکتورونات لیاز، مکانیسم آنزیمی مشابهی را به نمایش می‌گذارند. آنزیم موجب برش تصادفی پکتات‌ها به وسیله مکانیسم β - الیمیناسیون و تولید یک محصول با انتهای پرایمر با پیوند اشباع‌نشده‌ی ۴و۵ در باقیمانده‌ی گالاکتورونوزیل موجود در انتهای کاهش‌نیافته می‌شود (شکل ۱-۱۴؛ پترسون و همکاران، ۱۹۹۷). مطالعات ساختاری pelc در طیف متنوعی از pH و غلظت‌های متفاوت یون کلسیم نشان داده است که اتصال Ca^{2+} برای فعالیت pel c در شرایط آزمایشگاهی ضروری است و اینکه یون‌های Ca^{2+} دارای عملکردهای چندگانه‌اند (پیکرسیگل و همکاران، ۱۹۹۴، هرون و همکاران، ۲۰۰۳). یون‌های Ca^{2+} نه تنها موجب اتصال الیگوساکارید به پروتئین می‌شوند، بلکه قابلیت اتصال به میانه‌ی گالاکتورونات‌های موجود در یک رشته پکتات منفرد را نیز دارا می‌باشند. نبود همولوژی توالی در بین خانواده‌های مختلف از پکتات لیازها، گواهی بر این است که برخی از آنزیم‌های دارای عملکرد کاتالیتیکی مشابه، ممکن است به هم وابسته نباشند و این بازتابی از عملکردهای متفاوت آنها در طبیعت است (براون و همکاران، ۲۰۰۱).

جدول ۱-۲. طبقه بندی لیازها بر اساس نوع پیوندی که موجب کاتالیز برش آن می‌شوند

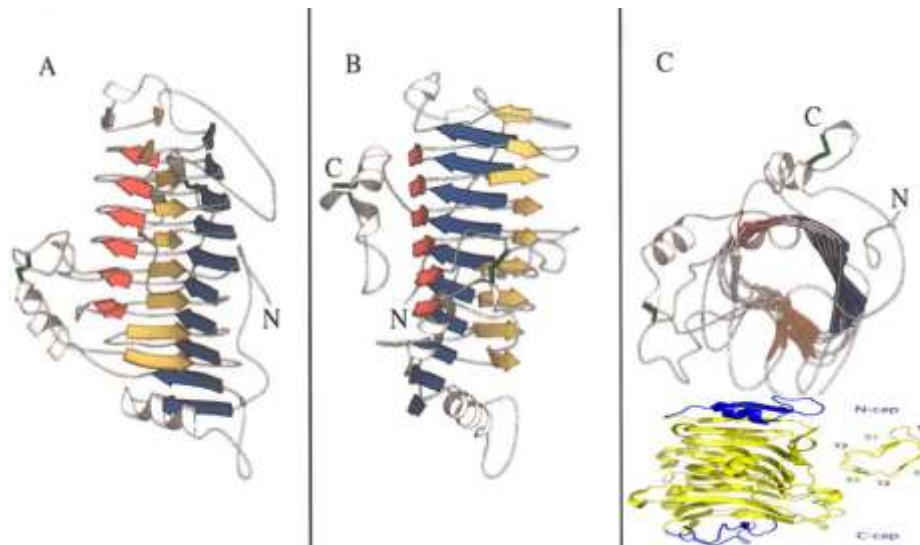
شماره	عملکرد	مثال
<u>EC 4.1</u>	کاتالیز برش پیوندهای کربن-کربن	دکربوکسیلازها و آلدهید لیازها
<u>EC 4.2</u>	کاتالیز برش پیوندهای کربن-اکسیژن	دهیدراتازها
<u>EC 4.3</u>	کاتالیز برش پیوندهای کربن-نیتروژن	آسپاراتات آمونیا لیاز
<u>EC 4.4</u>	کاتالیز برش پیوندهای کربن-سولفور	سولفولاکتات سولفو لیاز
<u>EC 4.5</u>	کاتالیز برش پیوندهای کربن-هالید	هالوهیدرین دهالوژناز
<u>EC 4.6</u>	کاتالیز برش پیوندهای فسفر-اکسیژن	آدنیلات سیکلاز
<u>EC 4.99</u>	سایر آنزیم‌های لیاز	فروشات



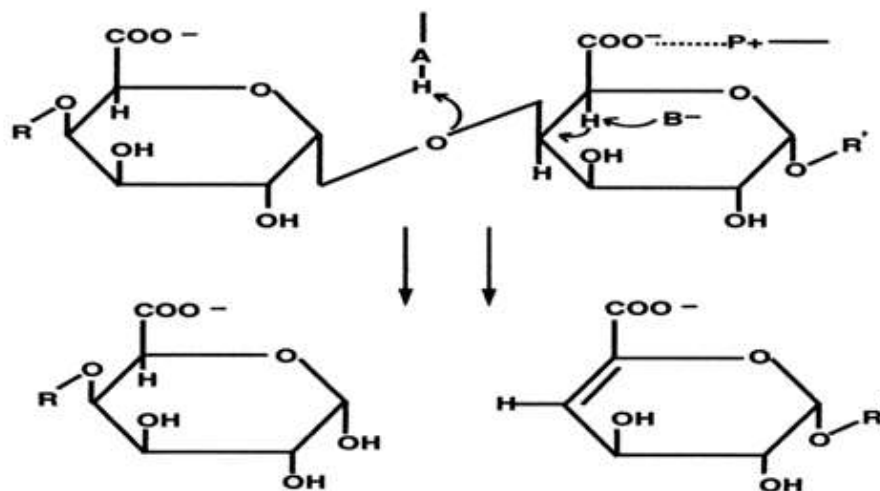
شکل ۱-۱۲. مکانیسم عمل لیازها. لیازها آنزیم‌هایی هستند که ضمن افزودن گروه عاملی به پیوندهای دوگانه موجب بریدن باند و یا با حذف گروه عاملی از سوبسترا ضمن انجام واکنشی معکوس، تشکیل مجدد باند دوگانه را کاتالیز می‌کنند (<http://www.chem.uwec.edu/Webpapers2005kasperjmPagespage1.html>).

جدول ۱-۳. طبقه بندی خانواده‌های مختلف پکتات لیاز بر اساس ساختار پروتئین و نوع عملکرد

Family of PLs	Members	Structure	Name	Type
			PeL	EC <u>4.2.2.9</u>
			Pel1	EC <u>4.2.2.2</u>
			Pel2	EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.9</u>
			Pel3	EC <u>4.2.2.2</u>
1	pectate lyase (EC <u>4.2.2.2</u>) exo-pectate lyase (EC <u>4.2.2.9</u>) pectin lyase (EC <u>4.2.2.10</u>)	parallel β -helix	PelA PelB PelC PelD PelE PelK PelZ	EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.9</u> EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.2</u>
2	pectate lyase (EC <u>4.2.2.2</u>) exo-pectate lyase (EC <u>4.2.2.9</u>)	(α / α) ₇ barrel	PelY PelW Pel3A Pel3B	EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.9</u> EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.2</u>
3	pectate lyase (EC <u>4.2.2.2</u>)	parallel β -helix	Pel3C Pel3D PelI	EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.2</u>
9	pectate lyase (EC <u>4.2.2.2</u>) exopolygalacturonate lyase (EC <u>4.2.2.9</u>) thiopeptidoglycan lyase (EC <u>4.2.2.-</u>)	parallel β -helix	PelL Pel9A PelX	EC <u>4.2.2.9</u> EC <u>4.2.2.2</u> EC <u>4.2.2.9</u>
10	pectate lyase (EC <u>4.2.2.2</u>)	(α / α) ₃ barrel	Pel10A Pel10B	EC <u>4.2.2.2</u>



شکل ۱-۱۳. ساختار پروتئینی آنزیم پکتات لیاز. ساختارهای هلیکس به صورت مارپیچ و ساختارهای صفحات β به صورت فلش در شکل مشخص شده‌اند. پکتات لیازها عموماً دارای یک بخش هلیکس هم‌سو و یک ناحیه لوپ بزرگ هستند. بخش هلیکس توسط رشته‌های هم‌سوی β که دور یک هلیکس بزرگ راست‌گرد می‌پیچند تشکیل می‌شود. رشته‌ی β خمیدگی‌های متوالی در کنار هم قرار می‌گیرند تا سه صفحه‌ی β هم‌سو با نام‌های PB1 (زرد رنگ)، PB2 (آبی رنگ) و PB3 (قرمز رنگ) را تشکیل دهند. خمیدگی T1 بین PB1 و PB2، خمیدگی T2 بین PB2 و PB3 و خمیدگی T3 بین PB1 و PB3 قرار گرفته است (Kraulis, 1991).



شکل ۱-۱۴. واکنش β -ایمیناسیون در برش پکتینولیتیک شامل سه مرحله است: خنثی‌سازی گروه کربوکسیل که در مجاورت پیوند گلیکوزیدی بریده شده واقع شده است، رابیش پروتون C_5 و انتقال پروتون به اکسیژن قندی که موجب باقی ماندن یک پیوند دوگانه بین کربن ۴ و ۵ می‌شود. (Herron et al. 2000).

۱-۶-۴ کاربرد آنزیم‌های پکتات لیاز

برای سال‌ها، آنزیم‌های پکتات لیاز در فرایندهای صنعتی مختلفی همچون صنایع منسوجات، فرآوری الیاف گیاهی، خیساندن الیاف و صمغ زدایی از آنها و تیمار پساب‌های صنعتی به کار رفته‌اند. به علاوه گزارشاتی نیز از کاربرد آنها در تولید کاغذ وجود دارد. با توجه به اینکه در صنایع نساجی، حضور الیاف غیر سلولزی موجب عدم رنگ‌پذیری مناسب الیاف کتان می‌شود، می‌توان با استفاده از این آنزیم قابلیت رنگ‌پذیری الیاف کتان را بهبود بخشید. پکتات لیازهای قلیایی به دلیل فعالیت تجزیه‌ای قوی برای خیساندن الیاف درخت ژاپنی میتسوماتا مناسبند (تاناب و کوبایاشی، ۱۹۸۷). این الیاف خیسانده شده برای تهیه کاغذ ژاپنی مورد استفاده قرار می‌گیرند (هوریکوشی، ۱۹۹۰). در طول فرآیند تولید کاغذ، آنزیم پکتات لیاز می‌تواند ضمن دپلمریزاسیون شبکه پکتینی، میزان کاتیون‌های مورد نیاز محلول‌های پکتینی را کاهش دهد (رید و ریچارد، ۲۰۰۰). از جمله کاربردهای دیگر آنزیم‌های پکتات لیاز، تیمار پساب‌های پکتیکی حاصل از صنعت فرآوری مرکبات توسط این آنزیم است که موجب تسریع حذف مواد پکتینی می‌شود (تاناب و کوبایاشی، ۱۹۸۷). به علاوه، تخمیر قهوه با استفاده از میکروارگانیزم‌های پکتینولیتیک که به منظور حذف پوشش موسیلاژی از دانه‌های قهوه و افزایش تخمیر چای در چای انجام می‌شود از دیگر کاربردهای این آنزیم می‌باشد (سورنسن و همکاران، ۲۰۰۰).

۱-۶-۵ منابع تولید آنزیم پکتات لیاز

منابع تولید آنزیم‌ها بسیار متنوع است. آنزیم‌های فعال زیستی از هر ارگانیزم زنده قابل استخراج هستند. از صدها آنزیمی که به طور تجاری استفاده می‌شود بیش از نیمی از آن‌ها از قارچ و مخمر و بیش از یک سوم آنها از باکتری‌ها و باقیمانده از حیوانات و گیاهان حاصل می‌شود. به طور کلی در صنعت، منابع جانوری و گیاهی به ترتیب تنها ۸ و ۳ درصد از کل آنزیم‌ها را شامل می‌شوند و سایر آنزیم‌های مورد استفاده، منشا میکروبی دارند (حسن و همکاران، ۲۰۰۶). ارجحیت استفاده از منابع میکروبی به دلیل یک سری عوامل از جمله تولید ارزان است. همچنین مواد مضر کاهنده یا مخرب

فعالیت آنزیم در گیاهان و جانوران بیش از میکروبهاست است. دستکاری ژنتیکی در میکروارگانسیم-ها راحت تر می باشد. میکروارگانسیمها در زمان کم و مقادیر فراوان از طریق تخمیر کشت داده می-شوند و پایداری پروتئینهای میکروبی نسبت به همتهای گیاهی و جانوری خود چندان متفاوت نیست (پاکروان، ۱۳۴۷). آنزیم پکتات لیاژ نیز تاکنون از منابع مختلفی جداسازی شده است که اغلب آنها منابع باکتریایی بوده است.

ترموفیلها نیز گروه دیگری از باکتریهای تولیدکننده ی آنزیم پکتات لیاژ می باشند. ترموفیلها در دمای ۴۵ الی ۶۰ درجه سانتیگراد زندگی می کنند. باکتریهای ترموفیل مطلق به باکتریهای گرمادوست معروف هستند و در دمای بالاتر از ۶۰ درجه سانتیگراد زندگی می کنند. آنزیم پکتات لیاژ از تعدادی باکتریهای ترموفیل مطلق نیز جداسازی شده است. باکتریهای ترموفیل مطلق یا همان اکسترموفیلها به دلیل مقاومت بالا در برابر حرارت از نظر تولید آنزیم بسیار مورد توجه هستند. این میکروارگانسیمها متعلق به گروه آرکی باکتریها هستند. در دسترس بودن تعداد زیادی از آنزیمهای مقاوم به حرارت، امکان استفاده از آنها را در فرآیندهای صنعتی خاص فراهم می کند. به دلیل پایداری ذاتی این آنزیمها، برخی از آنها دارای کاربردهای تجاری در صنعت نشاسته، سنتز آمینواسیدها، نفت خام، صنایع شیمیایی و هستند. هنگامی که یک پروتئین یا آنزیم دارای دمای گذار (T) بالا و یا نیمه عمر طولانی در یک دمای بالا باشد به آن متحمل دما می گویند. دلایل اساسی انتخاب آنزیمهای مقاوم به حرارت در فرآوریهای زیستی، به ماهیت پایداری دمایی آنها بازمی گردد. چون بسیاری از واکنشهای صنعتی در دماهای بالا به انجام می رسند. پایداری دمایی بالاتر این آنزیمها در مقایسه با آنزیمهای مزوفیل، آنها را به آنزیمهایی مناسبتر جهت استفاده در فرآیندهای شیمیایی دشوار مبدل ساخته است. به علاوه مقاومت بیشتر آنها در مقابل دما، نور، دنا توره کنندههای شیمیایی متداول مورد استفاده در واکنشهای شیمیایی، افزایش تحمل نسبت به حلالهای آلی و کاهش خطر آلودگی و از دست رفتن فعالیت در حین فرآوری، از جمله دلایل برتری این آنزیمها نسبت به انواع مزوفیل می باشد (کریست جانسون، ۱۹۸۹).

۱-۶-۶ پکتات‌لیازهای گیاهی

وجود توالی‌های مشابه پکتات‌لیاز در گیاهان عالی، اولین بار در دانه‌ی گرده گزارش شد (وینگ و همکاران، ۱۹۸۹). دو ژن با توالی‌های مشابه به پکتات‌لیاز *Erwinia* به میزان بالایی در گل‌های بالغ گوجه‌فرنگی بساک‌ها و دانه‌ی گرده بیان شدند. از آن زمان به بعد بسیاری از توالی‌های مشابه در دانه گرده بساک‌ها و مادگی‌ها بیان شده‌اند (کولیکوسکاس و مک کورمیک، ۱۹۹۷) و یک دانه گرده حساسیت‌زا از یک سرو ژاپنی شناسایی شده‌است که دارای فعالیت پکتات‌لیازی می‌باشد (تانی‌گوجی و همکاران، ۱۹۹۵). عملکردهای پیشنهاد شده برای پکتات‌لیاز موجود در دانه‌ی گرده شامل آغاز از بین رفتن دیواره‌ی سلولی دانه گرده است که موجب فراهم آمدن امکان رشد لوله می‌گردد، تسهیل و نفوذ آن در درون خامه می‌شود (تاناکوچی و همکاران، ۱۹۹۵، وئو و همکاران، ۱۹۹۶). نرم‌شدگی میوه‌ها نیز که به واسطه‌ی فروپاشی دیواره‌سلولی (سیمور و گراس، ۱۹۹۶) و رخ دادن تغییراتی در بخش پکتین انجام می‌شود، در طول فرایند رسیدگی قابل مشاهده است. اکثر مطالعات صورت گرفته بر روی فروپاشی دیواره سلولی میوه‌ها، بر روی رسیدگی گوجه‌فرنگی متمرکز شده است. پریکارپ رسیده‌ی این میوه غنی از فعالیت‌های گالاکتورونازی است و تا مدت‌ها تصور می‌شد که این آنزیم، آنزیم اصلی مؤثر در فرایند رسیدگی میوه‌ها است (اسمیت و همکاران، ۱۹۸۹). اما در میوه‌هایی مانند موز و توت‌فرنگی، به رغم تجزیه پکتین در رسیدگی آنها، فعالیت پلی‌گالاکتورونازی بسیار کم است یا اصلاً وجود ندارد (هوبر، ۱۹۸۴، اسمیت و همکاران، ۱۹۸۹). وجود توالی‌های پکتات‌لیازی در موز (دومینگوز و همکاران، ۱۹۹۷، مدینا و همکاران، ۱۹۹۷، پیلاتزکه-وندربیچ و نسلر، ۲۰۰۱، رودریگز، ۲۰۰۱) و توت‌فرنگی (مدینا و همکاران، ۱۹۹۷) و انگورهای رسیده (نونان و همکاران، ۲۰۰۱) گزارش شده است. در موزها، بیان دو ژن مشابه پکتات‌لیاز مجزا (pel I, pel II) در طول فرایند رسیدگی مشخص شده است. یک پروتئین پکتات‌لیازی فعال با بیان pel I موز در مخمر تولید شده (رودریگز، ۲۰۰۱)، در سال ۲۰۰۳ رودریگز و همکاران موفق به جداسازی دو cDNA از موز شدند و پیشنهاد کردند که این دو cDNA ایزوزیم‌های پکتات‌لیازی قوی را کد می‌کنند. به‌علاوه یک توالی پکتات‌لیازی از توت‌فرنگی

نیز در مخمر بیان شده است که منجر به تولید پروتئین فعالی شده است (مدینا و همکاران، ۱۹۹۷). بیان ژن‌های مشابه پکتات‌لیاز در میوه‌های رسیده، پیشنهاد می‌کند که این آنزیم‌ها می‌توانند نقش مهمی را در فرایند رسیدگی میوه‌ها ایفا نمایند.

۱-۶-۷ تولید پکتات‌لیازهای میکروبی به صورت نوترکیب

در سال ۲۰۰۰ ژن *peIA* کد کننده‌ی پکتات‌لیاز از باکتری *Bacillus sp.* BP-23 جداسازی و در میزبان اشرشیا کلی به صورت نوترکیب بیان گردید (سوریانو و همکاران). بررسی‌ها نشان داد که توالی آمینواسیدی این پروتئین دارای هومولوژی بالایی با پکتات‌لیازهای A, B, C, D از *Fusarium solani*, *PelB* و *Pel-3* باکتری *Erwinia carotovora* و *pelI* باکتری *Erwinia chrysanthemi* می‌باشد. در پژوهشی دیگر که در همین سال به انجام رسید، ژن پکتات‌لیاز باکتری KSM-P15 *Bacillus sp.* که پروتئینی با وزن مولکولی ۷۰۰۰۰ دالتون را کد می‌نمود کلون شد (اکاوا و همکاران). توالی آمینواسیدی این پروتئین شباهت کمی را با سایر پکتات‌لیازهای باکتری *Bacillus* به نمایش گذاشت. در سال ۲۰۰۱، ژن کد کننده‌ی پکتات‌لیاز متحمل حرارت با نام *pel 47* از باکتری *Bacillus sp.* TS 47 کلون، توالی یابی و به صورت نوترکیب در میزبان مزوفیل باسیلوس سوبتیلیس بیان گردید (تاکائو و همکاران). در سال ۲۰۰۳، ژن *pel A* از باکتری *Thermotoga maritima* به صورت کلی به عنوان اولین پکتات‌لیاز هترولوگ در *E. coli* بیان شده و با استفاده از استخراج بدون سلول توسط انکوباسیون حرارتی (80 c , 20 min) و کروماتوگرافی Q- سفاروز در ادامه، خالص‌سازی شد (کلوسکنس و همکاران). در سال ۲۰۰۴، ژن کد کننده‌ی پکتات‌لیاز *peIA* از باکتری *Bacillus licheniformis* سویه‌ی 14A کلون و توالی یابی شد (برنسمیر و همکاران). این آنزیم دارای هومولوژی بارزی با سایر پکتات‌لیازهای متعلق به خانواده‌ی ۱ پلی‌ساکارید لیازها همچون آنزیم‌های باکتری‌های *Bacillus spp.* و *Erwinia chrysanthemi* می‌باشد. این ژن در ادامه در میزبان بیانی اشرشیا کلی به صورت یک پروتئین نوترکیب دارای هیستیدین در انتهای C- ترمینال آن بیان گردید و در ادامه طی

یک دستورکار یک مرحله‌ای خالص سازی شد. در سال ۲۰۰۹، ژن پکتات لیاز C (PelC) از باکتری متحمل حرارت *Thermotoga maritime* در میزبان اشرشیا کلی کلون و بیان گردید (لی و همکاران). قابلیت بالای این آنزیم در تحمل دماهای بالا، آن را به گزینه‌ی مناسبی جهت استفاده در صنایع تخمیری در مقیاس بزرگ مبدل ساخته است. همچنین در پژوهشی دیگر ژن کد کننده‌ی پکتات لیاز ترموفیل SWU از باکتری *Bacillus sp. RN1* جداسازی، کلون و بیان گردید (سوخوم سیرچارت و همکاران). سوبسترای اختصاصی این آنزیم گالاکتورونیک اسید دی‌متیله بود و بکارگیری این پکتات لیاز ترموفیل در تجزیه‌ی شبکه‌های پکتینی در دماهای بالا می‌تواند مفید واقع شود. در سال ۲۰۱۰ ژن پکتات لیاز قلیایی Bsp165PelA باکتری باز دوست *Bacillus sp. N16-5* کلون و بیان گردید (لی و همکاران). بررسی توالی آمینواسیدی این پروتئین و مقایسه‌ی آن با سایر آنزیم‌های پکتات لیاز نشان داد که این آنزیم دارای هومولوژی زیادی با پکتات لیازهای خانواده‌ی ۱ پلی ساکارید لیازهاست. کاتیون دو ظرفیتی Ca^{2+} نیز برای عملکرد این آنزیم بر روی سوبستراهای پکتیکی ضروری نبود. در سال ۲۰۱۲ ژن کد کننده‌ی یک پکتات لیاز جدید با نام Apel از باکتری *Bacillus subtilis* کلون و متعاقبا در میزبان *B. subtilis* WB600 بیان گردید (لیو و همکاران). در سال ۲۰۱۳، یک پکتات لیاز جدید با نام PelN از باکتری *Dickeya dadantii* 3937 مورد شناسایی قرار گرفت و متعاقبا به صورت نوترکیب تولید شد (حسن و همکاران). بررسی‌ها نشان داد که این پکتات لیاز متعلق به خانواده ۹ پلی ساکارید لیازها می‌باشد و در pH برابر با ۷/۴ دارای بیشترین فعالیت است. در سال ۲۰۱۴ ژن پکتات لیاز از باکتری *Paenibacillus sp. 0602* در میزبان *Escherichia coli* به صورت نوترکیب کلن و بیان گردید و پس از آن ویژگی‌های بیوشیمیایی‌اش مورد بررسی قرار گرفت (لی و همکاران). مطالعات بر روی آنزیم تولیدی نشان داد که این آنزیم دارای قابلیت بالایی در زمینه‌ی صمغ زدایی از الیاف می‌باشد و از اینرو می‌تواند در صنایع نساجی به خوبی مورد استفاده قرار گیرد. در سال ۲۰۱۵، کومار و همکاران، ژن کد کننده‌ی پکتات لیاز باکتری *Bacillus subtilis* RCK در میزبان *Escherichia coli* به صورت نوترکیب کلن و بیان گردید که دمای اپتیمم جهت فعالیت آن ۵۰

درجه‌ی سانتی‌گراد است و در محدوده‌ی pH ۷/۵-۱۰ دارای بیشترین فعالیت است. در پژوهشی دیگر در همین سال، پکتات لیاز *Alternaria brassicicola* PL1332 مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق از باکتری ترموفیل بومی کوهنلا به عنوان منبع باکتریایی جهت استخراج آنزیم پکتات لیاز استفاده شد. از آنجایی که ترموفیل‌ها، میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت بقا در محیط‌هایی با دماهای بالا هستند، آنزیم‌های تولیدی توسط این میکروارگانیسم‌ها مقاومت قابل توجهی در دماهای بالا از خود نشان می‌دهند و گزینه‌های مناسبی جهت کاتالیز واکنش‌های صنعتی هستند که غالباً در دماهای بالا به انجام می‌رسند. آنزیم پکتات لیاز تولیدی توسط این باکتری می‌تواند به عنوان آنزیمی مناسب در صنایع نساجی به منظور مرطوب سازی محصولات فیبری و فرآوری الیاف گیاهی به منظور صمغ‌زدایی از الیاف گیاه کتان و حذف ناخالصی‌های غیر سلولزی بدون ایجاد هرگونه تاثیر منفی بر ساختار سلولز، به منظور بهبود قابلیت رنگ پذیری این الیاف در مرحله رنگ‌آمیزی مورد استفاده قرار گیرد. پیش تصفیه پساب حاصل از صنایع پردازش مرکبات، برای از بین بردن مواد پکتیکی موجود در فاضلاب و تصفیه آسانتر نیز می‌تواند به‌وسیله این آنزیم انجام شود. در استخراج روغن از دانه‌های روغنی مانند کلزا، نخل و آفتابگردان نیز کاربرد این آنزیم می‌تواند موجب سهولت خروج عصاره اجزای ساختاری دیواره سلولی دانه‌های روغنی و تسهیل در فرآیند استخراج روغن شود. در فصل بعد مواد و روش‌های مورد استفاده در این پژوهش به منظور کلونینگ، بیان، خالص‌سازی و مطالعه‌ی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

جدول ۱-۴. مشخصات تعدادی از میکروارگانیسم‌ها که تاکنون شناسایی و جداسازی ژن آنزیم پکتات لیا از آنها صورت گرفته است.

نام باکتری	نوع pel	وزن مولکولی (kDa)	دمای بهینه (°C)	pH بهینه	Km (g/l)	منبع
<i>Amycolata</i> sp.	Exo-Pel	۳۱	۷۰	۱۰/۳	۰/۰۲	بروهلمن و همکاران، ۱۹۹۵
<i>Azospirillum irakense</i>	Pel	۴۴/۴	۴۰	۹	۰/۰۸	بکری و همکاران، ۱۹۹۹
<i>Bacillus</i> sp. BP-23	PelA	۲۳	۵۰	۱۰	-	سوریانو و همکاران، ۲۰۰۰
<i>Bacillus</i> sp. TS 47	Pel 47	۵۰	۷۰	۸	-	تاکائو و همکاران، ۲۰۰۰
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	Pel-4A	۳۵	۷۰	۱۱/۵	۱/۸۷	هاتادا و همکاران، ۲۰۰۱
<i>Bacillus licheniformis</i> 14A	PelA	۴۰	۷۰	۹	-	کلوسکنس و همکاران، ۲۰۰۳
<i>Bacillus alcalophilus</i>	Pel	۳۵	۴۵	۹-۱۰	-	ژای و همکاران، ۲۰۰۳
<i>Bacillus licheniformis</i>	PelA	۳۳/۴	۶۵	۸/۵	۰/۵۶	برنسمیر و همکاران، ۲۰۰۴
<i>Bacillus subtilis</i> 168	PelC	۲۳	۶۵	۱۰	۰/۱۵	سوریانو و همکاران، ۲۰۰۶
<i>Bacillus pumilus</i> BK2	Pel	۳۷/۳	۷۰	۸/۵	۰/۲۴	کلاگ‌سانتر و همکاران، ۲۰۰۶
<i>Bacillus</i> sp. RN1	PelSW U	۳۸	۹۰	۱۰	-	سیرچارت و همکاران، ۲۰۰۹
<i>Thermotoga maritime</i>	PelC	۴۳	۹۰	۸/۵	۰/۱۱	لی و همکاران، ۲۰۰۹
<i>Bacillus</i> sp. N16-5	Bsp165 PelA	۳۵	۵۰	۱۱/۵	-	لی و همکاران، ۲۰۱۰
<i>Bacillus subtilis</i>	Apel	۴۵	۵۰	۹	-	لیو و همکاران، ۲۰۱۲
<i>Dickeya dadantii</i> 3937	PelN	-	-	۷/۴	-	حسن و همکاران، ۲۰۱۳
<i>Paenibacillus</i> sp. 0602	PelN	۴۸	۶۵	۹/۸	-	لی و همکاران، ۲۰۱۴
<i>Bacillus subtilis</i> RCK	Pel	-	۵۰	۷-۱۰/۵	-	کومار و همکاران، ۲۰۱۵

فصل دوم

مواد و روش ها

ر این پژوهش، پس از انجام مطالعات بیوانفورماتیکی در خصوص ژن کدکننده‌ی آنزیم پکتات لیاز Coh01152 از باکتری ترموفیل بومی *Cohnella* A01، DNA این باکتری، جداسازی شد. کشت باکتری در محیط کشت NB مایع استریل در دمای °C ۶۰ به مدت ۳ شبانه روز صورت گرفت و استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت تخلیص DNA ژنومی peQlab و مطابق با توصیه شرکت انجام پذیرفت. در ادامه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، تکثیر ژن کدکننده‌ی آنزیم پکتات لیاز به نام Coh01152 و با طول ۱۲۰۰bp انجام شد. همسانه‌سازی ژن Coh01152 ابتدا در ناقل کلونینگ pTZ57R/T صورت گرفت. سپس در ناقل بیانی pET26b کلون گردید و پس از ترانسفورم در باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) بیان شد. خالص‌سازی پروتئین و سنجش فعالیت آنزیمی به منظور یافتن بهترین pH و دما برای فعالیت این آنزیم در ادامه صورت گرفت. به‌علاوه جهت نشان دادن بهتر عملکرد آنزیم در شرایط طبیعی، آزمون پلیت و سنجش زیستی آنزیم نیز صورت گرفت. باکتری *Cohnella*A01 که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، از باسیلوس‌های گرم مثبت خانواده‌ی *Paenibacillaceae* می‌باشد که از کارگاه‌های پرورش میگو چوئبده‌ی آبادان جداسازی شده است. اکثر سویه‌های باکتری *Cohnella*A01 گرم مثبت و هوازی هستند. دمای مناسب رشد و تکثیر این سویه ۶۰ الی ۶۵ درجه‌ی سانتیگراد است و pH مناسب برای رشد آن، pH خنثی است و آنزیم-های آن به دلیل پایداری در دماهای بالا، جهت استفاده در فرآیندهای صنعتی مناسب هستند.

۲-۱ مطالعات بیوانفورماتیکی

در این تحقیق به منظور یافتن توالی‌های مشابه از پایگاه اینترنتی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)، از برنامه‌ی TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/>) به منظور بررسی غشایی یا غیر غشایی بودن پروتئین، برای پیش‌بینی وجود پپتید نشانه از SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/>) استفاده گردید و برای پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین از پایگاه اینترنتی PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) استفاده شد. به‌علاوه از نرم افزار MEGA 5 (www.megasoftware.net) برای رسم درختچه فیلوژنتیکی استفاده شد. مطالعات ساختاری با استفاده از برنامه I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) به منظور مشخص نمودن ساختار سه بعدی پروتئین پکتات لیاز انجام شد و مدل سه بعدی این پروتئین مورد پیش‌بینی قرار گرفت.

۲-۲ مواد مورد استفاده در این پژوهش

آنزیم پلیمرازی Taq و آنزیم‌های برش دهنده محدودگر *XhoI* و *NcoI*، آنزیم *T4 DNA ligase*، نشانگر اندازه DNA، نشانگر پروتئینی، IPTG و X-Gal از شرکت Fermentas (Burlington, Canada) خریداری شد. کیت High Pure PCR Product Purification برای خالص‌سازی محصول PCR و نیز خالص‌سازی قطعات DNA از روی ژل آگارز و کیت High Pure Plasmid Isolation برای استخراج DNA پلاسمیدی از شرکت Roche (Indianapolis, USA) خریداری گردید. آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کانامایسین، آگارز و پلی‌گالاکتورونیک‌اسید از شرکت Sigma (Steinheim, USA) خریداری شد. ستون نیکل Ni-NTA (Agarose) از شرکت Invitrogen (Carlsbad, USA) خریداری گردید. کیت DNA Extraction برای استخراج DNA ژنومی از شرکت peQlab خریداری شد. ایمیدازول، آکریل آمید، بیس آکریل آمید، APS و TEMED، از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) تهیه شد. آغازگرها از شرکت تکاپو زیست (Tehran, Iran) تهیه گردید.

۲-۳ استخراج DNA ژنومی و تعیین کمیت و کیفیت آن

کشت از استوک باکتری کوهنلا در محیط NB مایع (۰/۸ گرم NB در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت صورت گرفت. استخراج DNA ژنومی باکتری توسط کیت تخلیص DNA از شرکت peQlab مطابق با توصیه‌ی شرکت سازنده انجام شد. بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی توسط روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ تعیین گردید. در روش اسپکتروفوتومتری به منظور تعیین میزان غلظت DNA ژنومی باکتری، نسبت جذب نوری اسید نوکلئیک در ۲۶۰ نانومتر به جذب بقایای پروتئینی در ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. در الکتروفورز بر روی ژل آگارز (w/v) ۱٪، میزان ۱ گرم آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر $\times 0.5$ TBE (بافر تریس (M) ۰/۰۳)، اسید بوریک (M) ۰/۰۳ و EDTA (M) ۰/۲۵ در ۸ = pH تهیه گردید. DNA استخراجی با مقداری مناسب بافر بارگذاری $\times 6$ (w/v) ۰/۱۲۵ بروموفنل

بلو، (w/v) ۰/۲۵٪ گزین سیانول، (w/v) ۰/۰۱٪ SDS، (w/v) ۲۰٪ فایکول ۴۰۰ mM و EDTA ۱۰۰ (pH = ۸) مخلوط شد و در چاهک ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE تخلیه شد و در ولتاژ ۹۵ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. ژل به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی اتیدیوم بروماید (EtBr) یک درصد رنگ آمیزی و سپس با آب مقطر شستشو داده شد و در زیر نور ماوراء بنفش مشاهده و عکسبرداری انجام گردید.

۴-۲ تکثیر ژن پکتات لیاز مربوط به سویه بومی ایزوله شده

۴-۲-۱ طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن پکتات لیاز

با توجه به توالی ژن پکتات لیاز آغازگرهای Forward و Reverse با استفاده از نرم افزار gene runner، جهت جداسازی ژن پکتات لیاز و همسانه نمودن آن در TA-Vector به منظور تعیین توالی نوکلئوتیدی این ژن طراحی گردید. جهت طراحی آغازگرهای ژن پکتات لیاز دارای جایگاه برش آنزیم محدودگر مناسب، برای استفاده در فرایند الحاق با وکتور بیانی pET26b، با مطالعه توالی نوکلئوتیدی پلاسمید pET26b و شناسایی آنزیمهای محدودگر برش دهنده این پلاسمید و عدم وجود جایگاه برش آنزیمها در داخل توالی نوکلئوتیدی ژن پکتات لیاز، آنزیمهای محدودگر *XhoI* و *NcoI* جهت برش انتخاب شدند و جایگاه برش این آنزیمها در طراحی آغازگرهای مناسب استفاده شدند. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول آورده شده است.

جدول ۲-۱. آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن پکتات لیاز مربوط به باکتری کوهنلا

نام	توالی آغازگر	T _m (°C)
Fpl	5'- CCTCCATGGCGGCTCCTTCCGTCCTTTACGTCG -3'	۶۰
Rpl	5'- CCTCTCGAGGTTGTGGCCGATATCCTTGCCGTC -3'	۶۱

۲-۴-۲ تکثیر ژن پکتات لیاز از DNA ژنومی الگو جهت استفاده در فرایند کلونینگ

آنزیم *Taq* DNA پلیمرز به خاطر داشتن فعالیت داکی نوکلئوتیدیل ترانسفرازی خود مبادرت به اضافه کردن یک نوکلئوتید به انتهای ۳' بدون استفاده از الگو می‌کند. این نوکلئوتید اضافی معمولاً یک نوکلئوتید آدنین (A) است. با اتکا به خصوصیت این آنزیم، پلاسمید تجاری pTZ57R/T طراحی شده است. این پلاسمید پس از بدست آمدن محصول PCR جهت کلونینگ به روش T/A مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای *Fpl* و *Rpl* به منظور تکثیر ژن پکتات لیاز و قرار دادن جایگاه برشی آنزیم محدودگر مناسب در دو انتهای ژن پکتات لیاز جهت همسانه نمودن آن در ناقل بیانی pET-26b(+) انجام گرفت. مخلوط واکنش PCR با استفاده از این پرایمرها، در یک میکروتیوب ml ۰/۲ استریل روی یخ آماده شد. ۰/۷ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰mM)، ۱ میکرولیتر محلول dNTPs (۱۰mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10× PCR، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلیمرز (۵ Unit/μl) و ۱ میکرولیتر DNA الگو را با اضافه نمودن آب دیونیزه به حجم ۲۵ میکرولیتر رساندیم. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (PEQ Lab، آلمان) با برنامه ۵ دقیقه در ۹۴ °C برای واسرشت سازی اولیه و ۳۵ سیکل به صورت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ °C جهت واسرشت سازی، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ °C جهت اتصال آغازگرها و ۲ دقیقه در دمای ۷۲ °C جهت فرآیند تکثیر تکرار شد. ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ °C برای فرایند گسترش نهایی برنامه ریزی شد و در نهایت در دمای ۴ °C سرد شد. پس از انجام PCR، محصول آن بر روی ژل آگارز (w/v) ۱٪ الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، تکثیر ژن پکتات لیاز بررسی شد.

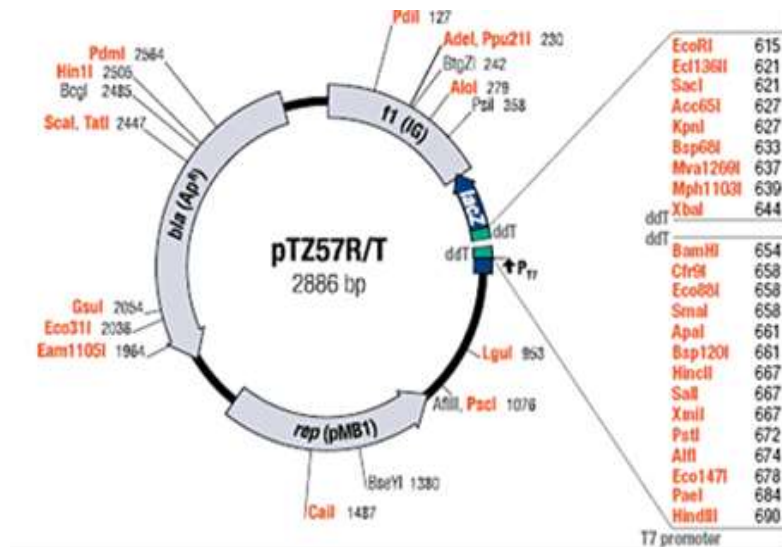
۲-۴-۳ تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

محصول PCR به حجم ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از کیت استخراج محصول PCR مطابق با توصیه سازنده، تخلیص شد و برای انجام کلونینگ آماده گردید. برای سنجش کیفیت DNA تخلیص شده،

۲ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و بقیه به منظور آنالیزهای بعدی در دمای °C ۲۰- قرار داده شد.

۲-۴-۴ انجام واکنش الحاق محصول PCR با پلاسمید

جهت انجام واکنش الحاق، از وکتور کلونینگ pTZ57R استفاده شد (شکل ۲-۱). به منظور ایجاد pTZ57R/T پلاسمید pTZ57R با آنزیم Eco32 I با انتهای صاف برش داده شده است و به دو انتهای ۳' آن ddT اضافه شده است. جایگاه چندگانه کلونینگ این حامل دارای ۶ جایگاه برش با انتهای چسبنده ۳' می‌باشد. فرم خطی شده پلاسمید pTZ57R/T، در شکل ۲-۱ نشان داده شده است. این وکتور به طول ۲۸۸۶ bp به صورت خطی است و در آن جایگاه *lacZ* طراحی شده است که با استفاده از این خصوصیت می‌توان نسبت به غربال‌گری کلنی‌های سفید و آبی اقدام نمود. با توجه به غلظت وکتور و غلظت محصول تخلیص PCR، واکنش الحاق شامل ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T به حجم ۱ μl، ۱ μl بافر الحاق (5×)، ۳ میکرولیتر محصول PCR تخلیص شده، (۳۰ng/ul) ۰/۷ میکرولیتر از T₄ DNA Ligase (5 Weiss units/μ) را با آب دیونیزه به حجم ۱۰ میکرولیتر رساندیم، ورتکس کوچکی انجام گرفت و مخلوط Ligation در دمای °C ۱۶ به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد.



M13pUC sequencing primer (-20), 17-mer (#S0100) 615 EcoRI Ecl136II SaclI Acc65I KpnI Bsp68I Mva1269I Mph1103I XbaI Eco32I

5' G TAA AAC GAC GGC CAG TGA ATT CGA GCT CCG TAC CTC GCG AAT GCA TCT AGA TAT C
 3' C ATT TTG CTG CCG GTC ACT TAA GCT CGA GCC ATG GAG CGC TTA CGT AGA TCT ATA G
 LacZ ← Val Val Ala Leu Ser Asn Ser Ser Pro Val Glu Arg Ile Cys Arg Ser Ile

BamHI Cfr9I Eco88I SmaI ApaI Bsp120I HincII SaI XmiI AflI PaeI Eco147I PaeI HindIII 695

GG ATC CCG GGC CCG TCG ACT GCA GAG GCC TGC ATG CAA GCT Tr
 CC TAG GGC CCG GGC AGC TGA CGT CTC CGG ACG TAC GTT CGA AA
 Pro Asp Arg Ala Arg Arg Ser Cys Leu Gly Ala His Leu Ser Glu

C CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGA GCT TGG CGT AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG 3'
 G GGA TAT CAC TCA GCA TAA TCT CGA ACC GCA TTA GTA CCA GTA TCG ACA AAG GAC 5'

*T7 transcription start T7 promoter M13pUC reverse sequencing primer (-20), 17-mer (#S0101)
 Arg Tyr His Thr Thr Asn Ser Ser Pro Thr Ile Met Thr Met

شکل ۲-۱. پلاسمید pTZ57R/T الف. نقشه خطی پلاسمید pTZ57R/T. به منظور ایجاد آن، پلاسمید pTZ57R با آنزیم Eco32 I با انتهای صاف برش داده شده است و به دو انتهای ۳ آن ddT اضافه شده است. ب ناحیه تجمع جایگاههای کلونینگ در پلاسمید pTZ57R/T جایگاه چندگانه کلونینگ این حامل دارای ۶ جایگاه برش با انتهای چسبنده ۳ می باشد (www.fermentas.com).

۲-۴-۵ مستعد کردن باکتری *E. coli* به روش استفاده از محلول CaCl_2

باکتری مستعد، باکتری است که توانایی ترانسفورم شدن با یک قطعه DNA خارجی را داشته باشد. برخی باکتری‌ها در مرحله رشد لگاریتمی و فاز ثابت، به طور خود به خود مستعد دریافت ژن می‌شوند اما باکتری *E. coli* طی مراحل زیر به طور مصنوعی مبدل به سلولی مستعد دریافت DNA می‌گردد. ابتدا یک لوپ از هریک از دو سویه‌ی DH5 α و BL21 از باکتری *E. coli* که در 70°C بود، هر کدام در ۵ ml محیط LB کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور 37°C شیک شد تا رشد نماید. از این محیط کشت ۱ ml به ۱۰۰ ml محیط کشت جدید LB در داخل ارلن تلقیح شد (رقت ۱ : ۱۰۰) و در شیکرانکوباتور تا رسیدن جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به 0.3 الی 0.5 در دمای 37°C با سرعت شیک ۱۸۰ rpm انکوبه شد. محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد.

۱۰۰ میلی‌لیتر LB حاوی باکتری *E. coli* در ۲ عدد فالكون ۵۰ ml خنک تقسیم شدند و هر یک از فالكون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C و با سرعت ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیدند تا باکتری‌ها رسوب کنند. محلول رویی دور ریخته شد و سپس رسوب‌های داخل هر فالكون که بر روی یخ قرار داشت به آرامی در ۲۵ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۱۰۰ mM سرد حل گردید (به ازای هر ۲۵ ml، ۱۲/۵ کلرید کلسیم ۰/۱ مولار اضافه شد) و به آرامی مخلوط شدند تا تشکیل سوسپانسیون دهند. پس از آن فالكون به مدت ۴۵ دقیقه درون یخ قرار داده شد. در پایان ۴۵ دقیقه، در دمای 4°C با سرعت ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی سانتریفیوژ دور ریخته شد، رسوب حاصل در ۱ ml از محلول حاوی CaCl_2 (100 mM) + 15% Glycerol حل شد و در میکروتیوب‌ها تقسیم گردید؛ به‌طوری‌که در هر میکروتیوب حدود ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ریخته شد و در دمای 70°C جهت مرحله ترانسفورماسیون نگه‌داری شد.

۲-۴-۶ ترانسفورم کردن محصول الحاق درون باکتری مستعد با استفاده از روش شوک حرارتی

در این مرحله ناقل pTZ57R/T نو ترکیب حاوی ژن پکتات لیاز، به میزبان مستعد *E. coli* (DH5 α) ترانسفورم گردید. به باکتری‌های مستعد در میکروتیوب، مقدار ۱۰ میکرولیتر محصول الحاق بر روی یخ اضافه شد. میکروتیوب به مدت ۳۰ دقیقه درون یخ قرار داده شد. پس از گذشت این زمان، به منظور ایجاد یک شوک حرارتی، میکروتیوب ۹۰ ثانیه در دمای 42°C قرار داده شد. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه درون یخ قرار داده شد. مقدار ۷۰۰ میکرولیتر از محیط کشت LB بدون آنتی بیوتیک به میکروتیوب اضافه شد و به مدت یک ساعت در 37°C انکوبه گردید. محتوای میکروتیوب به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت 7000 rpm سانتریفیوژ شد و حدود ۶۰۰ میکرولیتر از سوپ رویی برداشته شد، طوری که ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت به همراه رسوب باکتریایی باقی ماند. رسوب باکتری باقی مانده به اضافه مایع رویی به خوبی مخلوط شد و بر روی سطح LB آگار واجد آنتی بیوتیک آمپی سیلین، پخش گردید. در نهایت پلیت در دمای 37°C به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. بعد از این مدت اگر انتقال پلاسمید نو ترکیب به درون باکتری با موفقیت انجام شده باشد، کلونی‌های مقاوم به آنتی بیوتیک آمپی سیلین روی پلیت دیده می‌شوند.

انتخاب کلنی‌های حاوی پلاسمید pTZ57R/T نو ترکیب براساس تشکیل کلنی‌های آبی و سفید صورت گرفت. جهت تفکیک بهتر کلنی‌های سفید و آبی از یکدیگر پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای 37°C قرار گرفت. کلنی‌های آبی رنگ فاقد پلاسمید نو ترکیب هستند؛ زیرا آنزیم β - گالاکتوزیداز (*lac Z*) تولیدی آنها X-gal را به محصول رنگی هیدرولیز می‌کند. کلنی‌های سفید حاوی پلاسمیدهای نو ترکیب هستند، زیرا با ورود قطعه DNA هدف به جایگاه کلونینگ، توالی کد کننده آنزیم β - گالاکتوزیداز (*lac Z*) مختل شده و باکتری دیگر قادر به تجزیه X-gal نخواهد بود. IPTG (ایزوپروپیل β -D-تیو گالاکتوپیرانوزید، 0.1 M ، 0.2% W/V) به میزان ۳۰ میکرولیتر به ازای هر پلیت و به عنوان القا گر بیان ژن *lac Z* به محیطها اضافه شد و X-Gal (۵- برومو-۴- کلرو-۳- ایندولیل گالاکتو

پیرانوزید، (W/V) ۰.۲٪) به میزان ۳۰ میکرولیتر به ازای هر پلیت و به عنوان سوسترای رنگزا به محیط‌های کشت اضافه شد.

۲-۴-۷ تأیید کلنی‌های نوترکیب صحیح

در این مرحله از روش‌های زیر برای غربالگری کلنی‌هایی که حاوی قطعه DNA هدف صحیح بودند استفاده شد

الف - آزمایش اختلاف حرکت بر روی ژل آگارز

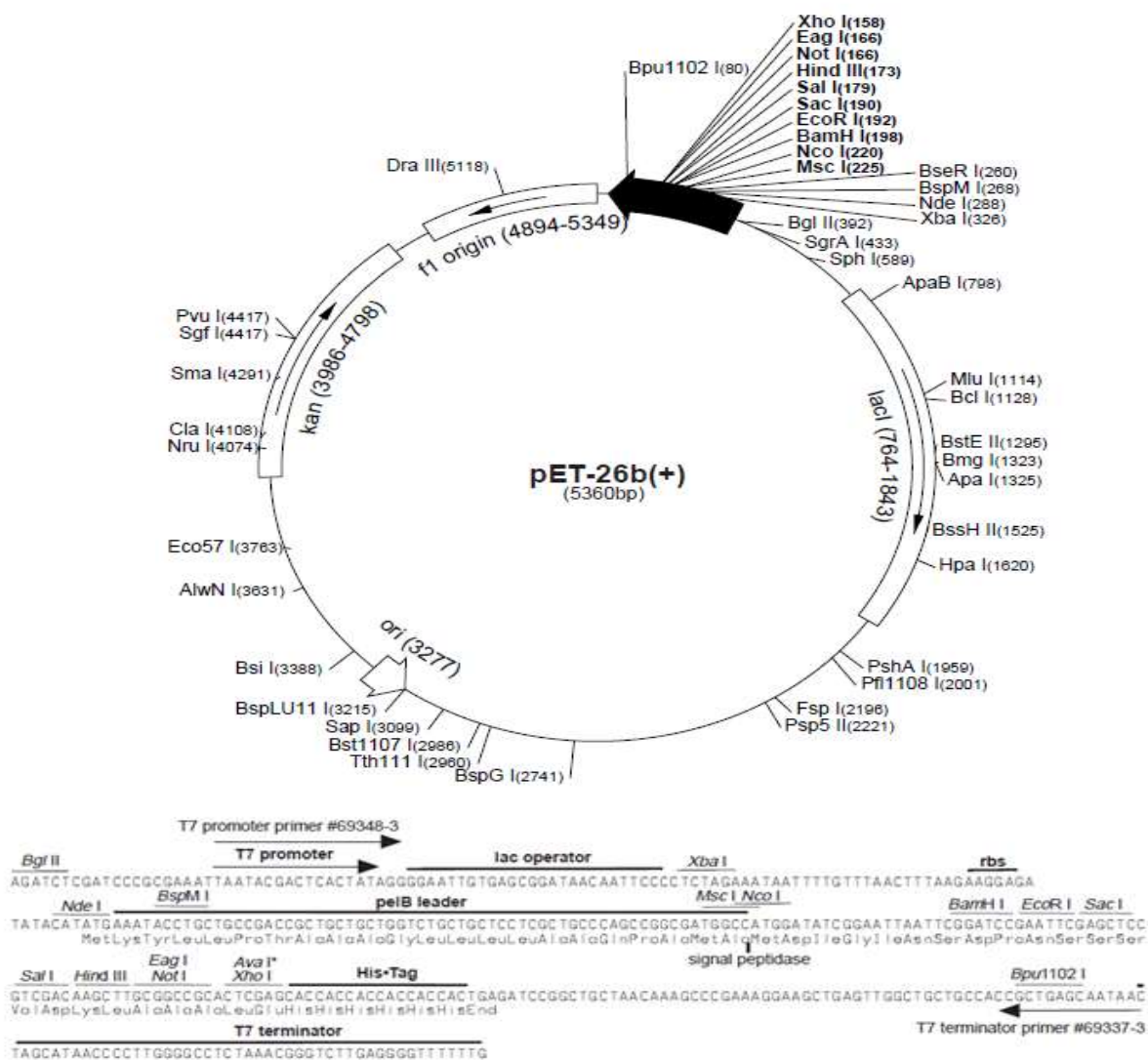
استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی بر روی همسانه‌های مثبت مرحله قبل انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از هر یک از پلاسمیدهای استخراجی به همراه ۲ میکرولیتر از پلاسمید غیر نوترکیب به عنوان کنترل منفی بر روی ژل آگارز (w/v) ۰.۱٪ الکتروفورز گردید. از آنجا که پلاسمید نوترکیب سنگین‌تر از پلاسمید غیر نوترکیب می‌باشد، بنابراین در صورت کلون شدن، قطعه مورد نظر بالاتر از پلاسمید غیر نوترکیب ایستاد و هم‌ردیف با پلاسمید غیرنوترکیب قرار نمی‌گیرد.

ب - روش هضم آنزیمی

برای این منظور پلاسمید pTZ57R/T پس از استخراج از همسانه‌های مثبت، طبق واکنش زیر مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. برای هضم هم‌زمان توسط دو آنزیم و خارج شدن ژن کلن شده، ۶ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب، ۲ میکرولیتر بافر تانگو $10\times$ ، ۰.۵ میکرولیتر آنزیم *NcoI*، ۰.۵ μl آنزیم *XhoI*، را با اضافه نمودن آب دیونیزه به حجم ۱۰ میکرولیتر رساندیم و سپس به مدت ۳ ساعت در دمای 37°C که دمای مناسب جهت فعالیت آنزیم است، انکوبه شد. سپس محصول هضم آنزیمی به همراه ۲ میکرولیتر از پلاسمید غیر هضم شده بر روی ژل آگارز (w/v) ۰.۱٪ الکتروفورز گردید. به منظور کلن قطعه در وکتور بیانی، قطعه ی کلون شده در TA-vector هضم شد و بعد از ریکاوری از روی ژل آگارز تخلیص آن توسط کیت High Pure PCR مطابق توصیه شرکت سازنده صورت گرفت.

۲-۴-۸ هضم ناقل pET26b و الحاق ژن در وکتور بیانی

ناقل pET26b (شکل ۲-۲) با ترانسفورم شدن در باکتری مستعد *E. coli* تکثیر شد. تخلیص پلاسمید توسط کیت استخراج پلاسمید، جهت هضم آنزیمی انجام شد. مخلوط واکنش هضم در ۳ واکنش ۲۰ تایی درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل آماده شد. پلاسمید pET26b به حجم ۱۲ میکرولیتر، ۴ میکرولیتر بافر تانگو×10، ۱ میکرولیتر آنزیم *NcoI*، ۱ μl آنزیم *XhoI*، را با اضافه نمودن آب دیونیزه به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید و سپس در دمای 37°C به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. چون آنزیم های *XhoI* و *NcoI* در بافر تانگو $\times 10$ ، واکنش هضم مشترک دارند، لذا برای انجام واکنش های هضم، از هر دو آنزیم به صورت هم‌زمان در مخلوط واکنش استفاده شد. پلاسمیدهای هضم شده pET26b بر روی ژل آگارز (w/v) ۱٪ برده شد و پس از بریدن باند هدف با استفاده از High Pure PCR Product Purification Kit خالص گردید و در حجم ۳۰ میکرولیتر جمع آوری شد. محصولات PCR و حامل pET26b هضم شده بدست آمده با استفاده از دستگاه Speed vacuum در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر تغلیظ شدند. بعد از ریکاوری و تخلیص ژن و وکتور بیانی، ۵ میکرولیتر از نمونه‌ها بر روی ژل آگارز (w/v) ۱٪ برده شد. همچنین غلظت آنها با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد. با توجه به غلظت ژن و ناقل واکنش الحاق با رعایت نسبت ۱ به ۳ وکتور به insert، ناقل هضم و تخلیص شده pET26b به حجم ۴ میکرولیتر و ۱۲/۵ میکرولیتر محصول PCR که هضم و تخلیص شده بود، در حجم ۲۰ میکرولیتر گذاشته شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۱۶ انکوبه گردید.



pET-26b(+) cloning/expression region

شکل ۲-۲ نقشه پلاسمید pET26b، الف ساختمان حلقوی پلاسمید pET-26b، ب نقشه‌ی خطی ناحیه‌ی تجمع جایگاه‌های کلونینگ در پلاسمید pET-26b. پلاسمید pET-26b(+) دارای ۵۳۶۰ bp طول می‌باشد. این وکتور، برای بیان پروتئین‌های دارای توالی هیستیدینی در انتهای کربوکسیل، مورد استفاده قرار می‌گیرد و دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین است. این وکتور همچنین دارای یک توالی سیگنالی pelB در بخش آمینی است که در ترشح پروتئین به فضای پری‌پلاسمی نقش دارد (www.Novagen.com).

۹-۴-۲ ترانسفورماسیون در میزبان بیانی

به منظور تولید پروتئین نو ترکیب باید وکتور بیانی به میزبان بیانی منتقل شود. در این تحقیق از میزبان بیانی BL21(DE3) استفاده شد. در سویه BL21(DE3) پروموتور IacUV5 در حضور IPTG القاء شده، رونویسی از ژن رمز دهنده T7 RNA polymerase را پیش می‌برد. این میزبان به دلیل مهار اکثر پروتئین‌های مهم در آن، بسیار مورد توجه است. واکنش ترانسفورماسیون همانند مرحله ی قبل با استفاده از شوک حرارتی به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. بعد از ۱۶ ساعت انکوباسیون و مشاهده ی کلنی‌ها، جهت انتخاب کلنی نو ترکیب، بعد از استخراج پلاسمید، PCR از نمونه‌ها و هضم آنزیمی با مکان های برشی مهندسی شده توسط پرایمرها صورت گرفت.

۲-۵ فرآیند بیان ژن پکتات لیاژ

یک کلونی از کلونی‌های مثبت در ۵ میلی‌لیتر محیط LB دارای کانامایسین تلقیح و به مدت ۱۶ ساعت در 37°C انکوبه شد. حجم ۱ میلی‌لیتر از این محیط کشت به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت جدید LB دارای کانامایسین در داخل ارلن تلقیح شد و در شیکرانکوباتور تا رسیدن جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ nm به ۰/۴ الی ۰/۸ در دمای 37°C با سرعت شیک ۱۸۰ rpm انکوبه شد. پس از رسیدن به $\text{OD}_{600} = 0.5$ ، قبل از القاء توسط IPTG، ۲ میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌ها، به‌عنوان کنترل منفی برداشته شد و در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصل در دمای 20°C قرار گرفت. پس از آن مقدار ۴۷ میکرولیتر از IPTG (۱M) به هر یک از ارلن‌های ۵۰ ml حاوی LB اضافه گردید، به‌طوری‌که غلظت نهایی IPTG به غلظت مناسب برای بیان، (۱ mM)، برسد. بعد از اضافه کردن IPTG، ارلن‌ها را در دمای 25°C و با شیک ۱۵۰ rpm گذاشتیم و پس از ۱ ساعت، ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ها را برداشته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در $6000 \times g$ سانتریفیوژ گردید تا رسوب بدست آید. این عمل پس از ۳ ساعت و همچنین پس از ۶ ساعت تکرار شد. رسوب ها را جهت انجام مراحل بعدی در دمای 20°C قرار داده شد.

۲-۶ تهیه ژل SDS-PAGE جهت تأیید بیان

جهت آماده کردن قالب مخصوص ژل، ابتدا شیشه‌های مربوط به آن با الکل (v/v) ۷۰٪ و دستمال کاغذی کاملاً تمیز شد. پس از خشک شدن شیشه‌ها، spacerها بین دو شیشه قرار گرفت و دو شیشه به کمک چند گیره کاملاً بهم متصل شدند. همچنین در هنگام ریختن ژل، جهت بستن فاصله‌ی بین دو شیشه (seal) که از ریختن ژل به بیرون جلوگیری می‌کند، از آگارز (w/v) ۱٪ استفاده شد. سپس برای اطمینان از seal شدن، مقداری آب مقطر در فضای بین دو قاب ریخته شد و در زیر قاب‌ها نیز دستمال کاغذی خشک گذاشته شد تا خیس شدن دستمال و seal نبودن مشخص گردد. پس از اطمینان از این موضوع، ابتدا Resolving Gel (۴/۵ ml) Resolving buffer شامل Tris-base (M) (۱/۵) و SDS (w/v) ۰/۴٪، ۵/۸۵ ml محلول Stock (w/v) ۳۰٪، آکریل آمید و (w/v) ۱/۳٪ بیس آکریل آمید، ۵۰ μl از محلول (w/v) ۱۰٪ TEMED و ml ۷/۶۵ آب دیونیزه) را ریخته شد و سپس با استفاده از سمپلر، آب مقطر افزوده گردید تا از ورود هوا به درون ژل جلوگیری شود و همچنین سطح ژل کاملاً صاف گردد. ظرف مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه ژل بسته شد و از طریق وارونه کردن قاب، آب دور ریخته شد.

Stacking Gel (۱/۲۵ ml) Stacking buffer شامل Tris-base (M) (۰/۵) و SDS (w/v) ۰/۴٪، ml ۰/۸ محلول Stock (w/v) ۳۰٪، آکریل آمید و (w/v) ۱/۳٪ بیس آکریل آمید، ۵۰ μl از محلول (w/v) ۱۰٪ APS، ۷۵ μl از محلول w/v ۱۰٪ TEMED و ml ۲/۹ آب دیونیزه) ریخته شد و بلافاصله شانه در آن قرار داده شد. در هنگام بیرون کشیدن شانه از ژل، این عمل را به آرامی انجام شد تا حباب تشکیل نشود. در این تحقیق، Resolving Gel (۱۰٪) با توجه به اندازه پروتئین نو ترکیب، تهیه شد و Stacking Gel (۵٪) تهیه شد. در هنگام تهیه Stacking Gel و Resolving Gel، TEMED (تترا متیل اتیلن دی آمید) آخر از همه و قبل از آن APS (آمونوم پر سولفات) اضافه شد.

قبل از الکتروفورز نمونه‌ها، به منظور واسرشت سازی پروتئین موجود، رسوب‌های پروتئینی هر کدام در ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمونه (Sample buffer) حاوی ۵ ml گلیسرول، ۱ گرم SDS، ۰/۵ ml برومو فنل

بلو، ۱ ml ۲- مرکاپتواتانول، ۱۰ ml بافر ژل بالا، با آب مقطر به حجم ۲۰۰ ml رسانده شد) مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. سانتریفیوژ نمونه ها به مدت ۱ دقیقه با شتاب $12000 \times g$ صورت گرفت. الکتروفورز ژل در بافر تانک (Tris-base) (۰/۰۲۴ M)، SDS ۰/۱ w/v و Glycine (۰/۱۹ M) با ولتاژ ۱۰۰ ولت، به مدت تقریبی ۲/۵ ساعت انجام گرفت. بعد از ۲/۵ ساعت جریان قطع شد و با زدن آب مقطر بین دو شیشه و جدا کردن شیشه‌ها، ژل به آرامی خارج گردید و درون ظرف رنگ آمیزی قرار داده شد. ژل توسط محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو (Comassie Blue ۰/۱ w/v) R-250، ۵۰٪ (v/v) متانول، ۱۰٪ (v/v) اسید استیک و ۴۰٪ (v/v) آب مقطر) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شد و در نهایت توسط محلول رنگ بر (۴۰٪ (v/v) متانول، ۱۰٪ (v/v) اسید استیک و ۵۰٪ (v/v) آب مقطر)، رنگ زدایی شد. بعد از رنگ بری کامل ژل، باندهای پروتئینی ظاهر شدند.

۲-۷ لیز باکتری‌ها با دستگاه اولتراسونیک (Sonifier)

جهت دستیابی به آنزیم پکتات لیاز، دیواره سلولی باید شکسته شود. در اینجا برای شکستن دیواره باکتری از دستگاه اولتراسونیک استفاده شد. در این روش برای استخراج پروتئین نوترکیب ابتدا رسوب حاصل از هر ۵۰ میلی لیتر سلول‌های جمع‌آوری شده، با ۵ میلی لیتر بافر لیز کننده (۴ mM NaH_2PO_4) (۵۰)، کلرید سدیم (۳۰۰ mM)، ایمیدازول (۱۰ mM) و ۰/۰۵٪ Tween 20) مخلوط شد و ۴۵ دقیقه درون یخ قرار داده شد، سپس از طریق سونیکاسیون با قدرت ۱۰۰ درصد و ۰/۹ پالس در هفت چرخه زمانی (هر کدام شامل ۱ دقیقه سونیکاسیون و ۱/۳۰ دقیقه استراحت درون یخ) با استفاده از نیروی امواج مافوق صوت شکسته شدند. محلول بدست آمده بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C و با سرعت ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و محلول (روی) شفاف بدست آمده، در مراحل بعدی برای تخلیص پروتئین نوترکیب مورد نظر استفاده گردید.

۲-۸ مراحل تخلیص پروتئین نوترکیب تحت شرایط طبیعی

ستون کروماتوگرافی نیکل- سفارز با هدف تسهیل خالص سازی پروتئین های نوترکیب دارای دنباله پلی هیستیدینی به روش میل ترکیبی طراحی شده است. رزین مورد استفاده در این ستون کروماتوگرافی (Ni-NTA Resin)، بر روی سطح خود یون های فلزی نیکل را حمل می کند. پروتئین های نوترکیب دارای دنباله پلی هیستیدینی در هنگام عبور از این ستون از ناحیه دنباله خود به یون های نیکل متصل می شوند و با شسته شدن پروتئین های میزبان از ستون کروماتوگرافی، امکان جداسازی و جمع آوری پروتئین نوترکیب با بهره مندی از شیب بالارونده ایمیدازول در بافرهای مراحل مختلف فراهم می آید. تمام مراحل تخلیص در اتاق مخصوص دارای دمای 4°C صورت گرفت. ابتدا ستون کروماتوگرافی نیکل به حجم ۱ میلی لیتر آماده شد، دو

بار با آب مقطر (به حجم کل ستون) شستشو داده شد و برای به تعادل رساندن ستون از بافر اتصال NaH_2PO_4 (۵۰ mM)، کلرید سدیم (۳۰۰ mM)، ایمیدازول (۱۰ mM)، Tween 20 ۰.۰۱٪، $\text{pH} = 8$ استفاده شد و ستون ۳ بار در حجم ۵ میلی لیتر (۵ برابر حجم ستون) شستشو داده شد. بعد از خروج بافر اول از ستون، محلول شفاف حاصل از مرحله قبل (سوپ پروتئینی) به ستون تزریق شد و ۳ بار از ستون رد شد و محلول خروجی آن (flow) در یک ظرف جمع آوری شد. تکرار تزریق و افزایش زمان در این مرحله باعث برقراری اتصال بهتر پروتئین های نوترکیب به ستون می شود. پروتئین های میزبان با تزریق ۳ میلی لیتر بافر شستشو NaH_2PO_4 (۵۰ mM)، کلرید سدیم (۳۰۰ mM)، ایمیدازول (۲۰ mM) و Tween 20 ۰.۰۱٪، $\text{pH} = 8$ به ستون از رزین شسته شد و محلول خروجی آن در یک ظرف مجزا جمع آوری شد (wash 1). این مرحله دوبار دیگر تکرار شد و محلول های خروجی، W_2 و W_3 نامیده شد. با رسیدن سطح بالایی بافر قبلی به یک چهارم انتهایی ستون، بافر خارج کننده Elution Buffer NaH_2PO_4 (۵۰ mM)، کلرید سدیم (۳۰۰ mM)، ایمیدازول (۲۵۰ mM) و Tween 20 ۰.۰۱٪، $\text{pH} = 8$ در حجم ۵ میلی لیتر به ستون تزریق شد. پروتئین های نوترکیب در این مرحله در رقابت با غلظت بالای ایمیدازول از رزین ها جدا شدند و با جریان بافری به

خارج هدایت شدند و محلول خروجی در حجم ۵۰۰ میکرولیتر در ۱۰ میکروتیوب جمع‌آوری شد. در نهایت ستون با ۵ میلی‌لیتر از بافر اتصال شستشو داده شده و در الکل ۷۰٪ در دمای ۴ °C نگهداری شد. بعد از اتمام مراحل به ۲ میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌های جمع‌آوری شده از خروجی ستون، بافر نمونه با نسبت ۳ نمونه و ۱ بافرنمونه اضافه شد و پس از جوشاندن و سانتریفیوژ، بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد تا باند حاصل از خالص سازی مشاهده گردد. از نمونه خروجی مرحله آخر نیز جهت سنجش فعالیت آنزیمی استفاده گردید.

۲-۹ بررسی فعالیت آنزیم پکتات لیاز و فاکتورهای مؤثر بر آن

روش‌های سنجش فعالیت آنزیم پکتات لیاز

روش‌های سنجش برای آنزیم‌های پکتینولیتیک توسط کولمر و همکاران (۱۹۸۸) شرح داده شده است. فعالیت پکتات لیاز به صورت اسپکترومتریک با اندازه‌گیری افزایش میزان جذب در ۲۳۲ نانومتر از محصولات واکنش اشباع‌نشده Δ -۵ و ۴ سنجیده می‌شود. یک سنجش دیگر هم فرایند تیوباربیتوریک اسید (TBA) است که توسط واراودکار و ساسلو (۱۹۵۷) ابداع شد و توسط ویس‌بک و هوروتیز (۱۹۵۹) تغییر یافت. محصولات اشباع نشده تولیدی کمپلکسی با TBA تشکیل می‌دهند که جذب ماکسیمم آن در محدوده ۴۴۵-۵۵۰ نانومتر است.

در روش TBA، الیگوگالاکتورونات‌های غیر اشباع تولیدی توسط این آنزیم در حضور معرف تیوباربیتوریک اسید (TBA) مورد استفاده تشکیل رنگ صورتی می‌دهد (شکل ۲-۳). جهت سنجش فعالیت آنزیم پکتات لیاز از پلی گالاکتورونیک اسید به عنوان سوبسترا استفاده شد. پودر پلی گالاکتورونیک اسید (w/v) ۰/۵٪ به بافر Tris-HCl (50 mM) با pH = ۸ حاوی CaCl₂ اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه روی استیر با کمک مگنت و حرارت حل گردید. محلول آنزیمی به حجم ۱۰۰ میکرولیتر به ۵۰۰ میکرولیتر محلول (w/v) ۰/۵٪ پلی گالاکتورونیک اسید در بافر Tris-HCl (50 mM) (۵۰) با pH = ۸، اضافه شد و با اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر بافر به حجم ۱ میلی‌لیتر رسید. ویال به-

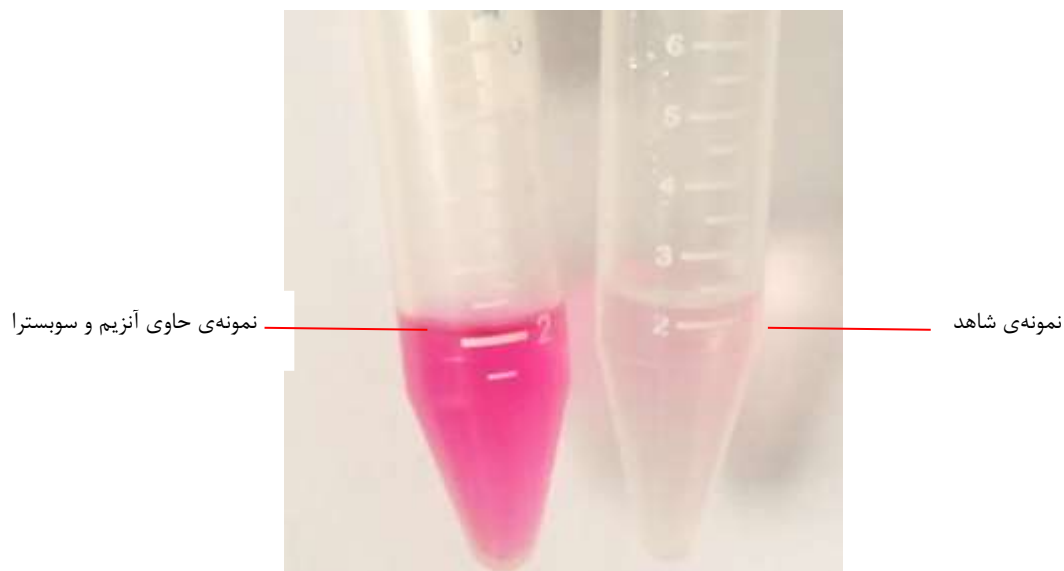
مدت ۱ ساعت در هات پلیت با دمای °C ۶۰ قرار داده شد. پس از این مدت واکنش با افزودن ۶۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم NaOH (۰/۵M) و ۶۰ میکرولیتر محلول زینک سولفات ZnSO₄ (۰/۹) متوقف گردید. ویال در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پس از آن مقدار ۵۶۰ μl از محلول شفاف رویی برداشته شد و به مخلوط تیوباربیتوریک اسید (۰/۰۴ M) و HCl افزوده شد. ویال به مدت ۳۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و پس از آن جذب مایع روئی در ۵۵۰ nm خوانده شد. از محلول حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl و ۵۰۰ میکرولیتر سوستر با عنوان شاهد استفاده شد (باسو و همکاران، ۲۰۰۸).

۲-۱۰ تعیین غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد

به منظور اندازه‌گیری غلظت پروتئین از روش غلظت سنجی بردفورد استفاده شد. مبنای این روش براساس پیوند کووالانسی رنگ کوماسی بلو (G-250) با پروتئین و تغییر مقدار جذب نوری از ۴۶۵ نانومتر به ۵۹۵ نانومتر طراحی شده است و سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر مقدار پروتئین ارزیابی می‌شود. در این روش برای پی بردن به غلظت نمونه‌ی مجهول نیازمند رسم یک منحنی استاندارد است. مواد مورد نیاز جهت غلظت سنجی عبارتند از معرف بردفورد که به منظور تهیه‌ی آن mg ۱۰۰ پودر کوماسی برلیانت بلو G250 در ۵۰ ml اتانول ۹۶٪ حل شد و پس از آن مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک (w/v) ۸۵٪ به آن اضافه شد. حجم محلول حاصل با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد و سپس با کاغذ صافی، صاف گردید. همچنین محلول استاندارد پروتئین با استفاده از ۱ mg/ml BSA تهیه شد. برای رسم منحنی استاندارد مطابق جدول عمل شد. محتویات لوله‌ها به خوبی مخلوط شد. پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ nm خوانده شد. شاهد مورد استفاده در مورد پروتئین‌های استاندارد، آب مقطر و در مورد پروتئین‌های مجهول، بافر می‌باشد.

۱۱-۲ تعیین پارامترهای کینتیکی V_{max} و K_m

به منظور محاسبه پارامترهای کینتیکی V_{max} و K_m ، سوبسترای پلی گالاکتورونیک اسید در غلظت‌های ۵-۱۰/۱ mg/ml تهیه شد و پس از آن میزان ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم به ۵۰۰ میکرولیتر از سوبسترای تهیه شده در غلظت‌های مختلف افزوده شد و سنجش فعالیت آنزیم با روش اندازه‌گیری جذب در ۲۳۵ نانومتر در شرایط بهینه به انجام رسید. در این شرایط سنجش فعالیت آنزیم بدون استفاده از معرف تیوباربیتورات و در نتیجه بدون مشاهده تغییر رنگ حاصل از فعالیت آنزیم انجام می‌شود.



شکل ۲-۳. روش TBA جهت سنجش فعالیت آنزیم پکتات لیاز. الیگوگالاکتورونات‌های غیر اشباع تولیدی توسط این آنزیم در حضور معرف تیوباریتوریک اسید (TBA) مورد استفاده تشکیل رنگ صورتی می‌دهد. جهت سنجش فعالیت آنزیم پکتات لیاز از پلی گالاکتورونیک اسید به عنوان سوبسترا استفاده شد. از محلول حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl و ۵۰۰ میکرولیتر سوبسترا به عنوان شاهد استفاده شد. و سنجش فعالیت آنزیم با روش اندازه گیری جذب در ۲۳۵ نانومتر در شرایط بهینه به انجام رسید. در این شرایط سنجش فعالیت آنزیم بدون استفاده از معرف تیوباریتورات و در نتیجه بدون مشاهده‌ی تغییر رنگ حاصل از فعالیت آنزیم انجام می‌شود.

۲-۱۲ تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم

۲-۱۲-۱ مطالعه اثر pH بر روی فعالیت آنزیم و بدست آوردن pH بهینه (pH profile)

به منظور بررسی عملکرد آنزیم در pH های مختلف و نیز تعیین pH یی که آنزیم در آن دارای بیشترین میزان فعالیت است، بافر میکسی با غلظت ۴۰ میلی مولار و شامل گلیسین، Tris- HCl، استات سدیم، کلسیم کلراید و فسفات تهیه شد. سوبسترای پلی گالاکتورونیک اسید با غلظت ۰/۵٪ در بافر میکس با کمک حرارت و ورتکس حل شد و پس از حل شدن کامل سوبسترا در بافر، pH محلول حاصل در گستره‌ی ۳ تا ۱۱ تنظیم گردید. سپس جهت بررسی عملکرد آنزیم در هریک از pH های فوق، آنزیم خالص که pH آن برابر با ۸ بود، به سه قسمت تقسیم گردید و ضمن افزودن مقادیر مشخصی از اسید و باز، سه pH ۴/۵، ۸ و ۱۰ حاصل آمد و هریک جهت انجام فرآیند سنجش در گستره‌ی خاصی از اسیدیته مورد استفاده قرار گرفت تا ضمن افزوده شدن آن به بافر حاوی سوبسترا تغییرات محسوسی در میزان pH مشاهده نگردد. سپس جهت سنجش فعالیت آنزیم میزان ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم به ۵۰۰ میکرولیتر سوبسترا در pH های مختلف افزوده شد و با افزودن ۴۰۰ میکرولیتر بافر تریس HCl به حجم ۱ میلی لیتر رسید. پیش از سنجش pH نهایی با کاغذ pH متر یکبار دیگر کنترل شد و سپس ویال‌ها برای مدت زمان ۷ دقیقه در هات پلیت با دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از این مدت واکنش با افزودن ۶۰ میکرولیتر سود ۰/۵ مولار و ۶۰ میکرولیتر ZnSO₄ ۹٪ متوقف شد و بلافاصله روی یخ قرار گرفت. در ادامه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ انجام شد و سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محلول شفاف رویی برداشته شد و پس از افزودن ۳۰۰ میکرولیتر معرف تیوبابیتوریک اسید ۰/۴ مولار و ۱۵۰ میکرولیتر HCl به آن، محلول فوق برای مدت زمان ۳۰ دقیقه جوشانده شد و سپس جذب هریک در طول موج ۵۵۰ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت.

۲-۱۲-۲ تأثیر دما روی فعالیت آنزیم (Temperature Profile) و بدست آوردن دمای اپتیمم جهت مشخص نمودن دمایی که آنزیم در آن دما حداکثر فعالیت را دارد، سوبسترای پلی گالاکتورونیک اسید در $\text{pH} = 7$ تهیه شد و پس از مخلوط کردن سوبسترا و آنزیم، سنجش فعالیت آنزیم در دماهای ۱۰ تا ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در مدت ۷ دقیقه به انجام رسید. مراحل متوقف نمودن واکنش و خوانش جذب مطابق دستورالعمل بالا به انجام رسید.

۳-۱۲-۲ بررسی پایداری آنزیم نسبت به pH (pH Stability)

به منظور مشخص نمودن میزان پایداری آنزیم نسبت به pH، ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم به ۸۰۰ میکرولیتر بافر میکس با غلظت ۵ میلی مولار افزوده شد و pH با افزودن اندکی اسید و باز در گستره‌ی ۳ تا ۱۲ تنظیم گردید. سوبسترا نیز در $\text{pH} 7$ تهیه گردید. محلول آنزیمی آماده‌سازی شده در هریک از pH ها برای مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و پس از آن با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم به ۵۰۰ میکرولیتر سوبسترا، سنجش فعالیت آنزیم در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به انجام رسید و پس از طی مراحل ذکر شده در بالا، جذب هریک از نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد.

۴-۱۲-۲ بررسی پایداری آنزیم نسبت به pH (pH Stability) در طول زمان

جهت بررسی پایداری آنزیم نسبت به pH، ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم به ۸۰۰ میکرولیتر بافر میکس که در سه pH منتخب ۵ و ۷ و ۹ تنظیم شده بود افزوده گردید و از زمان صفر در دمای اتاق انکوبه شد. هر سی دقیقه یکبار میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آنزیم مورد برداشت قرار گرفت و ضمن افزودن به ۵۰۰ میکرولیتر سوبسترای تهیه شده در pH بهینه، سنجش فعالیت آنزیم انجام گرفت. این کار تا پایان مدت زمان ۱۵۰ دقیقه، هر سی دقیقه یکبار تکرار شد و نتایج حاصل مورد بررسی قرار گرفت.

۵-۱۲-۲ بررسی پایداری آنزیم در دماهای مختلف (Temperature Stability)

به منظور بررسی پایداری آنزیم در دماهای مختلف، ۳۰۰ میکرولیتر آنزیم برای مدت زمان ۱۲۰ دقیقه در دماهای ۱۰ تا ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آنزیم‌های

انکوبه شده در هر دما به ۵۰۰ میکرولیتر سوبسترای تهیه شده در pH بهینه افزوده گردید و سنجش فعالیت آنزیمی در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به انجام رسید.

۲-۱۳ انجام تست پلیت جهت نشان دادن خوردگی سوبسترا توسط آنزیم

به منظور نشان دادن عملکرد آنزیم بر روی سوبسترای پلی‌گالاکتورونیک اسید از روش تست پلیت استفاده شد. در این روش ابتدا سوبسترا با غلظت ۱٪ تهیه گردید (۱۰۰ میلی‌گرم سوبسترا در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TrisHCl ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ و ۱ میلی‌مولار CaCl_2) و پس از آن با افزودن ۱ گرم پودر آگارز، مخلوط حاصل برای مدت زمان دو دقیقه حرارت داده شد تا محلول یکنواختی حاصل گردد. محلول سپس در چهار پلیت توزیع گردید و اجازه داده شد تا ضمن سرد شدن کاملاً منعقد گردد. پس از آن دیسک‌های سلولزی بر روی پلیت قرار گرفت و مقدار ۵ میکرولیتر از آنزیم خالص بر روی هر دیسک با استفاده از سمپلر قرار داده شد. پس از آن پلیت برای مدت زمان سه ساعت در آن با دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. به منظور مشخص شدن عملکرد آنزیم پس از گذشت این مدت زمان، پلیت با رنگ رتنیوم رد ۰/۵٪ (۵۰ میلی‌گرم پودر رتنیوم رد در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب) رنگ‌آمیزی شد. رنگ رتنیوم رد عمدتاً به طور اختصاصی جهت رنگ‌آمیزی سوبستراهای پکتیکی و به ویژه پلی‌گالاکتورونیک اسید مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این آزمایش، پلیت دیسک‌گذاری شده که به مدت سه ساعت در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شده بود، توسط رتنیوم رد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد و پس از گذشت این مدت زمان با آب مقطر شست‌وشو داده شد. ترکیبات پکتیکی به نحوی تقریباً اختصاصی ضمن رنگ‌آمیزی با رنگ رتنیوم رد، رنگی مایل به بنفش به خود می‌گیرند اما در بخش‌هایی که دیسک‌های حاوی آنزیم بر روی آنها قرار گرفته است، هاله‌هایی شفاف تشکیل خواهد شد که بیانگر تجزیه‌ی سوبسترا توسط آنزیم در این نواحی است.

۲-۱۴ انجام سنجش زیستی جهت مشاهده‌ی فعالیت آنزیم

عملکرد آنزیم پکتات لیاز نوترکیب تولیدی، بر روی برگ گونه‌ای از گیاه توتون *Nicotiana benthamiana* مورد سنجش قرار گرفت. در این سنجش پس از خالص‌سازی آنزیم، غلظت سنجی آن به روش بردفورد انجام شد و آنزیم با غلظت ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر به برگ گیاه بنتامیانا با استفاده از روش تزریق، تلقیح شد تا پس از گذشت سه روز در صورت عمل آنزیم بر روی برگ علائم مشاهده گردد. در این سنجش از بافر استخراج (با غلظت ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار) که خالص‌سازی نهایی آنزیم بوسیله‌ی آن انجام شده بود، به عنوان شاهد استفاده شد.

در فصل بعد، نتایج مربوط به مطالعات بیوانفورماتیکی، کلونینگ، بیان و خالص‌سازی توالی ژن کد کننده‌ی آنزیم پکتات لیاز، با نام Coh01152 به طول ۱۲۰۰ bp ارائه شده است. پس از ارائه و بررسی نتایج حاصل از پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی مربوط به این توالی، این ژن ابتدا در ناقل کلونینگ pTZ57RT همسانه‌سازی شد. سپس در ناقل بیانی pET26b کلون و پس از ترانسفورم در میزبان بیانی BL21 (DE3) باند مربوط به بیان در محدوده‌ی ۴۱ kDa ~ مشاهده گردید. سپس در ادامه به بررسی نتایج حاصل از خالص‌سازی و سنجش فعالیت آنزیم پرداخته شده است.

فصل سوم

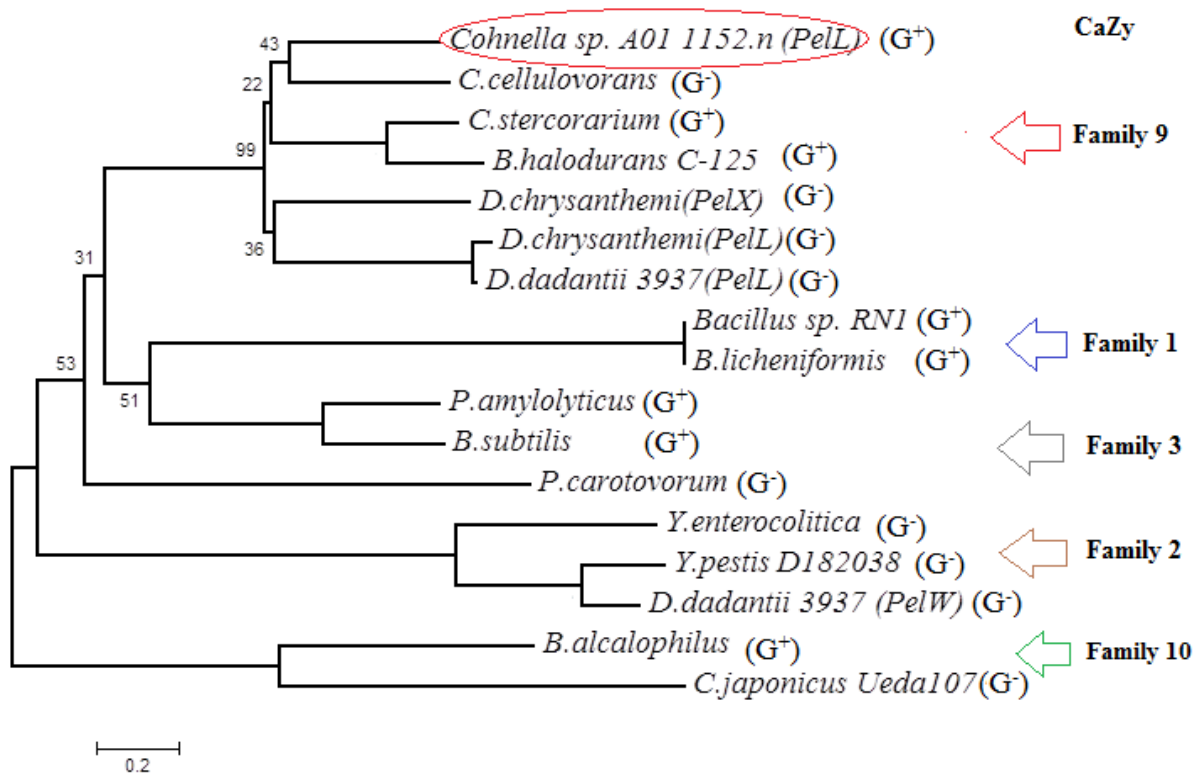
نتیج

در این فصل نتایج مربوط به مطالعات بیوانفورماتیکی، کلونینگ، بیان و خالص سازی توالی ژن کننده ی آنزیم پکتات لیاز باکتری *CohnellaA01* ، با نام Coh01152 به طول ۱۲۰۰ bp ارائه می-شود. پس از ارائه و بررسی نتایج حاصل از پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی مربوط به این توالی، این ژن ابتدا در ناقل کلونینگ pTZ57RT همسانه سازی شد. سپس در ناقل بیانی pET26b کلون و پس از انتقال به میزبان بیانی BL21 (DE3) باند مربوط به بیان در محدوده ی ۴۱ kDa ~ مشاهده گردید. در ادامه آنزیم پکتات‌لیاز با استفاده از ستون نیکل سفارز، خالص شد و سنجش فعالیت آنزیمی صورت گرفت. آزمون پلیت و سنجش زیستی بر روی گیاه نیز انجام شد.

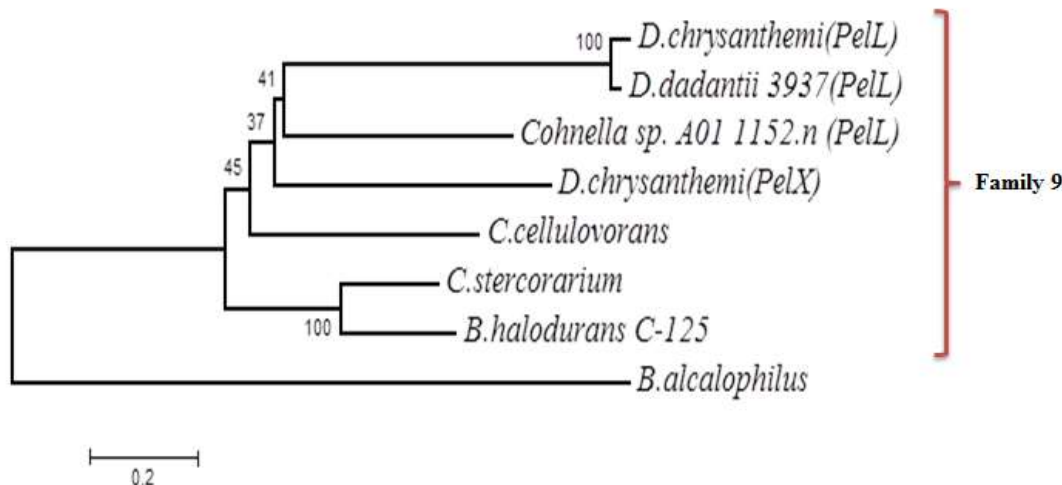
۳-۱ نتایج حاصل از مطالعات بیوانفورماتیکی

در این قسمت، نتایج حاصل از مطالعات بیوانفورماتیکی که به منظور یافتن توالی‌های آمینو اسیدی مشابه با آنزیم پکتات لیاز Coh01152 باکتری کوهنلا، پیش‌بینی وجود و یا عدم وجود پپتید نشانه و پیوند دی‌سولفیدی، پیش‌بینی ساختار دوم و نیز ساختار سه بعدی پروتئین و رسم درختچه فیلوژنتیکی انجام گرفت، آورده شده است. از پایگاه اینترنتی NCBI جهت پیدا کردن توالی‌های مشابه استفاده گردید. نتایج این بررسی نشان داد که پکتات لیاز باکتری *Cohnella laeviribosi* با ۹۹٪ تشابه، بیشترین شباهت را به توالی پکتات لیاز مورد مطالعه دارد (ضمیمه ۱). در خصوص پیش‌بینی ترشحاتی یا غیر ترشحاتی بودن پروتئین، خروجی برنامه SignalP نشان داد که پروتئین Coh01152 در توالی خود دارای سیگنال پپتید است (ضمیمه ۲). پیش‌بینی مسیر تولید پروتئین، که با استفاده از برنامه‌ی TargetP انجام شد، نشان داد که پروتئین Coh01152 به صورت ترشحاتی (S) است (ضمیمه ۳). به‌علاوه در خصوص پیش‌بینی وجود و یا عدم وجود پیوند دی‌سولفیدی، به دلیل عدم وجود آمینو اسید سیستئین در ساختار این پروتئین، هیچ پیوند دی‌سولفیدی در ساختار این پروتئین وجود ندارد. بررسی غشایی یا غیر غشایی بودن پروتئین انجام شد که در خروجی حاصل از برنامه TMHMM تعداد لنگرها در غشاء پروتئین برابر با صفر و حاکی از این بود که این پروتئین فاقد هرگونه دومین غشایی است (ضمیمه ۴). پیش‌بینی ساختار دوم آنزیم پکتات لیاز نیز که با استفاده از پایگاه

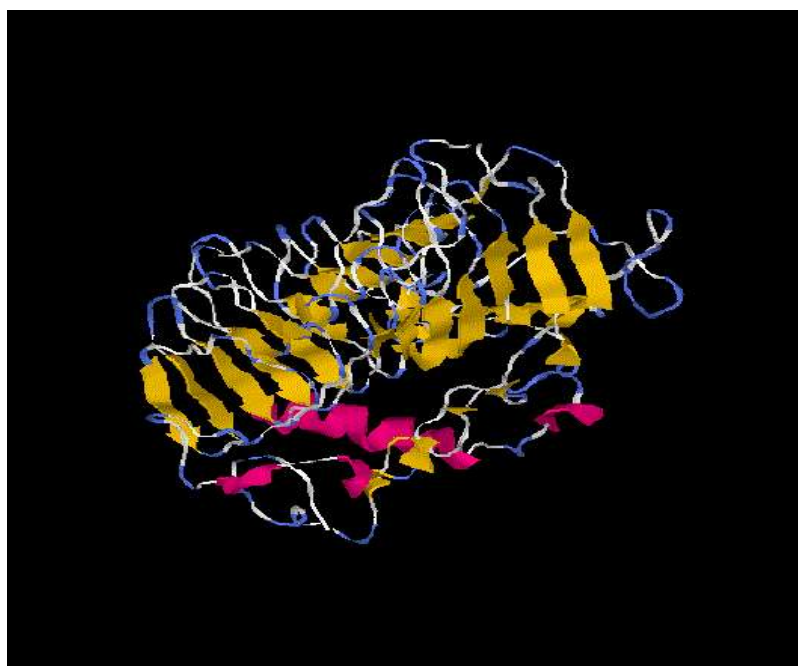
اینترنتی PSIPRED انجام شد نشان داد که آنزیم پکتات لیاز مورد مطالعه دارای ۴۰ درصد ساختار صفحه‌ی بتا، ۹ درصد آلفا هلیکس و ۵۱ درصد ساختار پیچ نامنظم می‌باشد (ضمیمه ۵). رسم درختچه فیلوژنتیکی نیز با استفاده از نرم افزار MEGA5 و انجام شد و بررسی نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های پروتئینی در میان خانواده‌های مختلف پکتات لیازها نشان داد که آنزیم پکتات لیاز باکتری کوهنلا با نام Coh01152.n متعلق به خانواده ۹ از پلی‌ساکارید لیازها است (شکل ۳-۱ و ۳-۲). مطالعات ساختار سه بعدی پروتئین پکتات لیاز که با استفاده از برنامه‌ی I-TASSER انجام شد نیز مدلی را برای این پروتئین ارائه نمود که بخش عمده آن شامل ساختارهای صفحات بتا و پیچ‌های تصادفی بود (شکل ۳-۳).



شکل ۳-۱. رسم درختچه فیلوژنتیکی به منظور مقایسه‌ی پکتات‌لیازهای باکتریایی خانواده‌های ۱، ۲، ۳، ۹ و ۱۰ پلی‌ساکارید لیازی با استفاده از نرم افزار MEGA5. براساس این درختچه، آنزیم PelL از باکتری *Cohnella sp. A01* در خانواده ۹ قرار می‌گیرد. از جمله اعضای دیگر این خانواده می‌توان به پکتات لیاز باکتری‌های *Bacillus* ، *Dickeya chrysanthemi* ، *Clostridium stercorarium* ، *Clostridium cellulovorans* ، *halodurans* C-125 ، *Dickeya dadantii* 3937 اشاره نمود. به‌علاوه خانواده‌ی ۱ و ۳ پلی‌ساکارید لیازها شامل پکتات لیازهای جنس *Bacillus sp.* می‌باشد. پکتات لیاز باکتری پاتوژن *Yersinia* نیز در خانواده ۲ قرار گرفت. خانواده ۱۰ شامل پکتات لیاز باکتری‌های *Cellvibrio* و *Caulobacter* بود.



شکل ۳-۲ رسم درختچه فیلوژنتیکی برای پکتات لیازهای خانواده ۹ پلی ساکارید لیاز با حضور یک نماینده پکتات لیازی از خانواده ۳ پلی ساکارید لیاز به عنوان out group با استفاده از نرم افزار MEGA5. براساس این درختچه، آنزیم PelL از باکتری *Cohnella* sp. A01 در خانواده ۹ قرار می گیرد. در رسم این درختچه، پکتات لیاز باکتری *Bacillus alcalophilus* به عنوان یک نماینده پکتات لیازی از خانواده ۳ (out group) آورده شد.



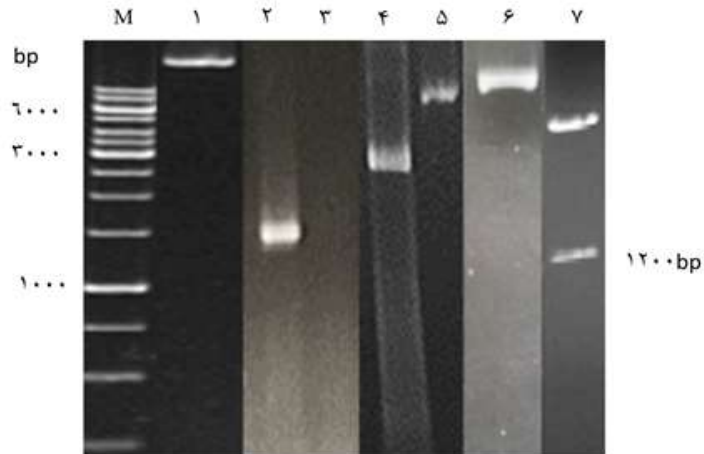
شکل ۳-۳. پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین پکتات لیاز باکتری *Cohnella* A01 با استفاده از برنامه‌ی I-TASSER. مدلی که برای این پروتئین ارائه شد مشتمل بر بخش‌های آلفا هلیکس، صفحات بتا و پیچ‌های تصادفی است که ساختارهای هلیکس به صورت مارپیچ صورتی رنگ و صفحات بتا به صورت فلش‌های زرد رنگ مشخص شده‌اند و بخش پیچ‌های تصادفی نیز به رنگ آبی مشخص شده‌اند. قرارگیری رشته بتا خمیدگی‌های متوالی در کنار هم موجب تشکیل سه صفحه بتا می‌شود. چرخش صفحات بتا به دور یک هلیکس بزرگ موجب تشکیل بخش سیلندرمانندی در آنزیم می‌شود (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>)

۲-۳ تکثیر و همسانه‌سازی ژن پکتات لیاز

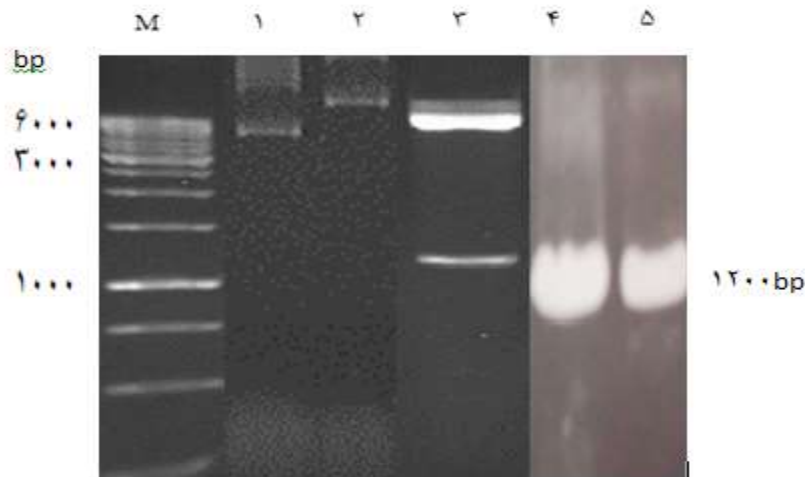
پس از تهیه کشت تازه از سویه ایزوله شده *Cohnella* A01، DNA ژنومی با استفاده از کیت تخلیص DNA استخراج شد. پس از تعیین کیفیت و کمیت، DNA برای تکثیر به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (بند ۲-۴ از فصل مواد و روش‌ها) و با استفاده از پرایمرهای FpeI و RpeI مورد استفاده قرار گرفت و باند اختصاصی معادل ۱۲۰۰ bp در روی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل ۳-۴-۲). واکنش الحاق بین ژن پکتات لیاز تخلیص شده و پلاسمید pTZ57R/T انجام گرفت. پلاسمید نو ترکیب به سلول‌های مستعد تهیه شده از باکتری *E. coli* (DH5 α) با استفاده از روش شوک حرارتی منتقل شد. کلنی‌های نو ترکیب سفید رنگ انتخاب و پس از تکثیر ناقل pTZ57R/T در باکتری *E. coli* (DH5 α) در محیط LB حاوی آمپی سیلین، استخراج پلاسمید با کیت استخراج پلاسمید انجام شد و از روش‌های آزمایش اختلاف حرکت بر روی ژل آگارز (شکل ۳-۴-۳ و ۳-۴-۵)، آزمایش هضم آنزیمی (شکل ۳-۴-۶ و ۳-۴-۷) به منظور تأیید مراحل همسانه سازی استفاده شد.

۲-۲-۳ الحاق ژن در وکتور بیانی pET26b و ترانسفورماسیون در میزبان BL21 (DE3)

پس از بررسی و اطمینان از کلن قطعه در وکتور کلونینگ، با آزمایش اختلاف حرکت بر روی ژل آگارز و نیز روش هضم آنزیمی، خروج قطعه با استفاده از آنزیم‌های *NcoI* و *XhoI* که جایگاه‌های برشی آنها در دو سمت پرایمرها طراحی شده بود، انجام شد. همسانه‌سازی مجدد قطعه ی خروجی در وکتور بیانی pET26b انتقال به باکتری *E. coli* (BL21) صورت گرفت. پس از گذشت ۱۶ ساعت از انکوباسیون پلیت از تعدادی از کلنی‌های ظاهر شده در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین پیش کشت تهیه شد. استخراج پلاسمید با استفاده از روش لیز قلیایی انجام شد. تایید کلنی‌های نو ترکیب با استفاده از بررسی اختلاف حرکت (شکل ۳-۵-۱ و ۳-۵-۲)، هضم آنزیمی با آنزیم‌های *NcoI* و *XhoI* (شکل ۳-۵-۳) و PCR با استفاده از پرایمرهای بالادست و پایین دست ژن (شکل ۳-۵-۴) انجام گرفت و نمونه DNA ژنومی باکتری کوهنلا نیز به عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR استفاده شد (شکل ۳-۵-۵).



شکل ۳-۴. مراحل استخراج DNA ژنومی، تکثیر ژن پکتات لیاز، همسانه سازی و کنترل فرآیند همسانه سازی. ۱- الکتروفورز DNA ژنومی. چاهک M- مارکر 1 Kb، چاهک ۱- نمونه DNA ژنومی باکتری *Cohnella sp. A01*، چاهک ۲- واکنش PCR برای تکثیر ژن کد کننده ی آنزیم پکتات لیاز باکتری *Cohnella sp. A01* با آغازگرهای RpeI و FpeI، چاهک ۳- کنترل منفی برای واکنش PCR بدون DNA ژنومی باکتری *Cohnella sp. A01*. ۲- آزمایش تعیین اختلاف حرکت بر روی ژل آگارز (w/v) ۱٪ به منظور کنترل فرآیند همسانه سازی ژن در مقایسه یا وکتور کلونینگ غیر نوترکیب. چاهک ۴- pTZ57R/T غیرنوترکیب به عنوان کنترل منفی، چاهک ۵- همسانه نوترکیب. ۳- واکنش هضم آنزیمی جهت تأیید همسانه سازی. چاهک ۶- همسانه نوترکیب هضم نشده به عنوان کنترل منفی، چاهک ۷- همسانه نوترکیب هضم شده با آنزیم های *NcoI* و *XhoI* و مشاهده قطعه ای به طول ۱۲۰۰ جفت بازی (طول ژن پکتات لیاز همسانه شده) و ۲۸۸۶ جفت بازی (طول پلاسمید pTZ57R/T)



شکل ۳-۵. بررسی الحاق ژن در وکتور بیانی pET26b و تأیید فرآیند کلونینگ بر روی ژل آگارز (w/v) ۱٪. ۱- بررسی اختلاف حرکت پلاسمید نوترکیب حاوی ژن پکتات لیاز بر روی ژل آگارز که پلاسمید نوترکیب به علت سنگین تر بودن نسبت به پلاسمید غیر نوترکیب، بالاتر می ایستد. چاهک M- مارکر 1 Kb، چاهک ۱- پلاسمید pET26b غیرنوترکیب ۵۳۶۰ جفت بازی به عنوان کنترل منفی، چاهک ۲- پلاسمید نوترکیب حاوی ژن پکتات لیاز. ۲- واکنش هضم آنزیمی. چاهک ۳- همسانه نوترکیب هضم شده با آنزیم های *NcoI* و *XhoI* و مشاهده قطعه ای به طول ۱۲۰۰ جفت باز (طول ژن پکتات لیاز) و ۵۳۶۰ جفت باز (طول پلاسمید pET26b). ۳- واکنش PCR. چاهک ۴- محصول واکنش PCR از پلاسمید نوترکیب حاصل از ترانسفورماسیون، با آغازگرهای ژن پکتات لیاز. چاهک ۵- قطعه تکثیر شده توسط PCR از DNA ژنومی باکتری به عنوان کنترل مثبت.

۳-۳ بیان ژن پکتات لیاز و خالص سازی آن

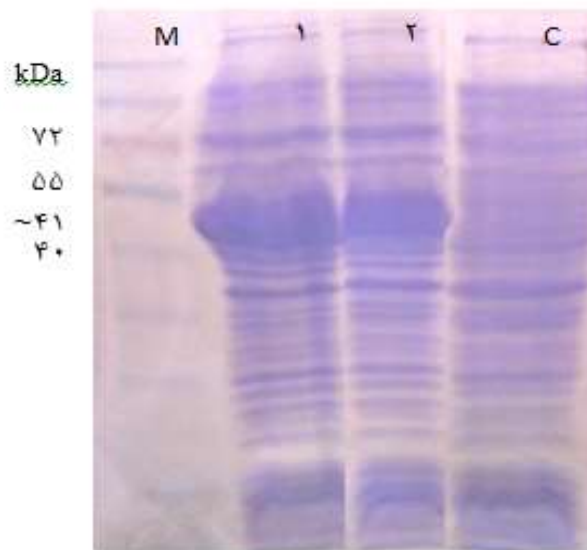
پس از رشد باکتری در محیط LB تازه و رسیدن به $OD_{600} = 0.5$ از ۱ میلی لیتر محیط به عنوان کنترل منفی (قبل از القاء IPTG) نمونه تهیه شد. القاء پروموتور برای بیان پروتئین نوترکیب با افزودن IPTG به غلظت نهایی ۱ mM انجام پذیرفت. کشت باکتری (۱ میلی لیتر) در زمان ۲ ساعت بعد از القاء جدا و رسوب داده شدند و برای آنالیز پروتئین به روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه باندهای پروتئینی حاصل از عصاره سلولی نمونه القاء شده و کنترل منفی، وجود یک باند اضافه را نشان داد. نتایج نشان داد که مطابق با آنچه که پیش بینی شده بود، پروتئینی با وزن تقریبی ۴۱ kDa تولید شده است (شکل ۳-۶). بیان کلنی نوترکیب در زمان های ۳ و ۶ ساعت بعد از القاء بررسی و نتایج نشان داد که بیان پروتئین پس از گذشت ۶ ساعت از القاء IPTG نسبت به میزان بیان پروتئین پس از گذشت ۳ ساعت از القاء افزایش بیشتری داشته است (شکل ۳-۵). در مرحله بعد پروتئین بیانی توسط ستون نیکل سفاروز خالص شد و تک باندی در محدوده ی ۴۱ kDa بیانگر خلوص نسبی پروتئین مورد نظر بود (شکل ۳-۷).

۴-۳ محاسبه پارامترهای V_{max} و K_m آنزیم

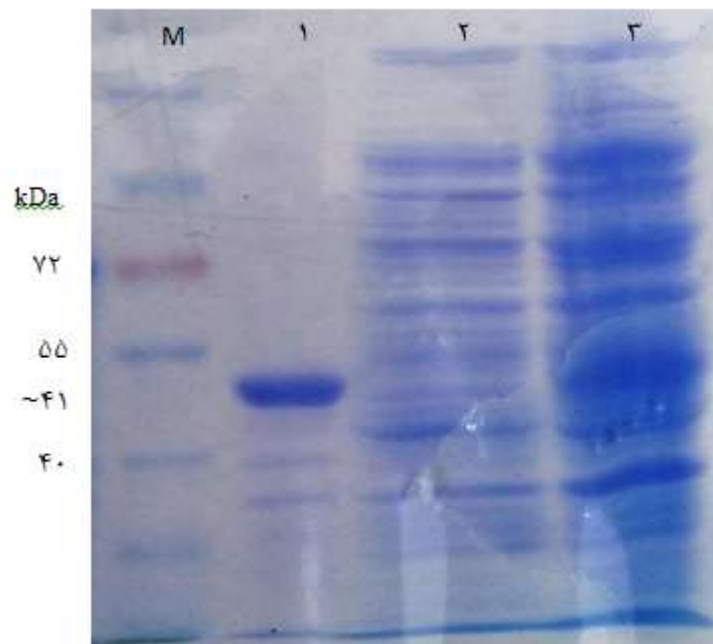
پلی گالاکتورونیک اسید به عنوان سوبسترا استفاده می شود، الگوی کینتیک این آنزیم از نوع Michaelis-Menten را در این آنزیم نشان داد (شکل ۳-۸). K_m محاسبه شده برای این آنزیم mg/ml 0.64 و V_{max} آن 1.51 Unit/ml بود.

۵-۳ تعیین غلظت پروتئین

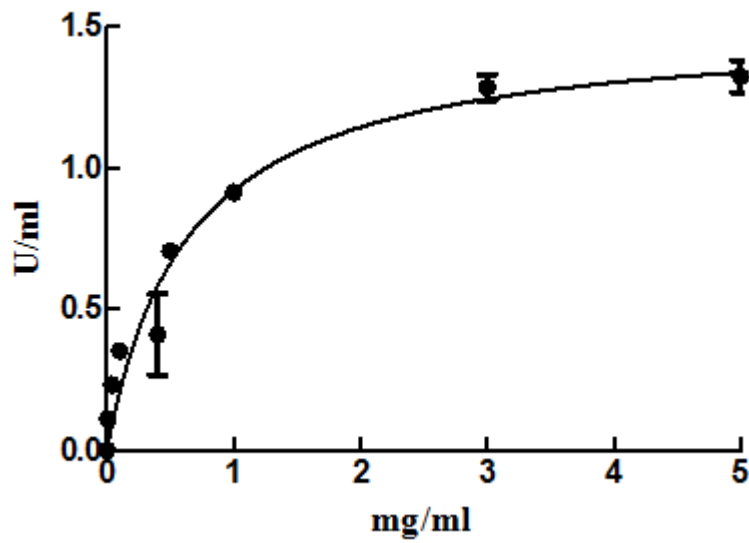
بر اساس روش بردفورد، غلظت پروتئین نوترکیب تولیدی پیش از خالص سازی و پس از آن مورد محاسبه قرار گرفت که میزان آن به ترتیب برابر با 0.7 میلی گرم بر میلی لیتر و 0.29 میلی گرم بر میلی لیتر بود (جدول ۳-۱). منحنی استاندارد غلظت پروتئین BSA بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر جهت محاسبه ی غلظت نمونه ی پروتئینی مجهول مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۳-۱).



شکل ۳-۶. بیان ژن پکتات لیاز از کلنی نو ترکیب در زمان های مختلف. چاهک M- مارکر پروتئینی ، چاهک ۱- بیان کلنی نو ترکیب شش ساعت پس از القاء ، چاهک ۲- بیان کلنی نو ترکیب سه ساعت بعد از القاء ، چاهک C- نمونه کنترل منفی قبل از القاء.



شکل ۳-۷. SDS-PAGE مراحل خالص سازی پروتئین نو ترکیب پکتات لیاز. چاهک M- مارکر پروتئینی ، چاهک ۱- محلول خروجی از ستون نیکل سفاروز که حاوی پروتئین نو ترکیب با وزن مولکولی ۴۱ kDa است ، چاهک ۲- محلول wash خروجی از ستون نیکل سفاروز که حاوی تمامی پروتئین ها به جز پروتئین نو ترکیب است که به واسطه ی دنباله ی هیستیدینی خود متصل به ستون باقی مانده است ، چاهک ۳- بیان در محلول رویی حاصل از سونیکاسیون رسوب که حاوی پروتئین نو ترکیب تولیدی به همراه سایر پروتئین های باکتری است.



شکل ۳-۸. نمودار میکائیلیس - منتن برای آنزیم پکتات لیاز *Coh01152n*. Km محاسبه شده برای این آنزیم 0.64 mg/ml و V_{\max} آن 1.51 U/ml بود

جدول ۱-۳. مراحل خالص سازی آنزیم پکتات لیاز

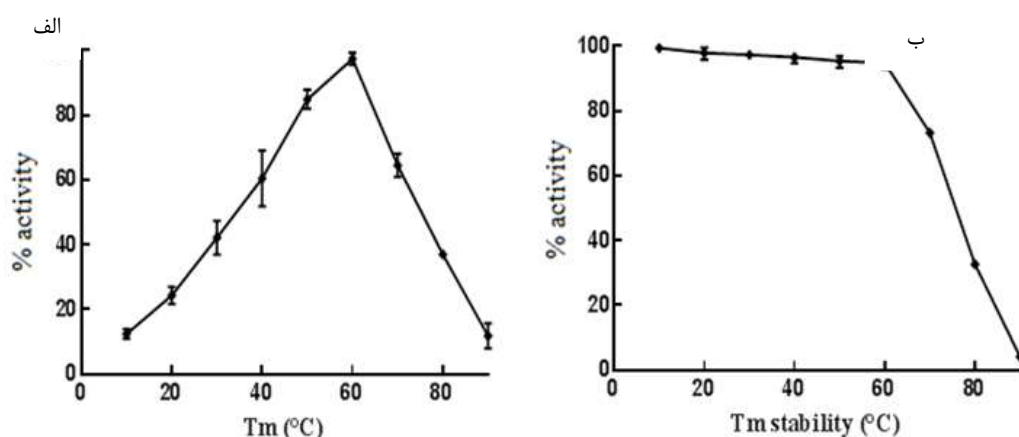
Steps	Unit activity ($\mu\text{mol/min}$)	Specific activity (U/mg)	Protein concentration (mg/ml)	Fold	Purification rate
pre-purification	۲/۴۲	۳/۴	۰/۷۱	۱	۱۰۰
after purification	۱/۳	۴/۴۸	۰/۲۹	۱/۳۱	۵۳/۷۱

۳-۶ تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم پکتات لیاز

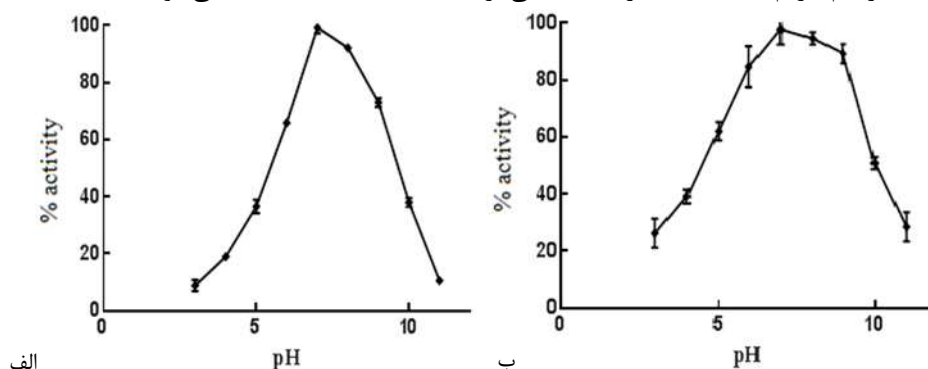
آنزیم پکتات لیاز در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (شکل ۳-۹ الف) و $\text{pH} = 7$ (شکل ۳-۱۰ الف) دارای بیشترین فعالیت است. همچنین این آنزیم در pH های ۶-۹ از پایداری برخوردار است (شکل ۳-۱۰ ب) و بیش از ۸۰ درصد از فعالیت آنزیم در pH های ۶-۹ به مدت ۹۰ دقیقه حفظ شد (شکل ۳-۱۰ ج). آنزیم تا دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد از پایداری بالایی برخوردار است و بیش از ۶۰ درصد از فعالیت آنزیم نیز تا دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه (شکل ۳-۹ ب) حفظ - شد.

۳-۷ آزمون خوردگی سوبسترا توسط آنزیم

رنگ رتنیوم رد عمدتاً به طور اختصاصی جهت رنگ آمیزی سوبستراهای پکتیکی و به ویژه پلی گالاتورونیک اسید مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این آزمایش، پلیت دیسک گذاری شده که به مدت سه ساعت در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شده بود، توسط رتنیوم رد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شد و پس از گذشت این مدت زمان با آب مقطر شست‌وشو داده شد. ترکیبات پکتیکی به نحوی تقریباً اختصاصی ضمن رنگ آمیزی با رنگ روتنیوم رد، رنگی مایل به بنفش به خود می‌گیرند اما در بخش‌هایی که دیسک‌های حاوی آنزیم بر روی آنها قرار گرفته است، هاله‌هایی شفاف تشکیل خواهد شد که بیانگر تجزیه‌ی سوبسترا توسط آنزیم در این نواحی است (شکل ۳-۱۱).

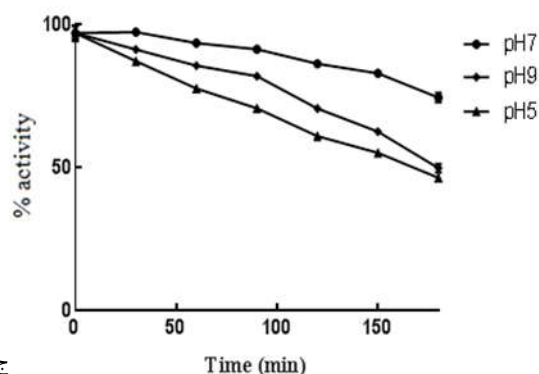


شکل ۳-۹. بررسی تاثیر دما بر فعالیت آنزیم پکتات لیاز در سه تکرار. الف. تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم. سنجش‌های صورت گرفته با استفاده از پلی‌گالاکتورونیک اسید به عنوان سوبسترا نشان داد که آنزیم پکتات لیاز باکتری کوهنلا در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد دارای بیشترین میزان فعالیت است. ب. بررسی پایداری آنزیم نسبت به دما در طول زمان. فعالیت این آنزیم در دماهای ۶۰-۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در بالاترین مقدار ممکن حفظ شد و بیش از ۹۰٪ فعالیت ماکزیمم آنزیم تا دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه حفظ می‌شود.



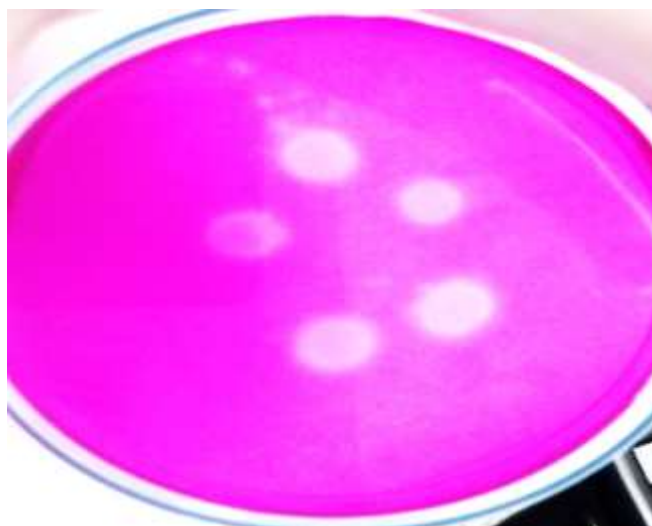
الف

ب



ج

شکل ۳-۱۰. بررسی تاثیر pH بر فعالیت آنزیم پکتات لیاز در سه تکرار. الف. تعیین pH بهینه جهت فعالیت آنزیم. نتایج سنجش‌های آنزیم در حضور پلی‌گالاکتورونیک اسید به عنوان سوبسترا، نشان داد که این آنزیم در pH = ۷ دارای بیشترین میزان فعالیت است. ب. بررسی پایداری آنزیم نسبت به pH. فعالیت این آنزیم در pH ۶-۹ پایدار است و بیش از ۸۰٪ فعالیت ماکزیمم آنزیم در pH های ۶-۹ به مدت ۹۰ دقیقه حفظ می‌شود. ج. بررسی پایداری آنزیم در سه pH ۵ و ۷ و ۹ در طول مدت زمان ۱۸۰ دقیقه



شکل ۳-۱۱. آزمون خوردگی سوبسترا توسط آنزیم. ترکیبات پکتیکی به نحوی تقریبا اختصاصی ضمن رنگ آمیزی با رنگ رتنیوم رد، رنگی مایل به بنفش به خود می‌گیرند اما در بخش‌هایی که دیسک‌های حاوی آنزیم بر روی آنها قرار گرفته است، هاله‌هایی شفاف تشکیل خواهد شد که بیانگر تجزیه‌ی سوبسترا توسط آنزیم در این نواحی است (مجد، ۱۳۸۱). در این سنجش از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد.

۸-۳ زیست سنجی آنزیم بر روی برگ گیاه بنتامیانا

آنزیم پکتات لیاز ضمن تاثیر بر روی پیوندهای آلفا ۱ به ۴ در فقره‌ی پلی گالاکتورونات موجود در تیغه‌ی میانی، با انجام واکنش بتا الیمیناسیون موجب کاتالیز برش حذفی این پیوندها و تشکیل الیگولاکتورونات‌های غیر اشباع می‌گردد. ضمن وقوع این پدیده، تیغه‌ی میانی که عمدتاً اولین سد دفاعی خارج سلولی در مقابل میکروارگانیسم‌های پاتوژن است، تا حدود زیادی استحکام و یکپارچگی خود را از دست خواهد داد. این پدیده با تغییراتی در مورفولوژی برگ نیز همراه است که ما در این آزمایش، اثرات خارجی عملکرد آنزیم بر سطح برگ گیاه بنتامیانا را که شامل از میان رفتن تدریجی بافت برگ در محل تلقیح آنزیم بود، پس از گذشت سه روز از زمان تلقیح مشاهده شد. بافر خارج کننده (NaH_2PO_4 ۵۰ mM)، کلرید سدیم (۳۰۰ mM)، ایمیدازول ($\text{pH} = 8$ ، ۲۵۰ mM) که فاقد آنزیم پکتات لیاز بود به عنوان کنترل در این سنجش مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳-۱۲).



الف



ب

شکل ۳-۱۲. زیست سنجی آنزیم بر روی برگ گیاه بنتامیانا. آنزیم پکتات لیاز ضمن تاثیر بر فقره‌ی پلی گالاکتورونات موجود در تیغه‌ی میانی، موجب کاتالیز برش حذفی پیوندهای گلیکوزیدی می‌گردد. ضمن وقوع این پدیده، تیغه‌ی میانی که عمدتاً اولین سد دفاعی خارج سلولی در مقابل میکروارگانیسم‌های پاتوژن است، تا حدود زیادی استحکام و یکپارچگی خود را از دست خواهد داد. این پدیده با تغییراتی در مورفولوژی برگ نیز همراه است که در این آزمایش، اثرات خارجی عملکرد آنزیم بر سطح برگ گیاه بنتامیانا که شامل از میان رفتن تدریجی بافت برگ در محل تلقیح آنزیم بود، پس از گذشت سه روز از زمان تلقیح در شکل سمت چپ (ب) مشاهده شد. شکل سمت راست (الف) نمونه‌ی شاهد است که با بافر استخراج فاقد آنزیم پکتات لیاز تلقیح شده است.

فصل چہارم

بحث

آنزیم‌ها، ابزار عملی مهمی در پزشکی، صنعت، شیمی، پردازش مواد غذایی و کشاورزی می‌باشند در چند دهه اخیر به عنوان موادی مناسب در تغییر و تبدیل ترکیبات در صنایع مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پیشرفت‌های بدست آمده در زمینه‌ی تکنولوژی DNA نو ترکیب و فرآیندهای زیستی، امکان تولید آنزیم‌های خالص با ویژگی‌های بیوشیمیایی مناسب در مقیاسی وسیع را فراهم آورده است که همین امر منجر به کاربرد گسترده‌ی آنزیم‌ها در محصولات صنعتی متنوعی مانند صنایع شیمیایی شوینده، خمیر و کاغذ، غذایی، خوراک حیوانات و منسوجات شده است. پیشرفت‌های اخیر در مهندسی پروتئین، دانشمندان را قادر ساخته است تا به تولید آنزیم‌هایی مناسب با فعالیت‌های جدید و یا برای استفاده در شرایط جدید بپردازند. اغلب آنزیم‌های صنعتی امروزه توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و تعداد زیادی از فرآیندهای آنزیمی نوین هم‌اکنون با فرآیندهای شیمیایی متداول و مرسوم تولید آنزیم جایگزین شده است. به‌علاوه آنزیم‌های میکروبی امروزه به طور گسترده‌ای جایگزین آنزیم‌های مرسوم حاصله از منابع گیاهی و جانوری شده‌اند و غالباً به صورت نو ترکیب تولید می‌شوند (سها و همکاران، ۲۰۰۹).

آنزیم پکتات لیا از انواع آنزیم‌های پکتیناز است که در فرآیندهای مرتبط با تجزیه‌ی مواد گیاهی، به کار می‌رود (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵). برای سال‌ها، این آنزیم در فرآیندهای صنعتی مختلفی همچون صنایع منسوجات، فرآوری الیاف گیاهی، قهوه، چای، استخراج روغن، تیمار پساب‌های صنعتی و ... به کار رفته است. به علاوه گزارشاتی نیز از کاربرد آنها در خالص‌سازی ویروس‌ها (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵) و تولید کاغذ (رید و ریچارد، ۲۰۰۰) وجود دارد. این آنزیم‌ها همچنین دارای کاربردهایی در صنعت فرآوری میوه هستند و به عنوان شفاف‌کننده‌های آب‌میوه، افزایش‌دهنده‌های رنگ و محصول و خمیرکردن میوه‌ها پیش از استخراج آب‌میوه به کار می‌روند (شارما و همکاران، ۲۰۱۳). آنزیم‌های پکتینولیتیک و از جمله پکتات لیا به طور گسترده‌ای در گیاهان عالی و میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها دیده می‌شوند (ویتاگر، ۱۹۹۱). پکتات لیا‌های باکتریایی ویژگی‌های سوسترایی گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند که این ویژگی به این باکتری‌ها این

امکان را میدهد که به تجزیه‌ی سوبسترای پکتیکی با درجات مختلف استریفیکاسیون بپردازند. تخمین زده شده است که پکتینازهای میکروبی چیزی در حدود ۲۵٪ از بازار فروش جهانی آنزیم‌های غذایی را به خود اختصاص می‌دهند (سمنووا و همکاران، ۲۰۰۶).

در اواخر دهه‌ی ۱۹۸۰ اولین آنزیم‌های ترموفیل خالص‌سازی شدند و مشخص شد که در دماهای بالا به شدت پایدار می‌مانند و فعالیت آنها در دماهایی کمتر از دماهای مورد نیاز برای رشد آنها بسیار کم است. محققان دریافتند که این آنزیم‌ها می‌توانند در میزبان‌های مزوفیل با حفظ فرم فضایی فعال و قابلیت تحمل حرارت کلن و بیان شوند. ترموفیل‌ها، میکروارگانیزم‌هایی با قابلیت بقا در محیط‌هایی با دماهای بالا هستند (بوزاس و همکاران، ۲۰۰۶). کلونینگ و بیان اطلاعات ژنومی یک میکروارگانیزم ترموفیل در یک میزبان مزوفیل با رشد سریع‌تر، همچنین امکان تولید آنزیم‌های thermostable خاص مورد نیاز جهت انجام یک واکنش بیوترانسفورماسیون ویژه را فراهم می‌کند (جیمز، ۱۹۵۵، بلک‌بروگ و بیرچ، ۱۹۸۱، ویلیام و دنیس، ۱۹۸۸، ایکدا و کلارک، ۱۹۹۸، هاگ و دانسون، ۱۹۹۹). در سال‌های اخیر تلاش‌هایی به منظور به دست آوردن آنزیم‌های خالص از پروتئین‌هایی که توسط ژن‌های خاص کد می‌شوند یا از میکروارگانیزم‌های مناسب برای افزایش فعالیت آنزیم نسبت به انواع به دست آمده از منابع طبیعی، صورت گرفته است. اشرشیاکلی متداولترین میزبانی است که برای بیان بسیاری از پروتئین‌های نو ترکیب چه در مقیاس صنعتی و چه در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (بانیکس، ۱۹۹۹، سوارتز، ۲۰۰۱، گرابر، ۲۰۰۲، فرخی و همکاران، ۲۰۰۹) و دلیل این امر نیز شاخص-های مثبت این باکتری از جمله قابلیت بالا در پذیرش ژن‌های خارجی، تکثیر سریع و آسان و میزان بالای بیان پروتئین نو ترکیب در زمانی کوتاه می‌باشد (مارکریدز، ۱۹۹۶). به‌علاوه تهیه‌ی محیط کشت آن آسان و ارزان است، مکانیسم رونویسی و همانندسازی آن به خوبی شناخته شده است و پروتئازهای مضر آن با دستکاری ژنتیکی غیرفعال شده است (پرووینسکا، ۲۰۱۳).

تا کنون پکتات لیازهای ترموفیل زیادی از منابع گوناگونی مثل باکتری متحمل حرارت *Thermotoga* *maritime* (کلوسکنس و همکاران، ۲۰۰۳، لی و همکاران، ۲۰۰۹) و انواع سویه‌های باکتری *Bacillus*

sp. (سوریانو و همکاران، ۲۰۰۰، اکاوا و همکاران، ۲۰۰۰، تاکائو و همکاران، ۲۰۰۱، برنسمیر و همکاران، ۲۰۰۴، لی و همکاران، ۲۰۱۰، لیو و همکاران، ۲۰۱۲) به صورت نو ترکیب کلن و بیان شده است. در این پژوهش از میزبان پروکاریوتی *E. coli* BL21 برای بیان پروتئین نو ترکیب پکتات لیاز سویه‌ی بومی *Cohnella* sp. A01 استفاده شد. برای همسانه‌سازی این ژن از حامل بیانی pET-26 b(+) استفاده شد که تحت پروموتور T7 که یک پروموتور ویروسی قوی می‌باشد، امکان بیان پروتئین در سطح بالایی را می‌دهد. پس از بیان و خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب تولیدی با استفاده از ستون نیکل سفاروز، پارامترهای کینتیکی آنزیم مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که پکتات لیاز Coh01152.n یک آنزیم ترموفیل است که دمای بهینه‌ی فعالیت آن ۶۰ °C می‌باشد. پایداری دمایی آنزیم‌های ترموفیل غالباً متأثر از نوع آمینو اسیدها و ترتیب قرارگیری آنها در ساختمان اول پروتئین می‌باشد که همین امر در مراحل بعدی تکامل ساختار پروتئین با قرارگیری آمینواسیدهای آبگریز در بخش‌های مرکزی و آمینواسیدهای آبدوست در سطح پروتئین محقق می‌گردد. کاهش فعالیت آنزیم در دماهای بسیار بالا را غالباً به فروپاشی ساختار آنزیمی در اثر حرارت نسبت می‌دهند (جانیک و همکاران، ۱۹۹۰). دمای اپتیمم پکتات لیازها عموماً بین ۴۰ تا ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد متغیر است (پایاسی و همکاران، ۲۰۰۹). دمای بهینه‌ی فعالیت این پکتات لیاز بالاتر از دمای بهینه‌ی فعالیت پکتات لیاز (pelA) باکتری *Bacillus* sp. BP-23 (سوریانو و همکاران، ۲۰۰۰)، پکتات لیاز باکتری *Bacillus alcalophilus* (ژای و همکاران، ۲۰۰۳)، پکتات لیاز قلیایی Bsp165PelA باکتری *Bacillus* sp. N16-5 (لی و همکاران، ۲۰۱۰) و پکتات لیاز (Apel) باکتری *Bacillus subtilis* (لیو و همکاران، ۲۰۱۲) بود. در این میان پکتات لیازهای متحمل حرارت از باکتری‌های *Bacillus* sp. RN1 و *Thermotoga maritima* *Thermoanaerobacter italicus* خود را به ترتیب در دماهای ۸۰ و ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به نمایش می‌گذارند (پایاسی و همکاران، ۲۰۰۹). پایداری دمایی آنزیم پکتات لیاز در دماهای ۱۰ تا ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت که نتیجه‌ی آن بیانگر این مسئله بود که آنزیم از دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تا دمای ۷۰

درجه‌ی سانتی‌گراد پایداری خود را در مدت زمان ۹۰ دقیقه حفظ می‌نماید به‌گونه‌ای که بیش از ۹۰ درصد از فعالیت آنزیم تا دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و نیز بیش از ۷۰ درصد از فعالیت آنزیم تا دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد باقی می‌ماند. این در حالی است که فعالیت آنزیم پکتات لیاز pel-10A از باکتری *P. cellulosa* پس از قرارگیری برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۶۲ درصد از فعالیت آن باقی ماند و پس از انکوباسیون در دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، فعالیت آن به طور کامل متوقف شد (براون و همکاران، ۲۰۰۱). به‌علاوه ۵۰ درصد از فعالیت پکتات لیاز باکتری هایپر ترموفیل *Thermotoga maritima* به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد حفظ شد که این میزان پایداری حرارتی، بالاترین مقدار گزارش شده در میان سایر پکتات لیازهاست.

فعالیت آنزیم به نحو قابل توجهی از pH تاثیر می‌پذیرد. این امر به این علت است که اتصال سوبسترا و کاتالیزور غالباً به توزیع بار، هم بر روی سوبسترا و هم مولکول آنزیم بستگی دارد. در حقیقت تغییرات pH بر روی فعالیت سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم تاثیر می‌گذارد. توزیع بار روی پروتئین‌ها توسط حالت زنجیره‌های قابل یونیزه در اسیدهای آمینه تشکیل دهنده آنها تعیین میشود، که این امر خود به pH بستگی دارد و می‌تواند مستقیماً بر اتصال سوبسترا و خاصیت کاتالیزوری تاثیر بگذارد (یونیزاسیون آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال آنزیم با تغییر pH تغییر می‌کند و همین امر بر فعالیت و عملکرد آنزیم اثرگذار است). pH بهینه‌ی آنزیم پکتات لیاز باکتری کوهنلا برابر با هفت بود که در مقایسه با سایر پکتات لیازهای باکتریایی که pH بهینه عملکرد آنها بین ۸ تا ۱۰ است (به جز پکتات لیاز باکتری *Erwinia* که در pH برابر یا ۶ بهترین عملکرد را دارا می‌باشد) کمتر است. از میان تمامی پکتات لیازهای باکتریایی که pH بهینه‌ی آنها در این پژوهش با پکتات لیاز باکتری کوهنلا مورد مقایسه قرار گرفت، Pel N از باکتری *Dickeya dadantii* 3937 که متعلق به خانواده ۹ پلی-ساکارید لیازهاست، با pH بهینه‌ی برابر با ۷/۴ بیشترین شباهت را از نظر pH به باکتری مورد مطالعه داشت (حسن و همکاران، ۲۰۱۳). تمامی پکتات لیازها دارای pH بهینه نزدیک به قلیایی و در محدوده‌ی ۶ تا ۱۰ هستند. pH علاوه بر کم کردن فعالیت کاتالیتیکی، بر پایداری آنزیم نیز اثر

مشخصی بر جای می‌گذارد. بدین سبب آنزیم‌ها نه تنها از نظر امکان فعالیت، بلکه از نظر پایداری نیز دارای گستره‌ی pH محدودی هستند. فعالیت و پایداری پکتات لیاها در pH های مختلف، می‌تواند موجب کارکردهای متفاوت آنها در صنایع مختلفی شود و از آنجا که این آنزیم در گستره‌ی pH ۶ تا ۹ بیش از ۸۰ درصد از فعالیت خود را به مدت ۹۰ دقیقه حفظ می‌نماید از اینرو می‌تواند علاوه بر کاربرد در صنعت نساجی و فرآوری منسوجات و الیاف گیاهی (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵) و نیز صنایع تخمیری (سورنسن و همکاران، ۲۰۰۰) گزینه‌ی مناسبی جهت استفاده در صنایعی مانند آب‌میوه گیری (سانچز و دومین، ۲۰۰۲) و نیز تیمار پساب‌های پکتیکی صنعتی حاصل از استحصال آب مرکبات (کوبایاشی، ۱۹۸۷) باشد که نیازمند آنزیم‌های پایدار در pH های اسیدی هستند و اگرچه بیشینه‌ی فعالیت این آنزیم در pH خنثی است، به دلیل پایداری در گستره‌ای از pH می‌تواند آنزیم مناسبی جهت کاربرد در صنایع مذکور باشد. به‌علاوه از آنجائیکه امروزه در صنایع مختلف علاوه بر کاربرد آنزیم‌ها به صورت منفرد، از کمپلکس‌های آنزیمی استفاده می‌شود، این آنزیم می‌تواند در فرآیند استخراج آنزیمی روغن از دانه‌های روغنی همچون زیتون در کنار سایر آنزیم‌هایی که دیواره سلولی را تخریب می‌کنند (سلولاز و همی سلولازها) با هدف افزایش راندمان تولید روغن به خمیر زیتون افزوده شود تا بازده و کیفیت روغن زیتون بکر افزایش یابد و همین امر موجب فیلتراسیون بهتر روغن و افزایش درجه خلوص آن می‌گردد (وست، ۱۹۹۶).

در این پژوهش فعالیت باقیمانده‌ی آنزیم در سه pH ۵ و ۷ و ۹ اندازه‌گیری شد که نتایج بدست آمده نشان داد فعالیت باقیمانده‌ی آنزیم برای این سه pH بعد از سه ساعت برابر با ۴۴٪، ۷۷٪ و ۵۰٪ می‌باشد که نشان می‌دهد آنزیم در طیف pH اسیدی تا قلیایی نسبتاً پایدار است. وقتی pH از میزان اپتیمم فاصله پیدا کند، خواص عملکردی آنزیم تغییر می‌یابد و این امر را می‌توان به اثر pH بر روی مقاومت آنزیم نسبت داد (دیکسون و وب، ۱۹۷۹).

مطالعات نشان داده است که تمامی پکتات‌لیازها به جز *pelw* از *Erwinia chrysanthemi* (شویک و همکاران، ۱۹۹۹) و پکتات‌لیاز *Bacillus pumilus* (کلاگ‌سانتر و همکاران، ۲۰۰۶) جهت فعالیت

درون شیشه‌ای خود در شرایط آزمایشگاهی نیازمند یون Ca^{2+} هستند. نیاز به این یون مطابق مقادیر گزارش شده 0.1 mM تا 1.0 mM متغیر است. در این پژوهش مشخص شد که آنزیم پکتات لیاز باکتری کوهنلا نیز همانند سایر پکتات لیازهای باکتریایی جهت فعالیت خود در شرایط آزمایشگاهی نیازمند یون کلسیم است و غلظت یک میلی مولار از این یون موجب افزایش ۳۶ درصدی در فعالیت آنزیم می‌شود. اگرچه در گذشته فرض بر این بود که Ca^{2+} تنها به سوبسترا متصل می‌شود، امروزه مشخص شده است که Ca^{2+} مستقیماً به پروتئین متصل می‌شود و موجب میانجی‌گری برهم‌کنش سوبسترا و آنزیم و در نتیجه اتصال الیگوساکارید به پروتئین می‌شود (هرون و همکاران، ۲۰۰۰).

وزن مولکولی پکتات لیازها از منابع باکتریایی مختلفی تا کنون مورد بررسی قرار گرفته است و عموماً بین ۲۰ تا ۷۰ کیلو دالتون متغیر است. وزن مولکولی آنزیم پکتات لیاز باکتری کوهنلا در این تحقیق برابر با ۴۱ کیلو دالتون بود که کمتر از وزن مولکولی پکتات لیاز باکتری *Bacillus sp. TS 47* (تاکائو و همکاران، ۲۰۰۰) با وزن مولکولی ۵۰ کیلو دالتون، پکتات لیاز *Bacillus subtilis* (لیو و همکاران، ۲۰۱۲) با وزن مولکولی ۴۳ کیلو دالتون، پکتات لیاز *Paenibacillus sp. 0602* (لی و همکاران، ۲۰۱۴) با وزن مولکولی ۴۸ کیلو دالتون بود.

خانواده‌های مشخصی از آنزیم‌های پکتات لیاز می‌توانند براساس هم‌ردیف کردن توالی‌های آمینواسیدی از یکدیگر متمایز شود (شویک و همکاران، ۱۹۹۷). براساس توالی آمینواسیدی پکتات لیاز باکتری گرم مثبت *Cohnella A01* از نوع *peilL* و متعلق به خانواده‌ی ۹ پلی ساکارید لیازهاست که شامل آنزیم-های باکتریایی است. هم‌ردیفی این پروتئین با سایر پروتئین‌های مشابه نشان داد که این پروتئین متعلق به ابر خانواده‌ی *Pectin lyase-like* و خانواده‌ی *Pectate transeliminase* می‌باشد. از جمله اعضای دیگر این خانواده ی پروتئینی می‌توان به آنزیم پکتات لیاز L باکتری گرم منفی *dadantii* ، *Dickeya* ، پکتات لیاز L باکتری گرم منفی *Dickeya chrysanthemi* ، پکتات لیاز باکتری گرم مثبت *Bacillus halodurans C-125* و پکتات لیاز باکتری گرم منفی *Clostridium cellulovorans* اشاره نمود (جدول ضمیمه ۹). سایر ایزوزیم‌های پکتات لیازی باکتری *Dickeya chrysanthemi* یعنی

پکتات لیازهای A, B, C, D, E, Z در خانواده ۱ پلی ساکارید لیازها قرار دارند که بزرگترین خانواده از پکتات لیازها و شامل آنزیم‌هایی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان می‌باشد و به لحاظ عملکرد شامل انواع مختلفی از آنزیم‌های پکتات لیاز (EC4.2.2.2) اگزو پکتات لیاز (EC4.2.2.9) از منابع مختلفی هستند. پکتات لیازهای جنس *Bacillus* می‌توانند در خانواده‌ی ۱ یا ۳ از پلی ساکارید لیازها قرار گیرند که از جمله اعضای خانواده‌ی ۱ می‌توان به پکتات لیاز باکتری گرم مثبت *B. lichneformis* (برنسمیر و همکاران، ۲۰۰۴)، *B. subtilis* S0113 (ناصر و همکاران، ۱۹۹۳) و یک پکتات لیاز قلیا دوست از باکتری *Bacillus* (کوبایاشی و همکاران، ۱۹۹۹) اشاره نمود که دارای همولوژی آمینواسیدی با پکتات لیازهای خانواده ۱ هستند. به علاوه، توالی آمینواسیدی پکتات لیازها از *Bacillus subtilis* 168 (سوریانو و همکاران، ۲۰۰۶)، *Bacillus sp* ksm- p15 (هاتادا و همکاران، ۲۰۰۰)، Bp- 23 *Paenibacillus* (سوریانو و همکاران، ۲۰۰۰) و نیز پکتات لیاز باکتری‌های *Ueda107* *Pectobacterium carotovorum amylolyticus* و باکتری *Cellvibrio japonicus* سویه Ueda107 دارای همولوژی بیشتری با لیازهای خانواده ۳ هستند که شامل آنزیم‌های پکتات لیاز باکتریایی و قارچی است. در خصوص خانواده ۲ پلی ساکارید لیازها که شامل آنزیم‌های باکتریایی است می‌توان به ایزوزیم پکتات لیاز X از باکتری *Dickeya dadantii*، پکتات لیاز باکتری *Yersinia* D182038 *pestis* و پکتات لیاز باکتری *Yersinia enterocolitica* اشاره نمود. از *Bacillus* *alcalophilus* همولوژی اندکی را با پکتات لیازهای شناخته شده از میکروارگانیسم‌های متنوع نشان داد. این آنزیم حاوی هیچ ناحیه‌ی حفاظت شده‌ای در توالی در مقایسه با توالی‌های سایر پکتات لیازهای میکروبی نبود. اما همولوگ بودن *pelA* با *pel- P358* با ۵۰٪ همسانی نشان داد که *pelA* از *Bacillus alcalophilus* به خانواده‌ی ۱۰ پلی ساکارید لیازها تعلق دارد که این خانواده نیز شامل پکتات لیازهای باکتریایی می‌باشد (زای و همکاران، ۲۰۰۳). به علاوه از آنجایی که توالی پکتات- لیازهای باکتری‌های مختلف فارغ از نوع پاسخ آنها به آزمایش گرم (G^- و G^+) می‌توانند در خانواده‌ی مشابهی قرار گیرند، از این رو نوع باکتری‌ها تاثیری در قرارگیری پکتات لیاز آنها در خانواده‌های

مختلف پلی ساکارید لیازی نخواهد داشت و مطالعه توالی‌های پکتات لیازی باکتری‌های مختلف قادر به تفکیک باکتری‌های گرم مثبت و منفی از یکدیگر نخواهد بود.

پیشنهادات

- انجام مطالعات مولکولی و ایجاد جهش در جایگاه فعال و مهندسی هدفمند در جهت دستیابی به آنزیمی با قابلیت‌های بهتر برای صنعت
- بهبود پایداری حرارتی این آنزیم از طریق مهندسی پروتئین
- مقایسه‌ی دو حالت فاقد جهش و جهش یافته‌ی آنزیم جهت پی بردن به تاثیر جهش در فعالیت آنزیم
- استفاده از کشت فرمانتور به منظور تولید بیشتر آنزیم جهت استفاده در صنعت
- کشت فرمانتور و بهینه سازی فرآیند خالص سازی جهت تولید آنزیم با خلوص بالاتر و میزان بیشتر
- از آنجائیکه این آنزیم نقش اساسی در روند بیماری‌زایی دارد، می‌توان با تولید موتانت‌هایی که فاقد این آنزیم هستند و یا فعالیت این آنزیم به نحوی در آنها محدود شده است، به کنترل روند بیماری پرداخت
- انجام مطالعات ساختاری و بیوانفورماتیکی گسترده‌تر بر روی آنزیم و مقایسه‌ی آن با سایر پکتات لیازهای میکروبی با کاربرد صنعتی جهت بررسی دقیق‌تر خصوصیات صنعتی آنزیم
- مطالعه‌ی بازدارنده‌های آنزیم پکتات‌لیاز بر روی گیاهان مدل جهت فهم بهتر عملکرد این آنزیم در شرایط طبیعی
- تعیین ساختار سه بعدی آنزیم از طریق کریستالوگرافی اشعه ایکس

- مقایسه آنزیم پکتات لیاز با سایر آنزیم‌های پکتیناز به‌لحاظ نوع سوبسترا و بررسی طیف متنوعی از سوبستراهای پکتیکی با درجات مختلف استریفیکاسیون جهت مشخص نمودن میزان قابلیت آنزیم در تجزیه‌ی سایر سوبستراهای پکتیکی علاوه بر پلی گالاکتورونیک اسید
- استفاده از سوبسترا و انجام مطالعات میکروسکوپ الکترونی
- فرمولاسیون آنزیم پکتات‌لیاز با سایر آنزیم‌ها به‌منظور استفاده در صنایع مختلف

ضماعم

جدول ضمیمه ۱. تهیه استانداردهای پروتئینی به منظور تعیین غلظت نمونه مجهول

پروتئین مجهول	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	محلول (میکرولیتر)
پروتئین استاندارد	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	-
آب مقطر	۹۰	۸۰	۷۰	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	-
نمونه	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۰۰
معرف	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵
[پروتئین استاندارد] (mg/ml)	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۰/۵	۰/۶	۰/۷	۰/۸	۰/۹	؟

جدول ضمیمه ۲. میزان جذب (OD) نمونه‌های پروتئینی در 595 nm جهت تعیین غلظت نمونه پروتئینی

مجهول بر اساس غلظت پروتئین استاندارد (BSA)

غلظت BSA (mg/ml)	میزان جذب OD 595 nm (سه تکرار)		
۰/۲	۰/۰۷۰	۰/۰۶۹	۰/۰۷۱
۰/۴	۰/۱۱۳	۰/۱۰۰	۰/۱۰۴
۰/۶	۰/۱۳۸	۰/۱۴۰	۰/۱۴۰
۰/۸	۰/۱۵۶	۰/۱۵۶	۰/۱۵۶
۱	۰/۱۸۹	۰/۱۸۰	۰/۱۷۷

جدول ضمیمه ۳. بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف سوبسترا بر سرعت واکنش جهت محاسبه پارامترهای

کینتیکی V_{max} و k_m

غلظت‌های مختلف سوبسترای پلی گالاکتورونیک اسید (mg/ml)	میزان جذب در OD 232 nm (سه تکرار)		
۰	۰	۰	۰
۰/۰۱	۰/۱۰	۰/۱۳	۰/۰۹۷
۰/۰۴	۰/۲۰	۰/۲۲	۰/۲۶
۰/۱	۰/۳۵	۰/۳۶	۰/۳۳
۰/۴	۰/۵۰	۰/۵۴	۰/۵۶
۰/۵	۰/۶۸	۰/۷۲	۰/۷۰
۱	۰/۹۳	۰/۹۲	۰/۸۷
۳	۱/۱۹	۱/۳۴	۱/۳۱
۵	۱/۴۱	۱/۴۱	۱/۳۴

جدول ضمیمه ۴. بررسی اثر pH بر روی فعالیت آنزیم و بدست آوردن pH بهینه (pH profile)

pH	میزان جذب در OD 550 nm (سه تکرار)			% activity
۳	۰/۰۳۶	۰/۰۳۰	۰/۰۳۴	۸/۷
۴	۰/۰۷۲	۰/۰۷۴	۰/۰۷۰	۱۸/۹۴
۵	۰/۱۳۵	۰/۱۳۹	۰/۱۴۲	۳۶/۵۷
۶	۰/۲۵۰	۰/۲۴۸	۰/۲۵۲	۶۵/۷۸
۷	۰/۳۷۴	۰/۳۸۰	۰/۳۷۷	۹۹/۹۹
۸	۰/۳۴۸	۰/۳۵۲	۰/۳۵۰	۹۲
۹	۰/۲۷۵	۰/۲۷۷	۰/۲۸۱	۷۲/۹۷
۱۰	۰/۱۴۷	۰/۱۴۴	۰/۱۴۲	۳۷/۹۷
۱۱	۰/۰۴۲	۰/۰۴۰	۰/۰۳۷	۱۰/۵۲

جدول ضمیمه ۵. بررسی پایداری آنزیم نسبت به pH (pH Stability)

pH	میزان جذب در OD 550 nm (سه تکرار)			% activity
۳	۰/۰۸۴	۰/۰۷۲	۰/۰۸۰	۲۶/۶۶
۴	۰/۱۱۷	۰/۱۱۴	۰/۱۲۰	۳۹
۵	۰/۱۹۰	۰/۱۸۶	۰/۱۸۲	۶۱/۹۹
۶	۰/۲۶۱	۰/۲۵۸	۰/۲۴۴	۸۴/۶۶
۷	۰/۲۸۸	۰/۲۹۱	۰/۳۰۰	۱۰۰
۸	۰/۲۸۱	۰/۲۸۴	۰/۲۸۶	۹۴/۶۶
۹	۰/۲۶۷	۰/۲۷۲	۰/۲۶۴	۸۸/۹۰
۱۰	۰/۱۵۵	۰/۱۵۰	۰/۱۵۲	۵۰/۶۶
۱۱	۰/۰۹۲	۰/۰۸۴	۰/۰۸	۲۸/۴۴

جدول ضمیمه ۶. بررسی پایداری آنزیم نسبت به pH (pH Stability) در طول زمان

pH	میزان جذب در OD 550 nm (میانگین سه تکرار)													
	۰	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰	۰	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰
۵	۰/۴۱	۰/۳۶۰	۰/۳۲۱	۰/۳۰۱	۰/۲۵۲	۰/۲۳۵	۰/۱۹۸	۹۷/۲۴	۸۷/۳۷	۷۷/۷۵	۶۸/۹۰	۶۱/۱۶	۵۵/۲۵	۴۶/۵۲
۷	۰/۴۱	۰/۴۰	۰/۳۸۰	۰/۳۷۸	۰/۳۵۷	۰/۳۳۹	۰/۳۱۸	۹۷/۲۴	۹۷/۰۸	۶۸/۹۳	۹۱/۵۰	۸۶/۴۸	۸۳/۰۹	۷۴/۵۹
۹	۰/۴۱	۰/۳۸۲	۰/۳۶۱	۰/۳۴۰	۰/۲۸۳	۰/۲۶۳	۰/۲۰۴	۹۷/۲۴	۹۱/۴۲	۸۵/۷۶	۸۲/۱۱	۷۰/۷۹	۶۲/۷۰	۴۹/۹۹

جدول ضمیمه ۷. تأثیر دما روی فعالیت آنزیم (Temperature Profile) و بدست آوردن دمای اپتیمم

دما (°C)	میزان جذب در 550 nm OD (سه تکرار)			% activity
۱۰	۰/۰۴۸	۰/۰۶۰	۰/۰۷۴	۱۲/۳۵
۲۰	۰/۱۴۲	۰/۰۹۶	۰/۱۲۰	۲۴/۳۰
۳۰	۰/۱۶۰	۰/۲۱۰	۰/۲۵۱	۴۲/۰۹
۴۰	۰/۲۴۱	۰/۲۷۰	۰/۳۸۲	۶۰/۴۶
۵۰	۰/۳۹۲	۰/۴۴۰	۰/۴۲۰	۸۴/۸۶
۶۰	۰/۴۶۰	۰/۴۹۱	۰/۴۸۳	۹۹/۹۹
۷۰	۰/۳۱۱	۰/۳۵۱	۰/۲۹۰	۶۴/۴۹
۸۰	۰/۱۷۰	۰/۱۸۲	۰/۱۹۳	۳۶/۹۳
۹۰	۰/۰۵۱	۰/۰۲۹	۰/۰۹۴	۱۱/۸۱

جدول ضمیمه ۸. بررسی پایداری آنزیم در دماهای مختلف (Temperature Stability) در طول زمان

دما (°C)	میزان جذب در 550 nm OD (سه تکرار)			% activity
۱۰	۰/۳۵۱	۰/۳۵۴	۰/۳۵۶	۹۹/۳۴
۲۰	۰/۳۵۰	۰/۳۴۱	۰/۳۵۴	۹۷/۸۴
۳۰	۰/۳۴۲	۰/۳۴۸	۰/۳۴۹	۹۷/۲۸
۴۰	۰/۳۴۸	۰/۳۴۶	۰/۳۳۷	۹۶/۵۳
۵۰	۰/۳۴۲	۰/۳۳۲	۰/۳۴۵	۹۵/۴۱
۶۰	۰/۳۴۳	۰/۳۴۱	۰/۳۳۸	۹۴/۷۵
۷۰	۰/۲۶۴	۰/۲۵۸	۰/۲۶۰	۷۳/۳۲
۸۰	۰/۱۱۳	۰/۱۱۵	۰/۱۲۰	۳۲/۵۸
۹۰	۰/۰۱۶	۰/۰۱۲	۰/۰۱۵	۴/۲

جدول ضمیمه ۹. درصد همسانی پکتات لیازهای باکتری‌های مختلف با پکتات لیاز باکتری *Cohnella*A01

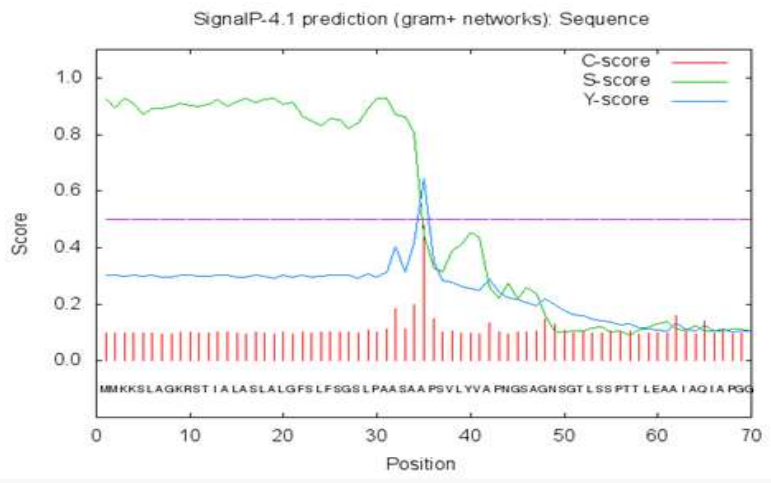
Name of bacteria	Kind	Identity (%)	family	References
<i>Bacillus licheniformis</i>	G ⁺	۴۷	۱	برنسمیر و همکاران، ۲۰۰۴
<i>Bacillus sp. RN1</i>	G ⁺	۴۷	۱	کوبایاشی و همکاران، ۱۹۹۹
<i>Clostridium cellulovorans</i>	G ⁻	۴۴	۹	تامارو و دوی، ۲۰۰۱
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	G ⁻	۴۳	۳	استار و موران، ۱۹۶۲
<i>Clostridium stercorarium</i>	G ⁺	۴۰	۹	هلا و همکاران، ۲۰۰۶
<i>Yersinia enterocolitica</i>	G ⁻	۳۸	۲	چاترجی و همکاران، ۱۹۷۹
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	G ⁻	۳۶	۹	ون جیگسم، ۱۹۸۶
<i>Dickeya dadantii</i> 3937 (Pel L)	G ⁻	۳۶	۲	حسن و همکاران، ۲۰۱۱
<i>Bacillus subtilis</i>	G ⁺	۳۳	۳	ناصر و همکاران، ۱۹۹۰
<i>Dickeya dadantii</i> 3937 (pel X)	G ⁻	۳۱	۹	جنکینز و همکاران، ۲۰۰۴
<i>Bacillus alcalophilus</i>	G ⁺	۳۰	۱۰	ژای و همکاران، ۲۰۰۳
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	G ⁺	۲۹	۹	هاتادا و همکاران، ۲۰۰۱
<i>Yersinia pestis</i> D182038	G ⁻	۲۹	۲	ابوت و همکاران، ۲۰۱۳
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	G ⁺	۲۸	۳	بولاند و همکاران، ۲۰۱۰
<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107	G ⁻	۲۸	۱۰	دبوی و همکاران، ۲۰۰۸
<i>Dickeya chrysanthemi</i> (pel D)	G ⁻	۲۷	۲	روبرت بادی و همکاران، ۲۰۰۰

pectate lyase [Cohnella laeviribosi]

Sequence ID: [ref|WP_026298117.1](#) Length: 434 Number of Matches: 1

Range 1: 10 to 434		GenPept	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
046 bits(2105)	0.0	Compositional matrix adjust.	419/425(99%)	420/425(90%)	0/425(0%)
Query	1	MMKKSLAGKRSTIALASLALGFSLFSGSLPAASAAPSVLYVAPNGGAGNSGTLSSPTTLE			60
Sbjct	10	MMKKSLAGKRSTIALASLALGFSLFAGSLPAASAAPSVLYVAPNGSAGNSGTLSSPTTLE			69
Query	61	AAIAQIAPGGTIYMRGGTYAYSSAVSIPRNNSGASGALKQIVPYGSEKPVLDIFSSEFYDA			120
Sbjct	70	AAIAQIAPGGTIYMRGGTYAYSSAVSIPRNNSGASGALKQIVPYGSEKPVLDIFSSEFYDA			129
Query	121	DDVSANERGLEVHGSYWLKGLEIKGAADNGIFISGNYNRIENLDVHHNRD SGVQISRYSD			180
Sbjct	130	DDVSANERGLEVHGSYWLKGLEIKGAADNGIFISGNYNRIENLDVHHNRD SGVQISRYSD			189
Query	181	SSATKAEWPSYNQIVNVYSHDNYPDNGEDADGFAIKLIVGPGNVVDGCI AAYNTDDGWD			240
Sbjct	190	SSATKAEWPSYNQIVNVYSHDNYPDNGEDADGFAIKLIVGPGNVVDGCI AAYNTDDGWD			249
Query	241	LYTKSDTGP IYFVTIKNSVAHHNGQTS DGRSTSDSDGNGFKLGGSDIPVNHIVINNVAYL			300
Sbjct	250	LYTKSDTGP IYFVTIKNSVAHHNCQTSDC TSDSDCNGFKLCCSDIPVNHIVINNVAYL			309
Query	301	NKKHGFTFNSNPGSITLTNNTSYANGESNFKFDEGTHVFANNLSYQGNASDKTSGTDVSG			360
Sbjct	310	NKKHGFTFNSNPGSITLTNNTSYANGESNFKFDEG HVFANNLSYQGN SDKTSGTDVSG			369
Query	361	SNVWVKNNKSTNARGIVASDEDFVSLTPTLTRNADGSPNTGNFIKLAAGSDIKGAGTDGK			420
Sbjct	370	SNVWVKNNKSTNARGIVASDEDFVSLTPTLTRNADGSPNTGNFIKLAAGSDIKGAGTDGK			429
Query	421	DIGHN 425			
Sbjct	430	DIGHN 434			

ضمیمه ۱. از پایگاه اینترنتی NCBI، بخش Protein BLAST جهت پیدا کردن توالی‌های مشابه پکتات لیاز هدف از باکتری *cohnella* A01 با طول ۴۲۵ آمینو اسید استفاده گردید. بر اساس این تشابه‌یابی، پکتات لیاز باکتری *cohnella* *laeviribosi* به طول ۴۳۳ آمینو اسید، با ۹۹ درصد تشابه، بیشترین شباهت را به توالی پکتات لیاز هدف داشت.



```
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 35 0.480
max. Y 35 0.643
max. S 31 0.928
mean S 1-34 0.890
D 1-34 0.739 0.450 YES
Name=Sequence SP='YES' Cleavage site between pos. 34 and 35: ASA-AP D=0.739 D-cutoff=0.450 Networks=SignalP-TM
# data
# gnuplot script
Signal peptides: 1
# processed fasta entries
# gff file of processed entries
```

ضمیمه ۲. پیش بینی وجود پپتید نشانه. برای مشخص شدن وجود پپتید نشانه از SignalP 4.1 استفاده شد. برای وجود پپتید نشانه باید نمره D بالاتراز ۰/۴۵ باشد. نمره پیش‌بینی شده برابر با ۰/۷۲۹ بود و وجود سیگنال پپتید در این توالی را تایید کرد.

Name	Len	mTP	SP	other	Loc	RC
Sequence	425	0.306	0.829	0.018	S	3
cutoff		0.000	0.000	0.000		

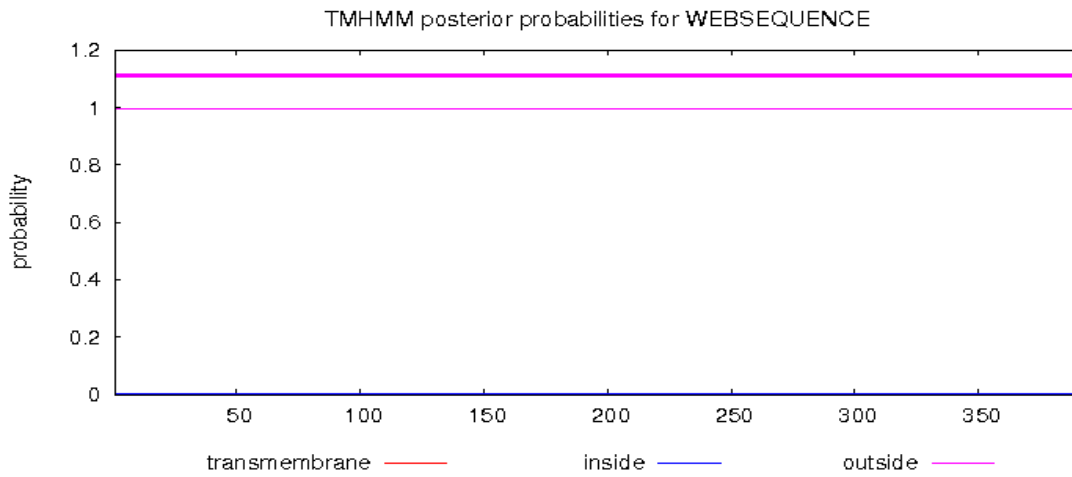
ضمیمه ۳. پیش بینی مسیر تولید پروتئین. از برنامه TargetP جهت پیش‌بینی مسیر ترشح پروتئین استفاده شد. ضریب قابلیت اطمینان (RC) ^۱ از عدد ۱ تا عدد ۴ است که عدد یک نشانگر بالاترین سطح اطمینان از مسیر تولید پروتئین می باشد. در خروجی برنامه TargetP، ضریب قابلیت اطمینان توالی برابر با سه بود که نشان می‌داد این پروتئین به صورت ترشحي (S) است.

۱- ضریب قابلیت اطمینان از عدد ۱ تا عدد ۴ است که عدد یک نشانگر بالاترین سطح اطمینان از مسیر تولید پروتئین می‌باشد

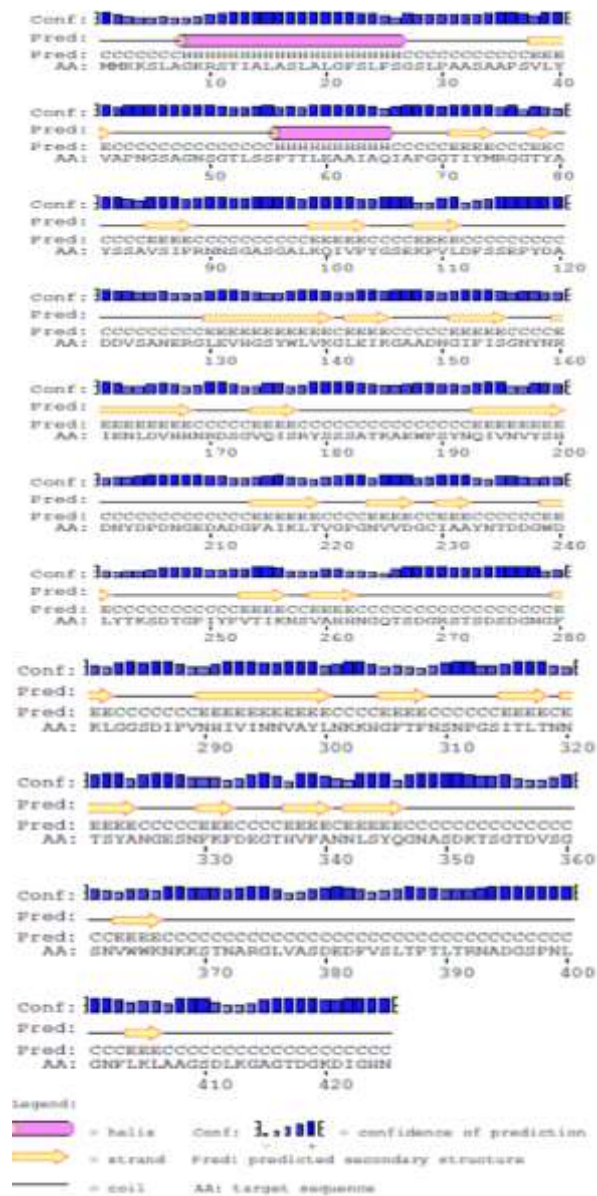
```

# WEBSEQUENCE Length: 391
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.02146
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.02127
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.00342
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 391

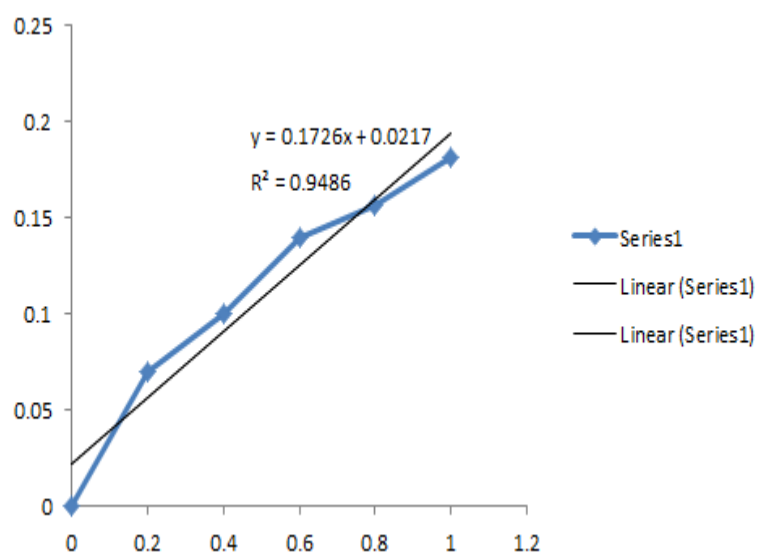
```



ضمیمه ۴. بررسی غشایی یا غیر غشایی بودن پروتئین. در خروجی حاصل از برنامه TMHMM تعداد لنگرها در غشاء در پروتئین پکنات لیا و متوسط تعداد اسید آمینه در هر مارپیچ TMH در این پروتئین برابر با صفر بود که نشان می‌داد احتمال لنگر اندازی این پروتئین در غشا صفر است و این پروتئین یک پروتئین غشایی نیست



ضمیمه ۵. پیش‌بینی ساختار دوم آنزیم پکتات لیاز مورد نظر با استفاده از سایت Psipred . ساختار دوم پروتئین پکتات لیاز باکتری ترموفیل و بومی *CohnellaA01* با استفاده از پایگاه اینترنتی PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) مورد پیش‌بینی قرار گرفت. در این بررسی مشخص شد که آنزیم پکتات لیاز مورد مطالعه دارای ۴۰ درصد ساختار صفحه‌ی بتا، ۹ درصد آلفا هلیکس و ۵۱ درصد ساختار پیچ نامنظم می‌باشد.



ضمیمه ۶. منحنی استاندارد غلظت پروتئین BSA بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر

منابع

پناهی شبستری، پ. ۱۳۸۴، مبانی بیوشیمی، انتشارات امید. صفحه ۳۳۵

مجد، ا. ۱۳۸۱، زیست شناسی سلولی و مولکولی، انتشارات آبیژ، صفحه ۲۴۴

Abbott, D. W. and A. B. Boraston (2007). "A family 2 pectate lyase displays a rare fold and transition metal-assisted β -elimination." Journal of Biological Chemistry 282(48): 35328-35336.

Abbott, D. W., D. Thomas, B. Pluvinaige and A. B. Boraston (2013). "An ancestral member of the polysaccharide lyase family 2 displays endolytic activity and magnesium dependence." Applied Biochemistry and Biotechnology 171(7): 1911-1923.

Aguilar, G. and C. Huitrón (1990). "Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon source." Biotechnology Letters 12(9): 655-660.

Ahlawat, S., B. Battan, S. S. Dhiman, J. Sharma and R. P. Mandhan (2007). "Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 34(12): 763-770.

Ahlawat, S., S. S. Dhiman, B. Battan, R. Mandhan and J. Sharma (2009). "Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric." Process Biochemistry 44(5): 521-526.

Akita, M., A. Suzuki, T. Kobayashi, S. Ito and T. Yamane (2000). "Crystallization and preliminary X-ray analysis of high-alkaline pectate lyase." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 56(6): 749-750.

Akita, M., A. Suzuki, T. Kobayashi, S. Ito and T. Yamane (2001). "The first structure of pectate lyase belonging to polysaccharide lyase family 3." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 57(12): 1786-1792.

Albersheim, P., A. Darvill, M. O'Neill, H. Schols and A. Voragen (1996). "A hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants." Pectins and Pectinases 14: 47-53.

Alkorta, I., C. Garbisu, M. J. Llama and J. L. Serra (1998). "Industrial applications of pectic enzymes: a review." Process Biochemistry 33(1): 21-28.

Antov, M. G., D. M. Peričin and G. R. Dimić (2001). "Cultivation of *Polyporus squamosus* for pectinase production in aqueous two-phase system containing sugar beet extraction waste." Journal of Biotechnology 91(1): 83-87.

Antranikian, G. and G. Winkelmann (1992). "Microbial degradation of starch." Microbial Degradation of Natural Products: 27-56.

Arenas-ocampo, M., S. Evangelista-lozano, R. Arana-errasquin, A. Jimenez-aparicio and G. Davila-ortiz (2003). "Softening and biochemical changes of sapote mamey fruit

(*Pouteria sapota*) at different development and ripening stages." Journal of Food Biochemistry 27(2): 91-107.

Arias, C. R. and J. K. Burns (2002). "A pectinmethylesterase gene associated with a heat-stable extract from citrus." Journal of Agricultural and Food chemistry 50(12): 3465-3472.

Aspinall, G. O. and J. Kuo-Shii (1974). "Rapeseed hull pectin." Carbohydrate Research 38: 247-255.

Bagherian, H., F. Z. Ashtiani, A. Fouladitajar and M. Mohtashamy (2011). "Comparisons between conventional, microwave-and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit." Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 50(11): 1237-1243.

Baneyx, F. (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." Current Opinion in Biotechnology 10(5): 411-421.

Barras, F., K. K. Thurn and A. K. Chatterjee (1987). "Resolution of four pectate lyase structural genes of *Erwinia chrysanthemi* (EC16) and characterization of the enzymes produced in *Escherichia coli*." Molecular and General Genetics MGG 209(2): 319-325.

Basu, S., A. Ghosh, A. Bera, M. N. Saha, D. Chattopadhyay and K. Chakrabarti (2008). "Thermodynamic characterization of a highly thermoactive extracellular pectate lyase from a new isolate *Bacillus pumilus* DKS1." Bioresource Technology 99(17): 8088-8094.

Beaulieu, C., M. Boccara and F. Van Gijsegem (1993). "Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants." Mol. Plant-Microbe Interact 6: 197-202.

Bekri, M. A., J. Desair, V. Keijers, P. Proost, M. Searle-van Leeuwen, J. Vanderleyden and A. Vande Broek (1999). "*Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase." Journal of Bacteriology 181(8): 2440-2447.

Benen, J. A., H. C. Kester, L. Parenicová and J. Visser (2000). "Characterization of *Aspergillus niger* pectate lyase A." Biochemistry 39(50): 15563-15569.

Berensmeier, S., S. Singh, J. Meens and K. Buchholz (2004). "Cloning of the *pelA* gene from *Bacillus licheniformis* 14A and biochemical characterization of recombinant, thermostable, high-alkaline pectate lyase." Applied Microbiology and Biotechnology 64(4): 560-567.

Bigucci, F., B. Luppi, T. Cerchiara, M. Sorrenti, G. Bettinetti, L. Rodriguez and V. Zecchi (2008). "Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin." European journal of Pharmaceutical Sciences 35(5): 435-441.

Blackebrough, N. and G. Birch (1981). *Enzymes of food processing*, Applied Science Publishers, London.

Boccaro, M., A. Dioloz, M. Rouve and A. Kotoujansky (1988). "The role of individual pectate lyases of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in pathogenicity on saintpaulia plants." Physiological and Molecular Plant Pathology 33(1): 95-104.

Boland, W. E., E. D. Henriksen and J. Doran-Peterson (2010). "Characterization of two *Paenibacillus amylolyticus* strain 27C64 pectate lyases with activity on highly methylated pectin." Applied and Environmental Microbiology 76(17): 6006-6009.

Brooks, A. D., S. Y. He, S. Gold, N. Keen, A. Collmer and S. Hutcheson (1990). "Molecular cloning of the structural gene for exopolysaccharide lyase from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and characterization of the enzyme product." Journal of Bacteriology 172(12): 6950.

Brown, I. E., M. H. Mallen, S. J. Charnock, G. J. Davies and G. W. Black (2001). "Pectate lyase 10A from *Pseudomonas cellulosa* is a modular enzyme containing a family 2a carbohydrate-binding module." Biochemical Journal 355(1): 155-165.

Brühlmann, F. and N. T. Keen (1997). "Cloning, sequence and expression of the pel gene from an *Amycolata* sp." Gene 202(1): 45-51.

Bueno, A. S., C. M. Pereira, B. Menegassi, J. A. G. Arêas and I. A. Castro (2009). "Effect of extrusion on the emulsifying properties of soybean proteins and pectin mixtures modelled by response surface methodology." Journal of Food Engineering 90(4): 504-510.

Canteri-Schemin, M. H., H. C. R. Fertoni, N. Waszczyński and G. Wosiacki (2005). "Extraction of pectin from apple pomace." Brazilian Archives of Biology and Technology 48(2): 259-266.

Cao, J., W. Sun, Y. Pan and S. Chen (2000). "High-producers of polygalacturonase selected from mutants resistant to rifampin in alkalophilic *Bacillus* sp. NTT33." Enzyme and Microbial Technology 27(8): 545-548.

Carpita, N. C. and D. M. Gibeaut (1993). "Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth." The Plant Journal 3(1): 1-30.

Chatterjee, A. K., G. E. Buchanan, M. K. Behrens and M. P. Starr (1979). "Synthesis and excretion of polygalacturonic acid trans-eliminase in *Erwinia*, *Yersinia*, and *Klebsiella* species." Canadian Journal of Microbiology 25(1): 94-102.

Cho, S. W., S. Lee and W. Shin (2001). "The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex." Journal of Molecular Biology 311(4): 863-878.

Cho, Y., M. Jang, A. Srivastava, J.-H. Jang, N.-K. Soung, S.-K. Ko, D.-O. Kang, J. S. Ahn and B. Y. Kim (2015). "A Pectate Lyase-Coding Gene Abundantly Expressed during Early Stages of Infection Is Required for Full Virulence in *Alternaria brassicicola*." PloS one **10**(5).

Coenen, G., E. Bakx, R. Verhoef, H. Schols and A. Voragen (2007). "Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I." Carbohydrate Polymers **70**(2): 224-235.

Coimbra, P., P. Ferreira, H. De Sousa, P. Batista, M. Rodrigues, I. Correia and M. Gil (2011). "Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications." International Journal of Biological Macromolecules **48**(1): 112-118.

Collmer, A. and N. T. Keen (1986). "The role of pectic enzymes in plant pathogenesis." Annual Review of Phytopathology **24**(1): 383-409.

Collmer, A., J. L. Ried and M. S. Mount (1988). "Assay methods for pectic enzymes." Methods in enzymology **161**: 329-335.

Cooper, R. M. (1983). "The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls."

Cornick, N., N. Jensen, D. Stahl, P. Hartman and M. Allison (1994). "*Lachnospira pectinoschiza* sp. nov., an anaerobic pectinophile from the pig intestine." International Journal of Systematic Bacteriology **44**(1): 87-93.

Corredig, M., W. Kerr and L. Wicker (2000). "Separation of thermostable pectinmethylesterase from marsh grapefruit pulp." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(10): 4918-4923.

Crawford, M. S. and P. Kolattukudy (1987). "Pectate lyase from *Fusarium solani* f. sp. pisi: purification, characterization, in vitro translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity." Archives of Biochemistry and Biophysics **258**(1): 196-205.

Creze, C., S. Castang, E. Derivery, R. Haser, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, V. E. Shevchik and P. Gouet (2008). "The crystal structure of pectate lyase peli from soft rot pathogen *Erwinia chrysanthemi* in complex with its substrate." Journal of Biological Chemistry **283**(26): 18260-18268.

D'INNOCENZO, M. and F. LAJOLO (2001). "Effect of gamma irradiation on softening changes and enzyme activities during ripening of *papaya* fruit." Journal of Food Biochemistry **25**(5): 425-438.

de Assis, S. A., P. Fernandes, B. S. Ferreira, J. Cabral, F. Oliveira and O. M. Mascarenhas (2004). "Screening of supports for the immobilization of pectinmethylesterase from *acerola* (*Malpighia glabra* L)." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **79**(3): 277-280.

De Lorenzo, G., R. D'Ovidio and F. Cervone (2001). "The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi." Annual review of Phytopathology 39(1): 313-335.

de Miguel Bouzas, T., J. Barros-Velázquez and T. Gonzalez Villa (2006). "Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review." Protein and Peptide letters 13(7): 645-651.

De Roeck, A., D. N. Sila, T. Duvetter, A. Van Loey and M. Hendrickx (2008). "Effect of high pressure/high temperature processing on cell wall pectic substances in relation to firmness of carrot tissue." Food Chemistry 107(3): 1225-1235.

DeBoy, R. T., E. F. Mongodin, D. E. Fouts, L. E. Tailford, H. Khouri, J. B. Emerson, Y. Mohamoud, K. Watkins, B. Henrissat and H. J. Gilbert (2008). "Insights into plant cell wall degradation from the genome sequence of the soil bacterium *Cellvibrio japonicus*." Journal of Bacteriology 190(15): 5455-5463.

Dehdashti, S. J., C. N. Doan, K. L. Chao and M. D. Yoder (2003). "Effect of mutations in the T1. 5 loop of pectate lyase A from *Erwinia chrysanthemi* EC16." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 59(7): 1339-1342.

Devi, N. A. and A. A. Rao (1996). "Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*." Enzyme and Microbial Technology 18(1): 59-65.

Di Matteo, A., A. Giovane, A. Raiola, L. Camardella, D. Bonivento, G. De Lorenzo, F. Cervone, D. Bellincampi and D. Tsernoglou (2005). "Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein." The Plant Cell Online 17(3): 849-858.

Dixon, M. and E. Webb (1979). "Enzyme inhibition and activation." Enzymes 3: 126-136.

Dominguez-Puigjaner, E., I. Llop, M. Vendrell and S. Prat (1997). "A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases." Plant Physiology 114(3): 1071-1076.

Emaga, T. H., C. Robert, S. N. Ronkart, B. Wathelet and M. Paquot (2008). "Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties." Bioresource Technology 99(10): 4346-4354.

Emaga, T. H., S. N. Ronkart, C. Robert, B. Wathelet and M. Paquot (2008). "Characterisation of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design." Food Chemistry 108(2): 463-471.

Espitia, P. J. P., W.-X. Du, R. de Jesús Avena-Bustillos, N. d. F. F. Soares and T. H. McHugh (2014). "Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties-a review." Food Hydrocolloids 35: 287-296.

- Fang, Y., S. Al-Assaf, G. O. Phillips, K. Nishinari, T. Funami and P. A. Williams (2008). "Binding behavior of calcium to polyuronates: comparison of pectin with alginate." Carbohydrate Polymers 72(2): 334-341.
- Faravash, R. S. and F. Z. Ashtiani (2008). "The influence of acid volume, ethanol-to-extract ratio and acid-washing time on the yield of pectic substances extraction from peach pomace." Food Hydrocolloids 22(1): 196-202.
- Farrokhi, N., M. Hrmova, R. A. Burton and G. B. Fincher (2009). Heterologous and cell-free protein expression systems. Plant Genomics, Springer: 175-198.
- Fayyaz, A., B. Asbi, H. Ghazali, Y. C. Man and S. Jinap (1993). "Pectinesterase extraction from *papaya*." Food Chemistry 47(2): 183-185.
- Federici, L., C. Caprari, B. Mattei, C. Savino, A. Di Matteo, G. De Lorenzo, F. Cervone and D. Tsernoglou (2001). "Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein)." Proceedings of the National Academy of Sciences 98(23): 13425-13430.
- Femenia, A., P. Garosi, K. Roberts, K. Waldron, R. Selvendran and J. Robertson (1998). "Tissue-related changes in methyl-esterification of pectic polysaccharides in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) stems." Planta 205(3): 438-444.
- Fishman, M. L. and H. K. Chau (2000). Form plants, Google Patents.
- Fishman, M. L., P. N. Walker, H. K. Chau and A. T. Hotchkiss (2003). "Flash extraction of pectin from orange albedo by steam injection." Biomacromolecules 4(4): 880-889.
- Fishman, M. L., H. K. Chau, P. D. Hoagland and A. T. Hotchkiss (2006). "Microwave-assisted extraction of lime pectin." Food Hydrocolloids 20(8): 1170-1177.
- Fishman, M. L., P. H. Cooke, H. K. Chau, D. R. Coffin and A. T. Hotchkiss (2007). "Global structures of high methoxyl pectin from solution and in gels." Biomacromolecules 8(2): 573-578.
- Fissore, E., L. Matkovic, E. Wider, A. Rojas and L. Gerschenson (2009). "Rheological properties of pectin-enriched products isolated from butternut (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret)." LWT-Food Science and Technology 42(8): 1413-1421.
- Förster, H. (1988). "Pectinesterases from *Phytophthora infestans*." Methods in Enzymology 161: 355-361.
- Fraeye, I., A. De Roeck, T. Duvetter, I. Verlent, M. Hendrickx and A. Van Loey (2007). "Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation." Food Chemistry 105(2): 555-563.
- Fraeye, I., T. Duvetter, E. Doungra, A. Van Loey and M. Hendrickx (2010). "Fine-tuning the properties of pectin-calcium gels by control of pectin fine structure, gel

composition and environmental conditions." Trends in Food Science & Technology 21(5): 219-228.

Fraissinet-Tachet, L. and M. Fevre (1996). "Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*." Current Microbiology 33(1): 49-53.

Gainvors, A., V. Frezier, H. Lemaesquier, C. Lequart, M. Aigle and A. Belarbi (1994). "Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain." Yeast 10(10): 1311-1319.

Garna, H., N. Mabon, C. Robert, C. Cornet, K. Nott, H. Legros, B. Wathelet and M. Paquot (2007). "Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed by alcohol." Journal of Food Science 72(1): C001-C009.

Glinisky, V. V. and A. Raz (2009). "Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets." Carbohydrate Research 344(14): 1788-1791.

Gonzalez-Candelas, L. and P. Kolattukudy (1992). "Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. pisi (Nectria haematococca, mating population VI)." Journal of Bacteriology 174(20): 6343-6349.

Grabherr, R. and K. Bayer (2002). "Impact of targeted vector design on ColE1 plasmid replication." Trends in Biotechnology 20(6): 257-260.

Guillemin, F., F. Guillon, E. Bonnin, M.-F. Devaux, T. Chevalier, J. P. Knox, F. Liners and J.-F. Thibault (2005). "Distribution of pectic epitopes in cell walls of the sugar beet root." Planta 222(2): 355-371.

Gummadi, S. N. and T. Panda (2003). "Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review." Process Biochemistry 38(7): 987-996.

Guo, W., L. Gonzalez-Candelas and P. Kolattukudy (1995). "Cloning of a novel constitutively expressed pectate lyase gene *pelB* from *Fusarium solani* f. sp. pisi (Nectria haematococca, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*." Journal of Bacteriology 177(24): 7070-7077.

Habibi, Y., A. Heyraud, M. Mahrouz and M. Vignon (2004). "Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits." Carbohydrate Research 339(6): 1119-1127.

Hadj-Taieb, N., M. Ayadi, S. Trigui, F. Bouabdallah and A. Gargouri (2002). "Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*." Enzyme and Microbial Technology 30(5): 662-666.

Haki, G. and S. Rakshit (2003). "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review." Bioresource Technology 89(1): 17-34.

- Hamman, J. H. (2010). "Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems." Marine Drugs 8(4): 1305-1322.
- Hassan, S. and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat (2011). "Identification of two feruloyl esterases in *Dickeya dadantii* 3937 and induction of the major feruloyl esterase and of pectate lyases by ferulic acid." Journal of Bacteriology 193(4): 963-970.
- Hassan, S., V. E. Shevchik, X. Robert and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat (2013). "PelN is a new pectate lyase of *Dickeya dadantii* with unusual characteristics." Journal of Bacteriology 195(10): 2197-2206.
- Hatada, Y., N. Higaki, K. Saito, A. Ogawa, K. Sawada, T. Ozawa, Y. Hakamada, T. Kobayashi and S. ITO (2001). "Cloning and sequencing of a high-alkaline pectate lyase gene from an alkaliphilic *Bacillus* isolate." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 63(6): 998-1005.
- Herron, S. R., J. A. Benen, R. D. Scavetta, J. Visser and F. Jurnak (2000). "Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens." Proceedings of the National Academy of Sciences 97(16): 8762-8769.
- Herron, S. R., R. D. Scavetta, M. Garrett, M. Legner and F. Jurnak (2003). "Characterization and implications of Ca²⁺ binding to pectate lyase C." Journal of Biological Chemistry 278(14): 12271-12277.
- Hinton, J., J. Sidebotham, D. Gill and G. Salmond (1989). "Extracellular and periplasmic isoenzymes of pectate lyase from *Erwinia carotovora* subspecies carotovora belong to different gene families." Molecular Microbiology 3(12): 1785-1795.
- Hoondal, G., R. Tiwari, R. Tewari, N. Dahiya and Q. Beg (2002). "Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review." Applied Microbiology and Biotechnology 59(4-5): 409-418.
- Hough, D. W. and M. J. Danson (1999). "Extremozymes." Current Opinion in Chemical Biology 3(1): 39-46.
- Huber, D. (1984). "Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses." Journal of Food Science 49(5): 1310-1315.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., G. Condemine, W. Nasser and S. Reverchon (1996). "Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*." Annual Reviews in Microbiology 50(1): 213-257.
- Ikeda, M. and D. S. Clark (1998). "Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*." Biotechnology and Bioengineering 57(5): 624-629.

- Insight Knowledge, U. (2011). "Production of polygalacturonase and pectin methyl esterase from agrowaste by using various isolates of *Aspergillus niger*." Insight 1(1): 1-7.
- Ishii, T. (1997). "O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls." Plant Physiology 113(4): 1265-1272.
- Ishii, T. and T. Matsunaga (2001). "Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan." Phytochemistry 57(6): 969-974.
- Ishii, T., T. Matsunaga, P. Pellerin, M. A. O'Neill, A. Darvill and P. Albersheim (1999). "The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer." Journal of Biological Chemistry 274(19): 13098-13104.
- Jackson, C. L., T. M. Dreaden, L. K. Theobald, N. M. Tran, T. L. Beal, M. Eid, M. Y. Gao, R. B. Shirley, M. T. Stoffel and M. V. Kumar (2007). "Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure." Glycobiology 17(8): 805-819.
- Jaenicke, R. and P. Závodszy (1990). "Proteins under extreme physical conditions." FEBS Letters 268(2): 344-349.
- Jayani, R. S., S. Saxena and R. Gupta (2005). "Microbial pectinolytic enzymes: a review." Process Biochemistry 40(9): 2931-2944.
- Jenkins, J., O. Mayans, D. Smith, K. Worboys and R. W. Pickersgill (2001). "Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site." Journal of Molecular Biology 305(4): 951-960.
- Jenkins, J., V. E. Shevchik, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat and R. W. Pickersgill (2004). "The crystal structure of pectate lyase Pel9A from *Erwinia chrysanthemi*." Journal of Biological Chemistry 279(10): 9139-9145.
- Jensen, J. K., S. O. Sørensen, J. Harholt, N. Geshi, Y. Sakuragi, I. Møller, J. Zandleven, A. J. Bernal, N. B. Jensen and C. Sørensen (2008). "Identification of a xylogalacturonan xylosyltransferase involved in pectin biosynthesis in *Arabidopsis*." The Plant Cell Online 20(5): 1289-1302.
- Jensen, S., C. Rolin and R. Ipsen (2010). "Stabilisation of acidified skimmed milk with HM pectin." Food Hydrocolloids 24(4): 291-299.
- Jiang, C.-M., Y.-J. Lai, B.-H. Lee, W.-H. Chang, M.-C. Wu and H.-M. Chang (2002). "Changes in physico-chemical properties of pectin from jelly fig (*Ficus awkeotsang* Makino) seeds during extraction and gelling." Food Research International 35(1): 31-35.
- Johansson, K., M. El-Ahmad, R. Friemann, H. Jörnvall, O. Markovič and H. Eklund (2002). "Crystal structure of plant pectin methylesterase." FEBS Letters 514(2): 243-249.

- Jug, M., I. Kosalec, F. Maestrelli and P. Mura (2012). "Development of low methoxy amidated pectin-based mucoadhesive patches for buccal delivery of triclosan: Effect of cyclodextrin complexation." Carbohydrate Polymers 90(4): 1794-1803.
- Jun, H.-I., C.-H. Lee, G.-S. Song and Y.-S. Kim (2006). "Characterization of the pectic polysaccharides from pumpkin peel." LWT-Food Science and Technology 39(5): 554-561.
- Kalpathy, U. and A. Proctor (2001). "Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin." Food Chemistry 73(4): 393-396.
- Karam, N. and A. Belarbi (1995). "Detection of polygalacturonases and pectin esterases in lactic acid bacteria." World Journal of Microbiology and Biotechnology 11(5): 559-563.
- Karaveg, K., A. Siriwardena, W. Tempel, Z.-J. Liu, J. Glushka, B.-C. Wang and K. W. Moremen (2005). "Mechanism of class 1 (glycosylhydrolase family 47) α -mannosidases involved in N-glycan processing and endoplasmic reticulum quality control." Journal of Biological Chemistry 280(16): 16197-16207.
- Kars, I., G. H. Krooshof, L. Wagemakers, R. Joosten, J. A. Benen and J. A. Van Kan (2005). "Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*." The Plant Journal 43(2): 213-225.
- Kashyap, D., P. Vohra, S. Chopra and R. Tewari (2001). "Applications of pectinases in the commercial sector: a review." Bioresource Technology 77(3): 215-227.
- Kawano, C. Y., M. A. d. S. C. Chellegatti, S. Said and M. J. V. Fonseca (1999). "Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*." Biotechnology and Applied Biochemistry 29(2): 133-140.
- Kegoya, Y., M. Setoguchi, K. Yokohiki and C. Hatanaka (1984). "Affinity chromatography of exopolygalacturonate lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*." Agricultural and Biological Chemistry 48(4): 1055-1060.
- Kennedy, J. F. and P. S. Panesar (2006). "YH Hui Handbook of Food Science, Technology and Engineering (Four Volume Set) 2006CRC Press, Taylor & Francis Group Boca Raton, FL, USA (1x+ 3488 pp.,£ 599.00, ISBN 0-8493-9847-9)." International Journal of Biological Macromolecules 38(2): 151-152.
- Kikuchi, T., H. Shibuya, T. Aikawa and J. T. Jones (2006). "Cloning and characterization of pectate lyases expressed in the esophageal gland of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*." Molecular Plant-Microbe Interactions 19(3): 280-287.
- Kimura, M., J. Kimura, P. Davie, R. Reinhardt and J. Dijk (1984). "The amino acid sequence of a small DNA binding protein from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*." FEBS Letters 176(1): 176-178.

Kirino, H., M. Aoki, M. Aoshima, Y. Hayashi, M. Ohba, A. Yamagishi, T. Wakagi and T. Oshima (1994). "Hydrophobic interaction at the subunit interface contributes to the thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*." European Journal of Biochemistry 220(1): 275-281.

Kirk, O., T. V. Borchert and C. C. Fuglsang (2002). "Industrial enzyme applications." Current Opinion in Biotechnology 13(4): 345-351.

Kita, N., C. M. Boyd, M. R. Garrett, F. Journak and N. T. Keen (1996). "Differential effect of site-directed mutations in pelC on pectate lyase activity, plant tissue maceration, and elicitor activity." Journal of Biological Chemistry 271(43): 26529-26535.

Kliemann, E., D. Simas, K. Nunes, E. R. Amante, E. S. Prudêncio, R. F. Teófilo, M. Ferreira and R. D. Amboni (2009). "Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) using response surface methodology." International journal of Food Science & Technology 44(3): 476-483.

Klug-Santner, B. G., W. Schnitzhofer, M. Vršanská, J. Weber, P. B. Agrawal, V. A. Nierstrasz and G. M. Guebitz (2006). "Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2." Journal of Biotechnology 121(3): 390-401.

Kobayashi, T., Y. Hatada, N. Higaki, D. D. Lusterio, T. Ozawa, K. Koike, S. Kawai and S. Ito (1999). "Enzymatic properties and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1427(2): 145-154.

Kotoujansky, A. (1987). "Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinias*." Annual Review of Phytopathology 25(1): 405-430.

Koubala, B., G. Kansci, L. Mbome, M.-J. Crépeau, J.-F. Thibault and M.-C. Ralet (2008). "Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from "Améliorée" and "Mango" mango peels." Food Hydrocolloids 22(7): 1345-1351.

Kraulis, P. J. (1991). "MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures." Journal of Applied Crystallography 24(5): 946-950.

Kratchanova, M., E. Pavlova and I. Panchev (2004). "The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin." Carbohydrate Polymers 56(2): 181-185.

Kristjansson, J. K. (1989). "Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes." Trends in Biotechnology 7(12): 349-353.

Kulikauskas, R. and S. McCormick (1997). "Identification of the *tobacco* and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed LAT59 gene of tomato." Plant Molecular Biology 34(5): 809-814.

- Kulkarni, S. and P. Vijayanand (2010). "Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.)." LWT-Food Science and Technology 43(7): 1026-1031.
- Kumar, S., K. K. Jain, A. Singh, A. K. Panda and R. C. Kuhad (2015). "Characterization of recombinant pectate lyase refolded from inclusion bodies generated in *E. coli* BL21 (DE3)." Protein expression and purification 110: 43-51.
- Kumar, A. and G. S. Chauhan (2010). "Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor." Carbohydrate Polymers 82(2): 454-459.
- Kumar, S., C.-J. Tsai and R. Nussinov (2000). "Factors enhancing protein thermostability." Protein Engineering 13(3): 179-191.
- Laurent, M. and P. Boulenger (2003). "Stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin." Food Hydrocolloids 17(4): 445-454.
- Li, G., L. Rao, Y. Xue, C. Zhou, Y. Zhang and Y. Ma (2010). "Cloning, expression, and characterization of a highly active alkaline pectate lyase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5." J Microbiol Biotechnol 20(4): 670-677.
- Li, P., Q. Jing and W. Shao (2009). "Expression, purification and characterization of a thermostable pectate lyase from *Thermotoga maritima*." Chinese Journal of Biotechnology 25(2): 223-229.
- Li, X., H. Wang, C. Zhou, Y. Ma, J. Li and J. Song (2014). "Cloning, recombinant expression and characterization of a pectate lyase from *Paenibacillus* sp. 0602 in recombinant *Escherichia coli*." BMC Biotechnology 14(1): 18.
- Liao, C.-H. (1989). "Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables." Applied and Environmental Microbiology 55(7): 1677-1683.
- Liao, C.-H., W. Fett, S.-S. Tzean and G. Hoffman (2006). "Detection and sequence analysis of an altered pectate lyase gene in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and related bacteria." Canadian Journal of Microbiology 52(11): 1051-1059.
- Libkind, D., P. Pérez, R. Sommaruga, M. del Carmen Diéguez, M. Ferraro, S. Brizzio, H. Zagarese and M. van Broock (2004). "Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts." Photochemical & Photobiological Sciences 3(3): 281-286.
- Lietzke, S. E., M. D. Yoder, N. T. Keen and F. Journak (1994). "The three-dimensional structure of pectate lyase E, a plant virulence factor from *Erwinia chrysanthemi*." Plant Physiology 106(3): 849-862.
- Lilley, D. M., R. M. Clegg, S. Diekmann, N. C. Seeman, E. Von Kitzing and P. J. Hagerman (1996). "Nomenclature Committee of the International Union of

Biochemistry and Molecular Biology (NC– IUBMB) A Nomenclature of Junctions and Branchpoints in Nucleic Acids Recommendations 1994." European Journal of Biochemistry, s. FEBS J 230(1): 1-2.

Lindsay, J. A. (1995). "Is thermophily a transferrable property in bacteria?" Critical Reviews in Microbiology 21(3): 165-174.

Löfgren, C., S. Guillotin, H. Evenbratt, H. Schols and A.-M. Hermansson (2005). "Effects of calcium, pH, and blockiness on kinetic rheological behavior and microstructure of HM pectin gels." Biomacromolecules 6(2): 646-652.

Lojkowska, E., C. Dorel, P. Reignault, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat and J. Robert-Baudouy (1993). "Use of GUS fusion to study the expression of *Erwinia chrysanthemi* pectinase genes during infection of potato tubers." Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI (USA).

Lojkowska, E., C. Masclaux, M. Boccara, J. Robert-Baudouy and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat (1995). "Characterization of the *pelL* gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937." Molecular Microbiology 16(6): 1183-1195.

Macdonald, H. M. and R. Evans (1996). "Purification and properties of apple pectinesterase." Journal of the Science of Food and Agriculture 70(3): 321-326.

MacDonald, L. C. and B. W. Berger (2014). "A polysaccharide lyase from *Stenotrophomonas maltophilia* with a unique, pH-regulated substrate specificity." Journal of Biological Chemistry 289(1): 312-325.

MacKinnon, I. M., W. G. Jardine, N. O'Kennedy, C. M. Renard and M. C. Jarvis (2002). "Pectic methyl and nonmethyl esters in potato cell walls." Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(2): 342-346.

Maldonado, M. C., A. M. S. de Saad and D. Callieri (1994). "Purification and characterization of pectinesterase produced by a strain of *Aspergillus niger*." Current Microbiology 28(4): 193-196.

Maldonado, M. and A. S. de Saad (1998). "Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 20(1): 34-38.

Marín-Rodríguez, M. C., J. Orchard and G. B. Seymour (2002). "Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening." Journal of Experimental Botany 53(377): 2115-2119.

Marin-Rodriguez, M., D. Smith, K. Manning, J. Orchard and G. Seymour (2003). "Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit." Plant Molecular Biology 51(6): 851-857.

- Marry, M., M. C. McCann, F. Kolpak, A. R. White, N. J. Stacey and K. Roberts (2000). "Extraction of pectic polysaccharides from sugar-beet cell walls." Journal of the Science of Food and Agriculture 80(1): 17-28.
- Martin, N., S. R. d. Souza, R. d. Silva and E. Gomes (2004). "Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct." Brazilian Archives of Biology and Technology 47(5): 813-819.
- Masclaux, C., N. Hugouvieux-Cotte-Pattat and D. Expert (1996). "Iron is a triggering factor for differential expression of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 pectate lyases in pathogenesis of African violets." MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions 9(3): 198-205.
- Masmoudi, M., S. Besbes, M. Chaabouni, C. Robert, M. Paquot, C. Blecker and H. Attia (2008). "Optimization of pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice using response surface methodology." Carbohydrate Polymers 74(2): 185-192.
- Matsunaga, T., T. Ishii, S. Matsumoto, M. Higuchi, A. Darvill, P. Albersheim and M. A. O'Neill (2004). "Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in *pteridophytes*, *lycophytes*, and *bryophytes*. Implications for the evolution of vascular plants." Plant Physiology 134(1): 339-351.
- May, C. D. (1990). "Industrial pectins: sources, production and applications." Carbohydrate Polymers 12(1): 79-99.
- Mayans, O., M. Scott, I. Connerton, T. Gravesen, J. Benen, J. Visser, R. Pickersgill and J. Jenkins (1997). "Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases." Structure 5(5): 677-689.
- McCann, M. C., K. Roberts and N. C. Carpita (2001). "Plant cell growth and elongation." eLS.
- Medina-Escobar, N., J. Cárdenas, E. Moyano, J. Caballero and J. Muñoz-Blanco (1997). "Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants." Plant Molecular Biology 34(6): 867-877.
- Min, B., J. Lim, S. Ko, K.-G. Lee, S. H. Lee and S. Lee (2011). "Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization." Bioresource Technology 102(4): 3855-3860.
- Minjares-Carranco, A., B. A. Trejo-Aguilar, G. Aguilar and G. Viniestra-González (1997). "Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation." Enzyme and Microbial Technology 21(1): 25-31.

Mishra, R., A. Banthia and A. Majeed (2012). "Pectin based formulations for biomedical applications: a review." Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 5(4): 1-7.

Mohnen, D. (2008). "Pectin structure and biosynthesis." Current Opinion in Plant Biology 11(3): 266-277.

Mollea, C., F. Chiampo and R. Conti (2008). "Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study." Food Chemistry 107(3): 1353-1356.

Monsoor, M., U. Kalapathy and A. Proctor (2001). "Improved method for determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy." Journal of Agricultural and Food chemistry 49(6): 2756-2760.

Morra, M., C. Cassinelli, G. Cascardo, M.-D. Nagel, C. Della Volpe, S. Siboni, D. Maniglio, M. Brugnara, G. Ceccone and H. A. Schols (2004). "Effects on interfacial properties and cell adhesion of surface modification by pectic hairy regions." Biomacromolecules 5(6): 2094-2104.

Munarin, F., L. Giuliano, S. Bozzini, M. Tanzi and P. Petrini (2010). "Mineral phase deposition on pectin microspheres." Materials Science and Engineering: C 30(3): 491-496.

Munarin, F., P. Petrini, S. Farè and M. Tanzi (2010). "Structural properties of polysaccharide-based microcapsules for soft tissue regeneration." Journal of Materials Science: Materials in Medicine 21(1): 365-375.

Munarin, F., S. Guerreiro, M. Grellier, M. Tanzi, M. Barbosa, P. Petrini and P. Granja (2011). "Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering." Biomacromolecules 12(3): 568-577.

Munarin, F., P. Petrini, M. C. Tanzi, M. A. Barbosa and P. L. Granja (2012). "Biofunctional chemically modified pectin for cell delivery." Soft Matter 8(17): 4731-4739.

Munarin, F., M. Tanzi and P. Petrini (2012). "Advances in biomedical applications of pectin gels." International Journal of Biological Macromolecules 51(4): 681-689.

Mutter, M., G. Beldman, H. A. Schols and A. G. J. Voragen (1994). "Rhamnogalacturonan [alpha]-L-Rhamnopyranohydrolase (A Novel Enzyme Specific for the Terminal Nonreducing Rhamnosyl Unit in Rhamnogalacturonan Regions of Pectin)." Plant Physiology 106(1): 241-250.

Mutter, M., I. J. Colquhoun, H. A. Schols, G. Beldman and A. G. Voragen (1996). "Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* Is a Rhamnogalacturonan [alpha]-L-Rhamnopyranosyl-(1->4)-[alpha]-D-Galactopyranosyluronide Lyase." Plant Physiology 110(1): 73-77.

- Mutter, M., C. M. Renard, G. Beldman, H. A. Schols and A. G. Voragen (1998). "Mode of action of RG-hydrolase and RG-lyase toward rhamnogalacturonan oligomers. Characterization of degradation products using RG-rhamnohydrolase and RG-galacturonohydrolase." Carbohydrate Research 311(3): 155-164.
- Naessens, M. and E. J. Vandamme (2003). "Multiple forms of microbial enzymes." Biotechnology Letters 25(14): 1119-1124.
- Naidu, G. S. N. and T. Panda (2003). "Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*." Biochemical Engineering Journal 16(1): 57-67.
- Nakamura, A., H. Furuta, H. Maeda, T. Takao and Y. Najamatsu (2002). "Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 66(6): 1301-1313.
- Nasser, W., F. Chalet and J. Robert-Baudouy (1990). "Purification and characterization of extracellular pectate lyase from *Bacillus subtilis*." Biochimie 72(9): 689-695.
- Nasser, W., A. Awade, S. Reverchon and J. Robert-Baudouy (1993). "Pectate lyase from *Bacillus subtilis*: molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme." FEBS Letters 335(3): 319-326.
- Ni, Y., K. M. Yates and R. Zarzycki (1999). Aloe pectin contains 3-o-methyl rhamnose, being capable of forming gel in presence of calcium salt; temperature reversible forms solution at room temperature; used as controlled release agent, Google Patents.
- Novoa de Armas, H., C. Verboven, C. De Ranter, J. Desair, A. Vande Broek, J. Vanderleyden and A. Rabijns (2004). "*Azospirillum irakense* pectate lyase displays a toroidal fold." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 60(6): 999-1007.
- Nunan, K. J., C. Davies, S. P. Robinson and G. B. Fincher (2001). "Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development." Planta 214(2): 257-264.
- O'Neill, M. A., D. Warrenfeltz, K. Kates, P. Pellerin, T. Doco, A. G. Darvill and P. Albersheim (1996). "Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester in vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer." Journal of Biological Chemistry 271(37): 22923-22930.
- O'Neill, M. A. and W. S. York (2003). "The composition and structure of plant primary cell walls." The Plant Cell wall: 1-54.
- O'Neill, M. A., T. Ishii, P. Albersheim and A. G. Darvill (2004). "Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide." Annu. Rev. Plant Biol. 55: 109-139.

- Ovodov, Y. S. (2009). "Current views on pectin substances." Russian Journal of Bioorganic Chemistry 35(3): 269-284.
- Pagan, J., A. Ibarz, M. Llorca, A. Pagan and G. Barbosa-Cánovas (2001). "Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace." Food Research International 34(7): 605-612.
- Paharia, A., A. K. Yadav, G. Rai, S. K. Jain, S. S. Pancholi and G. P. Agrawal (2007). "Eudragit-coated pectin microspheres of 5-fluorouracil for colon targeting." AAPS PharmSciTech 8(1): E87-E93.
- Patil, S. R. and A. Dayanand (2006). "Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions." Bioresource Technology 97(16): 2054-2058.
- Payasi, A., R. Sanwal and G. Sanwal (2009). "Microbial pectate lyases: characterization and enzymological properties." World Journal of Microbiology and Biotechnology 25(1): 1-14.
- Pedrolli, D. B., A. C. Monteiro, E. Gomes and E. C. Carmona (2009). "Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes." The Open Biotechnology Journal(3): 9-18.
- Petersen, T. N., S. Kauppinen and S. Larsen (1997). "The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel β helix." Structure 5(4): 533-544.
- Pickersgill, R., J. Jenkins, G. Harris, W. Nasser and J. Robert-Baudouy (1994). "The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium." Nature Structural & Molecular Biology 1(10): 717-723.
- Pilatzke-Wunderlich, I. and C. L. Nessler (2001). "Expression and activity of cell-wall-degrading enzymes in the latex of opium poppy, *Papaver somniferum* L." PlantMolecular Biology 45(5): 567-576.
- Pissavin, C., J. Robert-Baudouy and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat (1998). "Biochemical characterization of the pectate lyase PelZ of *Erwinia chrysanthemi* 3937." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology 1383(2): 188-196.
- Pitt, D. (1988). "Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*." Methods in Enzymology(161C): 350-354.
- Porowińska, D., M. Wujak, K. Roszek and M. Komoszyński (2012). "Prokaryotic expression systems." Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online) 67: 119-129.

- Prabasari, I., F. Pettolino, M.-L. Liao and A. Bacic (2011). "Pectic polysaccharides from mature orange (*Citrus sinensis*) fruit albedo cell walls: Sequential extraction and chemical characterization." Carbohydrate Polymers 84(1): 484-494.
- Ptichkina, N., O. Markina and G. Rummyantseva (2008). "Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes." Food Hydrocolloids 22(1): 192-195.
- Reid, I. and M. Ricard (2000). "Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide." Enzyme and Microbial Technology 26(2): 115-123.
- Ridley, B. L., M. A. O'Neill and D. Mohnen (2001). "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling." Phytochemistry 57(6): 929-967.
- Robert, C., T. H. Emaga, B. Wathelet and M. Paquot (2008). "Effect of variety and harvest date on pectin extracted from chicory roots (*Cichorium intybus* L.)." Food Chemistry 108(3): 1008-1018.
- Robert-Baudouy, J., W. Nasser, G. Condemine, S. Reverchon, V. E. Shevchik and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat (2000). "Pectic enzymes of *Erwinia chrysanthemi*, regulation and role in pathogenesis." Plant-Microbe interactions 5: 221-268.
- Rombouts, F. and W. Pilnik (1980). "Pectic enzymes."
- Ros, J. M., H. A. Schols and A. G. Voragen (1996). "Extraction, characterisation, and enzymatic degradation of lemon peel pectins." Carbohydrate Research 282(2): 271-284.
- Sabir, M. A., F. W. Sosulski and S. J. Campbell (1976). "Polymetaphosphate and oxalate extraction of sunflower pectins." Journal of Agricultural and Food Chemistry 24(2): 348-350.
- Saha, B., D. Jordan and R. Bothast (2009). "Enzymes, Industrial (overview)." Encyclopedia of Microbiology. Academic Press, Oxford: 281-294.
- Saha, D. and S. Bhattacharya (2010). "Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review." Journal of Food Science and Technology 47(6): 587-597.
- Sahari, M. A., A. Akbarian and M. Hamedi (2003). "Effect of variety and acid washing method on extraction yield and quality of sunflower head pectin." Food Chemistry 83(1): 43-47.
- Sakai, T. and G. Winkelmann (1992). "Degradation of pectins." Microbial Degradation of Natural Products.: 57-81.
- Sanchez, S. and A. L. Demain (2002). "Metabolic regulation of fermentation processes." Enzyme and Microbial Technology 31(7): 895-906.
- Santen, Y. v., J. A. Benen, K.-H. Schröter, K. H. Kalk, S. Armand, J. Visser and B. W. Dijkstra (1999). "1.68-Å Crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus*

niger and identification of active site residues by site-directed mutagenesis." Order 501: 10738.

Scandurra, R., V. Consalvi, R. Chiaraluce, L. Politi and P. C. Engel (1998). "Protein thermostability in extremophiles." Biochimie 80(11): 933-941.

Schäfer, T., T. W. Borchert, V. S. Nielsen, P. Skagerlind, K. Gibson, K. Wenger, F. Hatzack, L. D. Nilsson, S. Salmon and S. Pedersen (2007). Industrial enzymes. White Biotechnology, Springer: 59-131.

Schell, M. A., T. P. Denny and J. Huang (1994). Extracellular virulence factors of *Pseudomonas solanacearum*: role in disease and regulation of expression. Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence, Springer: 311-324.

Scheller, H. V., J. K. Jensen, S. O. Sørensen, J. Harholt and N. Geshi (2007). "Biosynthesis of pectin." Physiologia Plantarum 129(2): 283-295.

Searle-van Leeuwen, M., L. Van den Broek, H. Schols, G. Beldman and A. Voragen (1992). "Rhamnogalacturonan acetylerase: a novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins." Applied Microbiology and Biotechnology 38(3): 347-349.

Seggiani, M., M. Puccini, M. Pierini, S. Giovando and C. Forneris (2009). "Effect of different extraction and precipitation methods on yield and quality of pectin." International Journal of Food Science & Technology 44(3): 574-580.

Semenova, M., S. Grishutin, A. Gusakov, O. Okunev and A. Sinitsyn (2003). "Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*." Biochemistry (Moscow) 68(5): 559-569.

Semenova, M., O. Sinitsyna, V. Morozova, E. Fedorova, A. Gusakov, O. Okunev, L. Sokolova, A. Koshelev, T. Bubnova and Y. P. Vinetskii (2006). "Use of a preparation from fungal pectin lyase in the food industry." Applied Biochemistry and Microbiology 42(6): 598-602.

Seymour, G. and K. Gross (1996). "Cell wall disassembly and fruit softening." Postharvest News and Information (United Kingdom).

Sharma, N., M. Rathore and M. Sharma (2013). "Microbial pectinase: sources, characterization and applications." Reviews in Environmental Science and Biotechnology 12(1): 45-60.

Shevchik, V. E., J. Robert-Baudouy and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat (1997). "Pectate lyase PelI of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family." Journal of Bacteriology 179(23): 7321-7330.

Shevchik, V. E., H. C. Kester, J. A. Benen, J. Visser, J. Robert-Baudouy and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat (1999). "Characterization of the exopolygalacturonate lyase PelX of *Erwinia chrysanthemi* 3937." Journal of Bacteriology 181(5): 1652-1663.

- Shimizu, T., T. Nakatsu, K. Miyairi, T. Okuno and H. Kato (2002). "Active-site architecture of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum* revealed by crystal structures in native and ligand-bound forms at atomic resolution." Biochemistry 41(21): 6651-6659.
- Sila, D. N., C. Smout, F. Elliot, A. V. Loey and M. Hendrickx (2006). "Non-enzymatic Depolymerization of Carrot Pectin: Toward a Better Understanding of Carrot Texture During Thermal Processing." Journal of Food Science 71(1): E1-E9.
- Sinitsyna, O., E. Fedorova, M. Semenova, A. Gusakov, L. Sokolova, T. Bubnova, O. Okunev, A. Chulkin, E. Vavilova and Y. Vinetsky (2007). "Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*." Biochemistry (Moscow) 72(5): 565-571.
- Smith, N., G. Seymour, M. Jeger and G. Tucker (1989). "Cell wall changes in bananas and plantains". Symposium on Tropical Fruit in International Trade 269.
- Sørensen, S. O., M. Pauly, M. Bush, M. Skjøt, M. C. McCann, B. Borkhardt and P. Ulvskov (2000). "Pectin engineering: modification of potato pectin by in vivo expression of an endo-1, 4- β -D-galactanase." Proceedings of the National Academy of Sciences 97(13): 7639-7644.
- Soriano, M., A. Blanco, P. Díaz and F. J. Pastor (2000). "An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization." Microbiology 146(1): 89-95.
- Soriano, M., P. Diaz and F. I. J. Pastor (2006). "Pectate lyase C from *Bacillus subtilis*: a novel endo-cleaving enzyme with activity on highly methylated pectin." Microbiology 152(3): 617-625.
- Srirangarajan, A. and A. Shrikhande (1977). "Characterization of *mango* peel pectin." Journal of Food Science 42(1): 279-280.
- Starr, M. P. and F. Moran (1962). "Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot bacteria." Science 135(3507): 920-921.
- Sukhumsirchart, W., S. Kawanishi, W. Deesukon, K. Chansiri, H. Kawasaki and T. Sakamoto (2009). "Purification, characterization, and overexpression of thermophilic pectate lyase of *Bacillus* sp. RN1 isolated from a hot spring in Thailand." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 73(2): 268-273.
- Sungthongjeen, S., P. Sriamornsak, T. Pitaksuteepong, A. Somsiri and S. Puttipipatkachorn (2004). "Effect of degree of esterification of pectin and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets." Aaps Pharmscitech 5(1): 50-57.
- Swartz, J. R. (2001). "Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins." Current Opinion in Biotechnology 12(2): 195-201.

Tahir, M. N., A. Adnan and P. Mischnick (2009). "Lipase immobilization on O-propargyl and O-pentynyl dextrans and its application for the synthesis of click beetle pheromones." Process Biochemistry 44(11): 1276-1283.

Takao, M., T. Nakaniwa, K. Yoshikawa, T. Terashita and T. Sakai (2001). "Molecular cloning, DNA sequence, and expression of the gene encoding for thermostable pectate lyase of thermophilic *Bacillus* sp. TS 47." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 65(2): 322-329.

Tamaki, S., S. Gold, M. Robeson, S. Manulis and N. Keen (1988). "Structure and organization of the pel genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16." Journal of Bacteriology 170(8): 3468-3478.

Tamaru, Y. and R. H. Doi (2001). "Pectate lyase A, an enzymatic subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome." Proceedings of the National Academy of Sciences 98(7): 4125-4129.

Tanabe, H. and Y. Kobayashi (1987). "Plant-tissue maceration caused by pectinolytic enzymes from *Erwinia* spp. under alkaline conditions." Agricultural and Biological Chemistry 51(10): 2845-2846.

Tang, Q., Y. P. Liu, Z. G. Ren, X. X. Yan and L. Q. Zhang (2013). "1.37 Å Crystal structure of pathogenic factor pectate lyase from *Acidovorax citrulli*." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 81(8): 1485-1490.

Taniguchi, Y., A. Ono, M. Sawatani, M. Nanba, K. Kohno, M. Usui, M. Kurimoto and T. Matuhasi (1995). "Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity." Allergy 50(1): 90-93.

Tempel, W., K. Karaveg, Z.-J. Liu, J. Rose, B.-C. Wang and K. W. Moremen (2004). "Structure of mouse Golgi α -mannosidase IA reveals the molecular basis for substrate specificity among class 1 (family 47 glycosylhydrolase) α 1, 2-mannosidases." Journal of Biological Chemistry 279(28): 29774-29786.

Tho, I., S. A. Sande and P. Kleinebudde (2005). "Cross-linking of amidated low-methoxylated pectin with calcium during extrusion/spheronisation: Effect on particle size and shape." Chemical Engineering Science 60(14): 3899-3907.

Thomas, L. M., C. N. Doan, R. L. Oliver and M. D. Yoder (2002). "Structure of pectate lyase A: comparison to other isoforms." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 58(6): 1008-1015.

Thurn, K., F. Barras, Y. Kegoya-Yoshino and A. Chatterjee (1987). "Pectate lyases of *Erwinia chrysanthemi*: Pel E-like polypeptides and pelE homologous sequences in strains isolated from different plants." Physiological and Molecular Plant Pathology 31(3): 429-439.

Todorova, R. and B. Atanasov (2004). "The role of the salt concentration, proton, and phosphate binding on the thermal stability of wild and cloned DNA-binding protein

Sso7d from *Sulfolobus solfataricus*." International Journal of Biological Macromolecules 34(1): 135-147.

Urias-Orona, V., A. Rascón-Chu, J. Lizardi-Mendoza, E. Carvajal-Millán, A. A. Gardea and B. Ramírez-Wong (2010). "A novel pectin material: extraction, characterization and gelling properties." International Journal of Molecular Sciences 11(10): 3686-3695.

Van der Vlugt-Bergmans, C., P. Meeuwssen, A. Voragen and A. Van Ooyen (2000). "Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme." Applied and Environmental Microbiology 66(1): 36-41.

VAN GIJSEGEM, F. (1986). "Analysis of the pectin-degrading enzymes secreted by three strains of *Erwinia chrysanthemi*." Journal of General Microbiology 132(3): 617-624.

van Pouderoyen, G., H. J. Snijder, J. A. Benen and B. W. Dijkstra (2003). "Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*." FEBS Letters 554(3): 462-466.

Videcoq, P., C. Garnier, P. Robert and E. Bonnin (2011). "Influence of calcium on pectin methylesterase behaviour in the presence of medium methylated pectins." Carbohydrate Polymers 86(4): 1657-1664.

Vieille, C. and G. J. Zeikus (2001). "Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability." Microbiology and Molecular Biology Reviews 65(1): 1-43.

Vincken, J.-P., H. A. Schols, R. J. Oomen, M. C. McCann, P. Ulvskov, A. G. Voragen and R. G. Visser (2003). "If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture." Plant Physiology 132(4): 1781-1789.

Vitali, J., B. Schick, H. C. Kester, J. Visser and F. Jurnak (1998). "The three-dimensional structure of *Aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7-Å resolution." Plant Physiology 116(1): 69-80.

Voragen, A. G., G.-J. Coenen, R. P. Verhoef and H. A. Schols (2009). "Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls." Structural Chemistry 20(2): 263-275.

Vriesmann, L. C., R. F. Teófilo and C. L. de Oliveira Petkowicz (2011). "Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology." Carbohydrate Polymers 84(4): 1230-1236.

Wai, W. W., A. F. Alkarkhi and A. M. Easa (2010). "Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of durian rind pectin: An experimental design." Food and Bioproducts Processing 88(2): 209-214.

Waravdekar, V. and L. Saslaw (1959). "A sensitive colorimetric method for the estimation of 2-deoxy sugars with the use of the malonaldehydethiobarbituric acid reaction." Journal of Biological Chemistry 234(8): 1945-1950.

Warrilow, A. G., R. J. Turner and M. G. Jones (1994). "A novel form of pectinesterase in tomato." Phytochemistry 35(4): 863-868.

Weissbach, A. and J. Hurwitz (1959). "The formation of 2-Keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli*." Journal of Biological Chemistry 234(4): 705-709.

White, G. W., T. Katona and J. P. Zodda (1999). "The use of high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) as a molecular weight screening technique for polygalacturonic acid for use in pharmaceutical applications." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 20(6): 905-912.

Wiethölter, N., B. Graebner, M. Mierau, W. G. Willats, J. P. Knox and B. M. Moerschbacher (2003). "Isolation and characterisation of the homogalacturonan from type II cell walls of the *commelinoid* monocot wheat using HF-solvolysis." Carbohydrate Research 338(5): 423-431.

Willats, W. G., L. McCartney, W. Mackie and J. P. Knox (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. Plant Cell Walls, Springer: 9-27.

Willats, W. G., J. P. Knox and J. D. Mikkelsen (2006). "Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel." Trends in Food Science & Technology 17(3): 97-104.

Wing, R. A., J. Yamaguchi, S. K. Larabell, V. M. Ursin and S. McCormick (1990). "Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*." Plant Molecular Biology 14(1): 17-28.

Woo, K., Y. Chong, S. L. Hiong and P. Tang (2010). "Pectin Extraction and Characterization from *Red Dragon*." Journal of Biological Sciences 10(7): 631-636.

Wu, Y., X. Qiu, S. Du and L. Erickson (1996). "PO149, a new member of pollen pectate lyase-like gene family from *alfalfa*." Plant Molecular Biology 32(6): 1037-1042.

Yadav, S., P. K. Yadav, D. Yadav and K. D. S. Yadav (2009). "Pectin lyase: a review." Process Biochemistry 44(1): 1-10.

Yapo, B., C. Robert, I. Etienne, B. Wathelet and M. Paquot (2007). "Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts." Food Chemistry 100(4): 1356-1364.

Yapo, B. M., P. Lerouge, J.-F. Thibault and M.-C. Ralet (2007). "Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II." Carbohydrate Polymers 69(3): 426-435.

- Yapo, B. M. (2011). "Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model." Carbohydrate Polymers 86(2): 373-385.
- Yoder, M. D., N. T. Keen and F. Journak (1993). "New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor." Science 260(5113): 1503-1507.
- Yoder, M. D. and F. Journak (1995). "The refined three-dimensional structure of pectate lyase C from *Erwinia chrysanthemi* at 2.2 angstrom resolution (implications for an enzymatic mechanism)." Plant Physiology 107(2): 349-364.
- Zandleven, J., G. Beldman, M. Bosveld, H. Schols and A. Voragen (2006). "Enzymatic degradation studies of xylogalacturonans from apple and potato, using xylogalacturonan hydrolase." Carbohydrate Polymers 65(4): 495-503.
- Zandleven, J., S. O. Sørensen, J. Harholt, G. Beldman, H. A. Schols, H. V. Scheller and A. J. Voragen (2007). "Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*." Phytochemistry 68(8): 1219-1226.
- Zhai, C., J. Cao and Y. Wang (2003). "Cloning and expression of a pectate lyase gene from *Bacillus alcalophilus* NTT33." Enzyme and Microbial Technology 33(2): 173-178.
- Zheng, Y., C.-H. Huang, W. Liu, T.-P. Ko, Y. Xue, C. Zhou, R.-T. Guo and Y. Ma (2012). "Crystal structure and substrate-binding mode of a novel pectate lyase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5." Biochemical and Biophysical Research Communications 420(2): 269-274.
- Zhuge, B., G.-C. Du, W. Shen, J. Zhuge and J. Chen (2007). "Efficient secretory expression of an alkaline pectate lyase gene from *Bacillus subtilis* in *E. coli* and the purification and characterization of the protein." Biotechnology Letters 29(3): 405-410.
- Zykwinska, A., C. Rondeau-Mouro, C. Garnier, J.-F. Thibault and M.-C. Ralet (2006). "Alkaline extractability of pectic arabinan and galactan and their mobility in sugar beet and potato cell walls." Carbohydrate Polymers 65(4): 510-520.
- 宮入一夫, 小笠原愛, 殿内暁夫, 保坂耕三, 工藤真紀子 and 奥野智旦 (2004). "Low molecular weight pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*." Journal of Applied Glycoscience 51(1): 1-7.

Abstract

Pectate lyase is one of the pectinases that catalyse the elimination reaction of $\alpha(1\rightarrow4)$ glycosidic bond in polygalacturonic acid and produce unsaturated oligogalacturonate. The presence of this enzyme has been demonstrated in many plants, fruits and microorganisms like bacteria and fungi. Since pectate lyase has important roles in biological processes like plant growth and development and fruit maturation, Pectate lyase is a key enzyme in pectate degradation in middle lamella. Moreover the presence of pectate lyase has demonstrated in many plant pathogens and facilitating their penetration. Here the gene that encoded pectate lyase from *Cohnella* A01 was isolated and cloned in pET26-b expression vector and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The purification of the recombinant protein was performed. Biochemical properties of purified enzyme was assayed. The enzyme had an optimum activity at pH = 7 and 60 °C. The activity of the enzyme was further demonstrated via bioassay and plate test. With these properties we propose that the enzyme has application in pectic waste water treatment, textile industry and oil extraction process.

Keywords: pectate lyase, cloning, recombinant protein, biochemical properties



Shahrood University of technology

Faculty of Agriculture

Heterologous expression of a pectate lyase from *Cohnella* sp.

Shaghayegh Afraz

Supervisor(s):

Dr. Naser Farroki

Dr. Saeed Aminzadeh

september 2015