

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

Марија Г. Павловић

**Примена нових рекомбинантних
пектинолитичких ензима у побољшању
карактеристика воћних сокова**

докторска дисертација

Београд, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Marija G. Pavlović

**Application of novel recombinant pectinolytic
enzymes in improving the fruit juices characteristics**

doctoral dissertation

Belgrade, 2025

Ментори:

др Зоран Вујчић, редовни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Маринела Шокарда Славић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, ИХТМ – Центар за хемију

Чланови комисије:

др Милан Којић, научни саветник
Института за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“

др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Милан Николић, ванредни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Датум одбране: _____.

Ова докторска дисертација је урађена на Катедри за биохемију, Хемијског факултета, Универзитета у Београду.

Пре свега, захваљујем се свом ментору, др Зорану Вујчићу, на подршци и вођству током израде свих сегмената ове докторске дисертације. Његова експертиза, савети и сугестије били су од великог значаја за постизање високог научног нивоа овог рада.

Посебну захвалност упућујем менторки, др Маринели Шокарди Славић, на непрекидној помоћи, подршци и инспирацији. Њена вера у овај рад, као и знање и савети, помогли су ми да превазиђем све изазове и истрајем до успешног завршетка.

Неизмерну захвалност дугујем др Милану Којићу, научном саветнику, из Института за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“, на изузетној помоћи, конструктивним саветима и идејама које су значајно допринеле развоју и току овог рада, пре свега из области рекомбинанте DNA технологије. Његова подршка и стручност били су од велике важности за постизање успеха у овом истраживању.

Захвалност дугујем др Марији Гавровић-Јанкуловић и др Милану Николићу на корисним саветима, помоћи и сугестијама које су ми дали током писања дисертације.

Такође, желим да се захвалим својим драгим колегиницама – Биљани, Наташи, Мири и Александри, пре свега на лепом дружењу и подршци, као и на помоћи и сарадњи.

Све ово не би имало смисла без мојих пријатеља и колега који су ми улепшали дане проведене на факултету, у лабораторији и на паузама за кафу- Сања, Ненаде, Марија, Ратко, Исидора, Стефане и Небојша, хвала на предивним заједничким тренуцима! Такође, желим да се захвалим својим другарицама- Марини и Тањи, које су увек уз мене. Посебно желим да се захвалим свом дечку Анти који ми је највећа морална подршка.

На крају, желим да упутим најдубљу захвалност својој породици, својој мами Сандри и брату Петру, који су ми пружили безусловну љубав, подршку и разумевање током читавог процеса. Свом оцу Горану, који је увек био мој највећи ослонац и подршка и на чију сам иницијативу уписала и завршила ове студије- дугујем вечну захвалност. Иако више није са нама, његова љубав и вера у мене настављају да ме воде кроз живот.

Ову докторску дисертацију посвећујем своме тати.

“Примена нових рекомбинантних пектинолитичких ензима побољшању карактеристика воћних сокова”

САЖЕТАК

Ова докторска дисертација се бави изоловањем, карактеризацијом, рекомбинантном производњом и оптимизацијом синтезе пектинолитичких ензима у циљу њихове примене у индустрији воћних сокова, ради побољшања њихове текстуре, бистрине и квалитета. Истраживање обухвата развој нових стратегија за оптимизацију производње пектинолитичких ензима и коришћење савремених биотехнолошких метода, као што су хетерологна експресија у микроорганизмима, ради постизања економичније и ефикасније производње. Полигалактуроназе (ПГ) су међу најзначајнијим пектинолитичким ензимима и играју кључну улогу у деполимеризацији пектина. Ови ензими хидролизују α -1,4-гликозидне везе у молекулима полигалактуронске киселине, што резултује ослобађањем растворљивих галактуронских фрагмената. У дисертацији је посебно анализирана биохемијска карактеризација ПГ, укључујући одређивање њихове оптималне температуре, рН, молекулске масе и изоелектричне тачке. Показано је да ПГ имају критичну улогу у смањењу вискозности воћних сокова и унапређењу процеса отечњавања, што је од суштинске важности за повећање приноса и добијање бистрог и стабилног производа. Пектин лијазе су друга важна група пектинолитичких ензима која катализује нехидролитичку разградњу пектина путем β -елиминације, ослобађајући незасићене галактуронске фрагменте. За разлику од хидролазних ензима, пектин лијазе не производе метанол током реакције, што их чини посебно погодним за примену у преради воћних сокова и вина, где је важно избећи повећање концентрације метанола. У дисертацији су тестиране пектин лијазе из различитих бактеријских изолата, посебно рода *Bacillus*, и утврђено је да имају изузетну активност и стабилност при различитим рН и температурама. Ови ензими су значајни за уклањање замућености и побољшање транспарентности воћних сокова, као и за производњу безбедних и квалитетних напитака.

Клонирање гена за пектинолитичке ензиме у *Escherichia coli* је важан аспект истраживања. *E. coli* је широко коришћен систем за експресију због своје једноставности рада, великог броја експресионих вектора, брзог раста и високе продуктивности. У овом раду, гени који кодирају пектин хидролазе и пектин лијазе су изоловани из *Bacillus velezensis* 16В и *Aspergillus tubingensis* FAT 43, а затим клонирани у векторе pMALc5HisEk и pQE_Ek за експресију у *E. coli*. Производња ензима у овом систему омогућила је високе приносе, брзо добијање протеина и економичну производњу. Посебно је важно нагласити да ови експресиони вектори обезбеђују лако пречишћавање рекомбинантних ензима, јер протеинима додају 6His-ознаке за афинитетну хроматографију везивања за метал.

Квасац *Pichia pastoris* је коришћен као модел еукариотског система за експресију пектинолитичких ензима, са посебним фокусом на посттранслационе модификације које су од суштинске важности за стабилност и активност ензима. У овом систему је клониран ген за ендо-полигалактуроназу из *A. tubingensis* FAT 43, при чему је експресија индукована метанолом. Овај систем се показао веома погодним за производњу ензима еукариотског порекла. У експериментима ове дисертације је показано да интеграција пектинолитичких ензима у индустријске процесе може побољшати квалитет и количину произведених воћних сокова, уз истовремено смањење трошкова и повећање ефикасности. Примена савремених техника клонирања и хетерологне експресије у *E. coli* и *P. pastoris* обезбедила је производњу пречишћених ензима са побољшаним својствима, што доприноси њиховој широкој примени у прехранбеној и другим индустријама.

Кључне речи: пектинолитички ензими, ендо-полигалактуроназа, пектин лијаза, оптимизација, прерада воћних сокова, рекомбинантна производња ензима

Научна област: Хемија

Ужа научна област: Биохемија

“Application of novel recombinant pectinolytic enzymes in improving the characteristics of fruit juices”

ABSTRACT

This doctoral dissertation focuses on isolation, characterization, recombinant production and optimization of the synthesis of pectinolytic enzymes for their application in the fruit juice industry to improve the texture, clarity, and quality of fruit juices. The research includes the development of new strategies for optimizing the production of pectinolytic enzymes and the use of modern biotechnological methods, such as heterologous expression in microorganisms, to achieve more economical and efficient production.

Polygalacturonases (PG) are among the most significant pectinolytic enzymes, playing a crucial role in pectin depolymerization. These enzymes hydrolyze α -1,4-glycosidic bonds in polygalacturonic acid molecules, resulting in the release of soluble galacturonic fragments. The dissertation specifically analyzed the biochemical characterization of PG, including the determination of its optimal temperature, pH, molecular weight, and isoelectric point. It was demonstrated that PG enzymes play a critical role in reducing the viscosity of fruit juices and enhancing the liquefaction process, which is essential for increasing yield and producing clear and stable products.

Pectin lyases represent another important group of pectinolytic enzymes that catalyze the non-hydrolytic degradation of pectin via β -elimination, releasing unsaturated galacturonic fragments. Unlike hydrolase enzymes, pectin lyases do not produce methanol during the reaction, making them particularly suitable for use in fruit juice and wine processing, where it is crucial to avoid increasing methanol concentrations. In the dissertation, pectin lyases from various bacterial isolates, particularly from the genus *Bacillus*, were tested, and it was found that they exhibit exceptional activity and stability under different pH and temperature conditions. These enzymes are significant for removing turbidity, enhancing fruit juice transparency, and producing safe and high-quality beverages.

Cloning of genes encoding pectinolytic enzymes in *Escherichia coli* was an important aspect of the research. *E. coli* is widely used as an expression system due to its simplicity for manipulation, large number of expression vectors, rapid growth, and high productivity. In this work, genes encoding pectin hydrolases and pectin lyases were isolated from *Bacillus velezensis* 16B and *Aspergillus tubingensis* FAT 43, and then cloned into the vectors pMALc5HisEk and pQE_Ek for expression in *E. coli*. Enzyme production in this system allowed high yields, rapid protein production, and cost-effective manufacturing. It is particularly important to emphasize that these expression vectors provide easy purification of recombinant enzymes because they add 6His-tags to the proteins for metal-binding affinity chromatography.

The yeast *Pichia pastoris* was used as a model eukaryotic system for the expression of pectinolytic enzymes, with a special focus on post-translational modifications essential for enzyme stability and activity. In this system, the gene encoding endo-polygalacturonase from *A. tubingensis* FAT 43 was cloned, and its expression was induced by the addition of methanol. This system proved highly suitable for producing enzymes of eukaryotic origin. In the experiments of this dissertation, it was demonstrated that the integration of pectinolytic enzymes into industrial processes significantly improves fruit juice yield and quality, while simultaneously reducing costs and increasing efficiency. The application of modern cloning techniques and heterologous expression in *E. coli* and *P. pastoris* has ensured the production of purified enzymes with enhanced properties, contributing to their widespread use/application in the food and other industries.

Keywords: pectinolytic enzymes, endo-polygalacturonase, pectin lyase, optimization, fruit juice processing, recombinant enzyme production

Scientific field: Chemistry

Narrow scientific field: Biochemistry

Листа скраћеница и акронима коришћених у тексту

АА	акриламид
АПС	амонијум персулфат
АС	амонијум сулфат
BBD	Box – Behenken-ov дизајн
ЦП	цитрусни пектин
CBV	<i>coomassie brilliant blue</i>
CDD	<i>енгл. central composite design</i> - централни композитни дизајн
DOE	<i>енгл. design of experiment</i> - експериментални дизајн
DNS	динитросалицилна киселина
ЕФ	електрофореза
ФЕ	екстракт ферментационе течности
ХГ	хомогалактуронан
LC	<i>енгл. liquid chromatography</i> - течна хроматографија
МС	масена спектроскопија
НМП	ниско-метиловани пектин
OD	<i>енгл. optical density</i> - оптичка густина
PDA	<i>енгл. potato dextrose agar</i> - кромпир декстрога агар
PCR	<i>енгл. polymerase chain reaction</i> - ланчана реакција полимеризације
ПГ	полигалактуроназа
ПЛ	пектин лијаза
ПМГ	полиметилгалактуроназа
РГ	рамногалактуронан
RR	рутенијум црвено
SmF	<i>енгл. submerged fermentation</i> - ферментација у течном медијуму
SSF	<i>енгл. solid state fermentation</i> - ферментација на чврстој подлози
SDS	<i>енгл. sodium dodecylsulfate</i> - натријум додецилсулфат
ТЕМЕД	тетраметилендиамин
ВМП	високо-метиловани пектин

1. УВОД.....	1
2. ОПШТИ ДЕО	2
2.1 Структура и улога пектина у биљкама.....	2
2.2 Пектинолитички ензими	4
2.2.1 Класификација и особине пектинолитичких ензима.....	4
2.2.2 Природни извори и производња пектинолитичких ензима	7
2.2.2.1 Ферментационе технике за производњу пектинолитичких ензима	7
2.2.2.2 Дизајн експеримента.....	9
2.3 Рекомбинантни ензими у биотехнологији	11
2.3.1 Модел системи за експресију рекомбинантних ензима.....	11
2.3.2 Хетерологна експресија пектин хидролаза у <i>P. pastoris</i>	12
2.3.3 Хетерологна експресија пектин лијаза у <i>E. coli</i>	13
2.4 Примена ензима у преради воћних сокова.....	14
2.4.1 Физичко-хемијска својства воћних сокова	14
2.4.2 Утицај пектина на текстуру и квалитет воћних сокова	15
2.4.3 Пектинолитички третман за побољшање карактеристика воћних сокова.....	16
2.4.4 Биотехнолошки потенцијал заостале пулпе	17
3. НАШИ РАДОВИ	18
3.1 Одабир изолата гљиве рода <i>Aspergillus</i> spp. за продукцију пектинолитичких ензима	18
3.1.1 Изоловање и идентификација новог изолата гљиве са плода дуње	18
3.1.2 Претрага потенцијалних пектинолитичких произвођача <i>Aspergillus</i> spp.	19
3.1.2.1 Припрема инокулума	20
3.1.2.2 Ферментација у течном медијуму.....	20
3.1.2.3 Пектинолитичка активност	20
3.2 Оптимизација услова производње пектинолитичких ензима.....	22
3.2.1 Анализа значајних параметара за ферментацију на чврстој подлози	22
3.2.2 Финална SSF оптимизација.....	25
3.3 Пречишћавање ендо-пектинолитичких ензима.....	26
3.4 Биохемијска карактеризација ендо-пектиназе	27
3.4.1 Идентификација доминантне изоформе ендо-пектиназе методом масене спектрометрије	29
3.4.2 Температурна и рН зависност активности и стабилности ПГ II.....	29
3.4.3 Супстратна специфичност ПГ II.....	31
3.5 Рекомбинантна производња ПГ II.....	32
3.5.1 Клонирање гена у <i>E. coli</i>	34
3.5.2 Клонирање гена и експресија у <i>P. pink</i>	34
3.6 Пектинолитички ензими из <i>Bacillus</i> spp.	35
3.6.1 Рекомбинантна производња пектин лијазе	36
3.6.1.1 Биохемијска карактеризација <i>BvPelB</i>	37
3.6.1.1.1 Анализа дводимензионалне и тродимензионалне структуре <i>BvPelB</i>	37
3.6.1.1.2 Одређивање молекулске масе и рI вредности <i>BvPelB</i>	40
3.6.1.1.3 Утицај рН и температуре на стабилност и активност <i>BvPelB</i>	40
3.6.1.1.4 Испитивање утицаја металних јона и агенаса на <i>BvPelB</i>	42
3.6.1.1.5 Супстратна специфичност <i>BvPelB</i>	42
3.6.1.1.5.1 Испитивање начина разградње супстрата од стране <i>BvPelB</i>	42
3.6.1.1.5.2 TLC анализа производа хидролизе.....	42

3.7 Примена пектинолитичких ензима у побољшању карактеристика воћних сокова.....	43
3.7.1 Примена пектинолитичког комплекса ензима.....	43
3.7.2 Примена ПГ II у побољшању карактеристика воћних сокова	44
3.7.2.1 Испитивање антиоксидативних својстава воћних сокова	45
3.7.3 Примена <i>BvPelB</i> у преради неутралних сокова.....	46
3.7.3.1 Оптимизација услова <i>BvPelB</i> третмана сокова.....	46
3.7.3.2 Стабилност сокова	48
3.7.3.3 Одређивање садржаја метанола у соковима	48
3.8 ЗАКЉУЧЦИ.....	50
4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	51
4.1 Пектинолитички ензими из <i>Aspergillus</i> spp.....	52
4.1.1 Изоловање и таксономска идентификација новог изолата гљиве са плода дуње ...	52
4.1.2 Претрага потенцијалних пектинолитичких произвођача <i>Aspergillus</i> spp.	54
4.1.2.1 Припрема спора.....	54
4.1.2.2. Ферментација у течном медијуму.....	54
4.1.2.3 Пектинолитичка активност	54
4.1.2.3.1 Одређивање укупне пектинолитичке активности DNS методом	54
4.1.2.3.2 Одређивање ендо-пектиназне активности.....	55
4.1.2.3.3 Одређивање ендо-пектинолитичке активност дифузионим тестом.....	56
4.2 Оптимизација ферментације на чврстој подлози за производњу пектинолитичких ензима из соја <i>A. tubingensis</i> FAT 43	56
4.2.1 Анализа значајних параметара за ферментацију на чврстој подлози	56
4.2.2 Финална оптимизација- Optimal (Custom) дизајн.....	57
4.3 Пречишћавање ендо-ПГ	58
4.3.1 Ултрафилтрација	58
4.3.2 Таложење етанолом.....	58
4.3.3 Таложење амонијум-сулфатом	58
4.3.4 Гел хроматографија на Sephacryl S100 HR	58
4.3.4.1 Одређивање концентрације протеина	59
4.3.5 Јоноизменивачка хроматографија на колони DEAE Sephadex A 25	60
4.3.6 Јоноизменивачка хроматографија на колони Q Sepharose.....	60
4.3.7 Биохемијска карактеризација ендо-ПГ	61
4.3.7.1 SDS-PAGE електрофореза	61
4.3.7.2 Изоелектрично фокусирање и зимограмска детекција ендо-ПГ	62
4.3.7.3 Идентификација доминантне изоформе ендо-ПГ методом масене спектрометрије	63
4.3.7.4 Температурна и рН зависност активности и стабилности ПГ II.....	64
4.3.7.4.1 Одређивање температурног оптимума.....	64
4.3.7.4.2 Одређивање термалне стабилности.....	65
4.3.7.4.3 Одређивање кинетике термалне инактивације.....	65
4.3.7.5 Одређивање оптималне рН активности	65
4.3.7.6 Одређивање рН стабилности	65
4.3.8 Супстратна специфичност ПГ II.....	65
4.3.8.1 Танкослојна хроматографија.....	65
4.4 Рекомбинантна производња ПГ II.....	66
4.4.1 Амплификација гена <i>pgalII</i>	66
4.4.2 Рекомбинантна производња ПГ II у <i>E. coli</i>	67
4.4.3 Рекомбинантна производња ПГ II у <i>P. pink</i>	67
4.4.3.1 Клонирање ПГ II у <i>P. pink</i>	67

4.4.3.2 Експресија ПГ II у <i>P. pink</i>	68
4.5 Пектинолитички ензими из <i>Bacillus spp.</i>	68
4.5.1 Проналажење потенцијални произвођачи пектинолитичких ензима из <i>Bacillus spp.</i>	68
4.5.1.1 Одређивање пектин лијазне активности	69
4.5.2 Рекомбинантна производња пектин лијазе	69
4.5.2.1 Изоловање хромозомске DNA из <i>B. velezensis</i> 16B.....	70
4.5.2.2 Амплификација и експресија гена	71
4.5.2.3 Пречишћавање <i>BvPelB</i>	71
4.5.3 Биохемијска карактеризација <i>BvPelB</i>	72
4.5.3.1 Анализа дводимензионалне и тродимензионалне структуре <i>BvPelB</i>	72
4.5.3.2 Одређивање молекулске масе и pI вредности <i>BvPelB</i>	72
4.5.3.3 Утицај pH и температуре на стабилност и активност <i>BvPelB</i>	73
4.5.3.3.1 Одређивање температурног оптимума <i>BvPelB</i>	73
4.5.3.3.2 Одређивање термалне стабилности <i>BvPelB</i>	73
4.5.3.3.3 Одређивање енергије активације (E_a)	73
4.5.3.3.4 Одређивање pH оптимума <i>BvPelB</i>	73
4.5.3.3.5 Одређивање pH стабилности <i>BvPelB</i>	73
4.5.3.4 Испитивање утицаја металних јона и агенаса на <i>BvPelB</i>	73
4.5.3.5 Супстратна специфичност <i>BvPelB</i>	74
4.5.3.5.1 Испитивање начина разградње супстрата од стране <i>BvPelB</i>	74
4.5.3.5.2 TLC анализа производа хидролизе <i>BvPelB</i>	75
4.6 Примена пектинолитичких ензима у побољшању карактеристика воћних сокова.....	75
4.6.1 Примена пектинолитичког комплекса ензима.....	75
4.6.1.1 Отечњавање воћних каша.....	75
4.6.1.2 Кларификација воћних сокова	75
4.6.1.3 Одређивање концентрације редукујућих шећера у третираним и нетретираним соковима.....	76
4.6.2 Примена ПГ II у побољшању карактеристика воћних сокова	76
4.6.2.1 Отечњавање воћних каша.....	76
4.6.2.2 Кларификација воћних сокова	76
4.6.2.3 Испитивање антиоксидативних својстава воћних сокова	76
4.6.2.3.1 Одређивање укупног садржаја фенолних једињења.....	76
4.6.2.3.2 Антиоксидативна активност третираних и нетретираних сокова	77
4.6.3 Примена <i>BvPelB</i> у преради неутралних сокова.....	78
4.6.3.1 Оптимизација услова <i>BvPelB</i> третмана сокова.....	78
4.6.3.2 Стабилност сокова	79
4.6.3.3 Одређивање садржаја метанола у соковима	79
ЛИТЕРАТУРА:.....	81

1. УВОД

Пектинолитичка група ензима је незаобилазна у индустрији воћних сокова и сматрају се важним у комерцијалном сектору, посебно због способности да допринесу производњи добро избистрених и стабилних сокова са повећаним приносом (1). Употреба пектинолитичких ензима у овој индустрији значајно доприноси повећању приноса и унапређењу квалитета финалног производа. Комерцијално су се користили у обради сокова и вина, још од 1930-их година (2). Њихова употреба се временом значајно повећавала, посебно у индустрији хране, пића, текстила, пулпе и папира. Услед широке биотехнолошке примене, њихова годишња производња чини значајан део укупне индустријске производње ензима (3).

Пектинолитички ензими су кључни за разградњу дугих и сложених молекула пектина у воћној пулпи. Пектин је структурни полисахарид који доприноси замућености воћних сокова, чинећи их вискозним и мутним. Његовом разградњом вискозност воћног сока се смањује, побољшава се екстракција пулпе, структура гела се разлаже и тиме се олакшава добијање воћног сока са већим приносом (4).

Највећи допринос у избистривању, отечњавању и побољшању квалитета воћних каша имају ендо-полигалактуроназе. Оне хидролизују унутрашње регионе пектинских молекула, разграђујући их у мање, растворљиве фрагменте чиме се ефикасно смањује вискозност сока нарушавањем сложене пектинске мреже, што резултује бистријим и транспарентнијим соковима (5). Поред гљивичних ендо-полигалактуроназа значајну примену у индустрији имају пектин лијазе из бактерија, које имају способност да разграђују високо естерификоване пектине у мање, нетоксичне молекуле путем реакције β -елиминације, чиме се избегава ослобађање штетног метанола. Осим тога, ови ензими су корисни за добијање неутралних сокова који су природно кисели. Неутрализација киселих сокова омогућава формирање стабилнијих формулација које се могу обогатити хранљивим састојцима, као што су витамини, минерали и пребиотици, чија би стабилност и искористљивост иначе била смањена у киселој средини (6).

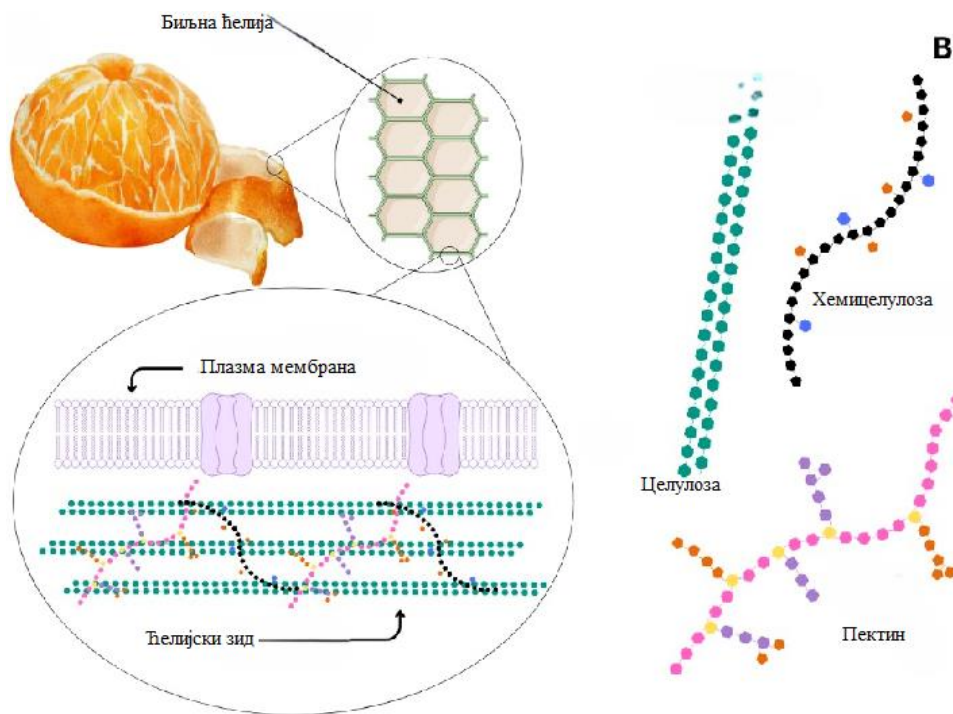
Оптимална производња пектинолитичких ензима постиже се кроз гајење гљива и бактерија у одговарајућем медијуму, или ферментацијом на чврстој подлози са природним супстратима где је уравнотежен однос простих угљених хидрата и пектина (7). Коришћење пољопривредног отпада у процесу ферментације смањује трошкове производње, као и количину отпада који се ослобађа у животну средину. Оптимизација производње ових ензима захтева контролу параметара ферментације, као што су рН, температура, трајање ферментације, састав супстрата и ниво влажности ваздуха. За ову сврху оптимизације услова најчешће служи метода дизајна експеримената, која омогућава систематско и ефикасно манипулисање подацима уз смањење броја експеримената потребних за постизање циљаних резултата.

Постоји значајна потреба за откривањем нових ензима који су ефикасни и стабилни при умереним температурама и различитим рН вредностима, због чега су недавна истраживања углавном била фокусирана на претраживање и инжењерисање сојева који производе пектин лијазе, јер је потреба за овим ензимима у индустрији све већа, а постојећи процеси производње често нису довољно ефикасни или економски одрживи. За хетерологну производњу пектин лијаза користе се домаћини као што су *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae* и *Pichia pastoris* (8).

2. ОПШТИ ДЕО

2.1 Структура и улога пектина у биљкама

Пектини су сложени полисахариди који се налазе у вишим биљкама, где играју важну улогу у очувању структурног интегритета целулозних мрежа, задржавању воде, развоју ткива, адхезији ћелија и регулисању апопластичне порозности (10). Највише их има у средишњој ламели и примарном ћелијском зиду биљних ћелија (слика 1), где чине око једне трећине укупне масе ћелијског зида (11).



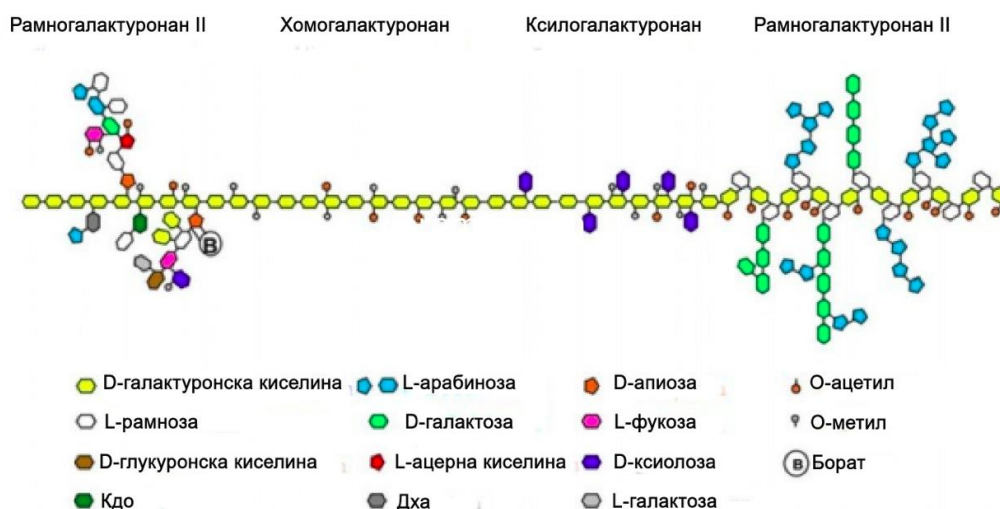
Слика 1. Структура ћелијског зида биљке (12)

Плодови воћа су главни извор пектина. У незрелим плодовима пектин се налази као нерастворљив протопектин, који је везан за целулозна влакна и доприноси чврстости и стабилности ћелијског зида. Током сазревања воћа, пектинолитички ензими разграђују полигалактуронски ланац и бочне ланце пектина, што доводи до омекшавања ткива услед хидролизе (13). Пектински полисахариди постају растворљивији због деполимеризације и уклањања бочних ланаца неутралних шећера, при чему губе ковалентну везу са ванћелијским матриксом (14). Ове промене у структури пектина резултат су синергистичке активности различитих ензима. Растворљиви пектини имају способност гелирања, формирајући тродимензионалну мрежу у којој се задржавају вода и растворљиве супстанције (15). Гелирајућа особина пектина зависи од фактора као што су температура, рН, степен естерификације, садржај шећера и интеракција између калцијумових јона и неестерификованих карбоксилних група (16). Степен естерификације пектина је дефинисан процентом естерификованих јединица галактуронске киселине у основном ланцу пектина. (17). У зависности од броја метилестерификованих група, односно степена метиловања, пектини се класификују на високометилване (степен естерификације $>50\%$) и нискометилване (степен естерификације $<50\%$) (18). Високометилвани пектини карактеристични су за формирање гелова у присуству високе концентрације шећера и киселих услова ($\text{pH} < 3,5$). Насупрот томе, нискометилвани пектини формирају гелове у присуству калцијумових јона, без потребе за високим концентрацијама шећера, што их чини погодним за примену у дијететским производима (19).

Најчешћи структурни домени пектина приказани су на слици 2. Пектински полисахариди се могу класификовати у три главна домена (19,20):

1. **Хомогалактуронан (ХГ)** чини више од 60% укупног пектина и представља његов основни ланац. Најчешће се састоји од 70-120 молекула D-галактуронске киселине које су повезане у линеарни ланац α -1,4-гликозидним везама (21). Такође се назива и полигалактуронска киселина или пектат. Степен и образац естерификације варира у зависности од биљних врста одакле је пектин екстрахован као и од степена зрења воћа (22);
2. **Рамногалактуронан I (РГ-I)** је јединствен међу пектинским полисахаридима, јер му је основни ланац састављен од понављајућих дисахарида галактуронске киселине и α -рамнозе (19). Представља 20-30% укупног пектина (23). Остаци α -рамнозе су обично разгранати и укључују линеарне или разгранате ланце дефинисаних полисахарида: α -1,5-арабинана и β -1,4-галактана. Бочни ланци РГ-I могу се даље гранати садржавајући следеће шећере: арабинозу, арабинан, галактан, арабиногалактан (24,25);
3. **Рамногалактуронан II (РГ-II)** је најсложенији домен пектина и чини око 10% полисахарида. Састоји се од основног ланца ХГ и четири (А-Д) добро дефинисана бочна ланца. Бочни ланци А (октасахарид) и Б (нонасахарид) су повезани са основним ланцем ХГ на О-2 позицији. Бочни ланци Ц и Д су дисахариди и повезани су са основним ланцем ХГ на О-3 позицији (25–27). Ова четири дефинисана и добро конзервирана бочна ланца доприносе комплексности РГ-II молекула, садрже 12 различитих врста моносахарида, укључујући следеће ретке шећере: 2-О-метилксилоза, 2-О-метилфруктоза, ацерна киселина, 2-кето-3-деокси-D-лихсо-хептулосариска киселина (Дха) и 2-кето-3-деокси-D-мано-октулозонска киселина (Кдо) (27);

Разноликост у структури пектина зависи од биљног материјала и степена зрелости плодова (29), а његова функционалност може бити модификована ензимским и хемијским методама. Ове модификације омогућавају широку примену пектина у различитим областима, укључујући прехранбену и фармацеутску индустрију, биомедицину и друге секторе. У прехранбеној индустрији, најчешће се користи као средство за гелирање у производњи џемов, желеа и других сличних производа (30), као и за израду биоразградивих амбалажних материјала, што доприноси одрживости и смањењу утицаја на животну средину (31). У фармацеутској индустрији, пектин се користи као биокompatibilни материјал за инкапсулацију лекова, омогућавајући контролисано ослобађање активних супстанција (32). Биомедицинску примену пектини налазе у производњи облога за ране, контактних сочива и катетера, захваљујући својим биоактивним и нетоксичним својствима (33).



Слика 2. Структурни домени пектина (34)

2.2 Пектинолитички ензими

Пектинолитички ензими, познатији као пектиназе, представљају велику групу ензима који катализују деполимеризацију и деестерификацију пектинског полисахарида. Разградњом пектина, пектиназе омогућавају микроорганизмима приступ изворима угљеника, истовремено повећавајући доступност других хранљивих материја које се налазе у биљним ткивима. Њихова улога је важна у процесима патогенезе, где фитопатогени микроорганизми, као што су *Erwinia* и *Botrytis*, лучше пектиназе које имају улогу у разлагању структурних баријера у ћелијским зидовима биљака, чиме омогућавају инфекцију (35–37).

Осим своје природне функције, пектинолитички ензими налазе примену у разним гранама индустрије, јер ефикасно разлажу сложене пектинске структуре. У прехранбеној индустрији се користе за повећање приноса и квалитета производа као што су воћни сокови и вина. На пример, додавање пектиназа током производње сока омогућава лакше бистрење и повећану екстракцију сока из пулпе воћа (38). У текстилној индустрији, ови ензими омогућавају ефикасно омекшавање и чишћење биљних влакана, чиме се смањује потреба за хемијским третманима (39). Такође, ови ензими се користе за пречишћавање отпадне воде које садрже пектинске материјале, што је посебно важно у индустрији попут прераде агрума и производњи хране. Ензимском разградњом пектинских компоненти у отпадној води смањује се њихова вискозност и омогућава ефикаснија филтрација, чиме се побољшава квалитет воде и олакшава даља прерада (40,41).

Напредак у биотехнологији довео је до проналажења ензима са специфичним карактеристикама за примену у различитим процесима и са побољшаним особинама, као што су термостабилност, активност у широком распону рН вредности и отпорност на инхибиторе (42). На пример, изоловање термостабилних пектиназа из термофилних микроорганизма попут *Thermotus lanuginosus* омогућила је њихову употребу у процесима који захтевају високе температуре, као што је производња биоетанола (43).

2.2.1 Класификација и особине пектинолитичких ензима

Према класификацији Ензимске комисије и Међународне уније за биохемију, пектиназе се сврставају у групу гликозид-хидролаза (ГХ 28) (44). На основу механизма деловања на пектинске молекуле сврставају се у три класе:

Гликозид-хидролазе, које обухватају ензиме који хидролизују гликозидне везе у пектину, укључујући полигалактуроназу (ПГ; ендо-ПГ, ЕС 3.2.1.15; и егзо-ПГ, ЕС 3.2.1.67), егзо-полигалактурозиду (ЕПГД; ЕС 3.2.1.82), рамногалактуроназу или РГ-хидролазу (РГХ; ЕС 3.2.1.171), РГ-галактуронохидролазу (РГ-ГХ; ЕС 3.2.1.173), РГ-рамнохидролазу (РГ-РХ; ЕС 3.2.1.174) и ендо-ксилогалактуронан хидролазу (ендо-КГХ; ЕС 3.2.1.);

Полисахарид-лијаза, делују кроз β -елиминацију одређених веза у пектину, обухватајући пектин лијазу (ПЛ; ЕС 4.2.2.10), пектат лијазу (ПГЛ; ЕС 4.2.2.2), егзо-пектат лијазу (егзо-ПГЛ; ЕС 4.2.2.9), рамногалактуронан лијазу (РГЛ; РГ ендо-лијазу, ЕС 4.2.2.23; и РГ егзо-лијазу, ЕС 4.2.2.24), као и олигогалактуронат лијазу (ОГЛ; која је сврстана у породицу пектат лијаза 22; ЕС 4.2.2.6);

Карбохидрат-естеразе, које делују на естарске везе у пектину, укључују пектин метил естеразу (ПМЕ; ЕС 3.1.1.11), пектин ацетилестеразу (ПАО; ЕС 3.1.1.6) и рамногалактуронан ацетил естеразу (РАЕ; ЕС 3.1.1.86) (45). Класификација пектинолитичких ензима приказана је у Табели 1.

Међу пектин хидролазама, ПГ су најзначајнији ензими у процесу деполимеризације пектина и катализују хидролизу α -1,4-гликозидних веза у полигалактуронској киселини, при чему настаје D-галактуронат. ПМГ катализују хидролизу метил-естарских веза у молекулима високо-метилованог пектина, при чему се ослобађа пектинаста киселина и метанол (46). Углавном се комерцијално производе помоћу сојева *A. niger* (47). Обе групе пектин хидролаза (ПМГ и ПГ) могу деловати ендо и егзо. Ендо-ПГ и ендо-ПМГ катализују насумичну

деградацију супстрата. Егзо-ПГ и егзо-ПМГ катализују раскидање веза на нередукуюћим крајевима супстрата и дају моногалактуронат или дигалактуронат (48). Већина ендо-ПГ има оптимални рН у киселом опсегу од 2,5 до 6, док је оптимална температура за њихову активност између 30 и 50°C (49).

Табела 1. Класификација пектинолитичких ензима (50)

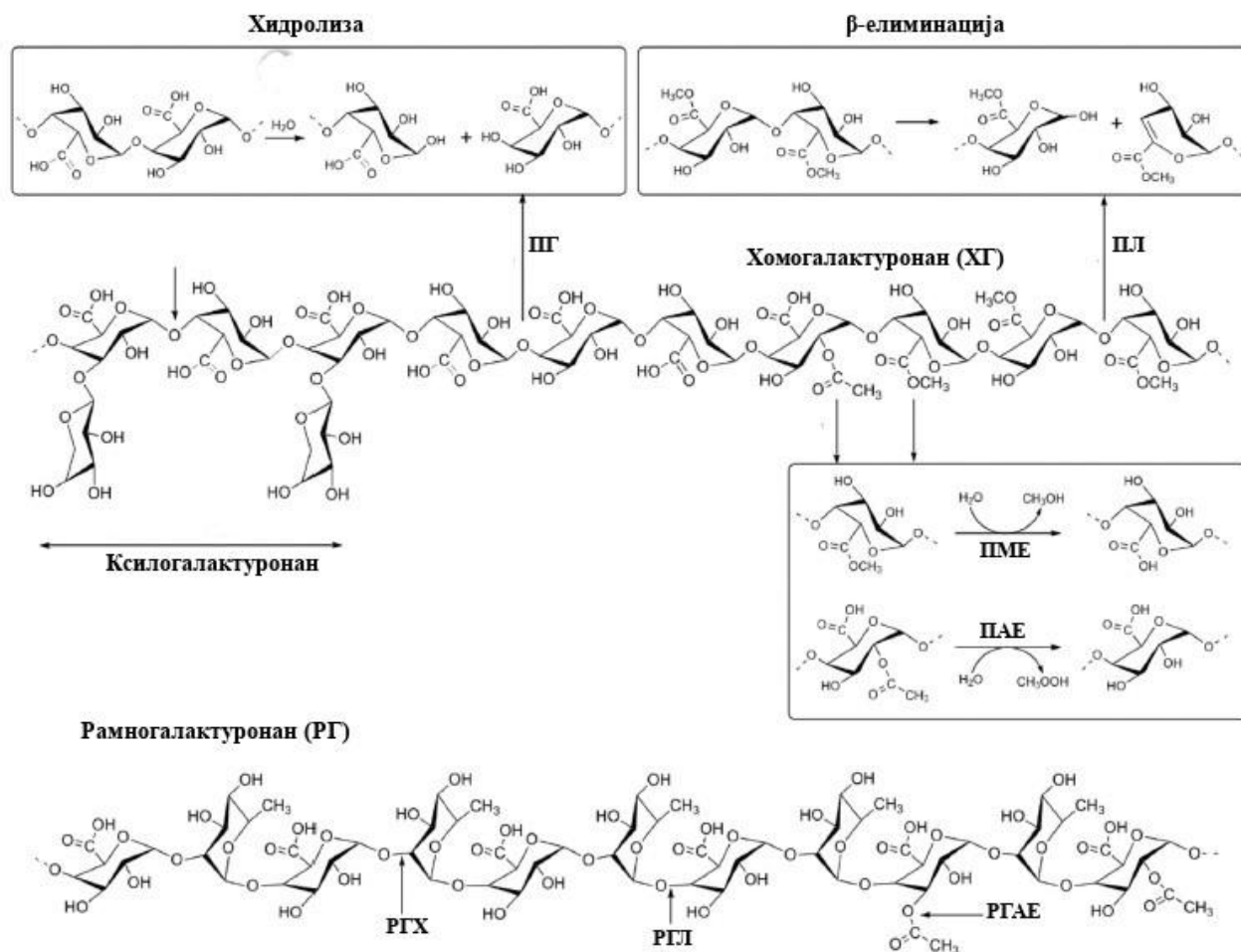
Ензим	Е.С бр.	Супстрат	Реакција	Производ
ендо-полигалактуроназа	3.2.1.15	Пектинска киселина	Хидролиза	Олигогалактурониди
егзо-полигалактуроназа I	3.2.1.67	Пектинска киселина	Хидролиза	Моногалактурониди
егзо-полигалактурозидаса II	3.2.1.82	Пектинска киселина	Хидролиза	Дигалактуронат
Рамногалактуроназа	3.2.1.171	РГ-I	Хидролиза	Олигосахариди са β -D-галактуронском киселином
РГ-галактуронохидролаза	3.2.1.173	РГ олигосахариди	Хидролиза	D-Галактуронска киселина
РГ-рамнохидролаза	3.2.1.174	РГ олигосахариди	Хидролиза	β -L-Рамноза
ендо-ксилогалактуронан хидролаза	3.2.1.	Пектин	Хидролиза	Ксилозиловани олигогалактурониди
Пектин лијаза	4.2.2.10	Пектин	β -елиминација	Незасићени галактурониди
Пектат лијаза	4.2.2.2	Пектинска киселина	β -елиминација	Незасићени галактурониди
Егзо-пектат лијаза	4.2.2.9	Пектинска киселина	β -елиминација	Незасићени галактурониди
РГ ендо-лијаза	4.2.2.23	РГ-I пектин	β -елиминација	L-рамнопираноза + незасићена D-галактопиранозилурунска киселина
РГ егзо-лијаза	4.2.2.24	РГ олигосахариди	β -елиминација	Дисахарид + незасићена D-галактопиранозилурунска киселина
Пектин метил естераза	3.1.1.11	Пектин	Хидролиза	Пектинска киселина + метанол
Пектин ацетил естераза	3.1.1.6	Пектин	Хидролиза	Пектинаска киселина + алкохол
РГ-ацетилестераза	3.1.1.86	РГ-I	Хидролиза	Деацетиловани РГ-I

Пектин естеразе се према типу веза које разграђују у молекулу пектина класификују у две главне групе, пектин метил естеразе (ПМЕ) и пектин ацетил естеразе (ПАЕ). Пектин метил естеразе катализују деестерификацију метоксилних група пектина, ослобађајући метанол и пектинску киселину (51). Пектин ацетил естеразе хидролизују ацетил естре пектина, дајући пектинску киселину и етанол. Особине ПЕ варирају у зависности од порекла. Најчешће им је температурни оптимум између 40 и 60°C. ПМЕ углавном имају шири рН оптимум, од 4 до 8, док ПАЕ могу деловати и у ужем рН опсегу. Активна места ПЕ структурно су прилагођена за специфичне интеракције са супстратима. Активно место ПМЕ садржи каталитичку тријад

амино-киселина (серин, аспартат и хистидин), која омогућава ефикасну хидролизу естарских веза, док активно место ПАЕ садржи хидрофобне џепове који олакшавају везивање и хидролизу ацетил естарских веза. Пектин лијазе катализују нехидролитичку разградњу пектата или пектина, кроз реакције транселиминације гликозидних веза. ПЛ разграђују гликозидне везе у високометилилованим регионима пектина, на четвртом угљенику и истовремено елиминишу водоник са петог угљеника, што доводи до формирања незасићених производа олигогалактуроната.

Пектат лијазе (ПГЛ) разлажу везе у демегилованим регионима пектина производећи незасићени метил-олигогалактуронат. ПЛ не захтевају присуство Ca^{2+} јона, али његова активност може бити стимулирана присуством овог и других катјона, док ПГЛ захтевају присуство Ca^{2+} јона. ПЛ и ПГЛ показују структурну сличност, имају конзервирану паралелну β -хеликсну структуру, али њихова активна места се разликују. Активно место ПЛ садржи ароматичне остатке, док је активно место ПГЛ богато наелектрисаним аминокиселинским остатцима (52).

До сада све описане ПЛ припадају ендо-пектин лијазама, а ПГЛ могу деловати као ендо-пектат лијазе (насуично раскидање) или екзо-пектат лијазе (раскидање веза са нередукујућег краја пектина). Пектин лијазе из *A. niger* производе моно-, ди-, три- и тетрагалактуронате, као и незасићене ди-, три- и тетра-метил-олигогалактуронате (53). Механизам деловања пектинолитичких ензима приказан је на слици 3.



Слика 3. Механизми деловања пектинолитичких ензима (54)

Последњих година обимно су проучаване пектат лијазе, док су пектин лијазе релативно недовољно истражене. Бројне пектат лијазе из родова *Aspergillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Paenibacillus* и *Streptomyces* су идентификоване и показују значајан потенцијал за примену у прехранбеној индустрији (55–57). Међутим, због њихове ниске стабилности и

активности у условима индустријске прераде воћа и биљног материјала, само неколико од окарактерисаних ензима се сматра економски одрживим за индустријску употребу. Због тога постоји потреба за откривањем нових ензима који су ефикасни и стабилни на умереним температурама и различитим рН вредностима (58).

2.2.2 Природни извори и производња пектинолитичких ензима

Пектиназе природно производе многи организми, попут бактерија, гљива, квасаца, инсеката, нематода, протозоа и биљака. Присутне су у различитим врстама воћа и поврћа, где учествују у процесу сазревања. Бактерије, гљиве и актиномицете које су до сада највише истражене за производњу пектиназа су родови *Bacillus*, *Aspergillus* и *Streptomyces*. Микроорганизми најчешће започну напад на биљке лучењем пектинолитичких ензима, јер су пектини доступнији у биљним ткивима у поређењу са другим влакнима у биљном ткиву (29). Студије су показале да микроорганизми производе различите врсте пектиназа које се разликују по молекулској маси и кинетичким карактеристикама. Ове разлике у особинама ензима омогућавају микроорганизмима да боље прилагоде свој метаболизам специфичним условима у околини у којој се налазе (59).

Филаментозне гљиве се истичу по већој продукцији пектинолитичких ензима у односу на друге произвођаче, што их чини погодним за употребу у индустријске сврхе. Истраживања су показала да су сојеви из родова *Trichoderma*, *Aspergillus* (60) и *Rhizopus* главни произвођачи пектинолитичких ензима у индустрији. Ове гљиве се најчешће користе за производњу пектиназа ферментационим техникама јер продукују велике количине екстрацелуларних ензима. Род *Aspergillus* обухвата разноврсну групу од неколико стотина врста које се разликују по морфолошким, физиолошким и филогенетским карактеристикама. Најчешће коришћене врсте рода *Aspergillus* за комерцијалну производњу пектиназа су *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. tubingensis*, *A. niveus*, *A. welwitschia* и *A. oryzae*. Овај род припада еукариотским организмима и његова таксономија приказана је у Табели 2.

Табела 2. Таксономија рода *Aspergillus*

Царство	<i>Fungi</i>
Тип	<i>Ascomycota</i>
Подтип	<i>Pezizomycotina</i>
Класа	<i>Eurotiomycetes</i>
Ред	<i>Eurotiales</i>
Фамилија	<i>Trichocomaceae</i>
Род	<i>Aspergillus</i>

Нека истраживања су показала да су међу различитим бактеријским изолатима врсте из рода *Bacillus* препознате као најефикаснији произвођачи пектинолитичких ензима (61). Род *Bacillus* чине Грам-позитивне бактерије, које формирају ендоспоре и познате су по производњи већих количина разноврсних хидролитичких ензима. Овај род обухвата више од 60 врста, од којих су већина сапрофити распрострањени у разноврсним екосистемима, укључујући земљиште, воду, биљке, животиње и екстремна станишта. Неколико врста, као *B. licheniformis*, *B. pumilus* и *B. subtilis*, идентификоване су као изузетно ефикасни произвођачи пектинолитичких ензима (62).

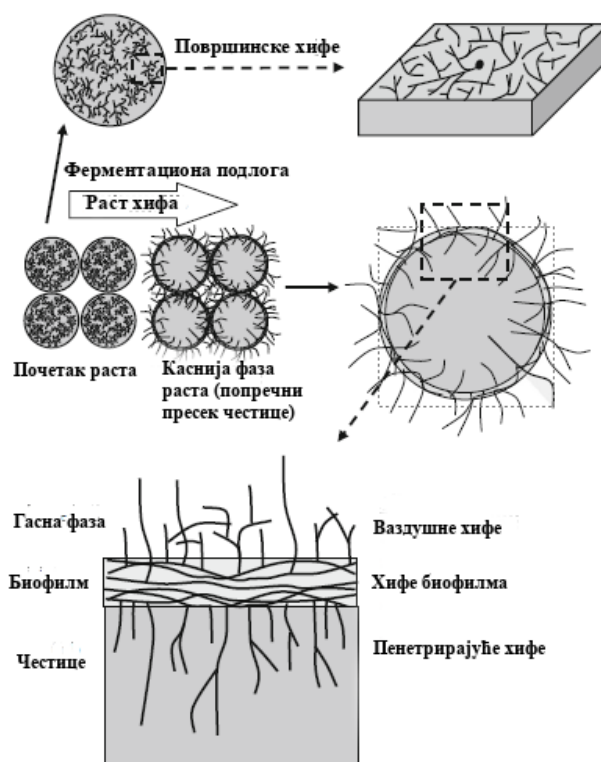
2.2.2.1 Ферментационе технике за производњу пектинолитичких ензима

Оптимизација услова ферментације представља важан корак у скалирању производње пектинолитичких ензима. Ферментација у течној подлози (SmF, од енгл. submerged

fermentation) и ферментација на чврстој подлози (SSF, од енгл. solid state fermentation) су најчешће коришћене технике за производњу пектиназа из гљива и бактерија. Обе методе захтевају прецизну оптимизацију медијума, који треба да садржи адекватне изворе угљеника и друге есенцијалне компоненте које директно утичу на индукцију производње ензима. Ови медијуми морају бити формулисани тако да подстичу синтезу ензима. Одређени параметри, као што су рН вредност, количина хранљивих материја, присуство индуктора и однос воде и чврстих супстанци, одлучујући су за постизање високе продуктивности у оба типа ферментације. Ферментација у течном медијуму представља добро развијен систем за производњу различитих микробних ензима на индустријској скали. Технички је једноставнија за извођење у односу на ферментацију на чврстој подлози и широко се користи за стандардизацију производних процеса, јер омогућава прецизну контролу параметара (63).

Кључни фактор за максималну продукцију пектиназа у ферментацији у течном медијуму је оптималан однос простих угљених хидрата и пектина, при чему пектин делује као главни индуктор синтезе ових ензима (64). Додатна предност ове технике је једноставно пречишћавање ферментационог производа из течног медијума, што олакшава даљу обраду и примену ензима. Погодна је за претрагу великог броја сојева гљива и бактерија како би се идентификовали потенцијални произвођачи ензима. Такође, омогућава испитивање утицаја различитих компоненти медијума и оптимизацију услова производње, јер је у поређењу са ферментацијом на чврстој подлози једноставније контролисати кључне параметре процеса, као што су рН вредност, температура и концентрација хранљивих материја.

Ферментација на чврстој подлози подразумева раст микроорганизама на чврстим материјалима без присуства слободне воде, при чему чврсти супстрат мора поседовати одређени ниво влажности, тако да додата вода формира танак површински водени филм, који омогућава дифузију хранљивих материја кроз течну фазу, док гасови дифундују кроз течну и гасовиту фазу у празнинама између честица супстрата. Замена водене фазе гасовитом подстиче ефикаснији транспорт кисеоника у ферментационим системима. Класификација хифа у SSF процесима на површинске, хифе биофилма, пенетрирајуће и ваздушне, у зависности од окружења у којем се налазе (слика 4), омогућава разумевање њихове интеракције са супстратом, што доприноси оптимизацији ферментације (64). Континуирано мешање оваквих система обично се избегава, јер може довести до оштећења мицелијума, чиме систем остаје нехомоген у различитим деловима. Ова нехомогеност чини оптимизацију процеса сложенијом и захтевнијом у поређењу са ферментацијом у течном медијуму. Као алтернатива континуираном мешању, могу се применити технике као што су секвенцијално мешање, навлажавање подлоге носачима са високом апсорпционом способношћу или континуирана аерација система, што обезбеђује бољи транспорт хранљивих материја и кисеоника.



Слика 4. Класификација хифа у SSF системима заснована на физичком окружењу (65)

Инокулација спора је такође битан фактор у процесу ферментације, а површинско наношење спора често није довољно ефикасно због ограниченог продирања у дубље слојеве супстрата. У лабораторијским условима, као што је ферментација у ерленмајерима, инокулација се изводи додавањем одговарајуће количине инокулума, односно броја спора уз темељно мешање, чиме се обезбеђује равномерно распоређивање спора унутар подлоге. Предности ферментације на чврстој фази су већа продукција ензима, концентрованији крајњи производ, приближнија је природним условима раста гљива и смањује се цена прераде биоотпада. Осим тога, споре добијене овом методом одликују се већом стабилношћу и вишом стопом клијања.

Више гљиве су добро прилагођене расту на чврстим и влажним подлогама. За продукцију пектиназа овом методом често се користе биљни супстрати као што су коре цитрусног воћа и меснати део јабуке. Поред тога, пољопривредни нуспроизводи, попут пшеничних мекиња, пиринчаног брашна и отпада шећерне репе такође су широко заступљени као економичне и ефикасне подлоге за овај процес (66).

2.2.2.2 Дизајн експеримента

Дизајн експеримента (DOE, од енгл. design of experiment) је статистичка техника оптимизације која налази широку примену у разним научним дисциплинама, укључујући оптимизацију микробиолошких ферментација и производњу ензима. За разлику од традиционалних експерименталних приступа који анализирају утицај једне варијабле док све остале остају константне, DOE омогућава истовремено варирање више фактора, чиме пружа детаљнији увид у њихову међусобну интеракцију. На основу добијених података, конструише се одговарајући математички модел за испитивани процес, који помаже у разумевању утицаја експерименталних параметара и може предвидети најоптималније услове процеса. DOE се ефикасно користи за оптимизацију састава медијума и услова раста у микробиолошким ферментацијама (67), као и за оптимизацију услова хидролизе супстрата (68)

Једна од најчешће коришћених стратегија у оквиру DOE је *методологија одговорних површина* (од енгл. *Response Surface Methodology*, RSM), која укључује различите

експерименталне дизајне као што су *централни композитни дизајн* (од енгл. *Central Composite Design*, CCD) и *Box-Behnken дизајн*. Ови дизајни омогућавају успостављање функционалне зависности између фактора и одговора система, при чему се утицај два фактора најчешће графички приказује као тродимензионална површина одговора. Ово омогућава прецизну анализу утицаја испитиваних параметара и проналажење оптималних услова за продукцију пектинолитичких ензима (67, 68).

У оквиру централног композитног дизајна, фактори експеримента варирају на више нивоа да би се истражили њихови утицаји на одговор система. Најчешће се користе три нивоа:

- **Ниво -1 (ниски ниво):** представља најнижу вредност изабраног фактора у експерименту. Ова вредност је испод референтне тачке и користи се за испитивање ефекта смањене вредности параметра (нпр. нижа температура, нижа концентрација супстрата).
- **Ниво 0 (централна вредност):** средња вредност фактора која одговара референтним условима или оптималној претпостављеној вредности. Ова вредност служи као контролни услов и представља основу за поређење резултата.
- **Ниво +1 (високи ниво):** представља највишу вредност фактора, што омогућава процену ефекта повећаног интензитета испитиваног параметра (нпр. виша температура, већа концентрација супстрата).

Примена експерименталних дизајна као што су Plackett-Burman дизајн, CCD и анализа варијанси (од енгл. *Analysis of variance*, ANOVA), може допринети унапређењу производње ензима. Ове методе омогућавају повећање приноса и доприносе развоју економичних и ефикасних приступа у производњи ензима на великој скали (69,70)

Plackett-Burman-ов дизајн је посебно користан за преглед великог броја фактора са ограниченим бројем експеримената. Примењен је у ранијим студијама како би се одредили оптимални услови за производњу ензима ферментацијом на чврстој подлози, испитујући различите параметре као што су температура, pH и концентрација супстрата (71).

Централни композитни дизајн се обично користи након иницијалних испитивања услова, за додатну оптимизацију путем анализе интеракција између различитих фактора. Овај дизајн омогућава стварање полиномног модела другог реда који може да идентификује интеракције и закривљености у површинском одговору, чиме постаје ефикасан алат за прецизно подешавање услова за максималну производњу ензима (70).

ANOVA се често примењује у комбинацији са претходно поменутих дизајнима како би се проценила значајност фактора. У студијама оптимизације продукције ензима, ANOVA помаже у утврђивању фактора који значајно утичу на производњу ензима анализом варијанси међу различитим експерименталним условима. Ова статистичка анализа пружа увид у то које варијабле треба испитивати у даљим експериментима (69).

Након оптимизације ферментације следећи корак је пречишћавање и идентификација најактивнијег ензима. Пречишћавање се ради хроматографским техникама како би се добила висока чистоћа протеина неопходна за даље анализе. Идентификација најчешће укључује LC-MS/MS (Liquid Chromatography-MS/MS), комбинацију течне хроматографије и тандемске масене спектрометрије, која омогућава високу осетљивост у анализи протеина. LC-MS/MS се користи за одређивање молекулске масе, анализу пептидних фрагмената и утврђивање аминокиселинске секвенце ензима (72). На основу добијене аминокиселинске секвенце, протеин се идентификује поређењем са базама података, што служи за проналажење одговарајућег гена у геному микроорганизма. Овај корак је битан за добијање жељеног ензима рекомбинантном технологијом, јер омогућава клонирање у погодни експресиони систем.

2.3 Рекомбинантни ензими у биотехнологији

Рекомбинантни ензими су биолошки катализатори произведени употребом технологије рекомбинантне DNA, која омогућава уметање гена који кодира жељени ензим у организам домаћина. Производња ових ензима може довести до већих приноса, лакшег пречишћавања и побољшане ефикасности у поређењу са традиционалним методама. Овако добијени ензими омогућавају повећање биотехнолошке ефикасности у коришћењу ресурса, што их чини еколошки прихватљивим и одрживим избором за различите процесе (73). Прилагодљивост генетички модификованих микроорганизама омогућава развој ензима са специфичним својствима, што их чини погодним за широк спектар индустријских примена, од прехранбене индустрије до биоенергетике (74).

Глобални трендови и промене у начину живота, укључујући све већу потражњу за практичним и прерађеним намирницама, значајно обликују тржиште хране и пића. Рекомбинантни ензими доприносе испуњавању ових захтева, јер омогућавају побољшање укуса, текстуре и нутритивних вредности прехранбених производа. У прехранбеној индустрији, користе се за оптимизацију процеса ферментације, прераде воћа и поврћа, стабилизације пића и смањења времена и трошкова обраде (75).

Примена ензима добијених уз помоћ генетски модификованих микроорганизама у прехранбеној индустрији строго је регулисана, са циљем да се обезбеди безбедност за људско здравље. У складу са европском уредбом (ЕС, бр. 1332/2008), ензимски препарати морају испуњавати одређене критеријуме пре него што добију дозволу за стављање у промет. Први и основни услов односи се на одсуство живих генетски модификованих организама у финалном производу. Други захтев односи се на количину заостале ДНК пореклом из модификованих микроорганизама. Смернице Европске агенције за безбедност хране (EFSA) дефинишу максимално дозвољени праг на ≤ 10 ng/g производа, како би се свела на минимум свака могућност генетичке контаминације или нежељеног утицаја на организам потрошача.

На крају, посебна пажња посвећује се степену пречишћавања ензима. Уобичајене технике, као филтрација, хроматографија и термичка обрада, морају бити део производног процеса, како би се уклонили сви остаци протеина и DNA микроорганизама који су коришћени током производње. Тиме се осигурава висок ниво чистоће финалног производа (76).

2.3.1 Модел системи за експресију рекомбинантних ензима

Избор одговарајућег домаћина за експресију рекомбинантних ензима кључан је за успешан развој и примену ових протеина у биотехнологији, јер различити организми нуде различите предности у зависности од порекла ензима који се производе. Најчешће коришћени домаћини за хетерологну експресију пектинолитичких ензима су *Escherichia coli* и *Pichia pastoris*.

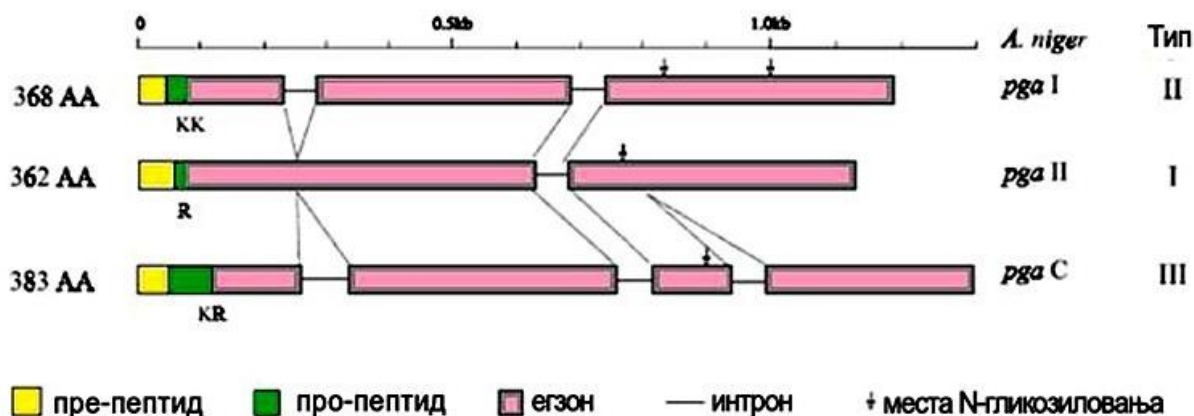
E. coli је највише коришћена бактерија за производњу рекомбинантних ензима због добро развијене генетике, брзог раста, једноставности гајења и могућности производње великих количина протеина у кратком временском периоду. Такође, постоји велики број вектора и мутаната који омогућавају прецизну контролу експресије гена. Међутим, као прокариотски организам, *E. coli* није у могућности да изврши сложене посттранслационе модификације, као што је N-гликозиловање, које су неопходне за функционалност великог броја еукариотских протеина (77).

Са друге стране, *P. pastoris*, као еукариотски организам, има сложену ћелијску структуру која укључује органеле као што су ендоплазматски ретикулум и Голџијев апарат, који су одговорни за посттранслационе модификације. Ове модификације побољшавају стабилност, растворљивост и активност рекомбинантно произведених ензима (78), што чини *P. pastoris* погодним за производњу рекомбинантних протеина еукариотског порекла.

2.3.2 Хетерологна експресија пектин хидролаза у *P. pastoris*

Сложеност пречишћавања ензима произведених ферментационим техникама, посебно код *Aspergillus* врста које производе низ других протеина, довела је до све шире употребе *P. pastoris* као модел система за хетерологну експресију протеина еукариотског порекла (79). *Pichia pink*, мутант *P. pastoris*, производи велике количине рекомбинантних протеина. У овом систему, експресија гена од интереса покреће се помоћу АОХ1 промотора, који је индукован метанолом и омогућава висок ниво синтезе (преко 30% укупних растворљивих протеина) (80). *P. pink* сојеви намењени за велику производњу секретованих биоактивних протеина у индустријским размерама (преко 1000 литара), а услови њиховог гајења слични су онима за *Saccharomyces cerevisiae*. Овај модел систем је изузетно погодан због своје способности узгајања до велике ћелијске густине на минималној подлози и увођења сложених посттранслационих модификација. *P. pastoris* користи метанол као извор енергије и може се лако култивисати у суспензионим системима са раствором метанола, што процес чини једноставним и економичним (78). Пример хетерологне експресије у једној студији (81) је клонирање ендо-полигалактуроназе пореклом из *A. niger* у *P. pastoris*. Ген који кодира овај ензим (*pgaA*) клониран је у експресиони вектор pPIC9K помоћу ензима лигазе. Добијени конструкт (pPIC9K-*pgaA*) најпре је умножен у *E. coli*, затим линеаризован помоћу рестрикционих ензима и трансформисан у *P. pastoris* чиме је добијена његова вишеструка интеграција у хромозом. Експресија гена индукована је додавањем метанола, што је резултирало производњом рекомбинантног ензима који поседује три пута већу хидролитичку активност, каталитичку ефикасност и афинитет према супстрату у поређењу са ензимом произведеним у природном продуценту *A. niger*.

Претраживањем геномске библиотеке *Aspergillus* врста утврђено је постојање породице гена назване *pga*, које кодирају ендо-полигалактуроназе. Структурне карактеристике *pga* гена међу различитим врстама рода *Aspergillus* су веома конзервиране. То се огледа у сличној величини кодираних ензима који углавном садрже између 362 и 383 аминокиселине, као и у организацији егзона и интрона. Такође, *pga* гени у *A. tubingensis* показују структурне карактеристике сличне онима у *A. niger*, укључујући присуство интрона и конзервисаних регулаторних елемената као што су ТАТА кутије. Ова сличност указује на заједничко еволуционо порекло међу овим гљивама и конзервирани елементи сугеришу да *pga* гени вероватно имају сличну улогу у обе врсте, доприносећи њиховој способности да производе ензиме који разграђују пектин, што је битно за њихов опстанак и прилагођавање условима средине. Гени изоловани из рода *Aspergillus* садрже од један до три интрона који прекидају кодирајући регион на идентичним позицијама. Тип *pga* гена означен је као I до III на основу броја интрона присутних у *pga* генима *A. niger*. Егзонске секвенце које одговарају пре-пептиду и про-пептиду приказане су на слици 5.



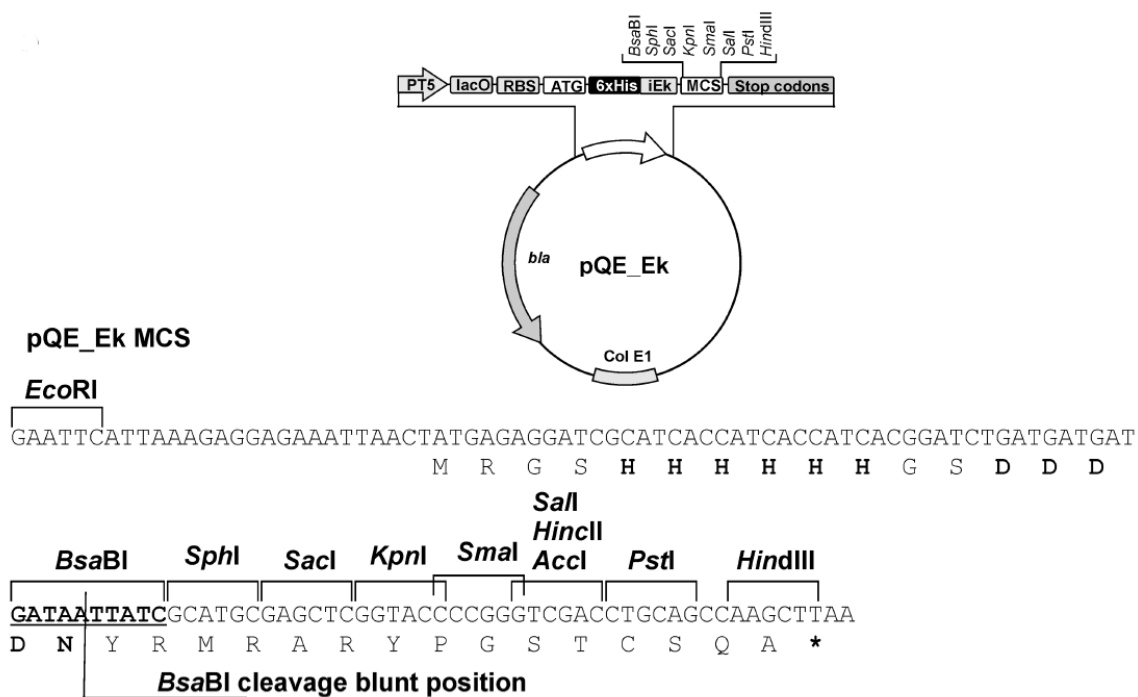
Слика 5. Схематски приказ структуре *pga* гена код *Aspergillus* spp.

Типичне аминокиселинске секвенце полигалактуроназа садрже пре-пептид (сигнални пептид), а у случају ендо-полигалактуроназа садрже и про-пептид. Зрели ензим се производи након исецања пре(про)пептида. Про-пептид у ендо-полигалактуроназама игра улогу у правилном увијању протеина (82). На основу аминокиселинских секвенци, *Aspergillus* полигалактуроназе садрже потенцијална места за N-гликозиловање (Asn-X-Thr/Ser, X може бити било која аминокиселина осим пролина), која се често јављају у конзервираним позицијама аминокиселина. Детаљна анализа промоторских региона гена за ендо-полигалактуроназу *A. niger* открила је постојање два типа конзервираних секвенци које играју важну улогу у регулацији експресије ових гена (83). Прва концензусна секвенца, TYATTGGTGGA, идентификована је у промоторским регионима *pgaI*, *pgall* и *pgaC* гена у геномима *A. niger*, као и у *pgall* гену у геному *A. tubingensis*. Ова секвенца се налази унутар узводног региона од 640 bp од стартног кодона (ATG). Делециона анализа промоторског региона *pgall* гена *A. niger* показала је да је 223 bp дуг фрагмент, који садржи ову концензусну секвенцу, од суштинског значаја за висок ниво експресије гена (83). Друга концензусна секвенца, CCCTGA, присутна је у свим анализираним пектинолитичким генима рода *Aspergillus*, као и у генима који кодирају ензиме арабиназе *A. niger*. Присуство ових конзервираних елемената указује на њихову улогу у регулацији експресије пектинолитичких ензима и њиховој адаптацији на специфичне услове средине (83,84).

2.3.3 Хетерологна експресија пектин лијаза у *E. coli*

Истраживања у области клонирања гена за пектин лијазе бактеријског порекла су ограничена и углавном се фокусирају на пектат лијазе. Због значаја и широке примене пектин лијаза, постоји потреба за ефикасном и економичном производњом ових ензима. Најчешће, гени за пектин лијазе бактеријског порекла клонирају се у *E. coli*.

Процес клонирања пектин лијаза у *E. coli* обухвата неколико корака. Први корак је изоловање циљаног гена из геномске DNA бактеријских сојева уз примену полимеразне ланчане реакције за амплификацију циљног гена, чиме се добијају бројне копије DNA секвенце која кодира пектин лијазу. Следећи корак подразумева припрему вектора, који служи као носач за увођење гена у *E. coli*. Често се користе плазмидни вектори као што су pUC18, pQE и други. Ови вектори садрже маркере резистенције на антибиотици, који омогућавају селекцију бактеријских колонија које су успешно примиле рекомбинантни плазмид. Схематски приказ вектора pQE приказан је на слици 6.



Слика 6. Схематски приказ редизајнираног плазмидног вектора pQE_Ek (85): ознака PT5 представља T5 промотор; lacO- lac оператор; RBS- место за везивање рибозома; 6xHis- секвенца 6xHis ознаке; MCS- место за вишеструко клонирање; Стоп кодони- у сва три оквира читања; Col E1- место отпочињања репликације; bla- ген за бета лактамазу која обезбеђује резистенцију на ампицилин;

Након припреме вектора, следи лигација, где се циљани ген убацује у вектор уз помоћ ензима T4 ДНК лигазе, што резултује формирањем рекомбинантног ДНК молекула. Рекомбинантни плазмид се затим уноси у компетентне *E. coli* ћелије трансформацијом, што омогућава уношење плаزمида у бактеријске ћелије. Трансформисане ћелије се култивишу на селективним медијима који садрже антибиотик(е), при чему преживљавају само оне колоније које су усвојиле плазмид. Ове колоније се подвргавају скринингу ради потврде активности пектин лијазе. Након скрининга, експримирани ензим се пречишћава коришћењем метал-афинитетне хроматографије, уз примену Hisx6-ознаке за олакшано пречишћавање.

Рекомбинантне пектат лијазе, пореклом из *Bacillus licheniformis* (86) и *Bacillus clausii* (87), произведене у *E. coli*, показале су већу специфичну активност, бољу стабилност при високим температурама (до 70°C) и алкалним рН вредностима (до 11.5), као и способност ефикасног деловања на различите супstrate, у поређењу са ендогеним ензимима истих организама. Ова побољшана својства их чине погодним за примену у текстилној индустрији где су за дегумирање текстила потребни екстремни услови (88).

2.4 Примена ензима у преради воћних сокова

2.4.1 Физичко-хемијска својства воћних сокова

Воћни сокови су исцедак плодова воћа, чији квалитет и сензорске карактеристике зависе од интеракција различитих компоненти. Физичка својства воћних сокова, као што су вискозност, текстура и боја, утичу на њихов квалитет и привлачност за конзументе, при чему вискозност утиче на осећај приликом конзумације, текстура зависи од присуства влакана и честица, а боја од природних пигмената који могу бити подложни променама током термичке обраде (89).

рН вредност воћних сокова игра кључну улогу у њиховој стабилности и микробиолошкој безбедности. Већина воћних сокова има рН вредност испод 4,5, што их сврстава у киселе напитке. Ова киселост доприноси очувању укуса и спречава развој микроорганизама. На

пример, сок од поморанџе има рН вредност од око 3,42 до 4,19, што му даје кисео укус и већу стабилност у поређењу са соковима који имају вишу рН вредност и захтевају додатне мере за очување квалитета (90). Садржај шећера такође утиче на укус и нутритивну вредност воћних сокова. Природни шећери, као што су фруктоза, глукоза и сахароза, представљају основни извор енергије у соковима. Садржај шећера варира у зависности од врсте воћа и поступака обраде.

Воћни сокови су значајан извор витамина, посебно витамина С, који има важну улогу као антиоксиданс (89). Витамин С је осетљив на топлоту, па се његова концентрација смањује током термичке обраде, као што је пастеризација. Осим тога, воћни сокови су богати полифенолима и другим антиоксидансима, који имају бројне здравствене предности. Међутим, ова биоактивна једињења су подложна оксидацији током складиштења, што може утицати на укус и смањити антиоксидативна својства сокова (91).

Антиоксиданси су један од главних активних састојака у многим воћним соковима. Биолошка активност воћних сокова према слободним радикалима може се користити као критеријум за одређивање квалитета сокова (92,93). Анализа антиоксидативних својстава воћних сокова може се вршити директно на самом соку, или на ензимским или хемијским екстрактима добијеним из сока (94,95). Антиоксидативна својства напитака могу бити лакше доступна организму у поређењу са антиоксидансима присутним у чврстим прехранбеним намирницама, где је често потребна ензимска активност за ослобађање антиоксидативних једињења (96). Већа искористивост антиоксиданаса у напцима повезана је са смањеном интерференцијом дијететских влакана, липида и протеина који се природно налазе у другим намирницама (97).

Седиментација пулпе представља параметар који утиче на изглед и текстуру сока. Сокови са високим вредностима индекса седиментације имају бољу стабилност захваљујући споријој седиментацији пулпе. Сокови са добро распоређеном пулпом су мање подложни микробиолошком расту. Присуство седимента може формирати окружење које подстиче развој микроорганизама, што може смањити рок трајања производа. Седиментација пулпе може довести до повећане мутноће и нежељених укуса услед микробиолошке активности, чиме се утиче на укупни квалитет сока (98).

Приликом ензимског третмана воћа егзогеним пектиназама, ослобађа се растворљиви пектин и метанол. На тај начин, воћни сокови садрже и слободни и везани метанол, а укупан метанол представља збир обе ове форме. Активност ендогених пектиназа одговорна је за повећану концентрацију метанола која се налази у свеже направљеним, ензимски необрађеним воћним соковима (99). Из тог разлога, веома је важно да егзогене пектиназе које се користе у преради воћа и алкохолних пића не повећавају концентрацију метанола (100). У ту сврху користе се пектин лијазе, чија активност не доводи до ослобађање метанола.

2.4.2 Утицај пектина на текстуру и квалитет воћних сокова

Пектински полисахариди присутни у воћу одговорни су за густу и мутну текстуру свеже цеђених сокова (101). Код сокова са високим садржајем пулпе, пектин побољшава сензорски доживљај. Супротно томе, у бистрим соковима пектин може давати осећај „тежине“, што смањује квалитет производа. Зато је код бистрих сокова важно уклонити пектин како би се добила лагана и освежавајућа текстура. Потрошачи често преферирају сокове који су бистри, са ниском вискозношћу и високом нутритивном вредношћу, због чега је третирање пектина у процесу производње сокова важно. Његова способност везивања воде повећава вискозност сокова, што представља изазов у индустријској преради, јер отежава процесе бистрења и филтрације, успоравајући производњу и смањујући ефикасност, односно принос и квалитет (102).

Замућеност воћних сокова директно је повезана са присуством пектина и других колоида. Формирање стабилних колоидних система, где пектин заједно са протеинима и влакнима задржава честице воћа у течности, доприноси овој замућености (103). Савремене технологије

уклањања пектина у индустрији прераде сокова укључују примену пектинолитичких ензима и мембранске филтрације ради постизања бистрине и смањења вискозности. Ове методе олакшавају процес избистравања и продужавају рок трајања производа, јер смањење количине пектина смањује ризик од микробиолошког кварења. Комбинација ензимских и механичких метода користи се у производњи висококвалитетних воћних сокова који задржавају природни укус и нутритивне вредности (104).

2.4.3 Пектинолитички третман за побољшање карактеристика воћних сокова

Прва комерцијална примена ензима у преради воћних сокова започета је 1930-их година увођењем пектинолитичких ензима. Ови ензими, посебно производ PECTINOL K®, пласиран 1934. године од стране компаније Röhm & Haas, били су кључни за разградњу пектина у воћној пулпи. Ова иновација олакшала је процесе екстракције и избистривања сока, решавајући значајне изазове са којима се индустрија суочавала у то време. Током 1970-их, са растом потражње за воћним соковима, употреба ензима проширила се изван пектиназе, укључујући целулазе и амлазе. Смеша ових ензима позната је као мацерацијски ензими. Ови ензими су олакшали екстракцију сока и побољшали нутритивни профил сокова, унапређујући ослобађање фено-лних једињења и других нутријената из ћелијских зидова биљака. Увођење ензима омогућило је ефикаснију прераду, смањујући трошкове енергије и повећавајући укупни принос (105).

Пектинолитички ензими се користе за побољшање екстракције сока из воћа, јер разграђују пектин, чиме се повећава принос и побољшава квалитет сока кроз процесе ликвефикације (отечавања) и избистривања. Реч „ликвефикација“ потиче од латинске речи *liquefactio*, што значи претварање у течност. У контексту сокова може се односити на процес превођења чврстих делова воћа у течност. Ензимска ликвефикација се користи за разградњу полисахарида у ћелијским зидовима. Током процеса ликвефикације пектин хидролизују полигалактуроназе, пектин естеразе и пектин лијазе, при чему се ослобађају неутрални шећери, као што су D-арбиноза, D-галактоза, L-рамноза и D-ксилоза, који су били везани за пектински ланац. Користећи ензимску ликвефикацију, произвођачи могу оптимизовати процесе прераде и постићи боље карактеристике воћних сокова (106,107).

Замућеност воћних сокова, која је углавном последица присуства пектинских полисахарида, представља изазов у индустрији за прераду воћних сокова. Уклањање ове замућености постиже се применом пектинолитичких ензима у процесу избистривања сокова (108). Избистривање сокова доноси бројне предности, укључујући побољшање визуелне привлачности и органолептичких својстава, као што су укус и текстура. Процес уклањања нерастворних честица побољшава стабилност производа током складиштења и продужава рок трајања (109). Бистри сокови се лакше комбинују са другим састојцима и могу се паковати у транспарентне амбалаже, што додатно повећава њихову привлачност (110).

Пектинолитички ензими синергистички делују у смањењу вискозности сокова кроз разградњу пектина. Прво, пектин метил естеразе уклањају метил групе са пектинских ланаца, остављајући слободне карбоксилне групе које омогућавају калцијумовим јонима да формирају комплексе и дестабилизују пектинске гелове. Ово омекшава структуру пектина и чини га подложнијим за даљу разградњу. Након тога, полигалактуроназе хидролизују α -1,4-гликозидне везе у деметилованом пектину, директно разграђујући главни ланац и смањујући вискозност. Истовремено, пектин лијазе раскидају пектинске ланце елиминацијом (без хидролизе), разграђујући пектин на мање фрагменте који не утичу на стабилност и вискозност сокова. Све три групе ензима, заједно са јонима калцијума, обезбеђују ефикасно смањење вискозности, стабилизацију текстуру сокова и олакшавају процес филтрације. Примена рекомбинантних пектинолитичких ензима, као што су пектин лијазе и полигалактуроназе, омогућава избистривање сокова и смањење вискозности без употребе хемикалија, што резултира еколошки и здравствено прихватљивијим процесом (111).

Пектинолитички ензими из гљива су идеални за прераду разних воћних сокова због њихове природно киселе рН вредности (од 3 до 5), која се подудара са оптималном активношћу ових ензима, што омогућава да се сокови обрађују без потребе за предтретманом чинећи сам производни процес економичнијим (112).

Са друге стране, природна киселост воћних сокова може представљати проблем, јер отежава додавање важних нутријената као што су протеини и липиди. Често су витамини и минерали присутни у малим количинама, што додатно компликује обогаћивање сокова. Ниска рН вредност може узроковати таложење протеина, што доводи до нежељених промена у текстури и смањује рок трајања пића. Да би се превазишли ови проблеми, један од ефикасних приступа је подешавање рН сокова на неутрални опсег, најчешће на рН око 6 (113). У том смислу, примена бактеријских пектин лијаза, које су активне у овом рН опсегу за избистривање неутрализованих сокова може створити високо квалитетне базе за воћне напитке, чиме се олакшава производња пића која су обогаћена разним нутријентима.

2.4.4 Биотехнолошки потенцијал заостале пулпе

Након третмана воћних сокова пектиназама и последичног центрифугирања добија се сок и заостала пулпа која не представља отпадни материјал. У оквиру концепта одрживе биотехнологије, овај остатак се препознаје као вредна сировина која се може додатно искористити. Ензимским третманом могуће је из њега ослободити ферментабилне шећере, погодне за даљу биоконверзију у биостанол или друге биопродукте. Осим тога, пулпа представља и извор наноцелулозе, биоразградивог материјала са широком применом у индустрији. На овај начин, кроз примену одрживих биотехнолошких стратегија, максимално се користи потенцијал биомасе и смањује количина отпада, што је у потпуности у складу са принципима циркуларне економије.

3. НАШИ РАДОВИ

Два главна типа пектинолитичких ензима, који се користе за разградњу пектинских полимера и налазе примену у прехранбеној индустрији, су пектин хидролазе и пектин лијазе. Циљ ове докторске дисертације био је да се идентификују, биохемијски окарактеришу и рекомбинантно произведу нови високоефикасни пектинолитички ензими. Извршена је претрага потенцијалних продуцера пектинолитичких ензима из лабораторијске колекције сојева, при чему је фокус стављен на врсте рода *Aspergillus* и *Bacillus*. Сходно томе постављени су следећи циљеви:

- Одабир изолата гљиве рода *Aspergillus* spp. који ће се користити за продукцију пектинолитичких ензима ферментацијом.
- Оптимизација продукције ензима како би се пронашла адекватна подлога за добијање највећег нивоа пектиназне активности.
- Биохемијска карактеризација ензима из добијених комплекса, да би се утврдило која врста пектинолитичких ензима је произведена у највећој количини.
- Идентификација најбољег бактеријског произвођача пектин лијазе, претрагом различитих сојева *Bacillus* sp. и избором најподобнијег за даље истраживање.
- Пречишћавање и биохемијска карактеризација пектиназа – одређивање рН и температурног оптимума и стабилности, молекулске масе и изоелектричне тачке ензима.
- Тестирање продукованих ензима у отечњавању и избистравању воћних каша и испитивање услова за побољшање приноса, бистрине, антиоксидативне активности и стабилности различитих воћних сокова.
- Изоловање тоталне DNA из селектованих сојева произвођача ензима и секвенцирање целокупних генома методологијом секвенцирања нове генетације (НГС).
- Претраживање геномске секвенције за гене одговорне за синтезу пектинолитичких ензима.
- Клонирање и рекомбинантна производња пектин хидролазе из *Aspergillus* spp. у *Pichia pink* и пектин лијазе из *Bacillus* spp. у *E. coli* за превазилажење ограничења природних система, повећање продуктивности и добијање ензима за важан приступ у биотехнолошким применама.

3.1 Одабир изолата гљиве рода *Aspergillus* spp. за продукцију пектинолитичких ензима

Већину киселих пектиназа производе гљиве, при чему је род *Aspergillus* spp. највише коришћен за производњу ових ензима (1). Већина врста овог рода је изузетно значајна јер производе нетоксичне, индустријски важне ензиме, а не синтетишу микотоксине, те се сматрају безбедним за примену (114–116). Претрага сојева укључује њихово гајење на одговарајућој подлози за производњу ензима као и успостављање теста за одређивање пектинолитичке активности, којим би се омогућило брзо тестирање великог броја узорака. За одабир потенцијалних произвођача пектинолитичких ензима, неопходно је анализирати како нове, тако и већ постојеће сојеве из лабораторијске колекције сојева (лабораторије 483 на Катедри за биохемију, Хемијског факултета Универзитета у Београду).

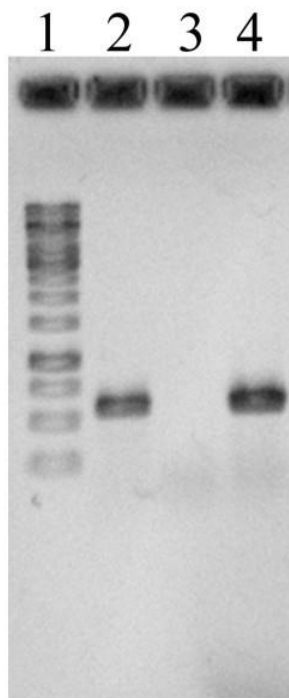
3.1.1 Изоловање и идентификација новог изолата гљиве са плода дуње

У циљу проналажења потенцијално доброг произвођача пектиназа, изолован је нови, дивљи сој, који је примећен да расте на кори плода дуње (*Cydonia oblonga*), која је богата пектином (117). На основу морфолошких карактеристика, овај изолат је сврстан у групу црних аспергилија, познатих по брзом расту и формирању спора црне боје.

Стандардним микробиолошким техникама, узорковано је парче коре плода дуње на коме је порастао изолат и засејано је на чврстој агарној подлози за гајење гљива (PDA, од енгл. potato dextrose agar) и инкубирано на 28°C током пет дана. Након инкубације, плоче су прегледане, а

гљивичне споре су пречишћене методом исцрпљивања и поновног засејавања на свежу подлогу, чиме је добијена чиста култура, која је потом сачувана у глицеролском штоку на -70°C . Геномска ДНК је изолована из белог мицелијума изолата који је растао на PDA током 3 дана на 28°C , применом ЦТАБ протокола (118). Први корак је замрзавање мицелијума у течном азоту и хомогенизација како би се ослободио ћелијски садржај, а затим следи додатак ЦТАБ пуфера (са 2-меркаптоетанолом), при чему је важно уклонити протеине који могу деградирати DNA молекулу, који се затим изолује на хладном преципитацијом изопропанолом.

За идентификацију гљиве, геномска ДНК је коришћена за умножавање *CaM* гена помоћу пара прајмера CMD5/CMD6, који је одабран за дискриминацију различитих сојева због свог једноставног умножавања и доступности података о различитим сојевима *Aspergillus* врсте. Изолована ДНК је коришћена за умножавање *CaM* секвенци у реакцији ланчане полимеризације (PCR, од енгл. polymerase chain reaction). Умножени CMD5/CMD6 производ је директно секвенциран у оба смера користећи исте прајмере као за умножавање. Добијена нуклеотидна секвенца је склопљена помоћу *Pregap4* из *Staden* програмског пакета, ручно проверена и поравнана са јавно доступним секвенцијама у NCBI GenBank бази података користећи програм BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Дужина ампликона потврђена је агарозном електрофорезом на 1% гелу (Слика 7). Након идентификације, сој је означен као FAT 43 (*Fungi Aspergillus tubingensis*, број 43) и заведен је у нашој лабораторијској колекцији сојева.



Слика 7. Агарозна електрофореза на 1% гелу: (1) маркер, 1 kb DNA (величина фрагмената од најнижег: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000 и 10000 базних парова) -Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp, (2) ампликони величине (~ 0.6 kb) гена за калмодулин добијени помоћу прајмерског пара CAM5/CAM6 са укупном ДНК изолованом из изолата FAT43, (3) негативна контрола, (4) позитивна контрола. Гел је визуелизован на УВ илуминатору инкорпорацијом етидијум бромид у гел.

3.1.2 Претрага потенцијалних пектинолитичких произвођача *Aspergillus* spp.

На основу ранијих лабораторијских прелиминарних испитивања за претрагу потенцијалних пектинолитичких произвођача, одабрано је 15 различитих сојева *Aspergillus* spp. из лабораторијске колекције, који су изоловани из природних извора и идентификовани (Табела 3).

Табела 3. Сојеви *Aspergillus* spp. из лабораторијске банке сојева

Ознака	Назив соја	Порекло	Извор
FAT 1	<i>A. tubingensis</i>	Дивљи сој	Сладни агар
FAT 4	<i>A. tubingensis</i>	Мутант од FAT 1	-
FAT 31	<i>A. tubingensis</i>	Дивљи сој	Хлеб
FAT 34	<i>A. tubingensis</i>	Дивљи сој	Хлеб
FAT 36	<i>A. tubingensis</i>	Дивљи сој	Пекмез
FAT 43	<i>A. tubingensis</i>	Дивљи сој	Дуња
FAN 10	<i>A. niger</i>	Дивљи сој	Пиринач
FAN 5	<i>A. niger</i>	Дивљи сој	Скроб + екстракт соје
FAN 6	<i>A. niger</i>	Дивљи сој	Хлеб
FAW 1	<i>A. welwitschiae</i>	Дивљи сој	Хлеб
FAW 4	<i>A. welwitschiae</i>	Дивљи сој	Сладни агар
FAW 5	<i>A. welwitschiae</i>	Дивљи сој	Пиринач
FAW 7	<i>A. welwitschiae</i>	Дивљи сој	Хлеб
FAW 6	<i>A. welwitschiae</i>	Дивљи сој	Сладни агар
FAU 1	<i>A. uvarum</i>	Дивљи сој	Земљиште

3.1.2.1 Припрема инокулума

Сојеви су узгајани на агарним PDA плочама, на 28°C и релативној влажности ваздуха од 60% током 5 дана, све док није постигнута спорулација. Споре су суспендоване помоћу 0,1 % Tween 20, а њихова концентрација у суспензији (1×10^7 спора/mL) је одређена мерењем оптичке густине на 605 nm (UV-1800 UV/Vis спектрофотометар, Shimadzu, Јапан). Ове споре су коришћене за инокулисање подлога за ферментацију.

3.1.2.2 Ферментација у течном медијуму

Продукциона ферментација је постављена у течном медијуму који садржи 0,1% пектин као индуктор производње пектиназа код гљива (64). Направљене су подлоге за инокулум и продукциона подлога, које имају исти састав, али се разликују по концентрацији пектина. Подлога за инокулум садржала је 0,1% пектина како би се иницирао раст гљива, док је продукциона подлога садржала 1% пектина, да би се током трајања ферментације гљивама обезбедила довољна количина пектина и индуковала производња ензима пектиназа. Након 96 сати, ферментација је прекинута, биомаса је уклоњена центрифугирањем. У добијеним ферментационим екстрактима (ФЕ) тестирана је пектинолитичка активност.

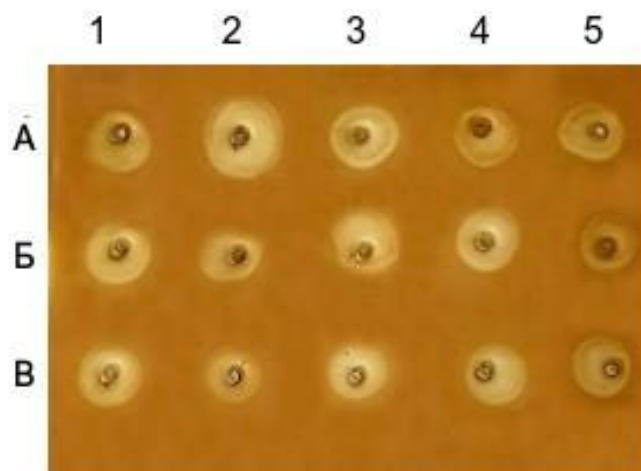
3.1.2.3 Пектинолитичка активност

У ФЕ пектинолитичка активност се може дефинисати као укупна и као ендо-пектинолитичка активност. Ове активности су одређене коришћењем спектрофотометријских есеја и дифузионог теста.

За одређивање укупне пектинолитичке активности коришћен је ензимски есеј који је заснован на 3,5-динитросалицилној (DNS) методи (119). Међутим, ова метода је осетљивија за одређивање егзо-пектиназне активности због производа који настају дејством ових ензима на нередукуюће крајеве пектинског ланца, а то су мономери D-галактуронске киселине.

Ендо-пектинолитичка активност се може одредити дифузионим тестом и есејем у раствору (120). Дифузиони тест изводи се у гелу са инкорпорираним супстратом, који се боји раствором рутенијум црвено, што омогућава истовремену анализу већег броја узорока. Дифузиони тест је рађен у 6 % полиакриламидном гелу, при концентрацији пектина у гелу (0,8 %), током сат времена на 45°C. За скрининг је нането по 10 μ L ФЕ у бунаре, на равномерној удаљености у

гелу, како би се обезбедила једнака дифузија свих узоракa. Визуелизацијом раствором рутенијум црвено, који боји пектин у гелу, настају зоне просветљења, услед разградње пектина дејством ендо-пектиназа. На овај начин је квалитативно потврђена присутност ензимске активности (Слика 8).



Слика 8. Дифузиони тест за детекцију ендо-пектинолитичке активности. Редослед узорака и дијаметар зоне ендо-пектинолитичке активности на гелу су наведени у Табели 4.

Квантитативна ендо-пектинолитичка активност у ФЕ одређена је спектрофото-метријском методом на 535 nm применом рутенијум-црвене боје (121), при чему је комерцијални цитрусни пектин служио као супстрат. Ензимска активност дефинисана је као количина ензима потребна за хидролизу 1 μ g пектина по минути (Табела 4).

Табела 4. Укупна и ендо-пектинолитичка активност у ферментационим екстрактима

ФЕ	Укупна пектиназна активност (U/mL)	Ендо-пектиназна активност (U/mL)	Дифузиони есеј (ознака бунара-диаметар зоне (cm))	
FAT 1	12,5	8,2	A3	0,60
FAT 4	8,6	6,4	A4	0,45
FAT 31	6,5	2,3	A5	0,44
FAT 34	9,1	2,5	B1	0,63
FAT 36	8,6	6,6	B2	0,62
FAT 43	15,1	10,0	A2	0,75
FAN 10	10,0	7,8	B4	0,59
FAN 5	9,0	7,4	B3	0,52
FAN 6	12,4	6,2	B5	0,44
FAW 1	4,5	1,7	B1	0,38
FAW 4	12,6	3,6	B2	0,35
FAW 5	5,1	2,3	B3	0,33
FAW 7	7,4	4,8	B4	0,32
FAW 6	4,6	4,5	B5	0,29
FAU 1	3,8	2,1	A1	0,28

Највиша укупна и ендо-пектиназна активност детектована је у узорку ФЕ соја који је изолован са плода дуње, FAT 43. Поред тога, *Aspergillus* sp, одабран је као сој који не производи микотоксине (122) и препознат је као безбедан микроорганизам захваљујући својој дугој историји употребе у индустријској производњи ензима и прехранбених адитива. Његова нетоксичност и непатогеност су потврђене научним истраживањима и регулаторним стандардима, који осигуравају да производни процеси следе добре произвођачке праксе (123).

3.2 Оптимизација услова производње пектинолитичких ензима

Садржај супстрата, температура, количина инокулума, рН вредност и време трајања ферментације су фактори који утичу на ефикасност ферментације на чврстој подлози. Неопходно је оптимизовати ове услове како би се постигла боља производња ензима. Статистичке методе дизајна експеримената омогућавају ефикасну анализу свих релевантних фактора, идентификацију значајних параметара и редукцију броја понављања неопходних експеримената које треба извести. Отпадни материјали, попут резанца шећерне репе и коре воћа, садрже пектин који се користи као супстрат за индукцију производње пектинолитичких ензима применом ферментације на чврстој подлози.

3.2.1 Анализа значајних параметара за ферментацију на чврстој подлози

Резанци шећерне репе, пшеничне мекиње, кора поморанце, лимуна, дуње и јабуке, коришћени су као супстрати за ферментацију на чврстој подлози. Како би се утврдили оптимални услови култивације и састав медијума за производњу пектинолитичких ензима, коришћен је статистички Plackett-Burman дизајн (PBD). Оптимизација је урађена кроз дванаест експеримената са варијацијом од осам параметара на два нивоа (Табела 5). Највећа ендо-пектинолитичка и укупна пектинолитичка активност добијена је у експерименту 9. и 10. (17,68-18,04 U/mL и 23.04-26,12 U/mL) (Табела 5).

Табела 5. PBD дизајн са променљивама процеса, њиховим кодираним нивоима, као и добијеним и предвиђеним експерименталним вредностима

Редослед извођења	Променљиве								Ендо- пектинолитичка активност (U/mL)		Укупна пектинолитичка активност (U/mL)	
	A	B	C	D	E	F	G	H	Стварна вредност*	Предвиђена вредност	Стварна вредност*	Предвиђена вредност
1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1.80	4.64	5.62	7.83
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	14.43	11.81	20.85	17.15
3	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	6.86	6.14	9.90	9.21
4	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	5.77	6.14	8.34	9.21
5	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	4.51	4.64	6.51	7.83
6	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	6.31	4.75	9.12	7.21
7	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	9.02	11.93	13.03	16.53
8	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	11.37	11.93	16.42	16.53
9	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	18.04	17.61	23.04	24.47
10	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	17.68	17.61	26.12	24.47
11	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	6.31	4.75	9.12	7.21
12	-1	1	-1	1	1	1	1	1	10.28	10.43	14.85	15.15

Променљиве процеса: А: резанац шећерне репе, В: кора поморанце, С: кора лимуна, D: кора дуње, Е: кора јабуке, F: пшеничне мекиње, G: време, H: температура; -1: минимална вредност у експерименту; 1: максимална вредност у експерименту.

Статистичка анализа PBD дизајна коришћењем ANOVA (анализа варијанси) методе (Табела 6.), показала је да су F-вредности од 449,70 и 25,70 за ендо-пектинолитичку и укупну пектинолитичку продукцију, редом, статистички значајне, са р-вредностима од 0,0367 и 0,0380.

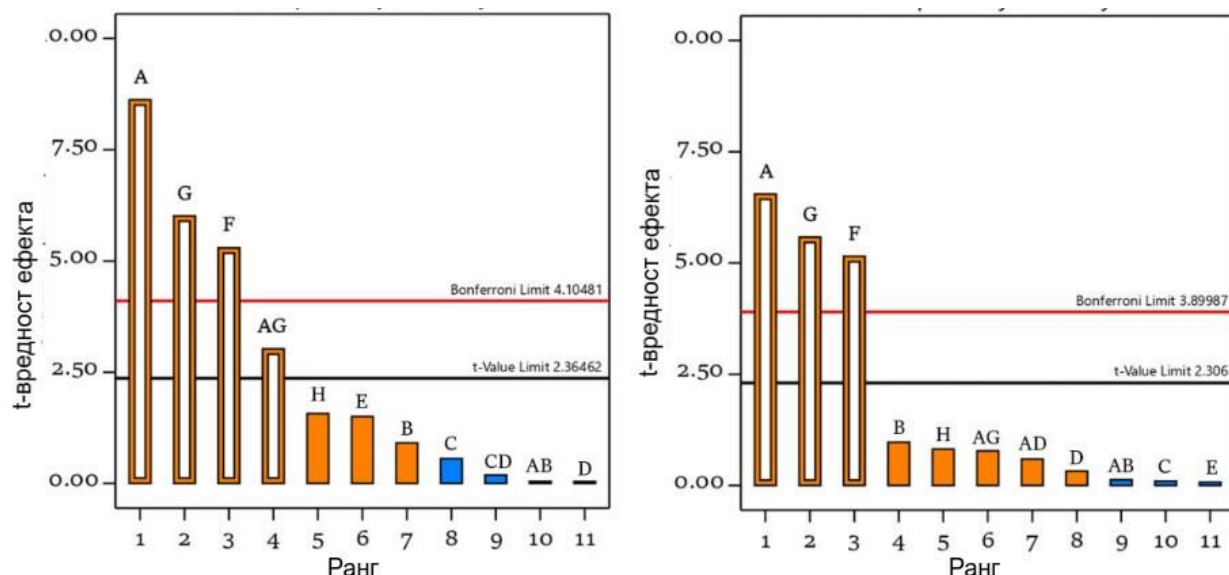
Табела 6. ANOVA за PBD: Ендо-пектинолитичка и укупна активност

Извор	Ендо-пектинолитичка активност					Укупна пектинолитичка активност				
	Збир квадрата	df	Средњи квадрат	F-вредност	P-вредност	Збир квадрата	df	Средњи квадрат	F-вредност	P-вредност
Модел	1104.82	10	110.48	449.70	0.0367	1903.09	9	211.45	25.70	0.0380
<i>А-Резанац шећерне репе</i>	482.44	1	482.44	1963.69	0.0144	826.15	1	826.15	100.43	0.0098
<i>В-Коре поморанце</i>	3.53	1	3.53	14.38	0.1641	33.72	1	33.72	4.10	0.1802
<i>С-Лимун</i>	0.6331	1	0.6331	2.58	0.3547	0.5732	1	0.5732	0.0697	0.8165
<i>Д-Дуња</i>	0.2547	1	0.2547	1.04	0.4943	7.40	1	7.40	0.8999	0.4429
<i>Е-Јабука</i>	19.61	1	19.61	79.82	0.0710	3.95	1	3.95	0.4796	0.5602
<i>F-Пшеничне мекиње</i>	191.00	1	191.00	777.41	0.0228	352.75	1	352.75	42.88	0.0225
<i>Г-Време</i>	254.77	1	254.77	1037.01	0.0198	517.03	1	517.03	62.85	0.0155
<i>Н-Температура</i>	4.45	1	4.45	18.10	0.1470	25.87	1	25.87	3.14	0.2182
<i>AB</i>	5.51	1	5.51	22.42	0.1325	123.77	1	123.77	15.05	0.0605
<i>AG</i>	69.03	1	69.03	280.99	0.0379					
Остатак	0.2457	1	0.2457			16.45	2	8.23		
Укупна корелација	1105.06	11				1919.54	11			

Подаци означени подебљано су значајне променљиве за производњу пектинолитичког комплекса (P-вредност $\leq 0,05$)

p-Вредности испод 0,05 указује да су испитивани параметри значајни у овом моделу. У оба случаја, параметри попут резанаца шећерне репе, пшеничних мекиња, времена, као и њихова интеракција су значајни за ендо-пектинолитичку активност, односно продукцију ензима.

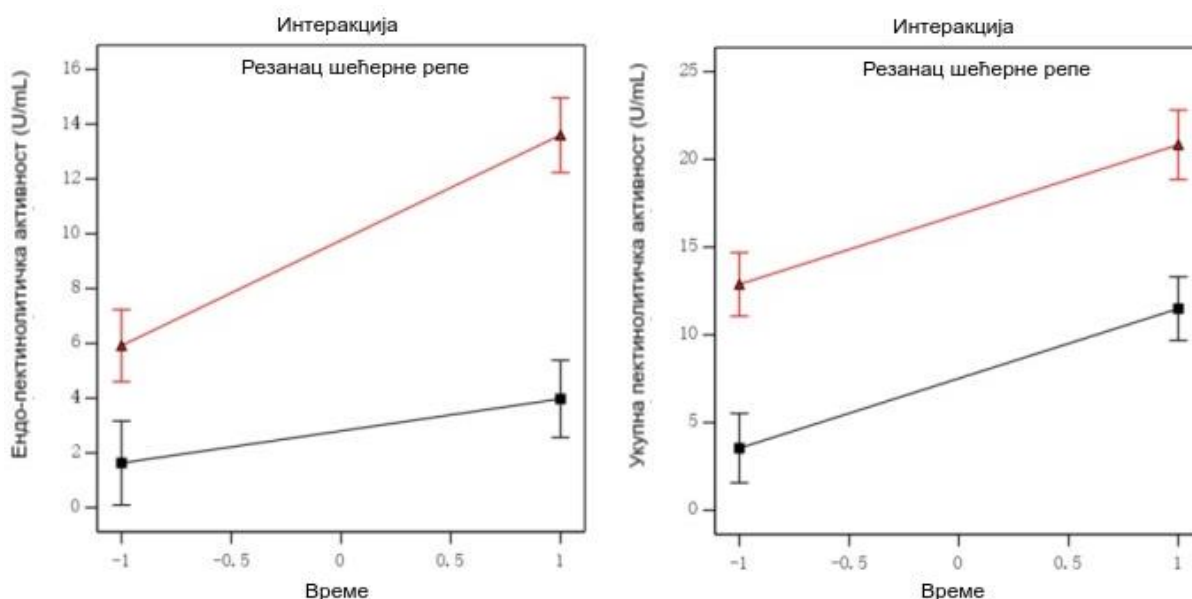
Процењени утицаји сваке променљиве приказани су у Парето графиконима (Слика 9). Променљиве су означене као: А- резанац шећерне репе, В-коре поморанце, С-коре лимуна, Д-коре дуње, Е- коре јабуке, F-пшеничне мекиње, Н-време и Г-температура. Позитиван ефекат је означен наранџастом бојом, а негативни ефекат плавом бојом. Графикон укључује два различита t-лимита: горња граница је утврђена Бонферонијевом коригованом t-критичном вредношћу, док је доња граница заснована на стандардној t-критичној вредности за појединачне тестове ефеката. Одабрани ефекти супстрата, као што су: А (резанац шећерне репе), G (време) и F (пшеничне мекиње), премашују Бонферонијев лимит (4,10 за ендо-пектинолитичку и 3,89 за укупну пектинолитичку активност) што указује да су значајни и треба их укључити у финалну оптимизацију. Поред тога, ефекат AG (интеракција резанац шећерне репе и времена) прелази t-лимит (2,36 за ендо-пектинолитичку активност) и треба га укључити у финалну оптимизацију, што значи да интеракција резанца шећерне репе и времена значајно утиче на ензимску активност и треба је укључити у оптимизацију, заједно са појединачним факторима који су премашили Бонферонијев лимит.



Слика 9. Парето графикон за: ендо-пектинолитичку активност (лево) и укупну пектинолитичку активност (десно)

Састав медијума који најбоље подстиче производњу пектинолитичког комплекса садржао је највеће испитиване количине пшеничних мекиња и резанаца шећерне репе (+1 ниво). Садржај пектина у резанаца шећерне репе је 15-30% суве масе (124), што потврђује њихов потенцијал као индучера продукције пектинолитичких ензима. Са друге стране, позитиван утицај пшеничних мекиње је у томе што оне остају растресите у влажним условима и пружају значајну површину за раст гљива (125). А уједно, у поређењу са другим испитаним агро-отпадима, пшеничне мекиње су добар извор азота, према нашим анализама Кјелдаловом методом (126) садрже 2,71 % укупног азота и 16,93 % сирових протеина.

Графикони интеракције између резанаца шећерне репе и времена трајања ферментације (слика 10) показују да време има већи утицај на продукцију ендо-пектинолитичких ензима у односу на укупну пектинолитичку продукцију. Што се тиче утицаја на ендо-пектинолитичку производњу, примећено је да се време мора зауставити након 96 сати, јер тада почиње спорулација. Резултати су такође показали да се већа производња ензима постиже када је у медијуму удео резанаца шећерне репе већи.



Слика 10. График интеракције између времена и количине резанаца шећерне репе на промене у ендо-пектиназној активности (лево) и укупној пектиназној активности (десно). За количину резанаца шећерне репе, црвена линија представља максималну вредност +1, а црна линија минималну вредност -1. Остале променљиве су биле константне на минималној вредности -1.

Ови резултати су коришћени за дизајнирање експеримената за финалну оптимизацију SSF процеса коришћењем Optimal (Custom) design (OCD).

3.2.2 Финална SSF оптимизација

За финалну оптимизацију SSF коришћени су мешовити дизајни, који се примењују када се одговор мења у зависности од релативних односа компоненти. Све компоненте морају бити унете у истим јединицама мере и сваки експериментални циклус мора имати исти укупни збир. У овом експерименту, коришћен је OCD као тип мешовитог дизајна, јер финална оптимизација захтева подешавања која се не могу постићи стандардним дизајном.

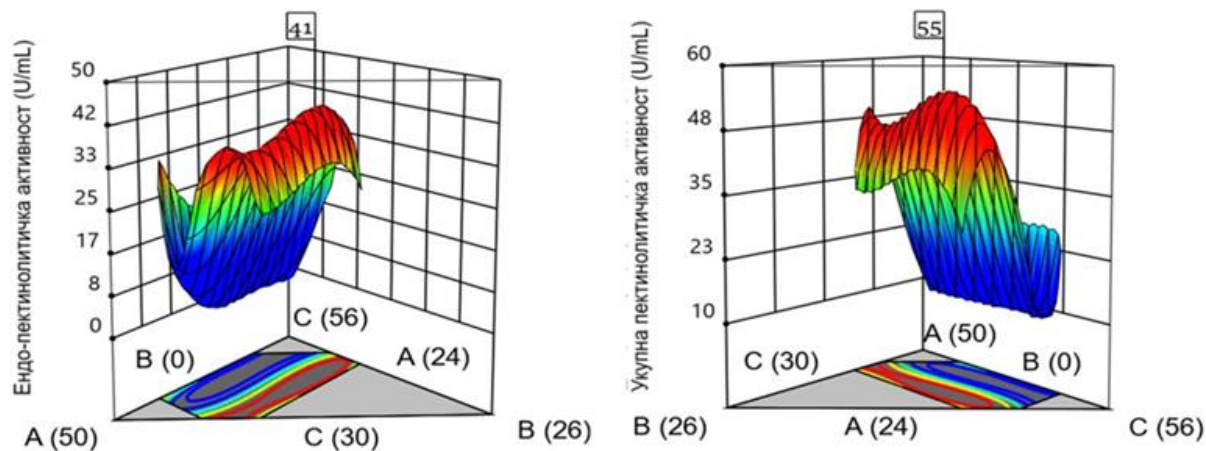
За финалну оптимизацију продукције пектинолитичких ензима, главне променљиве у SSF, резанци шећерне репе (А) и пшеничне мекиње (В), Czapek медијум (С), оптимизоване су коришћењем OCD, који су укључивали 15 експерименталних тачака (Табела 7). У овим експериментима, време инкубације је било фиксно (96 сати), јер је максимална продукција постигнута након овог периода инкубације. Остали експериментални параметри, као што су укупна маса супстрата и температура, били су фиксни на вредностима које су дале максималну ензимску продукцију у PBD: укупна маса од 80 g и температура од 28°C.

Табела 7. OCD са променљивим параметрима процеса и добијеним (стварним) и предвиђеним експерименталним подацима

Редослед извођења	А: Резанац шећерне репе (g)	В: Пшеничне мекиње (g)	С: Czapek медијум (g)	Ендо-пектинолитичка активност (U/mL)		Укупна пектинолитичка активност (U/mL)	
				Стварна вредност	Предвиђена вредност	Стварна вредност	Предвиђена вредност
1	29,9	4,9	45,2	18,23±0,08	18,00	28,09±0,07	28,00
2	38,7	10,0	31,3	24,32±0,20	24,11	30,23±0,15	32,50
3	38,7	10,0	31,3	24,08±0,12	24,11	35,45±0,05	32,50
4	30,0	0,0	50,0	16,22±0,10	15,56	25,97±0,03	25,00
5	34,4	5,3	40,3	17,56±0,12	20,22	29,43±0,05	29,33
6	25,3	10,0	44,7	25,26±0,15	25,94	33,23±0,10	33,50
7	34,4	5,3	40,3	20,12±0,20	20,22	29,87±0,15	29,33
8	44,0	6,0	30,0	32,09±0,11	32,00	42,04±0,05	42,00
9	24,0	6,0	50,0	21,08±0,15	21,08	31,80±0,08	29,50
10	34,4	5,3	40,3	23,65±0,14	20,22	30,34±0,15	29,33
11	24,0	6,0	50,0	21,36±0,21	21,08	28,22±0,12	29,50
12	34,6	0,0	45,4	17,49±0,05	17,10	26,34±0,06	26,00
13	39,3	0,0	40,7	21,06±0,21	20,63	27,06±0,12	27,00
14	39,3	5,0	35,7	16,70±0,05	16,00	22,09±0,21	22,00
15	25,3	10,0	44,7	27,98±0,10	25,94	34,14±0,12	33,50

Пектинолитичка активност је највиша при количини резанаца шећерне репе од ~30,5 g, пшеничних мекиња од ~8,6 g и Czapek медијума од ~41,0 g (Слика 11). Максималне вредности достижу плато при продуктивности од 41,0 U/mL за ендо-пектинолитичку и 55,0 U/mL за укупну пектинолитичку активност, што је означено заставицама на графикону. У литератури нема података о примени OCD-а за оптимизацију SSF. До сада су PBD (Plackett-Burman Design), FFD (потпуни факторијелни дизајн, енгл. Full Factorial Design), CCD (централни

композитни дизајн, енгл. Central Composite Design) и BBD (Box-Behnken Design) углавном коришћени као статистички алати за оптимизацију компоненти медијума за производњу пектинолитичког ензимског комплекса код других врста *Aspergillus*, као што су *A. niger* ATCC 1640, *A. flavus* и *A. giganteus* (127–129).



Слика 11. 3D графикони одзивних површина који приказују промене у ендо-пектиназној активности (лево) и укупној пектиназној активности са варирањем резанаца шећерне репе (десно), пшеничних мекиња и Czapek медијума у оквиру експерименталних опсега.

Валидација OCD модела финалне оптимизације је спроведена под оптималним условима уз три понављања. Стварне вредности добијене експериментима упоређене су са предвиђеним вредностима дизајна. Након 96 сати при оптимизованим условима, добијена је стварна вредност ендо-пектинолитичке активности од 39,9 U/mL (док је предвиђена вредност била 41,0 U/mL), а за укупну пектинолитичку активност добијена је стварна вредност активности од 56,2 U/mL (у поређењу са предвиђеном вредношћу од 55 U/mL), чиме се потврђује применљивост коришћеног модела. Финалном SSF оптимизацијом повећана је ендо-пектинолитичка активност и укупну пектинолитичка активност 2,22 и 2,15 пута, редом.

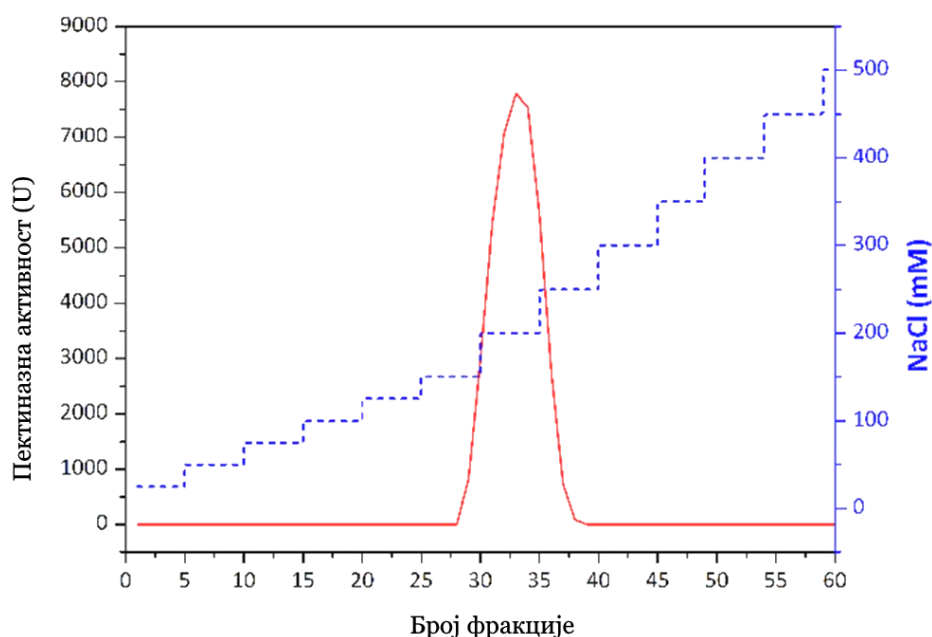
3.3 Пречишћавање ендо-пектинолитичких ензима

За пречишћавање доминантне групе ензима из пектинолитичког комплекса, ФЕ добијен оптимизацијом SSF-а, коришћен је као почетни узорак. Добијањем пречишћеног ензима омогућена је детаљна карактеризација. Почетни корак у пречишћавању била је ултрафилтрација чиме је узорак концентрован 10 пута. Ретентат је преципитиран 70%-тним етанолом, а након дијализе је преципитиран сукцесивним таложењем амонијум-сулфатом (30%, 50% и 70% засићења АС), при чему су протеини исталожени на 70%-тном засићењу АС. Добијени талог је ресуспендован у ацетатном пуферу (pH 4,5, 20 mM) и фракционисан гел-филтрационом хроматографијом на Sephacryl S100HR колони, еквилибрисаној претходно у дезаерисаном ацетатном пуферу (pH 4,5, 20 mM). У сакупљеним фракцијама одређена је пектиназна активност и концентрација протеина (Табела 8). Активне фракције са гел-хроматографије су сакупљене и даље пречишћене јоноизмењивачким хроматографијама на DEAE-Sephadex и Q-Sepharose колони, применом градијентне NaCl (0–0,5 M) елуције. Резултат пречишћавања је праћен SDS-PAGE електрофорезом (Слика 13). Табеларно су приказани сви резултати (Табела 8).

Табела 8. Кораци у пречишћавању ендо-пектинолитичких ензима

Кораци пречишћавања	Укупна активност (U)	Укупни протеини (mg)	Специфична активност (U/mg)	Степен пречишћења
Сирови екстракт	255000	140	1821,42	1
Преципитација етанолом	182362	109	1665,41	0,91
Преципитација АС-ом	167025	96	1709,57	0,94
Sephacryl S100 HR	92182	22	4182,99	2,30
DEAE Sephadex	51127	10	5092,33	2,8
Q Sepharose	40800	7	6001,67	3,3

Хроматрограм добијен анализом фракција са финалне јоноизмењивачке хроматографије на Q-Sepharose колони приказан је на слици 12. Две сукцесивне јоноизмењивачке хроматографије довеле су до повећања чистоће ензима за 3,3 пута, уз принос од 16 % и специфичну активност од 6001,67 U/mg. У поређењу са претходним истраживањима, примењиване су различите стратегије за пречишћавање полигалактуроназа из гљива. На пример, полигалактуроназа II из *A. tubingensis* је пречишћена DEAE-Sephadex хроматографијом, при чему је постигнут степен пречишћавања од 16,8 пута, али са нижим приносом од 13% (130). Слично томе, степен пречишћења полигалактуроназе из *A. japonicus* био је 2,8 пута након два хроматографска корака (131), што је упоредиво са делимично пречишћеном полигалактуроназом из *A. terreus*, чији су приноси износили 2,5% и 6,2%, редом (132). Ови упоредни резултати указују на ефикасност примењене стратегије, која је омогућила значајан степен пречишћења доминантне ендо-пектиназе у узорку ФЕ.

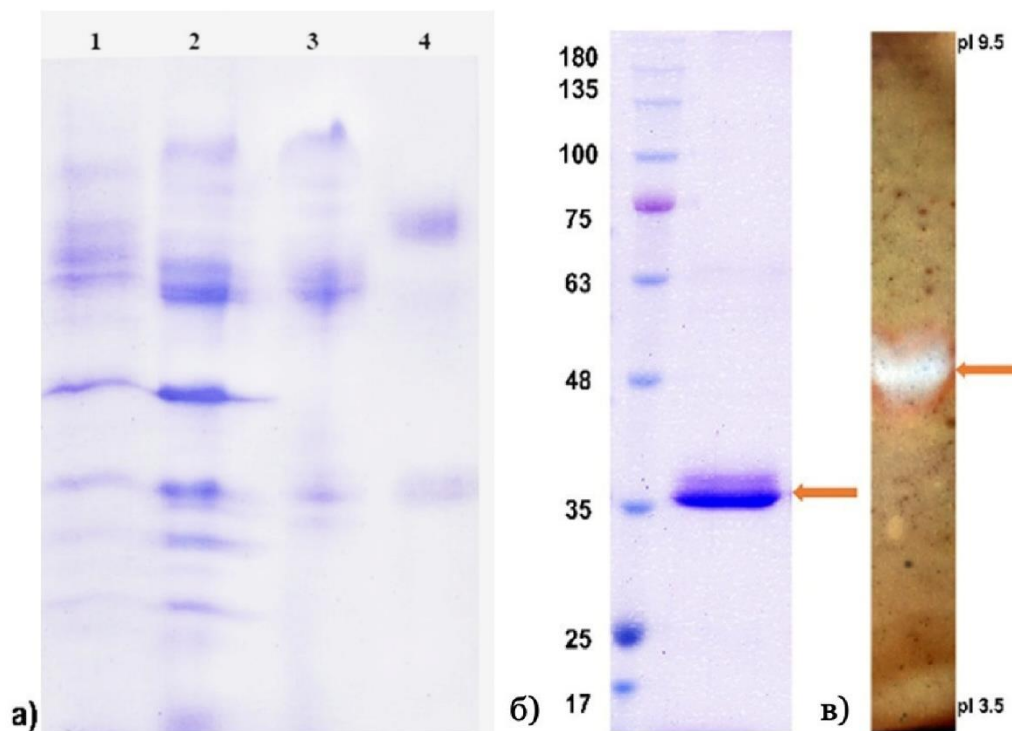


Слика 12. Елуциони хроматрограм добијен јоноизмењивачком хроматографијом на Q-Sepharose колони

3.4 Биохемијска карактеризација ендо-пектиназе

Пречишћена ендо-пектиназа је биохемијски окарактерисана како би се идентификовали оптимални услови за постизање највеће активности. Одређени су молекулска маса ензима, pI вредност, оптимални услови активности, као и pH и температурна стабилност. Идентификована је и анализирана генска секвенција која кодира ендо-пектиназу, чиме је омогућена њена потенцијална примена у рекомбинантној технологији.

Електрофоретски су одређене молекулска маса и pI вредност ендо-пектиназе (ендо-ПГ). Молекулска маса ензима, одређена SDS PAG електрофорезом према методи коју је описао Laemmli (1970) (133), коришћењем молекулских маркера *Blue Wide Range Protein Ladder* (10–245 kDa, Cleaver Scientific). била је 39 kDa. Изоелектрична тачка ензима одређена изоелектрофокусирајућом електрофорезом, где је зимографска анализа показала да је pI вредност 6. Ензимска активност ендо-пектиназе визуелизована је зимограмском детекцијом трансфером на супстратни гел са инкорпорираним пектином, применом рутенијум-црвено методе (Слика 13).



Слика 13. Електрофоретска анализа (а и б) и зимограмска детекција (в) ендо-пектиназе; положај молекулских маркера (17, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135, 180 kDa) је означен на слици под б, док су стрелицама означене маса ензима и изоелектрична тачка.

На слици 13 приказани су електрофореграми који прате кораке пречишћавања ендо-пектиназе (а) SDS PAG електрофореза: сирови екстракт ензима (1), ресуспендовани преципитат након преципитације 70 % AC (2), најактивнија фракција са гел-филтрације на Sephacryl S100 HR (3), парцијално пречишћена ендо-пектиназа јоноизмењивачком хроматографијом на DEAE Sephadex колони (4), (б) SDS PAG електрофореза: молекулски маркери и пречишћена ендо-пектиназа добијена јоноизмењивачком хроматографијом на Q Sepharose колони, и (в) зимографска анализа након изоелектричног фокусирања која показује да је pI вредност ендо-пектиназе 6.

У литератури је описано пет различитих ендо-полигалактуроназа из *A. niger* и *A. tubingensis*, при чему су ПГ I и ПГ II идентификоване као доминантне изоформе, са изоелектричним тачкама око 5-6 и 3,5 (134). Полигалактуроназа са нижом изоелектричном тачком највероватније одговара ензиму ПГ I. Полигалактуроназе са вишим изоелектричним тачкама из *A. tubingensis* FAT 43 веома су сличне полигалактуроназама из *A. tubingensis* NW756 и *A. niger* N400 и имају привидну молекулску масу приближно једнаку оној PG II из *A. tubingensis* FAT 43 (~38 kDa). Међутим, ови ензими се разликују, што је показано нешто вишом изоелектричном тачком PG II из *A. tubingensis* FAT 43 и *A. tubingensis* NW756 (~6,0) у поређењу са PG II из *A. niger* N400 (5,2) (134).

3.4.1 Идентификација доминантне изоформе ендо-пектиназе методом масене спектрометрије

У циљу идентификације доминантне ендо-пектиназе, узорак протеина добијен након пречишћавања је денатурисан са трис-(2-карбоксиетил)-фосфином и алкилован помоћу хлороацетамида, а затим хидролизован трипсином преко ноћи на 37°C. Електроспреј је коришћен за јонизацију пептида. Овај извор јонизације преводи молекуле пептида из течне фазе у јонизоване честице у гасној фази, које затим могу бити анализирани у масеном спектрометру (ESI-qTOF-MS). Добијени пептиди су анализирани помоћу Bruker Daltonics Compact ESI-qTOF масеног спектрометра, повезаног са Waters Acquity UPLC системом. Пептиди су раздвојени на Bruker Daltonics PepSep C18 аналитичкој колони. Спектрални подаци су обрађени и претражени у SwissProt бази користећи MASCOT софтвер.

Анализом масене спектрометрије идентификована су два пептида ендо-пектиназе II (ПГ II): DITVTGASGHLINCDGAR и LESVTGTVDISK, који чине 8% укупне аминокиселинске секвенце ензима. Ови резултати показују да је ензим ПГ II најзаступљенија у анализираном ФЕ *A. tubingensis* FAT43.

3.4.2 Температурна и рН зависност активности и стабилности ПГ II

Одржавање ензимске активности и стабилности на различитим температурама и рН вредностима има важну улогу у воћној индустрији. Током прераде сокова, воћне киселине узрокују промене рН вредности, што захтева стабилност ензима, посебно у фази отечњавања у индустријској обради. Многи ензими имају ограничену термичку стабилност, што представља изазов за њихову индустријску примену. Потреба за ензимима са побољшаном отпорношћу ка високим температурама и променама рН наглашава важност истраживања ензима попут ПГ II, који може задовољити захтеве индустријског процеса.

Активност ПГ ензима се мења у функцији рН. Оптимална ендо-ПГ активност добијена је у киселом рН опсегу од 3,5 до 5, као што је приказано на слици 14а. За ПГ из *A. niger*, утврђен је рН оптимум у распону од 4,3 до 4,9 (135). Овај опсег је у складу са рН условима који се налазе у многим биљним ткивима које гљиве нападају.

Стабилност ПГ II на различитим рН вредностима испитивана је у распону од рН 3 до рН 7. Ензим је инкубиран на свакој од ових рН вредности током 1, 2 и 7 дана при константној температури од 25°C, након чега је мерена резидуална активност како би се проценио степен задржавања ензимске активности, што је приказано на слици 14б. Резултати показују да ПГ II испољава максималну активност на рН 4, док на другим рН вредностима задржава 91–95% почетне активности након једног дана. Резидуална активност ПГ II остала је стабилно висока у свим испитиваним рН условима, задржавајући 87–93% активности након 2 дана и 40–53% након 7 дана, што указује на изузетну отпорност ензима на промене рН вредности током дужег временског периода. Литературни подаци показују да ПГ из *A. niger* NRC1am1 и *A. japonicus* имају знатно нижу стабилност у истом рН опсегу (131,136).

Каталитичка активност ПГ II је испитивана у температурном опсегу од 30 до 60°C, при чему је оптимална активност детектована на 45°C, док је на 50°C задржано 90% ове вредности (Слика 14в). Литературни подаци за ПГ ензиме из *F. oxysporum* и *A. tubingensis* (130), изолованих из банане и брескве, показују да је температурни оптимум у распону од 40 до 50°C, што је у складу са резултатима добијеним за ПГ II из *A. tubingensis* FAT43. Одређивање енергије активације (E_a) важан је параметар који указује на стабилност ензима при промени температуре. E_a за ПГ II износила је 62,1 kJ/mol и израчуната је коришћењем Аренијусове једначине након мерења активности ензима на различитим температурама и графичким приказивањем $\ln k$ у односу на $1/T$, у складу са линеарном модификацијом Аренијусове једначине:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

где је k константа брзине реакције на температури T (апсолутна температура), а R је универзална гасна константа.

Термална стабилност и кинетика иреверзибилног губитка ензимске активности испитани су коришћењем једначине која описује промене активности ензима током излагања различитим температурама. Константе инактивације израчунава су помоћу једначине:

$$\ln(A_t / A_0) = -k_d t$$

где је A_t/A_0 вредност преостале активности ензима после времена t (A_t је активност загрејаног ензима, а A_0 почетна активност ензима).

Слика 14г приказује кинетику инактивације ПГ II на различитим температурама инкубације од 40°C, 50°C и 60°C.

Полуживот ($t_{1/2}$) ензима добијен је из једначине:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_d$$

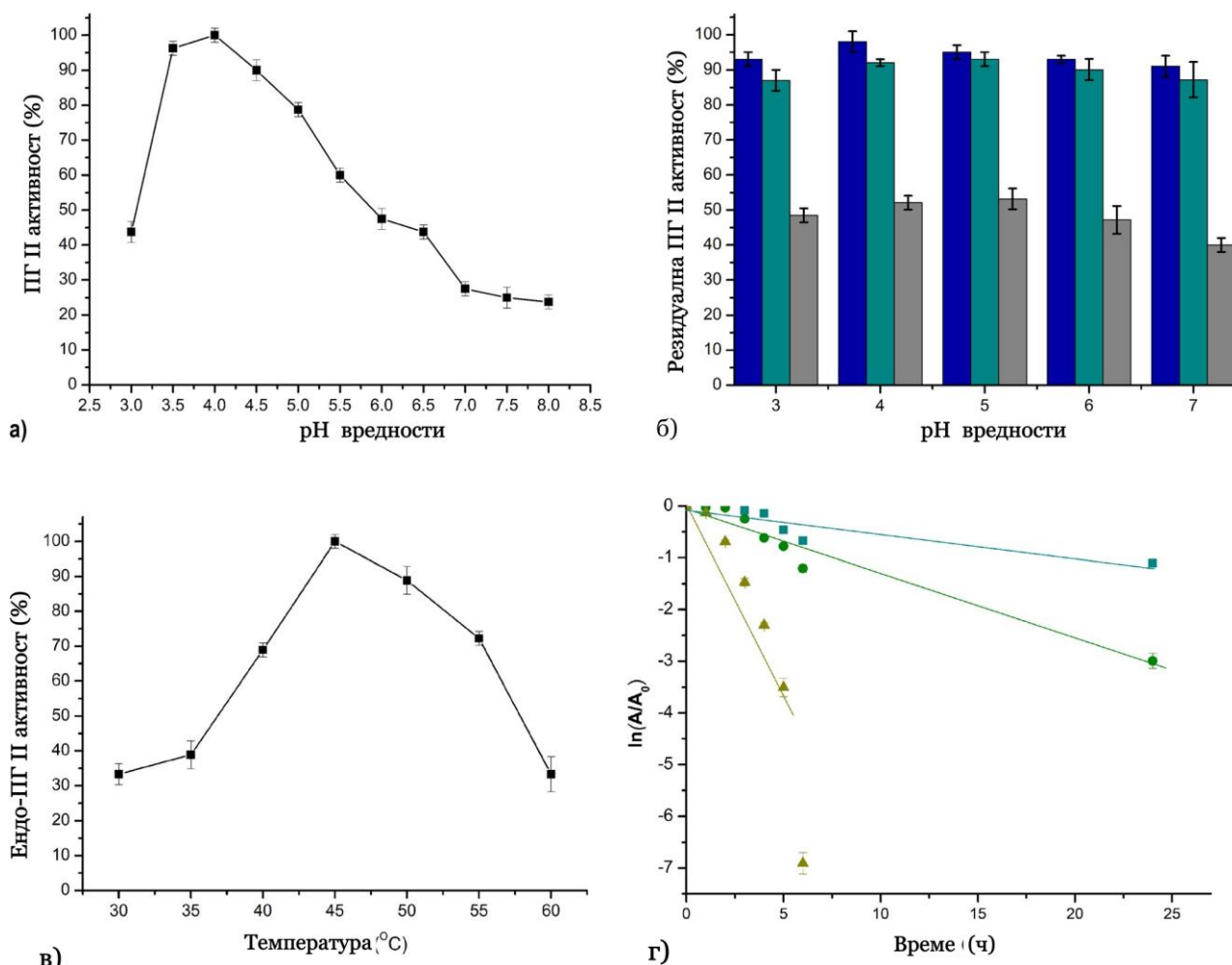
Полуживот ензима на 40°C износио је 13,7 сати, а на 50°C 5,4 сати. Међутим, на вишој температури од 60°C, полуживот ензима је смањен на 50 мин. Добијене вредности за полуживот на 40°C су веће у поређењу са подацима из литературе, као и на температурама од 50°C и 60°C, изузев у случају пектиназе из *A. niger* NRC1ami, која показује бољу термостабилност на 50°C, док је на 60°C упоредива са ПГ II из *A. tubingensis* FAT43 (136).

Термичка денатурација настаје након достизања минималне енергије, познате као енергија деактивације (Ed). Уколико је почетна енергија испод Ed , нестабилни интермедијер који је започео денатурацију може се вратити у своју нативну структуру. Међутим, када се пређе ова баријера, ензим пролази кроз потпуну денатурацију и губи способност враћања у свој нативни облик. Коришћењем линеарне модификације Аренијусове једначине, графичким приказом $\ln k_d$ у односу на $1/T$ (R је универзална гасна константа, T апсолутна температура):

$$\ln k_d = \ln A - \frac{E_d}{RT}$$

израчуната је Ed за ПГ II која је износила 32,8 kJ/mol, што је већа вредност у поређењу са Ed пектиназе изоловане из *A. niger* NRC1ami (138). Енергија деактивације је директно повезана са енталпијом активације денатурације (ΔH), која представља укупну количину енергије неопходну за денатурацију ензима. Високе и позитивне вредности Ed и ΔH указују на добру термичку стабилност ензима (137).

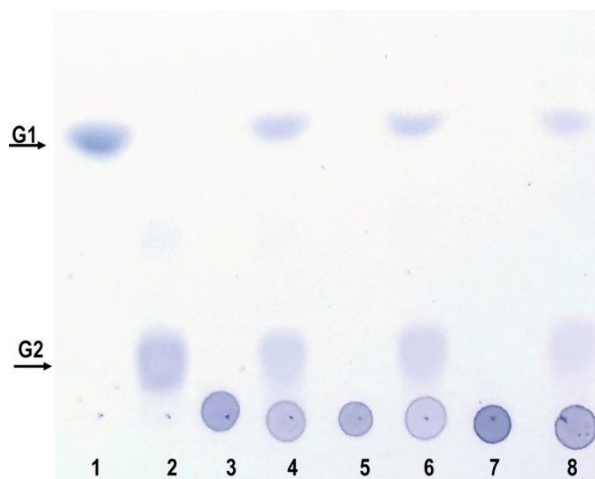
Прегледом доступне литературе о карактеризацији полигалактуроназних ензима утврђено је да они генерално показују ниску термичку стабилност. ПГ из *A. niger* задржава активност током 2 сата на 30°C и 40°C у рН опсегу од 4 до 6 (136). Слично томе, ПГ из *A. terreus* има полуживот од 2 сата на 40°C (134), док ПГ из *A. japonicus* показује слично понашање на 50°C (133). Кисели мезотермални ПГ ензими подложни су термалној инактивацији у интервалу од 50°C до 65°C, при чему долази до значајног смањења активности у року од 10 до 60 минута. Ендо-ПГ II из *A. tubingensis* FAT43 издваја се бољом термичком стабилношћу у односу на већину до сада познатих полигалактуроназних ензима.



Слика 14. pH и температурни оптимуми активности ПГ II и стабилност

3.4.3 Супстратна специфичност ПГ II

Будући да се у биљним ћелијским зидовима налазе различити типови пектина, њихова реактивност зависи од степена естерификације, што утиче на доступност супстрата ензиму и ефикасност хидролизе (138). Испитивање њихове хидролизе може пружити податке о улози супстратне специфичности у разградњи пектина у воћним соковима. Супстратна специфичност ПГ II испитана је хидролизом три врсте индустријских пектина: полигалактуронске киселине, ниско-метилованог пектина и високо-метилованог пектина, а производи хидролизе анализирани су танкослојном хроматографијом (Слика 15). Резултати су показали да ПГ II има највећу активност према неметилованом супстрату (полигалактуронској киселини), док се активност смањује са порастом метилације. Ово указује на специфичност ПГ II према неметилованим полигалактуронским ланцима, јер већи степен метилације смањује ефикасност хидролизе. Добијени производи хидролизе били су моно- и ди-галактуронска киселина, што потврђује резултате претходних студија о утицају степена метилације на активност ензима (139).



Слика 15. Анализа производа хидролизе танкослојном хроматографијом: 1. D-галактуронска киселина (G1), стандард, 2. ди- галактуронска киселина (G2), стандард, 3. ПГА, 4. производи хидролизе ПГА, 5. ВМП, 6. производи хидролизе ВМП, 7. НМП, 8. производи хидролизе НМП.

3.5 Рекомбинантна производња ПГ II

Производња ензима директно из гљива је сложен и захтеван процес, који се може заменити применом рекомбинантне ДНК технологије. Ове технике омогућавају прецизну контролу услова ферментације, смањују време потребно за добијање чистог и активног ензима и омогућавају производњу већих количина у краћем временском року. Због тога је у оквиру ове дисертације испитана могућност рекомбинантне продукције ПГ II клонирањем *pga* гена из соја *A. tubingensis* FAT 43 у експресионе системе *E. coli* и *P. pink*.

Да би се пронашао ген који кодира ПГ II, урађена је анализа свих доступних секвенци генома *A. tubingensis* из базе података секвенци протеина SWISS-PROT (Слика 16). Претрагом је откривен ген *pgalI* дуг 1086 базних парова, који кодира ензим ПГ II састављен од два егзона и једног интрона са укупно 362 аминокиселине. С обзиром на то да два пептида која су идентификована масеном спектрометријском анализом показују 100% идентичности са одговарајућим делом секвенције познате ПГ II из *A. tubingensis* (GenBank приступни број X58894), испитали смо да ли сој FAT43 поседује исти ген у свом геному. Одговарајући прајмери, засновани на познатој секвенци (за први и други егзон), су дизајнирани и то, један пар прајмера за први егзон (PecAt_ex1_Fw1 ATCCCCCATCGAAGCCCGG и PecAt_ex1_Rev1AATTTTTTCGCCAGAGTTGATCGCAAGACAG; *XmnI* рестрикционо место коришћено за клонирање егзона2 је подвучено) који даје PCR фрагмент величине 570 bp и други пар прајмера за други егзон (PecAt_ex2_Fw2 CATCTGGTTTACCAGCGGC и PecAt_ex2_Rev2 CAAAAGCTTGTTAGCAAGTGCTACAACCG који даје фрагмент од 502 bp) на основу GenBank секвенце X58894. Коришћењем геномске ДНК соја *A. tubingensis* FAT43 и специфичних прајмера. PCR методом добијена су два фрагмента. Успешно умножавање ДНК фрагмената очекиване величине (570 и 500 базних парова) указује на то да сој FAT43 поседује ген *pgalI* који је веома сличан оном код познатих сојева *A. tubingensis* врсте (Слика 16). Ови фрагменти су садржали отворени оквир читања (енгл. Open Reading Frame- ORF) који кодира 189 и 153 аминокиселине, док зрели протеин садржи 342 аминокиселине.

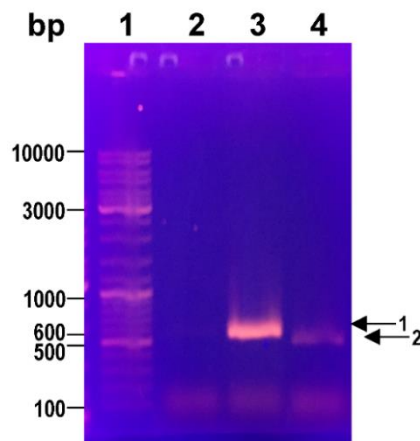
Експресија гена *pgalI* је снажно регулисана извором угљеника. У минималном медијуму који садржи просте угљене хидрате, као што су сахароза, глукоза, ксилоза или галактуронска киселина, сојеви *A. niger* N400 и *A. tubingensis* NW756 показали су минималну полигалактуроназну активност. Интересантно је да је значајна индукција производње ендо-полигалактуроназа примећена код *A. tubingensis* FAT 43 када су као извор угљеника коришћени супстрати које садрже пектин, попут резанаца шећерне репе, што је у складу са резултатима

добијеним за *A. niger* N400 и *A. tubigenensis* NW756 (136).
 60
 ATGCACTCCTTTGCTTCTCTTCTGGCCTACGGCCTAGCCGCCAGCGCCACCCTCGCTTCT
 M H S F A S L L A Y G L A A S A T L A S
 GCC TCCCCCATCGAAGCCCGGGGAAGCTGCACCTTCAAAACGGCTGCTGCTGCCAAAGCG 120
 A S P I E A R G S C T F K T A A A A K A
 GGCAAGGCAGGGTGCTCTACCATCACCTTGACAACATCGAAGTCCCCGCTGGAACCACC 180
 G K A G C S T I T L D N I E V P A G T T
 CTCGACCTGACCGGTCTCACCAGCGGTACGAAGGTCATCTTCGAGGGCACCACGACCTTC 240
 L D L T G L T S G T K V I F E G T T T F
 GATTATGAAGAATGGGCAGGCCCTTGATCTCCATGAGTGGCAAAGATATCACCGTCACT 300
 D Y E E W A G P L I S M S G K D I T V T
 GGTGCCTCAGGCCATCTCATCAACTGCGACGGTGCGCGGTGGTGGGACGGCAAGGGGACC 360
G A S G H L I N C D G A R W W D G K G T
 AGCGGAAAGAAGAAGCCCAAGTTCTTCTACGCTCATGGCCTTGACTCCTCGTCCATTACT 420
 S G K K K P K F F Y A H G L D S S S I T
 GGATTGAATATCAAGAACACTCCCCTTATGGCGTTTAGTGTTTCAGGCGGATGACATCACT 480
 G L N I K N T P L M A F S V Q A D D I T
 CTGACTGACATTACCATCAACAACGCGGACGGTGATACCCTGGGTGGACACAACACTGAT 540
 L T D I T I N N A D G D T L G G H N T D
 GCGTTTGATGTTGGTAACTCTGTGCGGTGTGAATATCATCAAACCGTGGGTCCATAACCAG 600
 A F D V G N S V G V N I I K P W V H N Q
 GATGACTGTCTTGCGATCAACTCTGGCGAGGTAAGCAGCTTTGAACATAGATTTGATTTG 660
 D D C L A I N S G E INTRON
 CATGTATGTTGATATTCTATAGAACATCTGGTTTACCAGCGGCACCTGCATTGGCGGCCA 720
INTRON N I W F T S G T C I G G H
 CGGTCTCTCCATCGGTTCTGTGCGGCGGCCGCTCCAACAACGTTGTCAAGAACGTCACTAT 780
 G L S I G S V G G R S N N V V K N V T I
 CGAACACTCCACCGTGAGCAATTCCGAGAACGCCGTCCGGATTAAGACCGTCTCTGGTGC 840
 E H S T V S N S E N A V R I K T V S G A
 CACTGGTTCCGTGTCTGAGATCACATACTCCAACATTGTCATGTCCGGCATCTCCGATTA 900
 T G S V S E I T Y S N I V M S G I S D Y
 CGGCGTCGTTATCCAGCAGGATTACGAGGATGGCAAGCCTACGGGTAAAGCCACGAACGG 960
 G V V I Q Q D Y E D G K P T G K P T N G
 TGTCAC TATTACGGATGTCAAGCTGGAGAGCGTGACTGGTACTGTGGATAGTAAGGCTAC 1020
 V T I T D V K L E S V T G T V D S K A T
 TGATATCTATCTCCTTTGCGGATCTGGTAGCTGCTCGGACTGGACTTGGGACGATGTGAA 1080
 D I Y L L C G S G S C S D W T W D D V K
 GGTCAC TGGAGGAAAGAAGTCTACTGCTTGCAAAAAC TACCCTTCGGTGGCTTCTTGCTAG 1141
 V T G G K K S T A C K N Y P S V A S C *

Слика 16. Секвенца *pgalI* гена; Секвенца подвучена црном бојом представља област интрона, док црвена означава лидер пептид. Пептидни фрагменти добијени анализом масене спектрометрије истакнути су плавом и зеленом бојом.

3.5.1 Клонирање гена у *E. coli*

E. coli експресиони систем се дуго користи за продукцију активних ензима, како унутарћелијски тако и ванћелијски. У оквиру ове дисертације развијена је производња рекомбинантне ПГ II клонирањем *pgalII* гена у експресиони вектор pQE_Ek. Најпре је клониран амплификован фрагмент који кодира за егзон 1 од 570 базних парова у *BsaBI* линеаризоване векторе (pMALc5HisEk и pQE_Ek) (Слика 17).



Слика 17. PCR амплификација: 1. Thermo Scientific GenRuler DNA Ladder mix маркер (100 -10000 bp), 2. негативна контрола без ДНК, 3. PCR амплификација првог егзона (570 bp), 4. PCR амплификација другог егзона (502 bp)

С обзиром да *BsaBI* рестрикциони ензим приликом сечења оставља равне крајеве, фрагмент се могао уклонирати у обе оријентације али је за даљи рад коришћен клон који има оријентацију у којој је *XmnI* рестрикционо место низводно у односу на таг који се налази на N-терминусу. Добијени клонови pMALc5HisEk-PGAex1 и pQE_Ek-PGAex1 (дигестија *SacI-XmnI* даје величину фрагмента од 600 базних парова) са исправном оријентацијом су коришћени за клонирање егзона 2. Фрагмент 2 који кодира егзон 2 величине око 500 базних парова је дигериран *HindIII* рестрикционим ензимом и клониран у конструкте pMALc5HisEk-PGAex1 и pQE_Ek-PGAex1 претходно исечене *XmnI-HindIII* рестрикционим ензимима. Добијени клонови pMALc5HisEk-PGAex1+2 и pQE_Ek-PGAex1+2 који садрже цео кодирајући *pgalII* ген су одабрани на основу дигестије *SacI-HindIII* (1100 базних парова) и потврђени секвенцирањем.

С обзиром на то да *E. coli* не поседује способност извођења сложених процеса гликозиловања, одлучено је да се за експресију користи *Pichia pink* модел систем, познат по својој способности да врши еукариотске процесе гликозиловања. Задржавање природног степена гликозиловања у *Pichia* систему може значајно побољшати ензимску активност и стабилност, чиме би рекомбинантни ензим био ближи својој природној функционалности (140).

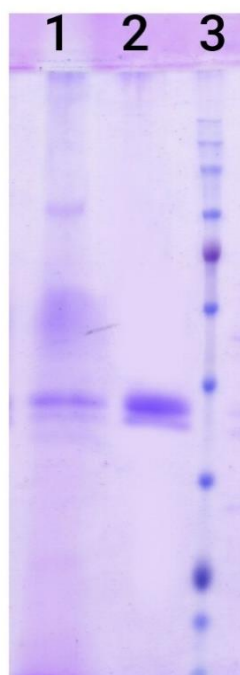
3.5.2 Клонирање гена и експресија у *P. pink*

Ради побољшања експресије и стабилности рекомбинантног протеина, *pgalII* ген је клониран је у *P. pink* модел систем користећи вектор pPink α -НС који на себи носи α -фактор сигналну секвенцу за екстраћелијско усмеравање синтетисаних протеина, С обзиром да је ген *pgalII* успешно клониран у *E. coli* експресионом систему (клонови pMALc5HisEk-PGAex1+2 и pQE_Ek-PGAex1+2) они су искоришћени за PCR амплификацију целог гена и његово клонирање у pPink α -НС плазмидни вектор у фазу транслације са α -фактором лигацијом у претходно исечен pPink α -НС *StuI-KpnI* рестрикционим ензимима.

Конструкт је затим унет процесом трансформације у *E. coli* DH5 α компетентне ћелије, како би се проверило да ли је клонирање гена било успешно. Након што је секвенцирањем потврђено да је ген успешно интегрисан у pPink α -НС вектор у фази са α -фактором, конструкт

pPink α -HC-PGAex1+2 је изолован у великој количини, линеаризован *SpeI* рестрикционим ензимом и линеарна ДНК унета у *P. pink* електропорацијом. Ћелије *P. pink* које су интегрисале конструкт у хромозом мењају боју из пинк у белу, а величина колонија указује на број инсерција конструкта у хромозом. За експресију протеина изабрано је неколико највећих белих колонија које су најпре гајене у медијуму са глицеролом за раст, који садржи пептон и екстракт квасца, који додатно стабилизују секретоване протеине, и спречавају њихово деградовање. Експресија је рађена на 30°C уз мешање на 250 rpm и додавањем метанола. Важан параметар за ефикасну експресију у *P. pink* сојевима је адекватна аерација током индукције метанолом (141).

Ендо-ПГ, која је екстрацелуларно експримирана у *P. pink*, пречишћена је из медијума метал-афинитетном хроматографијом на Ni-NTA колони. SDS PAG електрофорезом је потврђена чистоћа ензима и одређена је молекулска маса рекомбинантног ензима, која износи око 40 kDa (Слика 18). Рекомбинантна ПГ показује сличну термалну и рН стабилност као и нативни ензим, при чему су разлике занемарљиво мале.



Слика 18. Електрофоретска анализа: 1. експресија ендо-ПГ; 2. пречишћена рекомбинанта ендо-ПГ; 3. молекулски протеински маркери (17, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135, 180, 245 kDa).

3.6 Пектинолитички ензими из *Bacillus* spp.

Већина воћних сокова има киселу рН вредност, најчешће око 4, тако да иако су добар извор угљених хидрата, садрже мало протеина, витамина и минерала. Обогаћивање сокова овим нутријентима је пожељно, али киселост сокова представља проблем јер доводи до таложења протеина, што нарушава текстуру сока. Подешавањем рН вредности на неутралнији ниво, око рН 6, овај проблем се може решити. Употреба пектин лијаза у овако прилагођеним соковима омогућава производњу стабилних воћних база погодних за додавање нутријената.

У процесима прераде сокова, ензими који су активни у условима неутралног рН играју кључну улогу. Најчешће се користе ензими бактеријског порекла, јер показују стабилност и ефикасност у тим условима. Пектин лијазе, које такође потичу од бактерија, имају велики потенцијал у овим процесима, посебно за побољшање квалитета сокова.

У оквиру ове студије тестирано је 10 сојева *Bacillus* врста из лабораторијске колекције сојева. Изоване сојеви су одгајани у течном LB медијуму, а добијени узорци су тестирани на активност пектин лијаза. Преглед ових сојева дат је у Табели 9.

Табела 9. Сојеви *Bacillus* из лабораторијске колекције сојева

Назив соја и ознака	Пектин лијазна активност (U/mL)
<i>B. subtilis</i> 17B	2,5
<i>B. halotolerans</i> 1B	11,0
<i>Bacillus</i> sp 5B	8,9
<i>B. licheniformis</i> ST1	2,3
<i>B. paralicheniformis</i> ATCC 9945a	3,2
<i>B. velezensis</i> 24B	49,0
<i>B. velezensis</i> 16B	60,5
<i>Bacillus</i> sp 2A	13,1
<i>B. amyloliquefaciens</i> 12B	9,0
<i>Bacillus</i> sp 19A	20,2

На основу добијених резултата, сој *B. velezensis* 16B (GenBank: KC887501.1) је идентификован као најбољи произвођач пектин лијаза и одабран за даља истраживања. С обзиром на то да је овај сој показао највишу пектин лијазну активност, анализирали смо његов цео геном, који је претходно секвенциран, и утврдили присуство *pelB* гена за пектин лијазу. Детаљном анализом и поређењем са базама података закључено је да овај ензим није клониран и окарактерисан у литератури. Због потребе за већим количинама ензима за карактеризацију и експерименте оптимизације примене, одлучили смо да приступимо клонирању гена за пектин лијазу из соја *B. velezensis* 16B.

3.6.1 Рекомбинантна производња пектин лијаза

Клонирање гена за пектин лијазу започето је изоловањем хромозомалне ДНК из преконоћне културе *B. velezensis* 16B, која је коришћена као ДНК основа. За умножавање гена коришћени су прајмери дизајнирани на основу секвенце *pelB* гена *B. velezensis* 16B:

- *Forward* прајмер Pec_16B_Fw Ek (AGCAGCGGCTTATCCGGATGTG) са додатком "A" на 5' крају.
- *Reverse* прајмер Pec_16B_Rev (CGGCTGCAGGCGGTTTTTCGTATTATGG) са подцртаним местом за *PstI* ензим.

За PCR амплификацију је коришћења Phusion High Fidelity Taq ДНК полимераза при следећим условима:

- почетна денатурација на 98°C (120 s),
- 30 циклуса (денатурација на 98°C, 20 s; анелирање на 55°C, 30 s; полимеризација на 72°C, 90 s),
- завршна полимеризација на 72°C (420 s).

Амплификовани ген *pelB* (969 bp), без секвенце за сигнални пептид, пречишћен је, дигестован *PstI* рестрикционим ензимом и клониран у исечени pQE_Ek вектор коришћењем *BsaBI-PstI* рестрикционих ензима. Лигација је извршена Т4 ДНК лигазом. Компетентне ћелије *E. coli* M15pREP4 трансформисане су овим конструктом и селековане на LB агару са ампицилином и канамицином. Позитивни клонови pQE_Ek_PelB потврђени су рестрикцијом дигестијом ензимима *SacI/HindIII* и секвенцирањем (*Macrogen Europe*). Рекомбинантна пектин лијаза (BvPelB) успешно је експримирана као унутарћелијски His-таговани протеин у *E. coli*

M15pREP4. Ген је клониран тако да протеин садржи His6-таг и место за уклањање таг-а помоћу ентерокиназе, што је омогућило једноставно пречишћавање на Ni-NTA колони и добијање ензима у облику сличном нативном. Одређена је пектин лијазна активност (Табела 10) као и концентрација протеина Бредфордовом методом. SDS-PAG електрофорезом је проверена чистоћа (Слика 20). Овај поступак је створио основу за даљу биохемијску карактеризацију и експерименталне анализе ензима.

Табела 10. Кораци у пречишћавању *BvPelB*

Кораци пречишћавања	Укупна активност (U)	Укупни протеин (mg)	Специфична активност (U/mg)	Степен пречишћавања	Принос (%)
Лизат	111008	330	336,63	1	100
Ni-NTA	91022	96,56	942,56	2,8	82

3.6.1.1 Биохемијска карактеризација *BvPelB*

Дводимензионална и тродимензионална структура *BvPelB* анализирани су како би се утврдиле сличности и разлике са другим пектинолитичким ензимима. Пречишћени ензим је биохемијски окарактерисан кроз испитивање његове молекулске масе, pI вредности, супстратне специфичности, као и утицаја pH и температуре на активност и стабилност.

3.6.1.1.1 Анализа дводимензионалне и тродимензионалне структуре *BvPelB*

Анализа хомологије аминокиселинске секвенце и очуваности структуре пектин лијазе је од значаја за разумевање њене ензимске функције и представља основу за њено клонирање. Ген *pelB* из *B. velezensis* 16B кодира протеин који се састоји од 354 аминокиселине, садржи лидер пептид од 32 аминокиселине и зрели ензим од 322 аминокиселине (Слика 19).

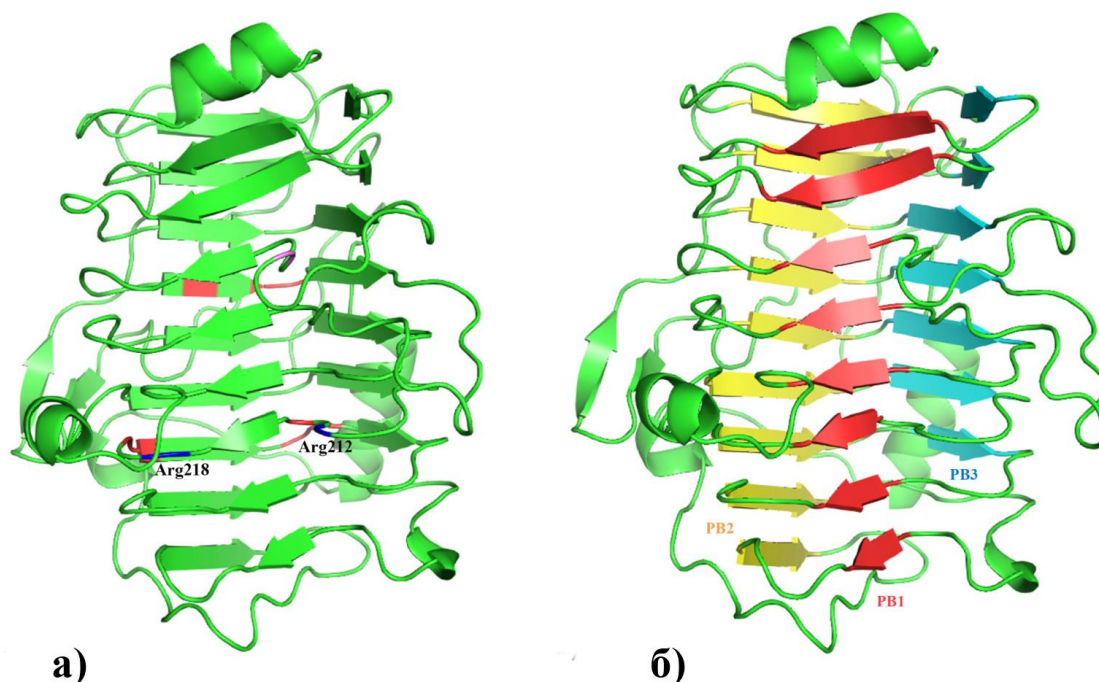
Претпостављена протеинска секвенца *BvPelB* показује 100 % сличности са *Pel* секвенцама из неколико генома *B. velezensis* (GenBank бројеви: MCX3306259.1, MCX8440859.1, MEC1338636.1, OQV51584.1 и ULH20295.1). Међутим, прегледом литературе установљено је да ниједна од тих секвенци није клонирана и експримирана. Упоредна анализа протеинских секвенци са познатим пектин/пектат лијазама показала је највише сличности (54,09 %) са пектиназом *BsPelA* 1A из *B. subtilis* (UniProtKB/Swiss-Prot: P94449,1) (142). Занимљиво је да пектат лијаза из *B. subtilis* соја 168 (UniProtKB/Swiss-Prot: P39116,1) (143) показује веома мали степен сличности (13,33 %) са *BvPelB*.

У поређењу са ензимима из *Bacillus sp P-4-N* (GenBank: BAA96478,1) (144), *Bacillus pumilus DKS1* (GenBank: ACD11362,1) (145) и *Shouchella clausii* (раније *Bacillus clausii*, GenBank: ALK03050,1) (146), *BvPelB* је показала идентичност од 25,85%, 24,02% и 22,6%, редом. Поређењем функционалне аминокиселинске секвенце *BvPelB* са секвенцама *BsPelA*, *BsPel*, *BpPel-DKS1*, *BaPel-4N* и *BacPelA* могу се уочити одређене сличности са другим пектат лијазама. Важно је напоменути да *BvPelB* садржи два конзервирана региона (W-DH и R-P---RY/FG---H---NY), које имају значајну улогу у везивању супстрата и у катализи (129). Очуваност ових регија указује на њихов функционални значај код различитих пектат лијаза.

Анализа секвенци даје увид о очуваности каталитичких остатака пектин лијазе. Иако је укупна сличност секвенци мала, аспартат (D) на позицији 152 (без лидер пептида Asp120) и аргинин (R) на позицији 243 (без лидер пептида Arg211) из пектин лијазе савршено се поклапају са каталитичким остацима D и R пронађеним у другим пектат-лијазама. Занимљива чињеница је да R244 (без лидер пептида R212) из пектин лијазе тачно се поклапа са каталитичким остатком R235 из *BpPel-DKS1*, док R250 (без лидер пептида R218) одговара другом R остатку у конзервисаној регији пектат лијаза. Ово преклапање показује важност датих аминокиселинских остатака за ензимску активност. С обзиром на присуство аргинина у обе пектиназе и пектат лијазе, закључује се да је његова улога каталитичка. Претпоставља се да аргинин обезбеђује позитивно наелектрисање, које стабилизује негативно наелектрисани

Слика 19. Поравнање секвенце аминокиселина *BvPelB* са *BsPelA* (пектин лијаза 1А из *B. subtilis*), *BsPel* (*B. subtilis* subsp. *subtilis* сој 168), *BpPel-DKS1* (*B. pumilus DKS1*), *BsPel-4 N* (*Bacillus* sp, *P-4-N*) и *BacPelA* (*S. clausii*). Две конзервирани регије карактеристичне за пектинолитичке ензиме су уоквирене. Звездица (*) показује идентичне аминокиселине, а остали знакови (:) указују на резлике између секвенци, (●) каталитичка места, (○) место везивања калцијума. Сигнални пептиди су обележени црвеном бојом. Аминокиселине које су исте у свим секвенцама су означене жутом бојом. Аминокиселине специфичне за *BvPelB*, које се такође налазе у одређеним референтним ензимима, приказане су плавом бојом. Сива боја се користи за аминокиселине које су присутне у неким референтним ензимима, али не и у *BvPelB*.

Језгро структуре *BvPelB* (Слика 20) представља типичан β -хеликс који се састоји од три паралелна β -ланца (PB1, PB2 и PB3) распоређена у десну спиралу. Ови β -ланци су међусобно повезани са три петље (T1, T2 и T3), од којих свака има специфичну дужину и улогу у структури. Петља T1, која повезује PB1 и PB2, је релативно кратка, што доприноси компактности структуре. Петље T2 и T3, које повезују PB2 и PB3, односно PB3 и PB1, су дуже и обезбеђују већу флексибилност и стабилност хеликса (158). У β -хеликсу *BvPelB* идентификовано је седам комплетних навоја, са 20 до 34 аминокиселине по навоју. Петље које повезују β -плоче садрже каталитички центар одговоран за разградњу пектина. Унутрашњост β -плоче (од 64, до 228, аминокиселине) састоји се од добро организованих кластера бочних ланаца. Ови кластери укључују 41 хидрофобну аминокиселину, попут валина, аланина, изолеуцина и леуцина, које доприносе стабилности ензима. Петље које повезују β -плоче формирају додатне структуре, попут антипаралелних β -плоча и α -хеликса. Ови структурни елементи доприносе стабилности, конформацији и електростатичким својствима ензима, што је од значаја за његову активност.



Слика 20. Предвиђена 3D структура *BvPelB* помоћу AlphaFold: (а) два конзервирана региона карактеристична за пектинолитичке ензиме, обележена су црвеном бојом. Конзервирани аргинински остаци обележени су плавом бојом, док је место везивања калцијума означено ружичастом бојом, (б) β -хеликс који се састоји од три паралелна β -низа (PB1, PB2 и PB3, обојена редом црвеном, жутом и плавом бојом), повезана са три петље (Turn 1, Turn 2 и Turn 3).

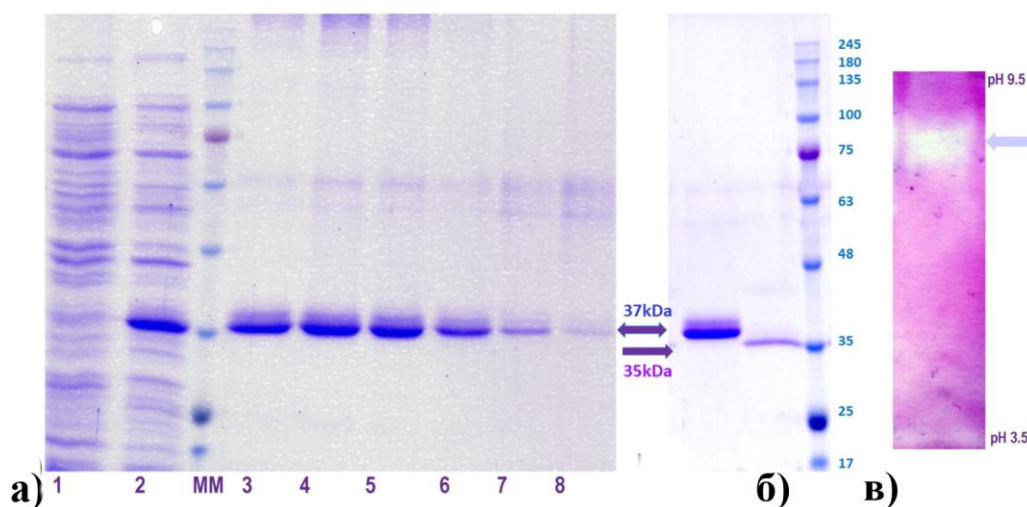
Иако пектин лијазе имају сличну основну структуру, постоје значајне варијације у грађи и функцији петље која везује супстрат. Ове петље се пружају из паралелног β -хеликалног језгра и обухватају супстрат. Поред тога, ови ензими деле заједничке структурне карактеристике,

укључујући високоорганизовано језгро састављено од линеарних бочних ланаца усмерених ка унутрашњости, што доприноси стабилности и функцији ензима.

Резултати поређења структурних сличности и разлика указују на то да *BvPelB* дели каталитичке остатке кључне за пектинолитичку активност са другим пектат лијазама. Ови резултати доприносе разумевању механизма рада ензима и истичу очуваност функција унутар ове групе ензима. Даље структурне и функционалне анализе су неопходне како би се разјаснила тачна улога ових остатака и њихов допринос активности пектинолитичких ензима.

3.6.1.1.2 Одређивање молекулске масе и pI вредности *BvPelB*

Бактеријске пектин лијазе обично имају базне изоелектричне тачке. За *BvPelB*, теоријска pI вредност износи 8,8, док је предвиђена молекулска маса 35 kDa. Изоелектрично фокусирање са зимограмском детекцијом показало је да pI вредност *BvPelB* износи 8,5 (Слика 21в), док је SDS-PAGE електрофорезом потврђена молекулска маса од 35 kDa (Слика 21б).

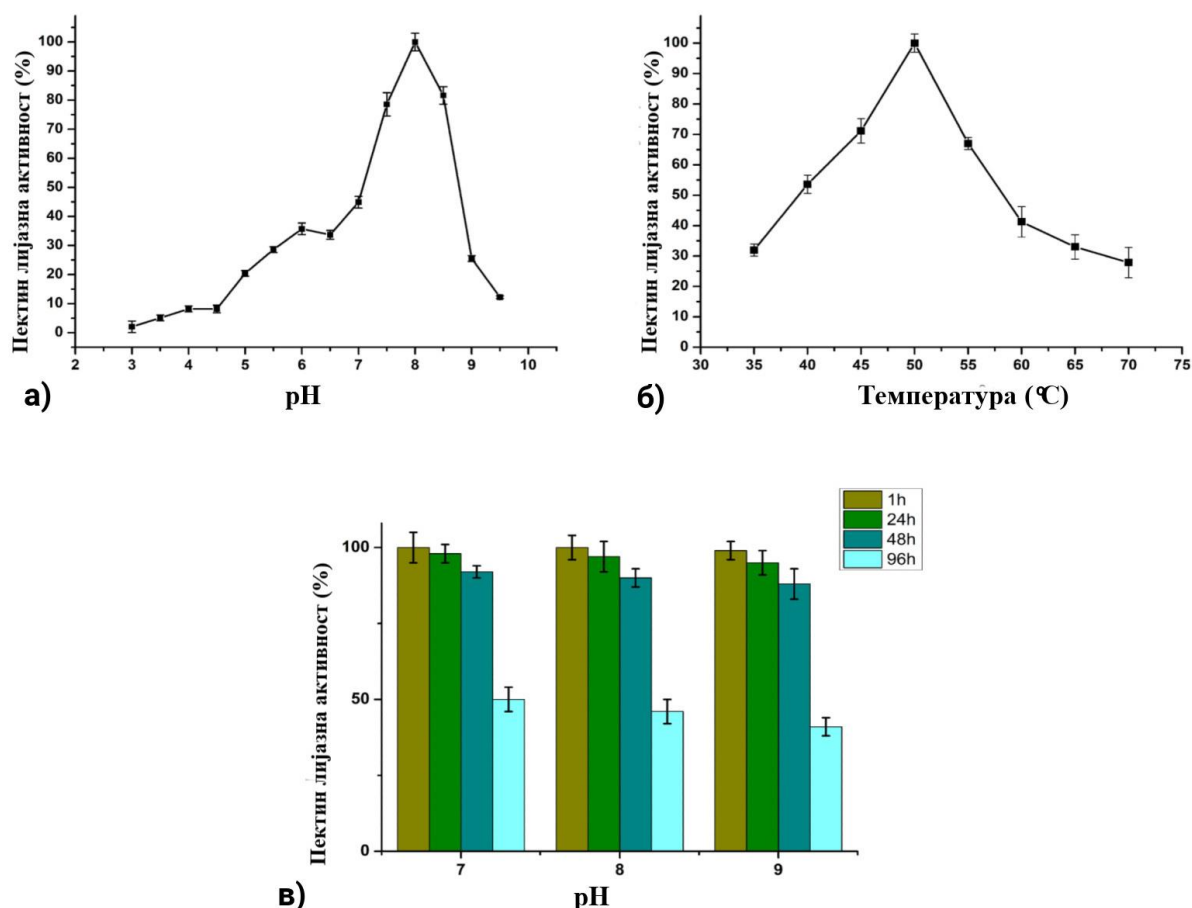


Слика 21. а) Електрофореграм пречишћавања: 1. лизат; 2. невезани протеини; MM; од 3. до 8. активне фракције *BvPelB*, б) молекулска маса *BvPelB* са и без тага, в) изоелектрична тачка *BvPelB*

3.6.1.1.3 Утицај pH и температуре на стабилност и активност *BvPelB*

На основу података из литературе, алкални и термостабилни пектинолитички ензими углавном потичу од бактерија, нарочито врста из рода *Bacillus*. Ови ензими показују оптималну активност у pH опсегу од 8,0 до 10,5 и на температурама између 40 и 70°C (149–151).

Да би се испитао утицај pH и температуре на активност, као супстрат је коришћен високо метиловани пектин. *BvPelB* активност одређивана је у различитим pH и температурним опсезима (Слика 22). Резултати су показали да ензим постиже највећу активност на pH 8, док се активност значајно смањује испод pH 6 и изнад pH 9 (Слика 22а). Оптимална температура је утврђена да је на 50°C, а ензим је задржао преко 30 % активности у температурном опсегу од 35 до 70°C (Слика 22б). Енергија активације, израчуната применом Аренијусове једначине износила је 61,45 kJ/mol. Слична вредност добијена је за пектин лијазу из *Carica papaya* (152).



Слика 22. Утицај pH и температуре на стабилност и активност *BvPelB* а) pH оптимум, б) температурни оптимум и в) pH стабилност

BvPelB показала је изузетну стабилност у алкалном pH опсегу од 7 до 9 (Слика 22в), задржавајући преко 95% своје почетне активности након 24 сата и 88% након 48 сати на 25°C.

Термална стабилност испитивана је на четири различите температуре, укључујући оптималну, као и температуре изнад и испод оптималне за активност (Табела 11). Кинетички параметри ензима израчунати су на основу Аренијусове једначине и приказани у Табели 11. Ови резултати истичу високу термалну стабилност и прилагодљивост *BvPelB*.

Табела 11. Термална стабилност *BvPelB*

Температура (°C)	Константа брзине деактивације K_d (h^{-1})	Полуживот $t_{1/2}$ (h)
40	0,0037	187
50	0,0123	56,4
60	0,173	4,01
70	0,196	3,54

Полуживот *BvPelB* на 50°C био је дужи од 56 сати, док је на 40°C продужен на 187 сати, при чему је ензим задржао око 55% своје активности коју испољава на оптималној температури. Добијена термална стабилност за рекомбинантну пектин лијазу је значајно виша од раније пријављених вредности за комерцијалне пектин лијазе (153). Енергија деактивације (Ed) пектин лијазе у испитиваном температурном опсегу, израчуната према линерној модификацији Аренијусове једначине, износила је 130,5 kJ/mol. Ова добијена вредност је два пута већа од раније пријављене Ed за комерцијалну пектин лијазу (Pectinex 3XL) (143), као и

пектин лијазе из *Oidiodendron echinulatum* MTCC 1356 и из *B. pumilus* DKS1, а шест пута већа од пектин лијазе изоловане из *Fusarium lateritum* MTCC 8794 (145,153–155)

BvPelB показала је високу стабилност у алкалним и температурним условима, сврставајући се међу најстабилније пектин лијазе пореклом из мезофилних бактерија које су до сада описане.

3.6.1.1.4 Испитивање утицаја металних јона и агенаса на *BvPelB*

Активност *BvPelB* испитивана је у присуству различитих металних јона и хемијских агенаса на температури од 50°C. Метални јони Mn^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} значајно су инхибирали активност ензима, док су Mg^{2+} и Ca^{2+} имали мали или никакав утицај. Једино је Mg^{2+} повећао активност за 6%, док је активност остала непромењена у присуству Ca^{2+} , што указује на независност *BvPelB* од Ca^{2+} јона, за разлику од већине микробних пектин лијаза. Претходна истраживања такође указују на позитиван утицај Mg^{2+} јона на пектин лијазну активност (156). Од хемијских агенаса, SDS је показао јак инхибиторни ефекат, смањујући активност за 31% при концентрацији од 0,1 %, док је потпуно инхибирао активност на 0,5 %, EDTA и Triton X-100 нису значајно утицали на активност *BvPelB*. Ови резултати истичу стабилност *BvPelB* у алкалним условима и његову толеранцију на већину испитиваних агенаса, уз изузетак SDS-а, што је у складу са претходним истраживањима бактеријских пектин лијаза (157).

3.6.1.1.5 Супстратна специфичност *BvPelB*

У погледу супстратне специфичности, *BvPelB* је показала највишу лијазну активност према високо-метилованом пектину, који је узет као референтна вредност (100% активности). У поређењу са високо-метилованим пектином, активност ензима на ниско-метилованом пектину износила је 50,41%, на ПМГ 39,9 %, а на ПГА 21,25%. *BvPelB* показује вишу активност на пектину са већим степеном метилације, што је јединствена карактеристика у односу на већину окарактерисаних алкалних пектин лијаза.

3.6.1.1.5.1 Испитивање начина разградње супстрата од стране *BvPelB*

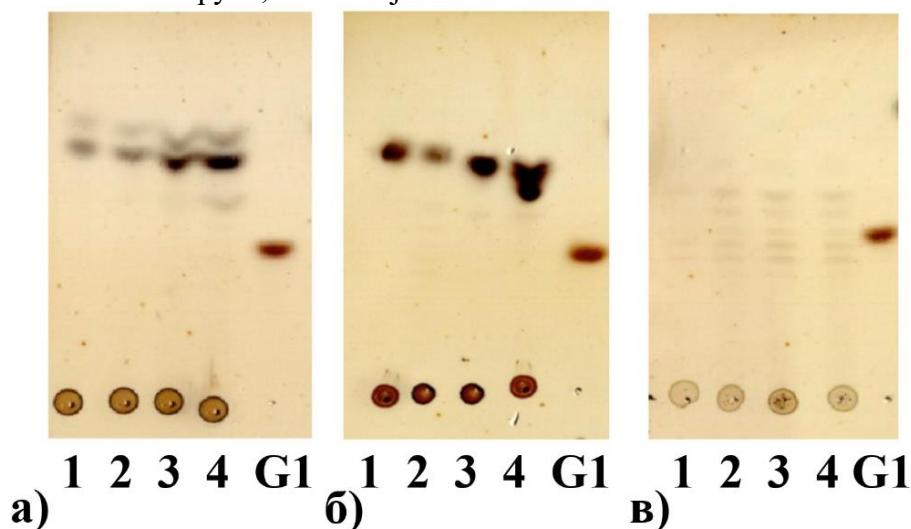
Да би се утврдило да ли *BvPelB* делује као ендо- или егзо-пектиназа, испитиван је начин на који ензим разграђује пектин кроз мерење смањења вискозности раствора и процента разградње гликозидних веза у ВМ пектину и ПГА. Вискозност раствора је измерена вискозиметром пре и након хидролизе супстрата, док је степен разградње одређиван мерењем повећања концентрације редукујућих шећера, што указује на степен разлагања гликозидних веза.

BvPelB је смањила релативну вискозност ВМ пектина за 66% уз разградњу само 3% гликозидних веза. Насупрот томе, код ПГА супстрата релативна вискозност је смањена за 40% уз разградњу приближно 2% гликозидних веза при истим реакционим условима. Претходна истраживања показала су да ендо-пектин лијазе смањују релативну вискозност раствора пектина за 50% након разградње 2% гликозидних веза, док егзо-пектат лијазе постижу слично смањење вискозности након разградње 22 % гликозидних веза (158). Ови резултати указују на то да *BvPelB* делује као ендо-лијаза, с обзиром на значајно смањење вискозности при ниском степену разлагања гликозидних веза.

3.6.1.1.5.2 TLC анализа производа хидролизе

TLC анализа потврдила је присуство незасићених олиго-галактуронских киселина међу идентификованим производима, при чему је моногалактуронска киселина коришћена као стандард (Слика 23). Ипак, моногалактуронска киселина није детектована као производ хидролизе. Поређење ових резултата са сличним студијама указује да *BvPelB* ослобађа мешавину незасићених олиго-галактуронских киселина, што је карактеристично за ендо-лијазе. Ендо-лијазе обично генеришу димере или веће олигомере, док егзо-лијазе углавном производе мономере. На основу каталитичких производа, закључено је да *BvPelB* делује као ендо-лијаза.

Иако је бактеријског порекла, *BvPelB* показује хидролитичку активност сличну многим гљивичним пектин лијазама. Уопштено, гљивичне пектин лијазе показују специфичност према галактуронатним полимерима, посебно онима богато метилованим С-6 карбоксилним групама, попут пектина. С друге стране, бактеријске лијазе циљају галактуронатне полимере са нижим односом метилованих С-6 група, као што је пектат.



Слика 23. TLC анализа производа хидолизе супстрата *BvPelB* (а) приказ реакције са ВМ пектином, (б) са НМ пектином, в) са полигалактуронском киселином (ПГА). Узорак 1 представља контролу супстрата, узорак 2 приказује хидролизу након 2 сата, узорак 3 хидролизу након 4 сата, а узорак 4 након 24 сата. Узорак G1 означава стандард D-галактуронске киселине.

3.7 Примена пектинолитичких ензима у побољшању карактеристика воћних сокова

3.7.1 Примена пектинолитичког комплекса ензима

Пектинолитички ензими широко су доступни на тржишту и већ се користе у различитим индустријским процесима, што указује на њихов значај у преради воћа. У циљу процене ефикасности пектинолитичког комплекса добијеног из *A. tubingensis* FAT43, изведени су експерименти који су потврдили његов потенцијал за повећање приноса, избистрења и концентрације редукујућих шећера у воћним соковима. Када се помињу редукујући шећери у овом раду, у њих се укључује и галактуронска киселина, јер је квантификација урађена DNS методом, која детектује сва редукујућа једињења. Тест отечњавања воћних каша (јабука, банана, кајсија, поморанџи и дуња) изведен је на оптималној температури за активност пектиназа из *Aspergillus* spp. (45°C) (159). Ефикасност отечњавања процењена је упоређивањем запремине сока који је добијен и измерен пре и након ензимског третмана, при чему је принос добијеног сока израчунат према једначини описаној у литератури (160):

$$\text{Принос сока (\%)} = \frac{\text{Маса бистрог сока (g)}}{\text{Маса пулпе (g)}} \times 100$$

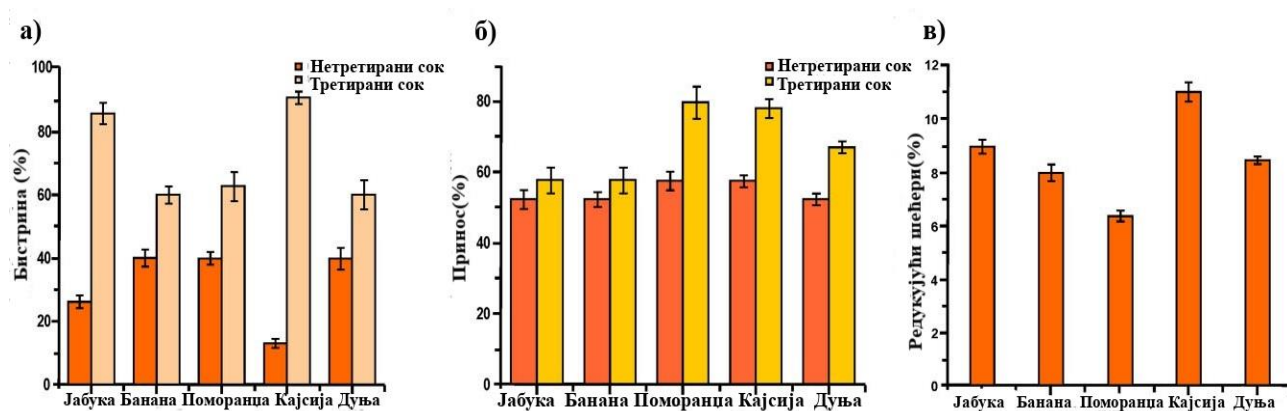
Ефикасност кларификације је потврђена спектрофотометријском анализом бистрине сокова на 660 nm (161), и израчуната коришћењем следеће једначине:

$$\text{Кларификација (\%)} = \frac{T_t - T_c}{T_c} \times 100$$

где је T_t трансмитанција третираног сока, а T_c трансмитанција нетретираног сока.

Добијени су следећи резултати, за:

- јабуке: принос сока повећан је са 52% на 71%, уз избистрење од 85% и повећање редукујућих шећера на 9%;
- банане: принос је повећан са 52% на 72%, избистрење достигло 60%, а концентрација редукујућих шећера 8%;
- кајсије: принос је повећан са 57% на 77%, уз избистрење од 91% и највеће повећање редукујућих шећера од 11%;
- поморанце: најефикасније отечњавање сока, са приносом повећаним са 57% на 79%, уз избистрење од 63% и повећање редукујућих шећера за 8,5%;
- дуње: принос је повећан са 52% на 66%, избистрење достигло 60%, док је концентрација редукујућих шећера повећана за 8,5%;



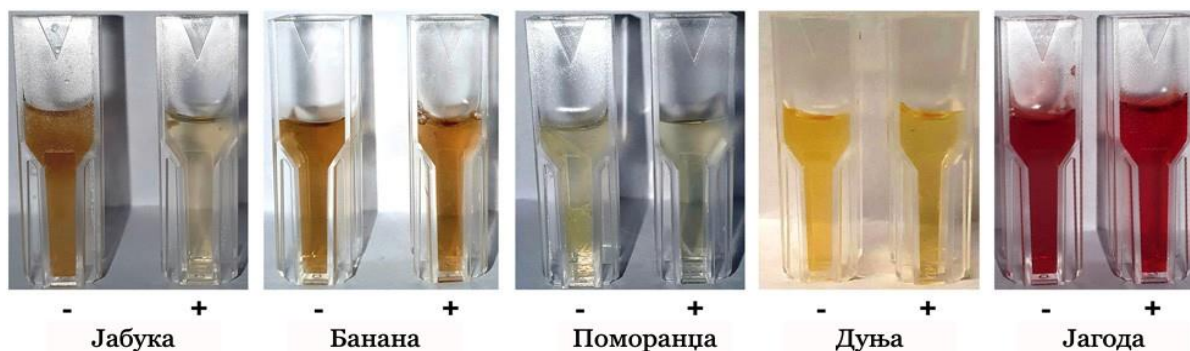
Слика 24. Третман воћних сокова пектинолитичким комплексом: (а) бистрина, (б) принос и (в) повећање концентрације редукујућих шећера

Добијени резултати (Слика 24) показују да је пектинолитички комплекс добијен из *A. tubingensis* FAT43 упоредив са одређеним комерцијалним пектинолитичким препаратима (162) који се индустријски примењују у преради воћа.

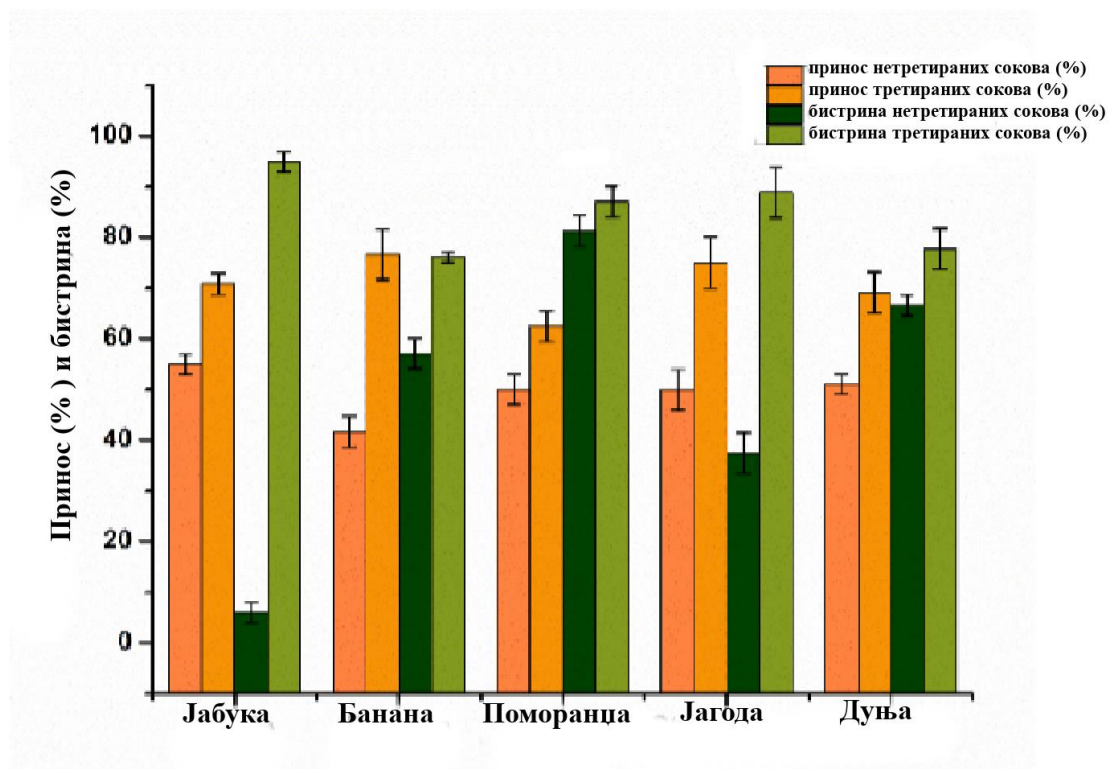
3.7.2 Примена ПГ II у побољшању карактеристика воћних сокова

Након испитивања природног ензимског комплекса, због потребе за већим количинама ензима, главни ензим из комплекса, ПГ II, клониран је и произведен у *P. pink* за даљу примену. Експерименталне анализе су спроведене на дуњи, јабуци, банани, јагоди и поморанци како би се испитао допринос ПГ II у побољшању карактеристика воћних сокова.

Највећи принос у отечњавању постигнут је код јагода, где је принос сока повећан за 25% у односу на нетретиран сок. Јабуке, поморанце и банане садрже високо метиловане пектине (степен метилације преко 50% (163–165) што утиче на ефикасност ензимског третмана. Третман сока од поморанце постигао је избистравање од 87,1% и повећање приноса за 12,5%, док је код јабука принос повећан за 15,83%, уз бистрину од 95%. Сок од банане је показао повећање приноса од 21%, са степеном избистравања од 76,1%. Насупрот томе, дуње, са степеном метиловања пектина преко 85% (166), показале су мању ефикасност ПГ II у отечњавању, уз повећање приноса од само 10%. Резултати отечњавања и избистравања ових сокова приказани су на сликама 25 и 26.



Слика 25. Приказ избистривања сокова: нетретирани (-) и ензимски третираны сокови (+)



Слика 26. Приказ резултата избистривања и отечњавања воћних сокова

Пектинолитички комплекс постиже боље резултате у третману одређених сокова, посебно код поморанца, јабука и дуња, где синергистичко деловање ензима значајно повећава принос и бистрину. Примећено је да заједничко деловање ПГ и других ензима доприноси повећању приноса, док је код дуња ефекат ПГ ензима ограничен због високог метиловања епектина, што захтева додатне ензиме. Код банана је ефекат ПГ ензима упоредив са пектинолитичким комплексом, што указује на мањи утицај других ензима у третману овог воћа. Ови резултати истичу значај синергизма у комплексу, али и улогу ПГ ензима, који код одређеног воћа, попут банана, доминира у побољшању приноса сока.

3.7.2.1 Испитивање антиоксидативних својстава воћних сокова

Циљ испитивања био је да се утврди да ли ензимски третман повећава антиоксидативни капацитет воћних сокова и у којој мери у односу на нетретиране сокове. За анализу промена у антиоксидативним својствима примењени су FRAP (енгл. Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH (енгл. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) и одређивање укупног фенолног садржаја TPC (енгл. Total Phenolic Content) у соковима пре и након третмана са ПГ II.

FRAP тест је изведен мешањем узорак са FRAP реагенсом, након чега је апсорбанција измерена и FRAP вредност израчуната као еквивалент аскорбинске киселине (167). DPPH тест је укључивао мешање узорак са DPPH реагенсом у метанолау, а резултати су изражени као

обезбојење или еквивалент аскорбинске киселине (168). Укупни фенолни садржај (TPC) одређен је методом Синглетон и сар. (1965) (169), изражен као еквивалент галне киселине (GAE). Резултати FRAP, DPPH и TPC тестова пре и након ензимске обраде анализирани су t-тестом, а вредности и разлике приказане су у Табели 12.

Табела 12. Антиоксидативни потенцијал и укупни фенолни садржај третираних и нетретираних воћних сокова.

Воћни сок	DPPH (mmol AAE)			FRAP (mmol AAE)			TPC (μ mol GAE)		
	Нетретирани сок	Третирани сок	р-вредност	Нетретирани сок	Третирани сок	р-вредност	Нетретирани сок	Третирани сок	р-вредност
Јабука	0,74 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,03	0,002	0,13 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,127	56 $\pm$ 2	65 $\pm$ 2	0,005
Банана	1,16 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,05	0,340	1,00 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,03	0,178	958 $\pm$ 32	1002 $\pm$ 41	0,217
Поморанца	2,75 $\pm$ 0,09	2,89 $\pm$ 0,10	0,146	6,32 $\pm$ 0,24	6,64 $\pm$ 0,24	0,148	885 $\pm$ 31	885 $\pm$ 24	1,000
Јагода	3,51 $\pm$ 0,12	3,69 $\pm$ 0,13	0,153	1,70 $\pm$ 0,28	1,51 $\pm$ 0,32	0,017	1500 $\pm$ 51	2027 $\pm$ 45	0,0002
Дуња	1,11 $\pm$ 0,04	1,63 $\pm$ 0,04	0,0001	1,99 $\pm$ 0,07	2,23 $\pm$ 0,08	0,127	479 $\pm$ 18	498 $\pm$ 15	0,233

Статистичка анализа резултата TPC, DPPH и FRAP тестова пре и после третмана ензимом урађена је коришћењем Student-овог t-теста. Значајна разлика у садржају укупних полифенолних једињења и антиоксидативној активности утврђена је за р-вредности $< 0,05$, док су р-вредности $> 0,05$ указивале на одсуство значајних промена. Сок од јагода показао је највеће повећање фенолног садржаја након ензимског третмана, што је било у складу са високим антиоксидативним потенцијалом измереним DPPH и FRAP тестовима, али у супротности са претходним истраживањима која су показала да третман сока од јагода пектиназом из *A. niger* није утицао на антиоксидативну активност (170).

Антиоксидативни капацитет воћних сокова је знатно повећан након третмана сокова од дуње (47%) и јабуке (20%). Сличан ефекат примећен је и код сокова од поморанце и банане, Ово повећање може бити последица боље екстракције антиоксиданата попут фенола и каротеноида из ћелијске цитоплазме. Пектиназа игра кључну улогу у овом процесу, разграђујући средњу ламелу и примарни ћелијски зид (Слика 1), чиме се олакшава ослобађање полифенолних једињења и каротеноида. У литератури постоје подаци о повећању антиоксидативног потенцијала у соковима од кајсије и малине третираним пектиназом (171,172).

Групе које донирају електроне, попут карбоксилних, хидроксилних и метоксилних група, могу значајно побољшати антиоксидативна својства узорка (173). Иако је способност хидроксилних група у полисахаридима да неутралишу слободне радикале ограничена због одсуства фенолних структура, присуство галактуронске киселине и других хемијских компоненти у полисахаридима значајно доприноси њиховој антиоксидативној активности (174).

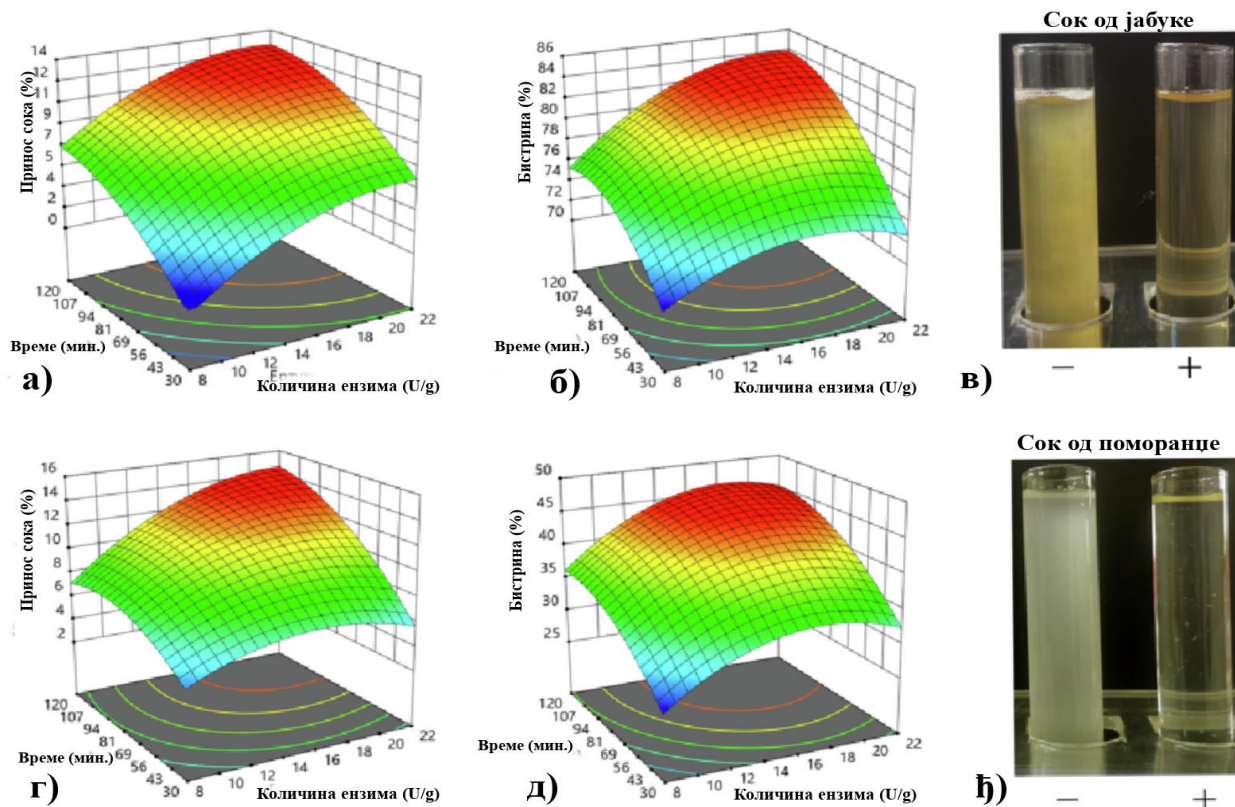
3.7.3 Примена BvPelB у преради неутралних сокова

Сокови од јабука и поморанци, због садржаја високометилованог пектина, изабрани су за рад као одговарајући супстрати за пектин лијазе. Воћна пулпа је хомогенизована, неутрализована и третирана BvPelB, на рН 6 и температури од 50°C у трајању од 2 сата, чиме је постигнута оптимална ензимска активност и ефикасна разградња пектина.

3.7.3.1 Оптимизација услова BvPelB третмана сокова

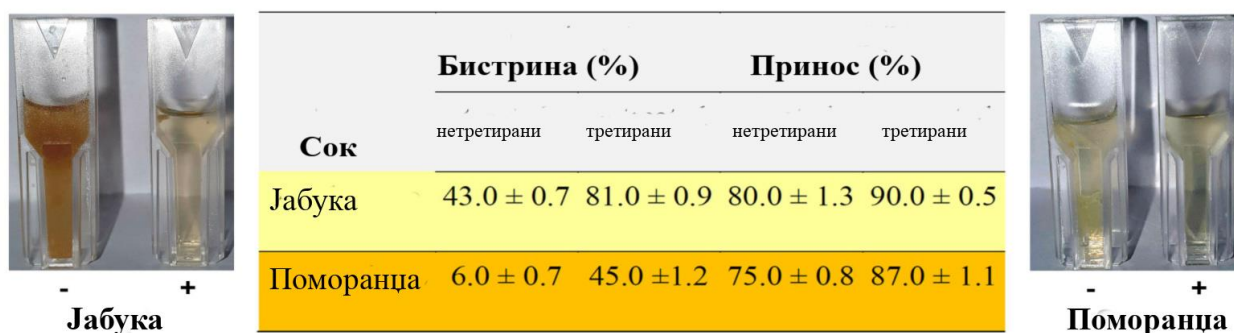
Оптимизација је спроведена коришћењем централног композитног дизајна како би се утврдили оптимални услови за избистривање и отечњавање сокова од јабуке и поморанце. Независне променљиве биле су количина ензима и време, са пет нивоа за сваки ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ и $+\alpha$) фактор. ANOVA резултати показали су да је модел значајан ($p < 0,0001$), што указује на адекватност изабраних фактора. Највећа побољшања уочена су између 60 и 90 минута, док је

ефикасност процеса расла с већом количином ензима. Анализа 3D графикона указала је на плато у „дрвеној зони“, што сугерише да даље повећање времена и концентрације ензима неће донети значајна побољшања (Слика 27).



Слика 27. Тродимензионални графици површинских одговора за оптимизацију процеса производње воћних сокова помоћу *BvPelB* за сок од јабуке (а и б) и сок од поморанце (г и д). Примена оптималних услова за третман сокова помоћу *BvPelB* резултирала је разликом у бистрини између нетретираног и третираног сока од јабуке (в) и поморанце (ђ);

*Свака вредност представља просек три независна тестирања, са наведеном стандардном грешком (стандардне грешке су биле мање од 5% у односу на просечне вредности).



Слика 28. Резултати избистривања и отечавања сокова од јабуке и поморанце;

Оптимални услови за избистривање сокова су 15 U/g воћне пулпе и време третмана од 90 минута. Третман сока од јабуке довео је до повећања приноса за 11% и бистрине за 82%, док је сок од поморанце показао повећање приноса за 12% и избистривања за 45% (Слика 27). Ови услови омогућавају ефикасну прераду без прекомерне употребе ензима и трајање третмана. Резултати превазилазе претходне студије са пектин лијазом из *B. pumilus*, где је избистривање

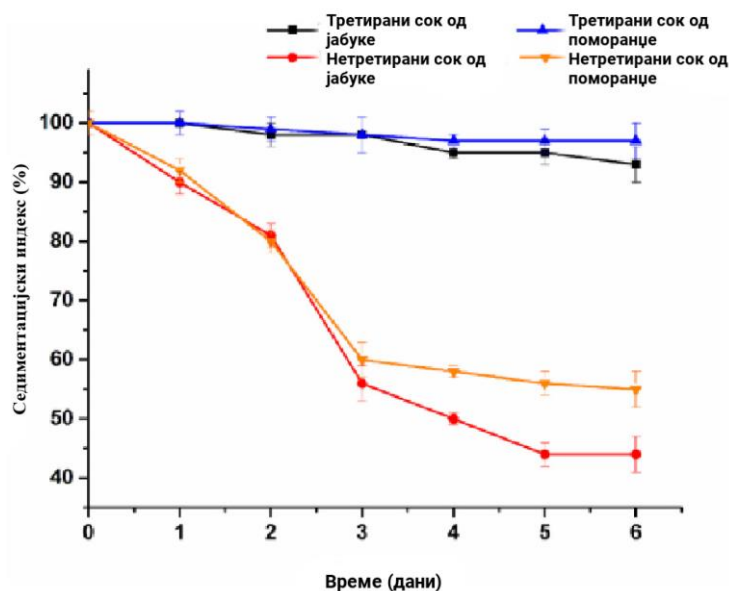
сока од јабуке износило 73,6% (175), као и студију с пектин лијазом из *G. stereothermophilus* Ah22, где је забележено повећање приноса од 8,6% за сок од јабуке, као и за сок од поморанце од 32,5 % (176).

3.7.3.2 Стабилност сокова

Седиментација пулпе представља параметар који утиче на изглед и текстуру сока. Седиментацијски индекс је показатељ стабилности пулпе у воћним соковима и представља однос запремине седимента према укупној запремини сока након одређеног периода складиштења. Виша вредност индекса седиментације указује на равномернију расподелу пулпе и бољу стабилност сока, док нижа вредност сугерише бржу седиментацију, што може негативно утицати на изглед, текстуру и микробиолошку безбедност производа (177). Седиментацијски индекс мерен је у ензимски-третираним и нетретираним соковима, током шест дана њиховог складиштења на 4°C (Слика 29), према једначини:

$$IS = (V_s/V_t) \times 100$$

где је IS – индекс седиментације, V_t - укупна запремина сока (mL), а V_s -запремина сока након таложења складиштењем (mL).



Слика 29. Седиментација пулпе третираних и нетретираних сокова од јабуке и поморанце након складиштења на 4°C током 6 дана

Након шест дана, необрађени сокови показали су бржу седиментацију него сокови од јабука и наранџи који су прошли ензимски третман. Ови резултати указују на то да ензимски третман сока може спречити стратификацију без утицаја на квалитет сока.

3.7.3.3 Одређивање садржаја метанола у соковима

BvPelB третман није довео до значајног повећања концентрације метанола у соковима, што је потврђено методом гасне хроматографије са пламеним детектором (GC-FID). Концентрације метанола у ензимски третираном соку од јабуке (25 ppm) и нетретираном (22 ppm) показале су минималне разлике. У соковима од поморанце забележене су вредности, са 60 ppm метанола у ензимски третираном и нетретираном соку. Присуство алкохола у овим соковима може бити последица активности ендогених ензима у биљним ткивима (178). Ово истиче важност контроле примене екзогених пектиназа у производњи како би се спречило повећање метанола у финалним производима.

Примена *BvPelB* у преради неутралних сокова показала је значајан потенцијал за побољшање квалитета и стабилности производа. Оптимизација услова третмана довела је до значајног повећања бистрине и приноса сокова од јабука и поморанџи, уз минималну

седиментацију пулпе током складиштења. Додатно, третман није утицао на концентрацију метанола, што потврђује сигурност и ефикасност ензимске обраде. Ови резултати указују на то да је *BvPelB* погодан за производњу стабилних и висококвалитетних воћних сокова, уз очување њихове безбедности и сензорних својстава. Ипак, својства и примена бактеријских лијаза у индустрији прераде сокова још увек нису довољно истражени, што представља простор за даља истраживања и унапређење технологије.

3.8 ЗАКЉУЧЦИ

- Молекуларно-генетичким и биохемијским методама идентификован је нови сој *Aspergillus tubingensis* означен као FAT43, изолован са плода дуње (*Cydonia oblonga*), који се показао као добар произвођач пектинолитичких ензима. Овај сој показује високу продукцију ендо пектиназа у поређењу са другим сојевима из рода *Aspergillus* spp. изолата из лабораторијске колекције.
- Коришћењем статистичког Plackett-Burman дизајна, идентификовани су кључни параметри који утичу на производњу ензима ферментацијом на чврстој подлози. Финална оптимизација методом Optimal (Custom) design (OCD) довела је до повећања ендо-пектиназне активности 2,22 пута и укупне пектиназне активности 2,15 пута.
- Утврђено је да је ендо пектиназа II (ПГ II) доминантни ензим у добијеном ферментационом екстракту. Молекулска маса ПГ II одређена SDS-PAG електрофорезом износила је 39 kDa, а изоелектрична тачка (pI) 6,0. Оптимална активност ензима је на рН 4,5 и температури од 45°C. Супстратна специфичност ПГ II је највећа према полигалактуронској киселини.
- Претрагом лабораторијске колекције сојева, идентификован је најбољи бактеријски произвођач пектин лијазе – *Bacillus velezensis* 16B. Показано је да сој 16B има највећу активност пектин лијазе (60,5 U/mL) међу испитиваним сојевима *Bacillus* spp.
- Изолована је укупна ДНК из изабраних сојева произвођача ензима и секвенциран је целокупни геном методологијом секвенцирања нове генетације.
- Клонирани су и рекомбинантно произведени пектинолитички ензими – пектин хидролаза (ПГ II) из *Aspergillus tubingensis* FAT43 и пектин лијаза (PelB) из *Bacillus velezensis* 16B у *Pichia pink* и *Escherichia coli*, чиме је омогућена висока продукција чистих ензима.
- Пектин лијаза *B. velezensis* 16B је пречишћена и биохемијски окарактерисана. Молекулска маса BvPelB одређена SDS-PAG електрофорезом износила је 35 kDa, а изоелектрична тачка око 8,8. Оптимална активност ензима забележена је на рН 8 и температури од 50°C. BvPelB је изузетно стабилна у неутралном и алкалном рН опсегу (7-9), задржавајући преко 95% активности након 24 сата и 88% након 48 сати на 25°C. Ензим делује као ендо лијаза, што је потврђено мерењем вискозности раствора и TLC анализом.
- Оптимизовани су услови за ензимски третман воћних сокова, утврђена је најефикаснија концентрација ензима за побољшање приноса, бистрине и антиоксидативне активности различитих воћних сокова. Рекомбинантни ензим ПГ II показује висок потенцијал у отечњавању и избистравању, посебно сокова од јагоде, јабуке и поморанце. Ензимски третман са ПГ II је довео до повећања антиоксидативног капацитета, нарочито код сокова од дуње (47%) и јабуке (20%). Третман сокова са BvPelB је значајно побољшао бистрину и принос сокова од јабуке (+11%) и поморанце (+12%). Третани сокови показују смањену седиментацију пулпе, чиме је осигурана стабилност сокова током складиштења.

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Списак коришћене опреме:

- Спектрофотометар: Shimadzu UV1800
- Када за хоризонталну агарозну електрофорезу, Bio-Rad
- Када за вертикалну SDS PAG електрофорезу, Hoefer
- Исправљач за једносмерну струју, Pharmacia ECPS 2000/300, Bio-Rad
- Водени термостат, Pharmacia Biotech, Multitemp III
- Инкубатор-шејкер, IKA KS 4000i control
- Инкубатор, Memmert INB 300
- pH метар, InoLab
- Кондуктометар WTW LF521, InoLab
- Магнетна мешалица, IKA
- Микроталасна пећница, Tesla
- Центрифуга, Eppendorf, Sigma
- Центрифуга, Thermo Scientific SL40R
- Термални циклер (PCR), Eppendorf Personal MasterCycler, Biometra
- Вискозиметар ротациони, HAAKE Viscotester 3, Thermo Scientific

4.1 Пектинолитички ензими из *Aspergillus* spp.

Процес проналаска најбољих произвођача пектинолитичких ензима из гљива рода *Aspergillus* обухватао је тестирање узорака са различитих природних супстрата (Табела 3) који се налазе у лабораторијској колекцији сојева и новог изолата са плода дуње.

4.1.1 Изоловање и таксономска идентификација новог изолата гљиве са плода дуње

Потребни раствори и материјал:

- PDA подлога:
 - 39 g комерцијалне PDA подлоге у праху (Sigma-Aldrich) се раствори у 1 L дестиловане воде.
- 1 M Tris-HCl, pH8:
 - Tris 12,11 g;
 - Подесити pH додавањем HCl на 8,0;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- 5 M NaCl:
 - NaCl 29,22 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- 0,5 M EDTA, pH8:
 - EDTA 18,61 g;
 - Подесити pH додавањем NaOH на 8;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- 2% СТАВ пуфер:
 - СТАВ 2,0 g;
 - 1 M Tris-HCl (pH 8,0) 10 mL;
 - 5 M NaCl 28 mL;
 - 0,5 M EDTA (pH 8,0) 4 mL;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- Изопропанол
- Хлороформ
- 70% етанол
- ТЕ пуфер (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl) pH8:
 - 1 M Tris-HCl (pH 8,0) 1 mL;
 - 0,5 M EDTA (pH 8,0) 200 μ L;
 - Подесити pH на 8,0
 - Дестилована вода до 100 mL
- Агароза,
- TBE пуфер
 - Tris base 10,9 g
 - Boric acid 5,56 g
 - EDTA 0,75 g.
 - Дестилована вода до 1L
- 0,1% раствор етидијум-бромид:
 - Етидијум-бромид 0,1 g
 - Дестилована вода до 100 mL

Поступак:

Нови изолат гљиве, који је уочен као раст микроба на кори дуње, узоркован је стерилном езом и пребачен на чврсту PDA подлогу у Петријеву шољу. Инкубирано је у термостату на 28°C током пет дана. Након инкубације, плоче су прегледане, а гљивичне културе су поново пречишћене преношењем на нову плочу, како би се изоловала чиста култура, која је сачувана у глицеролском штоку на -70°C и коришћена за даљу идентификацију.

За таксономску идентификацију гљиве, екстрахована је геномска ДНК и умножен ген за калмодулин као молекулски маркер. На PDA подлози у термостату (28°C, 48 сати) добијен је бели мицелијум који је сакупљен стерилном езом, замрзнут у течном азоту и хомогенизован, Хомогенизовани узорци третирани су са 2% ЦТАБ пуфером, а потом инкубирани на 65°C уз повремено мешање. Након екстракције хлороформом и центрифугирања на 10000 о/мин, током 5 минута, DNA је преципитирала помоћу изопропанола и испрана је хладним 70% етанолом, а затим ресуспендована у ТЕ пуферу за даљу употребу.

Амплификација гена за калмодулин урађена је коришћењем CMD5/CMD6 прајмера:

CMD5 (forward прајмер): 5'- CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3'

CMD6 (reverse прајмер): 5'- CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3'

У реакционој смеси за PCR (25 µL), налазила се геномска ДНК, 2 x PCR MasterMix (Thermo Fisher), и 0,4 µmol/L сваког од прајмера (Табела 13).

Табела 13. Састав PCR реакционе смеше

Компонента реакционе смеше	Запремина
MiliQ H2O	10,5 µL
Forward прајмер	0,5 µL
Reverse прајмер	0,5 µL
Master Mix (2 x)	12,5 µL
DNA	1 µL

Параметри који су коришћени за процес амплификације приказани су у Табели 14.

Табела 14. PCR програм коришћен за умножавање гена

Фаза	Температура (°C)	Време	Број циклуса
Иницијална денатурација	94	5 мин	1
Денатурација	94	45 сек	34
Анилинг	55	45 сек	34
Елонгација	72	1 мин	34
Завршна елонгација	72	7 мин	1

PCR продукти су анализирани помоћу агарозне електрофорезе на 1% агарозном гелу. У 30 mL TBE пуфера додато је 0,30 g агарозе. Раствор је затим загрејан до кључања, како би се агароза потпуно растворила. Након тога, агароза је изливена у припремљени калуп са чешљевима. Након пола сата, извађени су чешљеви, а агарозни гел је стављен у каду за електрофорезу са TBE пуфером. Узорци PCR продукта запремине од 4 µL помешани су са 3 µL комерцијалне боје (6 x концентрована) и 10 µL воде. Услови електрофорезе били су: 100 V, 200 mA и 30 минута. По завршетку електрофорезе, гел је бојен 0,1 % раствором етидијум-

бромида у трајању од 10 минута, а траке су визуелизоване под УВ трансилуминатором. PCR производ изолата је послат на секвенцирање. Коришћен је директни метод секвенцирања у оба смера уз употребу истих прајмера као за амплификацију. Добијена секвенција је упоређена са доступним секвенцијама других *Aspergillus* врста путем MegaBlast алгоритма.

4.1.2 Претрага потенцијалних пектинолитичких произвођача *Aspergillus* spp.

15 различитих сојева *Aspergillus*, из лабораторијске банке/колекције (Табела 3) гајени су ферментацијом у течном медијуму.

4.1.2.1 Припрема спора

Потребни раствор:

- 0,1% Tween 20:
 - Tween 20 0,1 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.

Поступак:

У стерилним условима, Петријева шоља са спорама се прелива раствором 0,1% Tween 20. Затворена Петријева шоља се лагано шејкира, а затим се стерилном пипетом покупи раствор 0,1% Tween 20 са спорама. Концентрација спора у припремљеним суспензијама одређује се мерењем апсорбације на 605 nm (OD_{605}).

4.1.2.2. Ферментација у течном медијуму

Потребни раствори и материјал:

- Састав подлоге за раст:
 - Пептон: 0,15 g;
 - Пектин: 0,15 g;
 - Czарек-ов раствор: до 100 mL.
- Састав продукционе подлоге:
 - $NaNO_3$ 2 g;
 - KH_2PO_4 1 g;
 - $MgSO_4$ 0,5 g;
 - KCl 0,5 g;
 - $FeSO_4$ 0,01 g;
 - Пектин 1 g;
 - Дестилована вода до 1 L.

Поступак:

За производњу ензима коришћена је подлога са комерцијалним, цитрусним пектином, рН подлоге је проверен на рН-метру, након чега су подлоге стерилисане аутоклавирањем.

У подлогу за раст додато је по 500 μ L спора (1×10^7 спора/mL) сваког од испитиваних *Aspergillus* сојева, у дупликату. Инокулуми су инкубирани у шејкеру на 200 о/мин, преко ноћи, на 28°C. Након 12 сати, у продукциону подлогу додато је по 50 μ L ампицилина (100 mg/mL) и по 2 mL инокулума. Као контрола коришћена је продукциона подлога без спора. Ерленмајери су инкубирани у шејкеру на 28°C и 180 о/мин. Након 96 сати, ферментација је прекинута центрифугирањем на 4500 о/мин током 15 минута, течна фаза је пренета пипетом у нове епрувете и измерена је запремина ФЕ, а биомаса је уклоњена цеђењем. ФЕ су замрзнути и коришћени у даљем раду.

4.1.2.3 Пектинолитичка активност

4.1.2.3.1 Одређивање укупне пектинолитичке активности DNS методом

За одређивање укупне пектинолитичке активности DNS методом коришћени су следећи раствори:

- 1% раствор пектина:
 - Пектин (комерцијални) 0,5 g;
 - Пуфер ацетатни рН 4,5, 50 mM до 50 mL.
- Раствор динитросалицилне киселине (DNS):
А, Динитросалицилатни раствор у NaOH:
 - NaOH 8 g;
 - DNS 5 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.Б, Тартаратни раствор:
 - К-Na-тартарат 150 g;
 - Дестилована вода до 250 mL.

Помешају се раствори А и Б, затим се дода дестилована вода до 500 mL.

Поступак:

У епрувете је одмерено 50 μ L ФЕ, а затим је додато 450 μ L раствора 1% пектина. Потом су епрувете инкубиране 1 сат на 40°C, након чега је реакција прекинута додавањем 500 μ L DNS реагенса, па је смеша прокувана 5 мин на 100°C. По хлађењу, раствори су разблажени водом до 5 mL (додато је 4 mL воде), промешани на вортексу и измерена је апсорбација на 540 nm. Слепа проба поседује исти састав, али су раствори додавани другачијим редоследом: најпре ФЕ, затим DNS, а на крају супстрат.

Ензимска активност измерена је на основу следеће једначине:

$$C_e \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{C \text{ редукујућих шећера (mM)} \times V_{\text{реакционесмеше (mL)}}}{t(\text{мин}) \times V_{\text{ензим (mL)}}} \times R$$

Концентрација редукујућих шећера се рачуна из једначине праве:

$$y = 0,11868x - 0,02189$$

где је:

- y – апсорбација на 540 nm (A540nm)
- x – концентрација редукујућих шећера.

4.1.2.3.2 Одређивање ендо-пектиназне активности

Потребни раствори:

- 0,5% супстрат:
 - Цитрусни пектин 25 mg
 - 50 mM ацетатни пуфер (рН 4,5) 5 mL
- Раствор RR 1,125 mg/mL:
 - $Cl_6H_{46}N_{14}O_2Ru_3$ 112,5 mg
 - Дестилована вода до 100 mL
- 8 mM NaOH:
 - NaOH 0,32 g
 - Дестилована вода до 1 L

Поступак:

Метода са Ruthenium Red (RR) изведена је према претходно описаној процедури у литератури(123), уз мање модификације. Реакциона смеша је припремљена додавањем 8 μL 0,5% пектина и 8 μL ФЕ у микроепрувете и инкубирано је на 40°C током 20 мин. Након инкубације, додато је 40 μL RR концентрације 1,125 mg/mL у сваку микроепрувету. Затим је смеша разблажена додавањем 100 μL 8 mM NaOH раствора и центрифугирана на 4°C при 10000 о/мин током 10 минута. За квантификацију је 50 μL супернатанта пренето у кивете, разблажено са 150 μL воде и мерена је апсорбанције на 535 nm, која је упоређена са стандардном кривом за цитрусни пектин ($y = -0,0218x + 0,7452$) како би се квантификовала хидролизована количина пектина, која није у стању да преципитује са RR. Јединица ензимске активности дефинисана је као количина ензима потребна да хидролизује 1 μg пектина у минути.

4.1.2.3.3 Одређивање ендо-пектинолитичке активност дифузионим тестом

Квалитативно је одређена ендо-пектинолитичка активност дифузионим тестом, који је рађен на 6% полиакриламидном гелу у који је инкорпориран супстрат, 0,8% пектин (ВМП).

Потребни раствори:

- Састав дифузионог гела:
 - Раствор акриламида-бисакриламида АА (30%) 9 mL;
 - 1 % ВМП у 50 mM ацетатном пуферу (pH 4,5) 35,8 mL;
 - TEMED 10,8 μL ;
 - APS (10%) 135 μL .
- 0,05% раствор рутенијум-црвено за бојење гела:
 - $\text{Cl}_6\text{H}_{46}\text{N}_{14}\text{O}_2\text{Ru}_3$ 0,005 g;
 - Дестилована вода до 50 mL.

Поступак:

Када АА гел са инкорпорираним пектином исполимеризује, на његову површину се поређају филтер папирићи исте величине исечени у облику круга, на које се нанесе по 20 μL ферментационих екстракта (ФЕ). Постави се влажна средина како би се спречило сушење гела и испаравање узорка и инкубира се у термостату на 45°C током 90 минута. Ензим са филтер папира дифундује у гел и реагује са супстратом. Након тога, филтер папири се уклањају са гела. За визуелизацију ендо-пектиназне активности, гел се боји раствором 0,05% рутенијум-црвено. Гел се прекрије 0,05% раствором рутенијума и оставља се преко ноћи да се потпуно обоји. На местима где је супстрат деградован пектиназном активношћу, појављују се прозирна зона.

4.2 Оптимизација ферментације на чврстој подлози за производњу пектинолитичких ензима из соја *A. tubingensis* FAT 43

Ферментацијом на чврстој подлози, уз примену природних супстрата, оптимизована је производње пектинолитичких ензима из соја *A. tubingensis* FAT 43. Природни материјали су коришћени као супстрати за стимулисање производње пектинолитичког ензимског комплекса и обезбеђивање доброг раста гљиве.

4.2.1 Анализа значајних параметара за ферментацију на чврстој подлози

Потребни раствори и материјал:

- Резанци шећерне репе;
- Пшеничне мекиње;
- Коре поморанце;

- Коре лимуна;
- Коре дуње;
- Коре јабука;
- Czapек медијум.

Поступак:

Plackett-Burman експериментални дизајн (PBD) са осам фактора за скрининг, укључујући састав медијума и услове култивације, осмишљен је за медијум за производњу пектинолитичког ензимског комплекса. Скрининг супстрата изведен је са резанцима шећерне репе, пшеничним мекињама и корама поморанци, лимуна, дуња и јабука. Сви супстрати су претходно осушени на 60°C и самлевени у блендеру за житарице. Затим су хидрирани са Czapekovим медијумом и стерилисани у аутоклаву. Хоризонтално кодирање сваког фактора супстрата у PBD-у приказано је у Табели 5.

Ферментација на чврстој подлози постављена је у ерленмајерима од 300 mL, који садрже различите комбинације мешавина супстрата. За сваки фактор коришћене су две високе и две ниске вредности (кодиране вредности: +1 и -1; стварне вредности: 30 и 0 g) ради анализе и скрининга компонената медијума за производњу пектинолитичког ензимског комплекса. Ерленмајери које садрже стерилне мешавине супстрата инокулисане су са 2 mL гљивичних спора и ферментација је трајала 48 и 96 сати (кодиране вредности: -1 и +1) на температури од 28°C и 30°C (кодиране вредности: -1 и +1), у термостату на релативној влажности од 60%. Ферментација је прекинута тако што је садржај сваке боце уситњен штапним миксером и екстрахован са 150 mL ацетатног пуфера (25 mM, pH 4,5) током 2 сата, уз мешање. Након центрифугирања (4700 о/мин, 30 минута), добијени супернатант је процеђен кроз вату и филтриран кроз стаклени филтер како би се уклониле заостале споре. Други сет ферментација је прекинут на исти начин након 96 сати инкубације. Тако припремљени ФЕ су замрзнути и коришћени за даљу анализу.

4.2.2 Финална оптимизација- Optimal (Custom) дизајн

Потребни раствори и материјал:

- Резанац шећерне репе;
- Пшеничне мекиње;
- Czapек медијум.

Поступак:

За Optimal (Custom) дизајн, три независне променљиве компоненте проучене су на различитим нивоима, а свака комбинација имала је исти укупни збир компоненти мешавине од 80 g (Табела 15). Подешавања комбинација мешавина шећерне репе, пшеничних мекиња и Czapekovог медијума алгоритамски су изабрана ради најбољег процењивања модела (Табела 7). Тродимензионални графици површина приказани су како би се показали ефекти независних променљивих на хидролизу, описану кубним полиномијалним једначинама прилагођеним експерименталним подацима. Прилагођеност и значајност модела анализирани су коришћењем софтвера Design-Expert® верзија 11 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA).

Табела 15. Ограничења дизајна за Optimal (Custom) дизајн

Доња граница	Ограничење	Горња граница
24	A: Пулпа шећерне репе (g)	44
0	B: Пшеничне мекиње (g)	10
30	C: Czapeк медијум (g)	50
	A+B+C = 80 g	

4.3 Пречишћавање ендо-ПГ

4.3.1 Ультрафилтрација

Поступак:

Први корак у пречишћавању ендо-ПГ је ультрафилтрација са надпритиском азота. Мембрана за ультрафилтрацију (10 kDa, PLGC15005, Ultracel® Millipore), која се чува у 20% етанолу у фрижидеру, најпре је исперана водом и постављена у ћелију за ультрафилтрацију. На мембрану је постављена гума, а у ћелију је сипана вода, а затим је мешана на магнетној мешалици око 15 мин. Проверена је пропусност мембране тако што је вода ультрафилтрирана током 10 минута. Након тога, вода је избачена, а у ћелију је наливен узорак за ультрафилтрацију; 1 L ферментационог екстракта подвргнут је ультрафилтрацији. Ћелија је састављена, у раствор је стављен магнет, постављена је на магнетну мешалицу и повезана са боцом азота. Течност је излазила под притиском азота кроз мембрану, док је у ультрафилтрационој ћелији остао ретентат. Остатак ензима је сакупљен са горње стране мембране минималном количином дестиловане воде. На крају, додато је мало воде у ћелију и остављено да се меша 15 минута. На овај начин ФЕ је сконцентрован осам пута. Мембрана је затим извађена, исперана дестилованом водом и враћена у 20% етанолу.

4.3.2 Таложење етанолом

Потребни раствори:

70% етанол

Поступак:

Након ультрафилтрације, протеини из ултрафилтрата су преципитирани постепеним додавањем хладног етанола (-20°C) у ферментациони екстракт. Овај процес је спроведен на контролисаној температури од 4°C, користећи магнетну мешалицу за ефикасно мешање. Након додавања целокупне запремине етанола, добијена смеша је центрифугирана на 10000 обртаја током 10 минута. Добијени преципитат је затим растворен у 5 mL 25 mM ацетатног пуфера pH 6. На овај начин ФЕ је концентрован десет пута и уклоњен је део пигмента. Центрифугирање је поновљено како би се уклонила нерастворна једињења из преципитата, чиме је добијен бистри ФЕ.

4.3.3 Таложење амонијум-сулфатом

Потребан материјал:

Амонијум-сулфат

Поступак:

Наредни кораци пречишћавања су укључивали преципитацију засићеним амонијум-сулфатом АС (30%, 50% и 70% засићења). Чврсти АС је постепено додаван у ФЕ уз константно мешање на магнетној мешалици. Талог је затим одвојен центрифугирањем на 10000 обртаја током 10 минута.

4.3.4 Гел хроматографија на Sephacryl S100 HR

Потребни раствори и материјал:

- Амонијум сулфат
- 25 mM ацетатни пуфер pH 6

Поступак:

Протеински талог добијен након преципитације са 70% засићењем АС, растворен је у 5 mL 25 mM ацетатног пуфера pH 6. Такав узорак је затим нанет на колону Sephacryl S100HR (70 cm x 2 cm; 250 mL запремине матрикса) која је претходно еквилибрисана са 25 mM ацетатним пуфером pH 6. Узорак је елуиран брзином протока од 1 mL/минути користећи 25 mM ацетатни пуфер pH 6, при чему су сакупљане фракције по 5 mL. Активност ендо-ППГ тестирана је у свим сакупљеним фракцијама тестом за одређивање ендо-пектиназне активности који је детаљно описан у поглављу 4.1.2.3.2.

4.3.4.1 Одређивање концентрације протеина

Концентрација протеина је одређена Бредфордовом методом.

Потребни раствори:

- Раствор боје:
 - CBV G-250 (Coomassie brilliant blue G-250) 100 mg
 - 95% етанол 50 mL
 - H_3PO_4 100 mL
 - Дестилована вода до 200 mL

Боја је растворена у етанолу, након чега је додата киселина и вода до финалне запремине,

- Бредфорд реagens:
 - Раствор боје 100 mL
 - Дестилована вода до 500 mL
- Раствор BSA

Поступак:

Као стандард за одређивање концентрације протеина коришћен је говеђи серум албумин (BSA, од енгл. bovine serum albumin), Раствор BSA (1 mg/mL) разблажен је у опсегу од 0,1 до 1,0 mg/mL, као што је приказано у Табели 16.

Табела 16. Стандардна крива за раствор BSA

BSA (1 mg/mL)	H ₂ O (μL)	Концентрација (mg/mL)
10	90	0,1
20	80	0,2
40	60	0,4
60	40	0,6
80	20	0,8
100	-	1,0
-	100	-

У 100 μL узорка додато је 2 mL Бредфордовога реагенса. Реакциона смеша је вортексована и након 20 мин мерена је апсорбанција на 595 nm. Као слепа проба коришћена је дестилована вода. За измерену вредност апсорбанције A_{595} са стандардне криве за раствор BSA ($y=0,0166x + 0,02$) је израчуната концентрација протеина, која је изражена у mg/mL .

4.3.5 Јоноизменивачка хроматографија на колони DEAE Sephadex A 25

Потребни раствори:

- Пуфер за еквilibрацију:
 - 25 mM натријум-ацетатни пуфер pH 6
- Пуфер за елуцију
 - Пуфер за еквilibрацију са додатим градијентом NaCl од 25 mM до 500 mM

Поступак:

Припремљена је серија раствора пуфера (25 mM натријум-ацетатни пуфер, pH 6,0) са различити моларним концентрацијама NaCl од 25 mM до 500 mM (Табела 17), растварањем одговарајуће количине NaCl у 100 mL пуфера.

Табела 17. Раствор пуфера (25 mM натријум-ацетатни пуфер, pH 6,0) са различити моларним концентрацијама NaCl.

mM	25	50	75	100	125	150	200	250	300	350	400	450	500
g	0,15	0,30	0,44	0,59	0,73	0,88	1,17	1,46	1,75	2,04	2,34	2,63	2,92

Фракције које су имале највећу ендо-ПГ активност су спојене (20 mL) и додатно су пречишћене јоноизменивачком хроматографији на DEAE Sephadex A 25 колони (10 cm x 2,3 cm; 50 mL запремине матрикса). Колона је еквilibрисана са 25 mM натријум-ацетатним пуфером pH 6. Линеарни градијент у распону од 0 до 0,5 M NaCl је примењен за елуцију ензима. Сакупљане су фракције од 2 mL у којима је одређена ензимска активност и концентрација протеина (поглавља 4.1.2.3.2 и 4.3.4.1).

4.3.6 Јоноизменивачка хроматографија на колони Q Sepharose

Потребни раствори:

- Пуфер за еквilibрацију:
 - 20 mM Tris HCl pH 8,0
- Пуфер за елуцију
 - Пуфер за еквilibрацију са додатим градијентом NaCl од 25 mM до 500 mM

Поступак:

Припремљена је серија раствора пуфера (20 mM Tris HCl pH 8,0) са моларним концентрацијама NaCl од 25 mM до 500 mM, растварањем одговарајуће количине NaCl у 100 mL пуфера (4.3.4).

Као финални корак у пречишћавању урађена је јоноизменивачка хроматографија на Q Sepharose колони, која је претходно еквilibрисана 20 mM Tris HCl пуфером на pH 8. Нането је 15 mL узорка на колону. Невезани протеини испрани су истим пуфером којим је еквilibрисана колона, пропуштањем две запремине колоне. Везани протеини елуирани су са линеарним градијентом NaCl (0,25-500 mM). Сакупљане су фракције од 2 mL. Активност ендо-ПГ (поглавље 4.1.2.3.2) тестирана је у свим сакупљеним фракцијама, а концентрација протеина је одређена Бредфордовом методом (поглавље 4.3.4.1).

4.3.7 Биохемијска карактеризација ендо-ПГ

Пречићена ендо-ПГ је биохемијски окарактерисана одређивањем молекулске масе, изоелектричне тачке, одређивањем температурне и рН стабилности и оптимума. Масеном спектрометријом је урађена идентификација доминантне изоформе ендо-ПГ.

4.3.7.1 SDS-PAGE електрофореза

Потребни раствори и материјал:

- Мономерни раствор акриламида:
 - Акриламид 58,4 g;
 - Бисакриламид 1,6 g;
 - Дестилована вода до 200 mL.
- Пуфер за раздвајајући гел:
 - Tris 36,30 g;
 - Дестилована вода до 200 mL;
 - 4M HCl до рН 8,8.
- Пуфер за концентрујући гел:
 - Tris 6,0 g;
 - Дестилована вода до 200 mL;
 - 4M HCl до рН 6,8.
- Иницијатор полимеризације амонијум-персулфат (APS) 10%:
 - APS 0,2 g;
 - Дестилована вода до 2 mL.
- Раствор за надслојавање:
 - n-бутанол 100 mL
 - Дестилована вода до стабилног доњег слоја
- Пуфер за обраду узорак (ПУЗ 3x):
 - 0,5 M Tris HCl рН 6,8 9,38 mL;
 - 99% глицерол 7,5 mL;
 - 0,1% бром-фенол плаво 1,5 mL;
 - 2% SDS 1,5 g;
 - Дестилована вода до 21,25 mL;
 - 5% β-меркаптоетанол 3,75 mL.
- Пуфер за електрофорезу:
 - Tris 3,0 g;
 - Глицин 14,4 g;
 - 10% SDS 10 mL;
 - Дестилована вода до 1 L.
- Гел за раздвајање:
 - Акриламид 4 mL;
 - Дестилована вода 4,8 mL;
 - Tris пуфер рН 8,8 3 mL;
 - Дезаерација (10 минута)
 - TEMED 4,8 μL;
 - 10% APS 60 μL;

- 10% SDS 120 μ L.
- Гел за концентровање:
 - Акриламид 0,4 mL;
 - Дестилована вода 1,8 mL;
 - Tris пуфер pH 6,8 0,75 mL;
 - Деаерација (10 минута)
 - Темед 3 μ L;
 - 10% АПС 15 μ L;
 - 10% SDS 30 μ L.
- Раствор за фиксирање:
 - Метанол 500 mL;
 - Сирћетна киселина 100 mL;
 - Дестилована вода до 1 L.
- Раствор боје (0,1% СВВ, 50% метанол, 10% сирћетна киселина):
 - СВВ R-250 0,5 g;
 - Раствор за фиксирање до 500 mL.
- Раствор за обезбојавање:
 - Метанол 50 mL;
 - Сирћетна киселина 70 mL;
 - Дестилована вода до 1 L.

Поступак:

Раствор за раздвајајући гел је сипан између плоча, а површина гела је надслојена *n*-бутанолом. Након полимеризације, *n*-бутанол је испран дестилованом водом и концентрујући гел је додат. У наливен концентрујући раствор гел је стављен „чешаљ“ између плоча. Након полимеризације гела, чешаљ је извађен, а бунари су испрани дестилованом водом. Узорци су припремљени мешањем са ПУЗ-ом у односу 2:1 (20 μ L узорка са 10 μ L ПУЗ-а). Запремина узорака у бунарима је износила 20 μ L. У један бунар нането је 3 μ L молекулских маркера Blue Wide Range Protein Ladder (10–245 kDa; Cleaver Scientific). Напон је подешен на 80 V за кретање узорака кроз концентрујући гел, а након уласка у гел за раздвајање, подешен је на 120 V по гелу. Након завршене електрофорезе, гел је испран дестилованом водом, а затим је обојен раствором СВВ R-250 ради визуелизације протеинских трака на следећи начин:

- Фиксирање (15 мин);
- Бојење раствором СВВ R-250 (5 мин);
- Фиксирање (10 мин);
- Обезбојавање раствором са 7% сирћетном киселином преко ноћи;

4.3.7.2 Изоелектрично фокусирање и зимограмска детекција ендо-ПГ

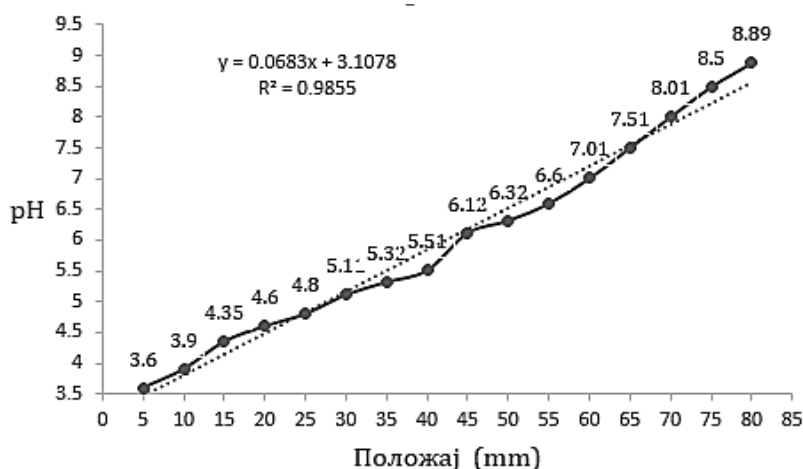
Потребни раствори и материјал:

- Гел за ИЕФ (7,5%):
 - Акриламид (30%) 3,75 mL;
 - Амфолити (pI 3,5–9,5) 0,75 mL;
 - Глицерол (50 %) 6,5 mL;
 - Дестилована вода 6,75 mL;
 - TEMED 12 μ L;
 - APS (10%) 75 μ L.

- Анодни електролит (75 mM H₂SO₄):
 - Концентрирана H₂SO₄ 1,0 mL;
 - Дестилована вода до 0,25 L.
- Катодни електролит (150 mM NaOH):
 - NaOH 0,3 g;
 - Дестилована вода до 50 mL.
- Пектин (1%):
 - ВМП 1 g;
 - 50 mM ацетатни пуфер до 100 mL.
- Раствор рутенијум-црвено (0,02%)

Поступак:

Изоелектрично фокусирање ендо-ПГ урађено је на систему за електрофорезу (LKB Pharmacia, Шведска). Протеини су раздвојени на 7,5 % полиакриламидном гелу са амфолитима у опсегу рН 3,5–9,5. Након полимеризације, гел је пренесен на хладњак. Силиконски апликатор за узорке постављен је на средину гела и по 25 µL ФЕ нанесено је за раздвајање. Процес је трајао 90 мин на 1000 V, 4,8 mA, при константних 5 W и температури од 10°C. Папирне електроде, претходно потопљене у електролитне растворе, нанете су на гел. Током наношења узорака на ИЕФ гел, један од бунара је остављен празан, како би се након завршетка процеса ИЕФ-а, издвојио тај сегмент гела. Исечен је на делове (величине 0,5 x 0,6 mm) који су стављени у вајле са по 5 mL дестиловане воде, која је претходно прокувана и охлађена ради уклањања угљен-диоксида. Потом су стављени на шејкер током сат времена, након чега је у свакој вајли измерена рН вредност. На основу измерених рН вредности у различитим сегментима гела, направљен је график који је омогућио прецизно одређивање рИ вредности ензима. Позиције трака на гелу су одређене коришћењем софтверског програма ImageJ.



Стандардна крива која приказује зависност рН вредности и положаја у гелу у односу на аноду (након ИЕФ), са назначеним измереним рН вредностима у деловима гела.

Гел је након ИЕФ раздвајања коришћен за зимограмску детекцију ендо-ПГ. Испран је дестилованом водом два пута и пажљиво је потопљен у раствор пектина (1%, у 50 mM ацетатном пуферу рН 4,5) и инкубиран је на собној температури уз мешање током пола сата. Затим је гел пренет у влажну средину и инкубиран је на оптималној температури од 45°C током 45 минута. Након инкубације, гел је добро испран дестилованом водом како би се уклонио вишак супстрата и бојен је раствором 0,02% рутенијума ради визуелизације трака.

4.3.7.3 Идентификација доминантне изоформе ендо-ПГ методом масене спектрометрије

Потребни раствори и материјал:

- Раствор за редукцију и алкилацију:

- 50 mM амонијум-бикарбонат:
 - NH_4HCO_3 0,395 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- 6 М уреа:
 - Уреа 36 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- 10 mM трис-(2-карбоксетил) фосфин (ТСЕР):
 - ТСЕР 0,287 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- 40 mM хлорацетамид
 - Хлорацетамид 0,374 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- 25 mM NH_4HCO_3
 - NH_4HCO_3 0,198 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- Раствор за дигестију:
 - 60 ng трипсина (додаје се укупно на 100 μL)
- Раствори за еквилибрацију
 - Мравља киселина
 - Ацетонитрил

Поступак:

10 μL (~3 μg) узорка протеина потпуно је осушено у вакуум-концентратору, редуковано и алкиловано у једном кораку са 10 mM (2-карбоксетил) фосфином (ТСЕР) и 40 mM хлорацетамидом у 10 μL 50 mM NH_4HCO_3 који садржи 6 М уреу. Реакција се одвијала у мраку на собној температури током 30 минута. Узорак је затим разблажен на 100 μL са 25 mM NH_4HCO_3 , који садржи 60 ng трипсина. Хидролиза је извршена преко ноћи на 37°C. Реакција је заустављена додавањем 1 μL мравље киселине. Добијени пептиди су анализирани помоћу Compact ESI-qTOF масеног спектрометра опремљеног CaptiveSpray nanoBooster извором (Bruker Daltonics, Bremen, Немачка) и повезаног са Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, САД), 2 μL хидролизата пептида је нането на ACQUITY UPLC M-Class Symmetry C18 Trap колону (100 Å, 5 μm , 180 μm x 20 mm; Waters, Wexford, Ирска) при протоку од 10 μL /мин, а колона је опрана раствором 0,1% (v/v) мравље киселине у води током 10 минута. Везани пептиди су раздвојени на PerSep C18 аналитичкој колони (15 cm x 150 μm x 1,5 μm ; Bruker Daltonics) еквилибрисаној у 9,5% раствору мравље киселине у води и 5 % раствора 0,1% (v/v) мравље киселине у ацетонитрилу, користећи 30-минутни линеарни градијент 5–45% (v/v) раствора мравље киселине у ацетонитрилу, а затим 1-минутни градијент до 90% (v/v) истог раствора, при протоку од 0,4 μL /минуто.

Извор електроспреј јонизације је подешен за рад у позитивном режиму, прекурсори MS су снимљени у m/z опсегу 150–2200, а MS/MS подаци су прикупљени користећи методу аутоматске MS/MS зависне од података (Compass HyStar 6,0 софтвер за прикупљање и обраду података, Bruker Daltonics). MS спектроскопски подаци су експортирани као Mascot генерички фајлови (mgf) и претражени помоћу SwissProt базе података (таксономија *Fungi*) користећи лиценцирани софтвер MASCOT верзија 2,8 (Matrix Science, Лондон, УК).

4.3.7.4 Температурна и рН зависност активности и стабилности ПГ II

4.3.7.4.1 Одређивање температурног оптимума

Потребни раствори:

- 50 mM ацетатни пуфер (pH 4,5).

Оптимални температурни опсег (30 до 60°C) за ПГ II одређен је мерењем активности у 50 mM ацетатном пуферу (pH 4,5) на различитим температурама: 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60°C, претходно описаним тестом у поглављу 4.1.2.3.2. Енергија активације је израчуната коришћењем Аренијусове једначине након мерења активности ензима на различитим температурама.

4.3.7.4.2 Одређивање термалне стабилности

Термална стабилност и кинетика иреверзибилног губитка ензимске активности испитане су на следећи начин: пречишћен ензим је распоређен у епрувете и инкубиран на 40, 50 и 60°C током различитих временских интервала (t). У одређеним интервалима узимани су узорци и измерена је преостала пектиназна активност, у складу са условима ензимског теста (поглавље 4.1.2.3.2).

4.3.7.4.3 Одређивање кинетике термалне инактивације

Енергија инактивације ензима (Ed) одређена је коришћењем линеарне модификације Аренијусове једначине.

4.3.7.5 Одређивање оптималне pH активности

Потребни раствори:

- Концентровани Britton–Robinson пуфер (0,4 mol/L H₃BO₃, 0,4 mol/L H₃PO₄, 0,4 mol/L CH₃COOH):
 - H₃BO₃ 2,47 g
 - H₃PO₄ 2,07 mL
 - CH₃COOH 2,29 mL

pH вредност је подешена на: 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8.

Пуфери су раблажени дестилованом водом тако да су финално били 50 mM у односу на све компоненте.

Активност ензима измерена је у серији 50 mM Britton–Robinson пуфера pH вредности од 3 до 7, у контролисаним условима, према протоколу описаном у поглављу 4.1.2.3.2. ради утврђивања оптималног pH опсега за ПГ II.

4.3.7.6 Одређивање pH стабилности

За процену pH стабилности, ензим је инкубиран у контролисаним условима при различитим pH вредностима у серији 50 mM Britton–Robinson пуфера у опсегу од 3 до 7, на константној температури (25°C), у трајању од 1, 2 и 7 дана. Узорци су узимани у назначеним временским интервалима, а преостала активност је измерена коришћењем стандардних услова ензимског теста који је описан у поглављу 4.1.2.3.2.

4.3.8 Супстратна специфичност ПГ II

4.3.8.1 Танкослојна хроматографија

Потребни раствори и материјал:

- Мобилна фаза:
 - п-бутанол/етанол/вода/глицерол/сирћетна киселина (5:3:2:0,5; V/V/V/V);
- Раствор за визуелизацију - α-нафтол:
 - α-нафтол 0,5 g;
 - Етанол 95 mL;
 - H₂SO₄ 5 mL.

α-нафтол се раствори у 80 mL етанола, затим се додаје 5 mL H₂SO₄ и раствор се допуни етанолом у мензури до 100 mL.

- Раствори супстрата (1%):
 - ВМП / НМП / ПГА 0,1 g;
 - 50 mM ацетатни пуфер pH 4,5 до 10 mL.
 Сваки раствор се појединачно прави у пуферу.

- Стандарди (1 mg/mL):
 - Моногалактуронска киселина 1 mg
 - Дигалактуронска киселина 1 mg
 - Дестилована вода до 1 mL
 Праве се појединачно растварањем у води.

Поступак:

Реакција хидролизе супстрата постављена је мешањем ензима и супстрата у односу 1:10, уз инкубацију на 45 °C. Након одређеног времена, реакција је прекинута кувањем узорка 3 мин на 100°C. За анализу производа хидролизе супстрата коришћене су комерцијалне плоче (TLC Silica gel 60 F254, Merck, Немачка) величине 4,5 x 6 cm. У хроматографску каду је сипано 3 mL мобилне фазе ради засићења парама растварача. Као стандарди коришћени су моно- и ди-галактуронска киселина. Аликвоти узорка и стандарда (1 µL узорка и 0,5 µL стандарда) нанети су микрошприцем на 10 mm од дна плоче и по 5 mm од ивица, са међусобним растојањем од 4 mm. Хроматографско раздвајање је урађено два пута. Након завршене хроматографије, плоча је осушена на собној температури око 45 мин. Раздвојени шећери су обојени потапањем плоче у раствор α-нафтола ради визуелизације. Плоча је затим загрејана на 120 °C у сушници.

4.4 Рекомбинантна производња ПГ II

4.4.1 Амплификација гена *pgalI*

За амплификацију *pgalI* гена, дизајнирана су два пара прајмера:

- за први егзон:

PecAt_ex1_Fw1 ATCCCCCATCGAAGCCCGG

PecAt_ex1_Rev1 GAATTTTTTCGCCAGAGTTGATCGCAAGACAG

- за други егзон:

PecAt_ex2_Fw2 CATCTGGTTTACCAGCGGC

PecAt_ex2_Rev2 CAAAAGCTTGTTAGCAAGTGCTACAACCG

Укупна ДНК соја *A. tubingensis* FAT43 изолована је из белог мицелијума гајеног на PDA подлози (3 дана на 28°C), коришћењем протокола који је описан претходно у поглављу 4.1.2. PCR метода урађена је употребом Phusion High Fidelity DNA Polymerase (0,5 U по реакцији од 50 µL) са изолованом укупном DNA соја FAT43 и дизајнираним прајмерима, под следећим условима: иницијална денатурација 2 минута на 98°C, затим 30 циклуса са по 20 секунди денатурације на 98°C, 30 секунди анилинга на 55°C и 15 секунди полимеризације на 72°C, а на крају завршна полимеризација трајала је 5 минута на 72°C. Успешност амплификације добијених ДНК фрагмената очекиване величине (570 и 502 базних парова) анализирана је електрофорезом на 1% агарозном гелу (поглавље 4.1.1.), док је величина фрагмената одређена поређењем са стандардом DNA дефинисаних величина фрагмената GeneRuler DNA Ladder Mix-a (Thermo Scientific).

4.4.2 Рекомбинантна производња ПГ II у *E. coli*

Од претходно амплификованих фрагмената (егзон 1 од 570 базних парова и егзон 2 од 502 базна пара) најпре је клониран амплификован фрагмент који кодира за егзон 1 од 570 базних парова у линеаризоване векторе (pMALc5HisEk и pQE_Ek) *Bsa*BI рестрикционим ензимом. С обзиром да *Bsa*BI рестрикциони ензим приликом сечења оставља равне крајеве фрагмент се могао уклонирати у обе оријентације али су за даљи рад коришћени клонови који има оријентацију у којој је *Xmn*I рестрикционо место низводно у односу на таг који се налази на N-терминусу, Добијени клонови pMALc5HisEk-PGAex1 и pQE_Ek-PGAex1 (дигестија *Sac*I-*Xmn*I даје величину фрагмента од 600 bp) са исправном оријентацијом су коришћени за клонирање егзона 2. Фрагмент 2 који кодира егзон 2 величине око 500 базних парова је дигестован *Hind*III рестрикционим ензимом и клониран у конструкте pMALc5HisEk-PGAex1 и pQE_Ek-PGAex1 претходно исечене *Xmn*I- *Hind*III рестрикционим ензимима. Добијени клонови pMALc5HisEk-PGAex1+2 и pQE_Ek-PGAex1+2 који садрже цео кодирајући *pgaII* ген су одабрани на основу дигестије *Sac*I-*Hind*III (1100 базних парова) и потврђени секвенцирањем. Клонови у pMALc5HisEk су трансформисани и експримирани у *E. coli* ER2523, док су клонови у pQE_Ek трансформисани и експримирани у *E. coli* M15pREP4. Тако добијени рекомбинантни клонови са (pMALc5HisEk-PGAex1+2 и pQE_Ek-PGAex1+2) су коришћени за индукцију (0,3 mM IPTG) синтезе ензима који је пречишћен, биохемијски окарактерисан и поређен са нативним ензимом.

4.4.3 Рекомбинантна производња ПГ II у *P. pink*

4.4.3.1 Клонирање ПГ II у *P. pink*

Потребни раствори:

- LB (Luria-Bertani) медијум:
 - Триптон 10 g;
 - Екстракт квасца 5 g;
 - NaCl 10 g;
 - Дестилована вода до 1 L.
- YPD подлога за гајење *P. pink*:
 - Екстракт квасца 10 g;
 - Пептон 20 g;
 - Глукоза 20 g;
 - Дестилована вода до 1 L.
- Раствор ампицилина (100 mg/mL)
 - Ампицилин 100 mg
 - Стерилна дестилована вода до 1 mL

Поступак:

Клонирање гена *pgaII* у плазмидни вектор pPink α -НС који на себи носи α -фактор сигналну секвенцу за екстраћелијско усмеравање синтетисаних протеина. С обзиром да је ген *pgaII* успешно клониран у *E. coli* експресионом систему (клонови pMALc5HisEk-PGAex1+2 и pQE_Ek-PGAex1+2) умножен је PCR амплификацијом (тако да носи и секвенцу за кодирање тага од 6 хистидина), дигериран *Kpn*I рестрикционим ензимом и клониран је у фазу транслације са α -фактором у pPink α -НС плазмидни вектор претходно исечен *Stu*I-*Kpn*I рестрикционим ензимима лигацијом Т4 ДНК лигазом. Лигациона смеша је најпре коришћена

за трансформацију компетентних *E. coli* DH5 α ћелија применом методе термичког шока (42°C, 90 секунди), а трансформанти су засејани на LB агар плоче са антибиотиком (ампицилин 100 $\mu\text{g/mL}$) и инкубирани преко ноћи на 37°C. После изоловања плаزمида (mini-prep), присуство гена *pgaII* у клоноовима потврђено је дигестијом рестрикционим ензимима *XhoI-KpnI* и електрофорезом на 1% гелу (величина фрагмента око 1100 базних парова). Након што је секвенцирањем потврђено да је *pgaII* ген успешно интегрисан у pPink α -НС вектор у фази са α -фактором, плазмидна DNA конструкта pPink α -НС-PGAex1+2 је изолована у великој количини. Линеаризација плазмидног конструкта извршена је специфичним рестрикционим ензимом (*SpeI*), а ефикасност линеаризације проверена је на 1% агарозном гелу. Компетентне ћелије *P. pink* припремљене су методом прања у 1М сорбитолу на леду, затим је урађена електропорација линеаризованим конструктом, а након периода опоравка у YPD медијуму, засејане на селективне плоче (PAD комерцијалне подлоге) које су инкубиране 2 дана на 30°C. Позитивни трансформанти су детектовани као беле крупне колоније, за разлику од нетрансформисаних које су мале величине и пинк боје.

4.4.3.2 Експресија ПГ II у *P. pink*

Коришћењем једне колоније, инокулисано је 30 mL BMGY медијума у ерленмајерима запремине 250 mL. Ћелије су гајене 1 дан на температури од 28 °C у инкубатору на 300 о/мин. Ћелије су пребачене у конусне вајле запремине 50 mL и центрифугиране при 1500 $\times$ g током 5 минута на собној температури. Супернатант из BMGY медијума је одливан, а ћелијски пелет ресуспендован у 3 mL BMMY медијума ради индукције експресије. Ћелије у BMMY медијуму враћене су у инкубатор на температури од 30°C ради даљег раста током ноћи. Наредног дана, узето је 100 μL узорка за гел анализу, а затим додато 100 μL 40% метанола. Ћелије су настављене да се гаје током 3 дана у инкубатору подешеним на 300 о/min на 30°C. Узорци су замрзнути и анализирани су на експресију протеина помоћу SDS-PAG електрофорезе.

Рекомбинантна ПГ II пречишћена је метал-афинитетном хроматографијом на Ni-NTA колони еквилибрисаној 20 mM Tris-фосфатним пуфером pH 7,4, 0,5 M NaCl и 20 mM имидазола. Невезани протеини испрани су са две запремине истог пуфера. Везани ензим је елуиран растућом концентрацијом имидазола (од 25 до 300 mM). SDS-PAG електрофореза примењена је за проверу чистоће и молекулске масе ензима. Ензимска активност је измерена стандардним ензимским есејом (4.2.2).

4.5 Пектинолитички ензими из *Bacillus* spp.

Како би се пронашли потенцијални произвођачи пектинолитичких ензима из *Bacillus* spp. тестирано је 10 сојева *Bacillus* доступних из лабораторијске банке. Преглед ових сојева дат је у Табели 9.

4.5.1 Проналажење потенцијални произвођачи пектинолитичких ензима из *Bacillus* spp.

Потребни раствори:

- LB (Luria-Bertani) медијум
- Продукциона подлога:
 - Пектин 10 g;
 - (NH₄)₂SO₄ 5 g;
 - Екстракт квасца 3 g;
 - K₂HPO₄ 5 g;
 - MgSO₄·7H₂O 0,5 g;
 - Дестилована вода до 1 L;

- рН подесити на 7-

Поступак:

Инокулуми сојева су припремљени засејавањем култура из глицеролских штокова у 5 mL преконоћне LB подлоге и инкубирани су на 37°C и 150 о/мин током 12 сати. Сутрадан су преконоћне културе пребачене у ерленмајере са 50 mL продукционе подлоге и инкубирани су 72 сата на 37°C. Ферментације су прекинуте центрифугирањем на 10000 о/мин, током 10 мин, на 4°C. Добијени супернатанти ФЕ су замрзнути за даље анализе.

4.5.1.1 Одређивање пектин лијазне активности

Потребни раствори:

- Фосфорна киселина 30 mM:
 - $\text{H}_3\text{PO}_4(85\%)$ 200 μL
 - Дестилована вода до 100 mL
- ВМ пектин 0,2%:
 - НМ пектин 0,2 g
 - 50 mM Tris HCl пуферу рН 8,0 до 100 mL

Поступак:

У свим добијеним ФЕ анализирано је присуство пектин лијазне активности. Активност пектин лијазе је одређена према методи коју су описали Zhou и сар. (2017) (87), мерењем пораста броја незасићених веза на таласној дужини од 235 nm. Реакциона смеша састојала се од 190 μL 0,2% ВМ пектина у 50 mM Tris HCl пуферу рН 8,0 и 10 μL ФЕ. Реакција је трајала 10 мин на 50°C, након чега је заустављена додавањем 300 μL 30 mM фосфорне киселине. Апсорбанција је затим измерена на 235 nm УВ спектрофотометром. Једна јединица активности пектин лијазе дефинисана је као количина ензима која у минуту произведе 1 μmol незасићених веза, уз моларни екстинкцијски коефицијент од 4600 L/M/cm и израчуната је из једначине

$$A = (\Delta A/\text{min}) / (\epsilon \times l)$$

где су:

- $\Delta A/\text{min}$ – брзина промене апсорпције у временској јединици,
- ϵ – моларни екстинкцијски коефицијент (4600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ за пектин лијазу),
- l – дебљина кивете у cm (стандардно 1 cm).

Све експерименталне анализе потребне за одређивање ензимске активности урађене су у трипликату.

4.5.2 Рекомбинантна производња пектин лијазе

Сој *B. velezensis* 16В одабран је као најбољи извор пектин лијазе и коришћен је за њену рекомбинантну производњу у *E. coli*.

Потребни раствори:

- 2% SDS раствор:
 - SDS 2 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- Пуфер за лизу:
- 50 mM натријум-фосфатни пуфер, рН 8,0

- Na_2HPO_4 3,9 g;
- NaH_2PO_4 1,2 g.

-300 mM NaCl

- NaCl 17,53 g.

-10 mM имидазол

- Имидазол 0,68 g.

Растворити све компоненте у око 800 mL дестиловане воде, подесити pH на 8,0 и затим додати дестиловану воду до запремине од 1 L.

4.5.2.1 Изоловање хромозомске DNA из *B. velezensis* 16B

Хромозомска DNA добијена је фенол-хлороформ методом из културе *B. velezensis* 16B у фази експоненцијалног раста на LB медијуму.

Потребни раствори:

- ТЕ пуфер (10 mM Tris-HCl pH 8,0 и 1 mM EDTA)
- Раствор лизозима (4 mg/mL):
 - Лизозим 4 mg;
 - Дестилована вода до 1 mL.
- 3 М натријум-ацетат pH 5,2:
 - $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 40,8 g;
 - Глацијална сирћетна киселина до pH 5,2;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- Фенол-хлороформ (1:1)
- Етанол (96% и 70%)

Поступак:

Ћелије *B. velezensis* 16B сакупљене су центрифугирањем културе на 10000 о/мин током 10 минута на 4°C. Добијени пелет је ресуспендован у 500 μL ТЕ пуфера који садржи 10 mM Tris-HCl pH 8,0 и 1 mM EDTA. У раствор је додато 4 mg/mL лизозима, након чега је смеша (500 μL) ћелија инкубирана 30 минута на 37°C ради разградње ћелијског зида. Додато је 250 μL 2% SDS и раствор је интензивно мешан на вортексу а затим инкубиран 10 минута на 65°C уз повремено мешање како би се лизирале ћелијске мембране. Лизат је екстрахован са 250 μL раствора фенола и хлороформа у односу 1:1. Туба је пажљиво инвертована пар пута ради добијања емулзије. Смеша је центрифугирана на 10000 о/мин током 10 минута на 4°C. Након центрифугирања, водена фаза која представља горњу фазу пажљиво је пренета у нову епендорф тубу, избегавајући протеинску међуфазу. Горња фаза поново је екстрахована додавањем једнаке запремине чистог хлороформа. Након мешања и центрифугирања при 10000 о/мин током 10 минута на 4°C, водена фаза је пажљиво пренета у нову тубу. DNA је преципитована додавањем 2,5 запремине 96% етанола и 0,1 запремине 3 М натријум-ацетата pH 5,2. Смеша је инкубирана на -20°C током једног сата. Добијени преципитат сакупљен је центрифугирањем на 13000 о/мин током 15 минута на 4°C. Пелет ДНК испран је са 500 μL 70% етанола и поново центрифугиран при 13000 о/мин током 5 минута на 4°C. Након прања, етанол је пажљиво уклоњен а пелет осушен на ваздуху 15 до 20 минута. ДНК је ресуспендована у 50 μL ТЕ пуфера. Чистоћа DNA проверена је агарозном електрофорезом.

4.5.2.2 Амплификација и експресија гена

Два олигонуклеотидна прајмера дизајнирана су на основу секвенције гена *pelB*, без лидер пептид (аминокиселине 1–32):

- Forward прајмер Pec_16B_Fw (AGCAGCGGCTTATCCGGATGTG) са додатком „А“ нуклеотида на 5' крају,
- Reverse прајмер Pec_16B_Rev (CGGCTGCAGGCGGTTTTTCGTATTATGG)

PCR реакција (50 μ L) утврђена је коришћењем Phusion High Fidelity Taq полимеразе (0,5 U) уз следеће услове:

1. Почетна денатурација: 98°C, 120 s;
2. 30 циклуса:
 - Денатурација: 98°C, 20 s;
 - Анилинг: 55°C, 30 s;
 - Полимеризација: 72°C, 90 s;
3. Завршна полимеризација: 72°C, 420 s.

Амплификовани ген (969 bp) пречишћен је, дигестован *Pst*I рестрикционим ензимом и лигиран у *Bsa*BI-*Pst*I дигестовани pQE_Ek вектор коришћењем T4 ДНК лигазе (1 U, Thermo Scientific). Трансформација је извршена у компетентне ћелије *E. coli* M15pREP4 методом топлотног шока. Трансформанти су селектовани на LB аграу са ампицилином (100 μ g/mL) и канамицином (50 μ g/mL).

Трансформант *E. coli* M15pREP4 са pQE_Ek_PelB конструктом узгајан је у LB медијуму са ампицилином (100 μ g/mL), канамицином (50 μ g/mL) и глукозом (1%) на 30°C уз мешање (180 о/мин). Индукција експресије извршена је додавањем 0,3 mM IPTG када је OD₆₀₀ достигла 0,8, а инкубација је трајала 3 сата на 30°C. Ћелије су сакупљене центрифугирањем (10000 о/мин, 10 мин на 4°C), ресуспендоване у пуферу за лизу (50 mM натријум-фосфатни пуфер, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM имидазол) и лизирани сонификацијом. Супернатант добијен центрифугирањем лизата (13000 о/мин, 30 мин на 4°C) коришћен је у даљем раду.

4.5.2.3 Пречишћавање *VuPelB*

Потребни раствори:

- Пуфер за еквilibрацију колоне:
 - 50 mM натријум-фосфатни пуфер, pH 8,0,
 - 300 mM NaCl
- Елуциони пуфер:
 - Пуфер за еквilibрацију (50 mM натријум-фосфатни пуфер, pH 8,0 са 300 mM NaCl) са додатим градијентом имидазола од 10 mM до 300 mM.
- Пуфер за ентерокиназу:
 - 20 mM Tris-HCl, pH 7,4
 - 50 mM NaCl
 - 2 mM CaCl₂

Растворити 2,42 g Tris базе у око 800 mL дестиловане воде. Подесити pH на 7,4 додавањем концентроване HCl (уз континуирану контролу pH). Додати 2,92 g NaCl и мешати док се потпуно не раствори. Додати 0,22 g CaCl₂ и мешати док се потпуно не раствори. Допунити дестилованом водом до коначне запремине од 1 L.

Поступак:

Припремљена је серија раствора пуфера (50 mM натријум-фосфатни пуфер, pH 8,0 са 300 mM NaCl) са различити концентрацијама имидазола (Табела 18), растварањем одговарајуће количине имидазола у 100 mL пуфера.

Табела 18. Раствор пуфера (50 mM натријум-фосфатни пуфер, pH 8,0 са 300 mM NaCl) са различити концентрацијама имидазола.

25 mM	50 mM	75 mM	100 mM	125 mM	150 mM	200 mM	250 mM	300 mM
0,17 g	0,34 g	0,51 g	0,68 g	0,85 g	1,02 g	1,36 g	1,70 g	2,04 g

6xHis-таговани ензим пречишћен је на Ni-NTA колони, која је претходно еквилибрисана са 50 mM натријум-фосфатним пуфером (pH 8,0, 300 mM NaCl). Ензим је елуиран градијентом имидазола (25–300 mM). Таг је уклоњен ентерокиназом у 20 mM Tris-HCl пуферу pH 7,4 са 50 mM NaCl и 2 mM CaCl₂ преко ноћи на собној температури. Сакупљене фракције тестиране су на пектин лијазну активност, а концентрација протеина одређена је Бредфордовом методом.

4.5.3 Биохемијска карактеризација *BvPelB*

Биохемијска карактеризација пречишћене *BvPelB* обухватала је анализу дводимензионална и тродимензионална структура *BvPelB* како би се идентификовале сличности и разлике у поређењу са осталим пектинолитичким ензимима, одређивање молекулске масе, pI вредности, супстратне специфичности, као и процену утицаја pH и температуре на његову активност и стабилност.

4.5.3.1 Анализа дводимензионалне и тродимензионалне структуре *BvPelB*

Секвенца гена *pelB* анализирана је и упоређена са секвенцама гена других пектинолитичких ензима користећи BLAST алатку (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), а резултати су потврђени применом софтвера Clustal Omega (EMBL-EBI Service), који је коришћен за усклађивање секвенци.

Присуство сигналног пептида, дужине 32 аминокиселине (MIKKTRHLAFLAALGFAL-CLAIVCSASKQAEA), предвиђено је коришћењем онлајн софтвера SignalP-5.0. Дводимензионална и тродимензионална структура протеина предвиђене су применом AlphaFold 2.0 (179), чиме су утврђене потенцијалне карактеристике које омогућавају његову функционалност.

4.5.3.2 Одређивање молекулске масе и pI вредности *BvPelB*

Рекомбинантни ензим *BvPelB* раздвојен је методом SDS-PAG електрофорезе према претходно описаном протоколу (4.3.7.1.) користећи 10% полиакриламидни гел за раздвајање протеина. Након завршене електрофорезе, молекулска маса ензима одређена је поређењем положаја трака у гелу са позицијама стандардних протеинских маркера молекулских маса (Blue Wide Range Protein Ladder, 10–245 kDa, Cleaver Scientific). Процењена вредност потврђена је израчунавањем Rf вредности за испитивани протеин.

Изоелектричним фокусирањем одређена је pI вредности *BvPelB*. Поступак је описан у поглављу 4.3.7.1. Електрофореза је трајала 90 минута под условима: 1000 V, 50 mA и 4 W. Након завршене електрофорезе, ИЕФ гел је темељно испран дестилованом водом, а затим у 50 mM Tris-HCl пуферу (pH 8). Гел је инкубиран 60 минута у раствору високометилованог пектина (0,2 %) припремљеном у 50 mM Tris-HCl пуферу (pH 8). Затим је гел пренет у влажну

средину на 50°C током 45 минута. Након тога, добро је испран дестилован водом и визуализација је извршена применом раствора RR, уз инкубацију од 20 минута.

4.5.3.3 Утицај рН и температуре на стабилност *BvPelB*

4.5.3.3.1 Одређивање температурног оптимума *BvPelB*

Оптимална температура за *BvPelB* одређена је мерењем ензимске активности (пектин лијазне) у температурном опсегу од 35°C до 70°C, у 50 mM Tris HCl пуферу (pH 8), у складу са претходно описаним протоколом у поглављу 4.5.1.1.

4.5.3.3.2 Одређивање термалне стабилности *BvPelB*

Термална стабилност *BvPelB* испитана је инкубирањем узорака пречишћеног ензима у епруветама током различитих временских интервала (1–24 сата) на температурама од 40°C, 50°C, 60°C и 70°C. Након инкубације, преостала ензимска активност мерена је у стандардизованим условима есеја, који је описан у поглављу 4.5.1.1.

4.5.3.3.3 Одређивање енергије активације (E_a)

Енергија активације *BvPelB* одређена је применом Аренијусове једначине. Активност ензима мерена је у температурном опсегу од 35°C до 70°C коришћењем 0,2% ВМ пектина у 50 mM Tris HCl пуферу pH 8.

4.5.3.3.4 Одређивање рН оптимума *BvPelB*

Активност ензима *BvPelB* испитана је при различитим рН вредностима од 3 до 10, на претходно описан начин у поглављу 4.5.1.1.

4.5.3.3.5 Одређивање рН стабилности *BvPelB*

рН стабилност је испитивана тако што је ензим инкубиран у контролисаним условима при рН вредностима између 7 и 9, на константној температури од 25°C током 1, 24, 48 и 96 сати. Узорковани су аликвоти у одређеним временским интервалима, а преостала активност ензима квантификована је помоћу стандардног ензимског теста.

4.5.3.4 Испитивање утицаја металних јона и агенаса на *BvPelB*

Потребни раствори:

- 50 mM HEPES пуфера (pH 8,0):
- Растворити 11,9 g HEPES-а у 1 L дестиловане воде, подесити рН на 8,0 додавањем 1 M NaOH.
- 100 mM MnCl₂:
 - MnCl₂ x 4 H₂O 0,20 g;
 - Дестилована вода до 10 mL.
- 100 mM ZnCl₂:
 - ZnCl₂ 0,16 g;
 - Дестилована вода до 10 mL.
- 100 mM MgSO₄:
 - MgSO₄ x 7 H₂O 0,25 g;

- Дестилована вода до 10 mL.
- 100 mM CaCl₂:
 - CaCl₂ 0,11 g;
 - Дестилована вода до 10 mL.
- Triton X 100 1%:
 - Triton X 100 1 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- SDS 1%:
 - SDS 1 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.
- 100 mM EDTA:
 - EDTA 3,72 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.

Поступак:

Одмерено је 50 μ L узорка, који је инкубиран у 50 mM HEPES пуферу (pH 8) у присуству 1 mM и 5 mM соли. Реакциона смеша припремљена је додавањем 4 μ L или 20 μ L 100 mM раствора соли, 50 mM HEPES пуфера до финалне запремине од 400 μ L. Све пробе постављене су у дупликату. Након 30 минута инкубације на собној температури, изведен је тест за одређивање пектин лијазне активности. Релативна активност изражена је као проценат у односу на активност нетретираног узорка, која је узета као 100%.

4.5.3.5 Супстратна специфичност *BvPelB*

Специфичност *BvPelB* према различитим супстратима испитана је коришћењем теста за одређивање пектин лијазне активности (описано у поглављу 4.5.1.2) и танкослојне хроматографије као и мерењем вискозности раствора након хидролизе, према протоколу описаном у поглављу 4.3.8.1.

4.5.3.5.1 Испитивање начина разградње супстрата од стране *BvPelB*

Степен разградње супстрата (ПГА или ВМ пектина) одређен је мерењем повећања концентрације редукујућих шећера након инкубације ензима са супстратима на 50°C током 30 минута, што указује на степен раскидања гликозидних веза у супстрату. Концентрација редукујућих шећера измерена је DNS методом коришћењем D-галактуронске киселине као стандарда.

Потребни раствори:

- 2,5% пектин у 50 mM ацетатном пуферу, pH 4,5
 - ВМ пектин 2,5 g
 - 50 mM ацетатни пуфер, pH 4,5 до 100 mL.
- 2,5% ПГА у 50 mM ацетатном пуферу, pH 4,5:
 - ПГА 2,5 g
 - 50 mM ацетатни пуфер, pH 4,5 до 100 mL.
- DNS реагенс (описано у поглављу 4.1.2.3.1.).

Поступак:

Припремљена је реакциона смеша мешањем 500 μ L узорка ензима и 9,5 mL раствора супстрата (2,5% пектин или ПГА у 50 mM ацетатном пуферу, pH 4,5). Реакција је трајала 30

минута на 50°C уз константно мешање. Контролни узорак садржао је само пуфер, уместо узорка ензима. Након завршетка реакције, реакциона смеша сипана у посуду у коју је уроњена сонда ротационог вискозиметра HAAKE Viscotester 3, Thermo Scientific и након пар секунди је очитана вредност (mPas). Као контрола коришћена је иста запремина раствора супстрата са пуфером уместо додатог ензима. На основу смањења вискозности одређује се активност ендо-пектиназе. Једна јединица ендо-пектиназне активности дефинише се као количина ензима која узрокује 50% смањење вискозности реакционе смеше у минуту под датим условима.

4.5.3.5.2 TLC анализа производа хидролизе BvPelB

TLC анализа изведена је према претходно описаном протоколу у поглављу 4.3.8.1. Реакција хидролизе је трајала два сата на 50°C на 350 о/мин. Моногалактуронат коришћен је као стандард у овој анализи.

4.6 Примена пектинолитичких ензима у побољшању карактеристика воћних сокова

4.6.1 Примена пектинолитичког комплекса ензима

Комплекс пектинолитичких ензима који је добијен ферментацијом на чврстој подлози из *A. tubingensis* FAT 43, примењен је за обраду воћних каша и сокова у процесима отечњавања и кларификације.

4.6.1.1 Отечњавање воћних каша

Потребни раствори и материјал:

- Пулпа воћа (50 g):
 - Банане;
 - Кајсије;
 - Јабукe;
 - Поморанце;
 - Дуње;

Поступак:

Свежи плодови (банане, кајсије, јабукe, поморанце и дуње) су ољуштени и уситњени у блендеру до добијања хомогене пулпе. На 50 g узорка пулпе сваког воћа додато је 10 mL ФЕ, која садржи 100 IU ендо-пектинолитичке активности и 140 IU укупне пектинолитичке активности. Тест за отечњавање изведен је на оптималној температури за активност ПГ II (45°C). Узорци су инкубирани 90 минута на 45°C у воденом купатилу. Као контрола, припремљени су узорци пулпе воћа у којима је ензим замењен ацетатним пуфером (25 mM, pH 4,5). Након инкубације, узорци су центрифугирани на 14000 о/мин током 15 минута, а запремина добијеног супернатанта измерена. Проценат отечњавања изражен је као повећање запремине сока у односу на контролни узорак који није третиран пектинолитичким ензимским комплексом и израчунат је према једначини датој у поглављу 3.7.2.

4.6.1.2 Кларификација воћних сокова

Поступак:

Након ензимске обраде и отечњавања, добијени супернатант филтриран је кроз филтер папир ради уклањања свих суспендованих честица. Прозирност сока одређена је мерењем трансмитанције на таласној дужини од 660 nm. Проценат бистрења изражен је као степен повећања трансмитанције у поређењу са соковима који нису третиран пектинолитичким ензимским комплексом и израчунат је на основу једначине дате у поглављу 3.7.2.

4.6.1.3 Одређивање концентрације редукујућих шећера у третираним и нетретираним соковима

Потребни раствори:

- Раствор динитросалицилне киселине (DNS);

Поступак:

У епрувету је одмерено 250 μL сока (ензимски третираног и нетретираног) и додато је 250 μL раствора DNS. Узорци су кувани 5 минута у кључалој води (100°C). Након хлађења, разблажени су са 2 mL воде, промешани на вортексу и измерена је апсорбација. Слепа проба је садржала 500 μL воде и 500 μL раствора DNS. Након кувања, разблажено је са 4 mL воде. Апсорбација је мерена на 540 nm. Одређивање концентрације редукујућих шећера у третираним и нетретираним соковима се израчунава на основу стандардне праве за глюкозу.

4.6.2 Примена ПГ II у побољшању карактеристика воћних сокова

4.6.2.1 Отечњавање воћних каша

- Пулпа воћа (50 g):

- Банане;
- Јабуке;
- Поморанце;
- Дуње;
- Јагоде;

Поступак:

Свеже пулпе воћа су хомогенизоване штапним миксером, а третман ензимом (2 U по граму воћне каше) изведен је на температури од 40°C током 60 минута. Контролни узорци, у којима је ензим замењен ацетатним пуфером, такође су припремљени. Након центрифугирања током 20 минута на 13000 обртаја на 20°C, степен отечњавања је квантитативно одређен мерењем повећања запремине сока у поређењу са контролним узорком. Експерименти су изведени у три понављања, а за сваки сок су израчунате средње вредности са стандардним девијацијама. Поступак је описан у поглављу 4.7.1.1.

4.6.1.2 Кларификација воћних сокова

Поступак кларификације воћних сокова је претходно описан у поглављу 4.7.1.2.

4.6.2.3 Испитивање антиоксидативних својстава воћних сокова

4.6.2.3.1 Одређивање укупног садржаја фенолних једињења

Потребни раствори:

- Folin-Ciocalteu реагенс:
- Разблажити концентровани Folin-Ciocalteu реагенс у односу 1:10 дестилованом водом непосредно пре употребе.
- 20% раствор Na_2CO_3 :
 - Na_2CO_3 20 g;
 - Дестилована вода до 100 mL.

- Стандардни раствор галне киселине (1 mg/mL)

Поступак:

Најпре је припремљена серија разблажења стандардног раствора галне киселине у концентрацијама од 10, 20, 40, 60, 80 и 100 $\mu\text{g/mL}$, при чему је свака концентрација припремљена у финалној запремини од 2 mL, идентично као и узорци ензимски третираних и нетретираних сокова. На основу измерене апсорбанције стандардних раствора, конструисана је стандардна крива која је коришћена за израчунавање концентрације полифенола у узорцима. У епрувету је додато 0,1 mL испитиваног сока и 0,5 mL разблаженог Folin-Ciocalteu реагенса, након чега је смеша остављена да одстоји 5 минута на собној температури. Потом је додато 0,4 mL 20% раствора натријум-карбоната, а запремина је допуњена дестилованом водом до укупне запремине од 2 mL. Смеша је инкубирана 30 минута на тамном месту на собној температури. Апсорбанција је измерена на таласној дужини од 765 nm спектрофотометријски, а као слепа проба коришћени су реагенси без додатог сока. Укупни садржај фенолних једињења изражен је као еквиваленти галне киселине у mg на 100 mL сока. Добијени резултати концентрације полифенола у соковима пре и након ензимског третмана упоређени су применом t-теста, чиме је утврђена статистичка значајност разлика.

4.6.2.3.2 Антиоксидативна активност третираних и нетретираних сокова

Да би се испитале промене антиоксидативних својстава сокова, изведени су FRAP (способност редукције гвожђа) и DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) тестови пре и након третмана полигалактуроназом.

Потребни раствори:

- FRAP реагенс:
 - Ацетатни пуфер (300 mM, pH 3,6) 50 mL
 - 10 mM TPTZ у 40 mM HCl:
 - TPTZ 0,0156 g;
 - HCl 40 mM до 5 mL.
 - 20 mM FeCl₃·6H₂O:
 - FeCl₃·6H₂O 0,027 g;
 - Дестилована вода до 5 mL.
- DPPH реагенс:
 - DPPH 4 mg;
 - Метанол 100 mL.
- Аскорбинска киселина (10 mM):
 - Аскорбинска киселина 17,6 mg;
 - Дестилована вода до 10 mL.

Поступак:

FRAP тест:

За стандардну праву аскорбинске киселине прво је припремљена 10 mM аскорбинска киселина, а затим, је направљена серија раствора за стандардну криву (Табела 19).

Табела 19. Припрема раствора за стандардну криву аскорбинске киселине

Концентрација стандарда (μM)	10mM аскорбинска киселина (μL)	H ₂ O (μL)
50	5	1995
100	10	1990
200	20	1980
250	50	1950
500	100	1900

За FRAP тест, 100 μL узорка је помешано са 900 μL FRAP реагенса, који се састоји од 50 mL ацетатног пуфера pH 3,6, 5 mL трипиридилтриазина (TPTZ) и 5 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Добијена смеша је остављена у потпуном мраку 5 минута. Након тога, апсорбанција смеше је измерена на 593 nm. FRAP вредности израчунате су на основу једначине стандардне криве за аскорбинску киселину: $y = 0,00551x$.

DPPH тест:

DPPH тест је изведен мешањем 10 μL узорка са 900 μL DPPH реагенса (1 mM 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил растворен у метанолу). Реакција је спроведена у потпуном мраку током 15 минута. Након инкубације, апсорбанција је измерена спектрофотометријски на таласној дужини од 517 nm. Резултати реакције су приказани као проценат промене боје. Добијени резултати пре и након третмана ензимима упоређени су t-тестом.

4.6.3 Примена *BvPelB* у преради неутралних сокова

4.6.3.1 Оптимизација услова *BvPelB* третмана сокова

Потребни раствори и материјал:

- 1 M KOH:
 - o KOH 56,11 g;
 - o Дестилована вода до 1 L.
- Свежа пулпа воћа:
 - o Јабукe 200 g;
 - o Поморанце 200 g.

Поступак:

Два кључна независна променљива фактора: количина ензима (X_1) и време (X_2) испитивана су на пет нивоа ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ и $+\alpha$), као што је детаљно приказано у Табели 20.

Табела 20. Праве и кодиране вредности фактора за CCD

Фактор	$-\alpha$	-1	0	$+1$	$+\alpha$
X_1 , количина ензима (IU/g)	5	8	15	22	25
X_2 , време (мин)	11	30	75	120	139

Табела 21. Поставка експеримената за CCD

Број експеримента	X1, количина ензима (IU/g)	X2, време (мин)
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	- α	0
6	+ α	0
7	0	- α
8	0	+ α
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

Централна тачка је поновљена пет пута, што је резултовало са укупно 13 експерименталних тачака. Сокови од јабуке и поморанце су припремљени у складу са претходно описаном методом. У свим експериментима коришћена је иста количина свежих, хомогенизованих воћних каши (200 g) и константна температура (50°C). Да би се обезбедила равномерна ензимска реакција рН свежих каша од воћа је неутралисан, узимајући у обзир варијације које зависе од врсте воћа и степена зрелости, чиме је постигнута рН 6, титрацијом са 1 М КОН. Контролни узорци су припремљени заменом ензима једнаком запремином пуфера. Након центрифугирања на 13000 о/мин на 20°C, измерене су запремине узорака и упоређене. Проценат отечљавања и приноса сокова, као и степен кларификације сокова одређени су према претходно описаном протоколу (4.6.2).

4.6.3.2 Стабилност сокова

Потребни раствори:

- Сок од поморанце 50 mL;
- Сок од јабуке 50 mL

Поступак:

По 50 mL ензимски третираних/испитиваних сокова од поморанце и јабуке складиштено је на температури од 4°C током 6 дана како би се одредила стабилност сокова одређивањем индекса седиментације сока. Индекс седиментације израчунат је према једначини датој у поглављу 3.7.3.

4.6.3.3 Одређивање садржаја метанола у соковима

Потребни раствори:

- Метанол

Поступак:

Гасна хроматографија са пламеним детектором (GC-FID) коришћена је за мерење количине метанола у соковима који су прошли ензимски третман, као и у нетретираним соковима. Припремљена је серија стандардних раствора метанола у опсегу концентрација од 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm и 50 ppm, коришћењем чистог метанола и Milli-Q воде као растварача. Стандарди су припремљени свежи, непосредно пре анализе. Коришћена је колона DB-WAX (Agilent Technologies) димензија 30 m×0.25 mm×0.25 μ m. Узорци испитиваних сокова разблажени су десетоструко, мешањем 1 mL узорка и 9 mL воде. Узорци су убризгавани са односом раздвајања 1:10, а температура је подешена на 100°C. Хелијум је коришћен као носећи гас са подешеним притиском и протоком од 1 mL/min. Концентрација метанола у узорцима

одређена је поређењем интензитета пика метанола у узорцима са интензитетима пика стандардних раствора метанола.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Haile S, Ayele A. Pectinase from microorganisms and its industrial applications. *The Scientific World Journal*. 2022;2022:1-15. doi:10.1155/2022/1881305
2. Kertesz, Z. I. A new method for enzymic clarification of unfermented apple juice. Agricultural Experiment Station, 1930. Print. Bulletin (New York State Agricultural Experiment Station); No. 589.
3. Oumer OJ, Abate D. Screening and molecular identification of pectinase producing microbes from coffee pulp. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1-7. doi:10.1155/2018/2961767
4. Ribeiro DS, Henrique SMB, Oliveira LS, Macedo GA, Fleuri LF. Enzymes in juice processing: A review. *Int J Food Sci Technol*. 2010;45(4):635-641. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02177.x
5. Patel VB, Chatterjee S, Dhoble AS. A review on pectinase properties, application in juice clarification, and membranes as immobilization support. *J Food Sci*. 2022;87(8):3338-3354. doi:10.1111/1750-3841.16233
6. Zheng L, Xu Y, Li Q, Zhu B. Pectinolytic lyases: a comprehensive review of sources, category, property, structure, and catalytic mechanism of pectate lyases and pectin lyases. *Bioresour Bioprocess*. 2021;8(1):79. doi:10.1186/s40643-021-00432-z
7. Pili J, Danielli A, Nyari NL, et al. Biotechnological potential of agro-industrial waste in the synthesis of pectin lyase from *Aspergillus brasiliensis*. *Food Science and Technology International*. 2018;24(2):97-109. doi:10.1177/1082013217733574
8. Liu L, Yang H, Shin H dong, et al. How to achieve high-level expression of microbial enzymes. *Bioengineered*. 2013;4(4):212-223. doi:10.4161/bioe.24761
9. Obomighie I, Prentice IJ, Lewin-Jones P, et al. Understanding pectin cross-linking in plant cell walls. *Commun Biol*. 2025;8(1):72. doi:10.1038/s42003-025-07495-0
10. Bidhendi AJ, Geitmann A. Relating the mechanics of the primary plant cell wall to morphogenesis. *J Exp Bot*. 2016;67(2):449-461. doi:10.1093/jxb/erv535
11. Minussi G do A, Santos AA dos, Scapini T, et al. Transforming orange waste with yeasts: bioprocess prospects. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*. 2024;59. doi:10.5327/Z2176-94781859
12. Paniagua C, Posé S, Morris VJ, Kirby AR, Quesada MA, Mercado JA. Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Ann Bot*. 2014;114(6):1375-1383. doi:10.1093/aob/mcu149
13. Mellerowicz E, Sundberg B. Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Curr Opin Plant Biol*. 2008;11(3):293-300. doi:10.1016/j.pbi.2008.03.003
14. Thakur S, Govender PP, Mamo MA, Tamulevicius S, Thakur VK. Recent progress in gelatin hydrogel nanocomposites for water purification and beyond. *Vacuum*. 2017;146:396-408. doi:10.1016/j.vacuum.2017.05.032
15. Sahari MA, Akbarian M A, Hamed M. Effect of variety and acid washing method on extraction yield and quality of sunflower head pectin. *Food Chem*. 2003;83(1):43-47. doi:10.1016/S0308-8146(03)00034-7
16. Oakenfull DG. The Chemistry of High-Methoxyl Pectins. In: *The Chemistry and Technology of Pectin*. Elsevier; 1991:87-108. doi:10.1016/B978-0-08-092644-5.50010-8
17. Thakur BR, Singh RK, Handa AK, Rao MA. Chemistry and uses of pectin — A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1997;37(1):47-73. doi:10.1080/10408399709527767

18. Sánchez D, Muguerza B, Moulay L, Hernández R, Miguel M, Aleixandre A. Highly Methoxylated Pectin Improves Insulin Resistance and Other Cardiometabolic Risk Factors in Zucker Fatty Rats. *J Agric Food Chem*. 2008;56(10):3574-3581. doi:10.1021/jf703598j
19. Lau JM, McNeil M, Darvill AG, Albersheim P. Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydr Res*. 1985;137:111-125. doi:10.1016/0008-6215(85)85153-3
20. Liu J, Willför S, Xu C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2015;5(1):31-61. doi:10.1016/j.bcdf.2014.12.001
21. Renard CMGC, Crépeau MJ, Thibault JF. Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins. *Carbohydr Res*. 1995;275(1):155-165. doi:10.1016/0008-6215(95)00140-O
22. Mukhiddinov Z. Isolation and structural characterization of a pectin homo and rhamnogalacturonan. *Talanta*. 2000;53(1):171-176. doi:10.1016/S0039-9140(00)00456-2
23. Lerouge P, O'Neill MA, Darvill AG, Albersheim P. Structural characterization of endoglycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydr Res*. 1993;243(2):359-371. doi:10.1016/0008-6215(93)87039-U
24. Yapo BM. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydr Polym*. 2011;86(2):373-385. doi:10.1016/j.carbpol.2011.05.065
25. Sun L, Ropartz D, Cui L, Shi H, Ralet MC, Zhou Y. Structural characterization of rhamnogalacturonan domains from Panax ginseng C. A. Meyer. *Carbohydr Polym*. 2019;203:119-127. doi:10.1016/j.carbpol.2018.09.045
26. Palin R, Geitmann A. The role of pectin in plant morphogenesis. *Biosystems*. 2012;109(3):397-402. doi:10.1016/j.biosystems.2012.04.006
27. Lerouge P, Carlier M, Mollet JC, Lehner A. The cell wall pectic rhamnogalacturonan II, an enigma in plant glycobiology. In: ; 2021:553-571. doi:10.1039/9781839164538-00553
28. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*. 2008;11(3):266-277. doi:10.1016/j.pbi.2008.03.006
29. Prade A, Rolf, Zhan Dongfeng, Patricia Ayoubi, Andrew J. Mort. Pectin, Pectinase and Plant-Microbe Interaction. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1999;(16).
30. Lara-Espinoza C, Carvajal-Millán E, Balandrán-Quintana R, López-Franco Y, Rascón-Chu A. Pectin and Pectin-Based Composite Materials: Beyond Food Texture. *Molecules*. 2018;23(4):942. doi:10.3390/molecules23040942
31. Maxwell EG, Belshaw NJ, Waldron KW, Morris VJ. Pectin – An emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends Food Sci Technol*. 2012;24(2):64-73. doi:10.1016/j.tifs.2011.11.002
32. Luppi B, Bigucci F, Abruzzo A, Corace G, Cerchiara T, Zecchi V. Freeze-dried chitosan/pectin nasal inserts for antipsychotic drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;75(3):381-387. doi:10.1016/j.ejpb.2010.04.013
33. Munarin F, Tanzi MC, Petrini P. Advances in biomedical applications of pectin gels. *Int J Biol Macromol*. 2012;51(4):681-689. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002
34. Harholt J, Suttangkakul A, Vibe Scheller H. Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiol*. 2010;153(2):384-395. doi:10.1104/pp.110.156588
35. Collmer A, Keen NT. The Role of Pectic Enzymes in Plant Pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol*. 1986;24(1):383-409. doi:10.1146/annurev.py.24.090186.002123
36. Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. 2005;40(9):2931-2944. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026

37. Gummadi SN, Manoj N, Kumar DS. Structural and Biochemical Properties of Pectinases. In: *Industrial Enzymes*. Springer Netherlands; :99-115. doi:10.1007/1-4020-5377-0_7
38. Wu J, Zhang H, Shao LM, He PJ. Nondestructive characterization of the contaminated biodegradable fraction of municipal solid waste using synchrotron radiation-induced micro-X-ray fluorescence. *Bioresour Technol.* 2013;132:239-243. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.066
39. A N. Extraction, Purification and Industrial Applications of Pectinase: A Review. *Journal of Biotechnology & Bioresearch*. 2018;1(1). doi:10.31031/JBB.2018.01.000503
40. Hoondal GS, Tiwari RP, Tewari R, Dahiya N, Beg QK. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;59(4-5):409-418. doi:10.1007/s00253-002-1061-1
41. Garg G, Singh A, Kaur A, Singh R, Kaur J, Mahajan R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech.* 2016;6(1):47. doi:10.1007/s13205-016-0371-4
42. Amin F, Bhatti HN, Bilal M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. *Int J Biol Macromol.* 2019;122:1017-1026. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048
43. Yeoman CJ, Han Y, Dodd D, Schroeder CM, Mackie RI, Cann IKO. Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. In: ; 2010:1-55. doi:10.1016/S0065-2164(10)70001-0
44. Sharma N, Rathore M, Sharma M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2013;12(1):45-60. doi:10.1007/s11157-012-9276-9
45. Sharma N, Rathore M, Sharma M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2013;12(1):45-60. doi:10.1007/s11157-012-9276-9
46. Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ. [Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. In: ; 1993:213-294. doi:10.1016/S0065-2164(08)70597-5
47. Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry.* 2005;40(9):2931-2944. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026
48. Kant S, Vohra A, Gupta R. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expr Purif.* 2013;87(1):11-16. doi:10.1016/j.pep.2012.09.014
49. Singh SA, Appu Rao AG. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biotechnol Appl Biochem.* 2002;35(2):115-123. doi:10.1042/BA20010077
50. Kanungo A, Bag BP. Structural insights into the molecular mechanisms of pectinolytic enzymes. *J Proteins Proteom.* 2019;10(4):325-344. doi:10.1007/s42485-019-00027-5
51. Parmar I, Rupasinghe HPV. Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol.* 2013;130:613-620. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.084
52. Mayans O, Scott M, Connerton I, et al. 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.* 1997;5(5):677-689. doi:10.1016/S0969-2126(97)00222-0
53. Yadav S, Yadav PK, Yadav D, Yadav KDS. Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry.* 2009;44(1):1-10. doi:10.1016/j.procbio.2008.09.012
54. Kanungo A, Bag BP. Structural insights into the molecular mechanisms of pectinolytic enzymes. *J Proteins Proteom.* 2019;10(4):325-344. doi:10.1007/s42485-019-00027-5
55. Heffron S. Structure-Based Multiple Alignment of Extracellular Pectate Lyase Sequences. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 1995;8(2):331. doi:10.1094/MPMI-8-0331

56. Yadav S, Maurya SK, Anand G, Dwivedi R, Yadav D. Purification and characterization of a highly alkaline pectin lyase from *Fusarium lateritium* MTCC 8794. *Biologia (Bratisl)*. 2017;72(3):245-251. doi:10.1515/biolog-2017-0038
57. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Shevchik VE. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environ Microbiol Rep*. 2014;6(5):427-440. doi:10.1111/1758-2229.12166
58. Sharma HP, Patel H, Sugandha. Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices—A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57(6):1215-1227. doi:10.1080/10408398.2014.977434
59. Jin DF, West CA. Characteristics of Galacturonic Acid Oligomers as Elicitors of Casbene Synthetase Activity in Castor Bean Seedlings. *Plant Physiol*. 1984;74(4):989-992. doi:10.1104/pp.74.4.989
60. Ribeiro DS, Henrique SMB, Oliveira LS, Macedo GA, Fleuri LF. Enzymes in juice processing: a review. *Int J Food Sci Technol*. 2010;45(4):635-641. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02177.x
61. Sohail M, Latif Z. Phylogenetic Analysis of Polygalacturonase-Producing *Bacillus* and *Pseudomonas* Isolated From Plant Waste Material. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9(1). doi:10.5812/jjm.28594
62. Rehman HU, Aman A, Nawaz MA, Qader SAU. Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21. *Food Hydrocoll*. 2015;43:819-824. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.08.018
63. Singhania RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb Technol*. 2010;46(7):541-549. doi:10.1016/j.enzmitec.2010.03.010
64. Fontana RC, Silveira MM. Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2012;29(4):683-690. doi:10.1590/S0104-66322012000400001
65. Sugai-Guérios MH, Balmant W, Furigo A, Krieger N, Mitchell DA. Modeling the Growth of Filamentous Fungi at the Particle Scale in Solid-State Fermentation Systems. In: ; 2015:171-221. doi:10.1007/10_2014_299
66. Koser S, Anwar Z, Iqbal Z, et al. Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues. *J Radiat Res Appl Sci*. 2014;7(3):327-332. doi:10.1016/j.jrras.2014.05.001
67. Ahmed A, Khan MN, Ahmad A, Khan SA, Sohail M. Optimization of pectinase production from *Geotrichum candidum* AA15 using response surface methodology. *Pak J Bot*. 2019;51(2). doi:10.30848/PJB2019-2(41)
68. Ahmed T, Rana MR, Zzaman W, Ara R, Aziz MG. Optimization of substrate composition for pectinase production from Satkara (*Citrus macroptera*) peel using *Aspergillus niger*-ATCC 1640 in solid-state fermentation. *Heliyon*. 2021;7(10):e08133. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e08133
69. Sun T, Yan P, Zhan N, et al. The optimization of fermentation conditions for *Pichia pastoris* GS115 producing recombinant xylanase. *Eng Life Sci*. 2020;20(5-6):216-228. doi:10.1002/elsc.201900116
70. Prasad Talluri V, Lanka SS, Rajagopal Saladi V. Statistical Optimization of Process Parameters by Central Composite Design (CCD) for an Enhanced Production of L-asparaginase by *Myroides gitamensis* BSH-3, a Novel Species. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2019;11(1):59-66.

71. Shrestha S, Chio C, Khatiwada JR, Kognou ALM, Qin W. Optimization of multiple enzymes production by fermentation using lipid-producing *Bacillus* sp. *Front Microbiol.* 2022;13. doi:10.3389/fmicb.2022.1049692
72. Kulyyassov A, Fresnais M, Longuespée R. Targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of proteins: Basic principles, applications, and perspectives. *Proteomics.* 2021;21(23-24). doi:10.1002/pmic.202100153
73. Khan S, Ullah MW, Siddique R, et al. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *Int J Genomics.* 2016;2016:1-14. doi:10.1155/2016/2405954
74. Ullah MW, Khattak WA, Ul-Islam M, Khan S, Park JK. Encapsulated yeast cell-free system: A strategy for cost-effective and sustainable production of bio-ethanol in consecutive batches. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 2015;20(3):561-575. doi:10.1007/s12257-014-0855-1
75. Trono D. Recombinant Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries. In: *Advances in Enzyme Technology.* Elsevier; 2019:349-387. doi:10.1016/B978-0-444-64114-4.00013-3
76. Deckers M, Deforce D, Fraiture MA, Roosens NHC. Genetically Modified Micro-Organisms for Industrial Food Enzyme Production: An Overview. *Foods.* 2020;9(3):326. doi:10.3390/foods9030326
77. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014;5. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
78. Yang J, Luo H, Li J, et al. Cloning, expression and characterization of an acidic endo-polygalacturonase from *Bispora* sp. MEY-1 and its potential application in juice clarification. *Process Biochemistry.* 2011;46(1):272-277. doi:10.1016/j.procbio.2010.08.022
79. Karbalaee M, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris* : A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol.* 2020;235(9):5867-5881. doi:10.1002/jcp.29583
80. Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM, Gingeras TR. Isolation of Alcohol Oxidase and Two Other Methanol Regulatable Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* 1985;5(5):1111-1121. doi:10.1128/mcb.5.5.1111-1121.1985
81. Liu MQ, Dai XJ, Bai LF, Xu X. Cloning, expression of *Aspergillus niger* JL-15 endo-polygalacturonase A gene in *Pichia pastoris* and oligo-galacturonates production. *Protein Expr Purif.* 2014;94:53-59. doi:10.1016/j.pep.2013.10.025
82. Bussink HJD, Kester HCM, Visser J. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding prepro-polygalacturonase of *Aspergillus niger*. *FEBS Lett.* 1990;273(1-2):127-130. doi:10.1016/0014-5793(90)81066-W
83. Bussink HJD, Brouwer KB, de Graaff LH, Kester HCM, Visser J. Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. *Curr Genet.* 1991;20(4):301-307. doi:10.1007/BF00318519
84. Bussink HJD, Buxton FP, Fraaye BA, Graaff LH de, Visser J. The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. *Eur J Biochem.* 1992;208(1):83-90. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17161.x
85. Gardijan L, Miljkovic M, Obradovic M, et al. Redesigned pMAL expression vector for easy and fast purification of active native antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol.* 2022;133(2):1001-1013. doi:10.1111/jam.15623
86. Berensmeier S, Singh SA, Meens J, Buchholz K. Cloning of the *pelA* gene from *Bacillus licheniformis* 14A and biochemical characterization of recombinant, thermostable, high-alkaline pectate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;64(4):560-567. doi:10.1007/s00253-003-1446-9

87. Zhou C, Xue Y, Ma Y. Cloning, evaluation, and high-level expression of a thermo-alkaline pectate lyase from alkaliphilic *Bacillus clausii* with potential in ramie degumming. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101(9):3663-3676. doi:10.1007/s00253-017-8110-2
88. Zhao D, Pan C, Ping W, Ge J. Degumming crude enzyme produced by *Bacillus cereus* HDYM-02 and its application in flax retting. *Bioresources*. 2018;13(3):5213-5224. doi:10.15376/biores.13.3.5213-5224
89. Al-Farsi M. The Quality Characteristics of Different Fruit Juice Brands Consumed in Oman. *Food Sci Nutr*. 2024;10(5):1-8. doi:10.24966/FSN-1076/100201
90. Aneja KR, Dhiman R, Aggarwal NK, Kumar V, Kaur M. Microbes Associated with Freshly Prepared Juices of Citrus and Carrots. *Int J Food Sci*. 2014;2014:1-7. doi:10.1155/2014/408085
91. Pinto T, Vilela A, Cosme F. Chemical and Sensory Characteristics of Fruit Juice and Fruit Fermented Beverages and Their Consumer Acceptance. *Beverages*. 2022;8(2):33. doi:10.3390/beverages8020033
92. Santini A, Romano R, Meca G, Raiola A, Ritieni A. Antioxidant Activity and Quality of Apple Juices and Puree After *in vitro* Digestion. *J Food Res*. 2014;3(4):41. doi:10.5539/jfr.v3n4p41
93. Santini A, Tenore GC, Novellino E. Nutraceuticals: A paradigm of proactive medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;96:53-61. doi:10.1016/j.ejps.2016.09.003
94. Ryan L, Prescott SL. Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an *in vitro* digestion. *Int J Food Sci Technol*. 2010;45(6):1191-1197. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02254.x
95. Stella SP, Ferrarezi AC, dos Santos KO, Monteiro M. Antioxidant Activity of Commercial Ready-to-Drink Orange Juice and Nectar. *J Food Sci*. 2011;76(3). doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02055.x
96. Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*. 2008;41(3):274-285. doi:10.1016/j.foodres.2007.12.004
97. Saura-Calixto F, Goñi I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chem*. 2006;94(3):442-447. doi:10.1016/j.foodchem.2004.11.033
98. Salehi F. Physico-chemical and rheological properties of fruit and vegetable juices as affected by high pressure homogenization: A review. *Int J Food Prop*. 2020;23(1):1136-1149. doi:10.1080/10942912.2020.1781167
99. Savary BJ, Nuñez A. Gas chromatography–mass spectrometry method for determining the methanol and acetic acid contents of pectin using headspace solid-phase microextraction and stable isotope dilution. *J Chromatogr A*. 2003;1017(1-2):151-159. doi:10.1016/S0021-9673(03)01293-7
100. Hodson G, Wilkes E, Azevedo S, Battaglene T. Methanol in wine. *BIO Web Conf*. 2017;9:02028. doi:10.1051/bioconf/20170902028
101. Barrosi STD, Mendes ES, Peres L. Influence of depectinization in the ultrafiltration of West Indian cherry (*Malpighia glabra* L.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Meer) juices. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2004;24(2):194-201. doi:10.1590/S0101-20612004000200006
102. Aggarwal P, Kumar V, Yaqoob M, Kaur S, Babbar N. Effect of different levels of hydrocolloids on viscosity and cloud stability of kinnow juice and beverages. *J Food Process Preserv*. 2020;44(10). doi:10.1111/jfpp.14802

103. Sorrivass V, Genovese DB, Lozano JE. Effect of pectinolytic and amylolytic enzymes on apple juice turbidity. *J Food Process Preserv.* 2006;30(2):118-133. doi:10.1111/j.1745-4549.2006.00054.x
104. Bhattacharjee C, Saxena VK, Dutta S. Fruit juice processing using membrane technology: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies.* 2017;43:136-153. doi:10.1016/j.ifset.2017.08.002
105. Wang W, Xu S, Jin M. Effects of different maceration enzymes on yield, clarity and anthocyanin and other polyphenol contents in blackberry juice. *Int J Food Sci Technol.* 2009;44(12):2342-2349. doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01637.x
106. Sin HN, Yusof S, Sheikh Abdul Hamid N, Rahman RA. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *J Food Eng.* 2006;73(4):313-319. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.01.031
107. Sun Y, Wang Z, Wu J, Chen F, Liao X, Hu X. Optimising enzymatic maceration in pretreatment of carrot juice concentrate by response surface methodology. *Int J Food Sci Technol.* 2006;41(9):1082-1089. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01182.x
108. Sharma HP, Patel H, Sugandha. Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices– A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(6):1215-1227. doi:10.1080/10408398.2014.977434
109. Mieszczakowska-Frąć M, Markowski J, Zbrzeźniak M, Płocharski W. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. *LWT - Food Science and Technology.* 2012;49(2):251-256. doi:10.1016/j.lwt.2011.12.034
110. Patel VB, Chatterjee S, Dhoble AS. A review on pectinase properties, application in juice clarification, and membranes as immobilization support. *J Food Sci.* 2022;87(8):3338-3354. doi:10.1111/1750-3841.16233
111. Ramadan MF, Moersel JT. Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice. *J Sci Food Agric.* 2007;87(3):452-460. doi:10.1002/jsfa.2728
112. Sandri IG, Fontana RC, Barfknecht DM, da Silveira MM. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT - Food Science and Technology.* 2011;44(10):2217-2222. doi:10.1016/j.lwt.2011.02.008
113. Kamarei, A. R., Anglea, T. A., & Kang, Y. C. (2011). Neutralized juice-based beverages and method of making same. *U.S. Patent US2011/0081455A1*
114. Kumar A. *Aspergillus nidulans* : A Potential Resource of the Production of the Native and Heterologous Enzymes for Industrial Applications. *Int J Microbiol.* 2020;2020:1-11. doi:10.1155/2020/8894215
115. Barberis CL, Landa MF, Barberis MG, Gaj-Merlera G, Dalcero AM, Magnoli CE. Hydrolytic enzymes production by *Aspergillus* section *Nigri* in presence of butylated hydroxyanisole and propyl paraben on peanut meal extract agar. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(2):131-136. doi:10.1016/j.riam.2013.02.005
116. de Vries RP, Visser J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2001;65(4):497-522. doi:10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001
117. Kostecka-Gugała A. Quinces (*Cydonia oblonga*, *Chaenomeles* sp., and *Pseudocydonia sinensis*) as Medicinal Fruits of the Rosaceae Family: Current State of Knowledge on Properties and Use. *Antioxidants.* 2024;13(1):71. doi:10.3390/antiox13010071
118. Day JP, Shattock RC. Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *Eur J Plant Pathol.* 1997;103(4):379-391. doi:10.1023/A:1008630522139

119. Bernfeld P. [17] Amylases, α and β . In: ; 1955:149-158. doi:10.1016/0076-6879(55)01021-5
120. Taylor RJ, Secor GA. An improved diffusion assay for quantifying the polygalacturonase content of Erwinia culture filtrates. *Phytopathology* 1997;78:1101-1103. doi: 10.1094/Phyto-78-1101
121. Ortiz GE, Guitart ME, Albertó E, Fernández Lahore HM, Blasco M. Microplate assay for endo-polygalacturonase activity determination based on ruthenium red method. *Anal Biochem*. 2014;454:33-35. doi:10.1016/j.ab.2014.02.028
122. Stojanović S, Stepanović J, Špirović Trifunović B, et al. Selection of Non-Mycotoxigenic Inulinase Producers in the Group of Black Aspergilli for Use in Food Processing. *Food Technol Biotechnol*. 2022;60(4):421-433. doi:10.17113/ftb.60.04.22.7521
123. Pariza MW, Foster EM. Determining the Safety of Enzymes Used in Food Processing. *J Food Prot*. 1983;46(5):453-468. doi:10.4315/0362-028X-46.5.453
124. Jafarzadeh-Moghaddam M, Shaddel R, Peighambaroust SH. Sugar beet pectin extracted by ultrasound or conventional heating: a comparison. *J Food Sci Technol*. 2021;58(7):2567-2578. doi:10.1007/s13197-020-04763-1
125. Dhillon GS, Oberoi HS, Kaur S, Bansal S, Brar SK. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Ind Crops Prod*. 2011;34(1):1160-1167. doi:10.1016/j.indcrop.2011.04.001
126. Lynch JM, Barbano DM. Kjeldahl Nitrogen Analysis as a Reference Method for Protein Determination in Dairy Products. *J AOAC Int*. 1999;82(6):1389-1398. doi:10.1093/jaoac/82.6.1389
127. Abdel Wahab WA, Mostafa FA, Ahmed SA, Saleh SAA. Statistical optimization of enzyme cocktail production using Jew's mallow stalks residues by a new isolate *Aspergillus flavus* B2 via statistical strategy and enzymes characterization. *J Biotechnol*. 2023;367:89-97. doi:10.1016/j.jbiotec.2023.04.003
128. Ahmed T, Rana MR, Zzaman W, Ara R, Aziz MG. Optimization of substrate composition for pectinase production from Satkara (*Citrus macroptera*) peel using *Aspergillus niger*-ATCC 1640 in solid-state fermentation. *Heliyon*. 2021;7(10):e08133. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e08133
129. Ortiz GE, Ponce-Mora MC, Nosedá DG, et al. Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2017;44(2):197-211. doi:10.1007/s10295-016-1873-0
130. Ahmed R. Al-Najada. Characterization of polygalacturonases from fruit spoilage *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus tubingensis*. *Afr J Biotechnol*. 2012;11(34). doi:10.5897/AJB12.355
131. Cavalieri de Alencar Guimarães N, Gliénke NN, Silva Galeano RM, et al. Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2022;39:102233. doi:10.1016/j.bcab.2021.102233
132. Vaz RP, Vici AC, Teixeira de Moraes Polizeli M de L, Magalhães PO, Filho EXF. Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Appl Biochem*. 2021;68(1):197-208. doi:10.1002/bab.2004
133. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0

134. Bussink HJD, Buxton FP, Visser J. Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigensis* genes encoding polygalacturonase II. *Curr Genet.* 1991;19(6):467-474. doi:10.1007/BF00312738
135. da Câmara Rocha J, da Silva Araújo J, de Paiva WKV, et al. Yellow mombin pulp residue valorization for pectinases production by *Aspergillus niger* IOC 4003 and its application in juice clarification. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2020;30:101876. doi:10.1016/j.bcab.2020.101876
136. Esawy MA, Gamal AA, Kamel Z. Optimization of *Aspergillus niger* NRC1ami Pectinase Using Citrus Peel Pectin, Purification, and Thermodynamic Characterization of the Free and Modified Enzyme. *Waste Biomass Valorization.* 2022;13(12):4823-4837. doi:10.1007/s12649-022-01838-2
137. Melikoglu M, Lin CSK, Webb C. Kinetic studies on the multi-enzyme solution produced via solid state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*. *Biochem Eng J.* 2013;80:76-82. doi:10.1016/j.bej.2013.09.016
138. Obomighie I, Prentice IJ, Lewin-Jones P, et al. Understanding pectin cross-linking in plant cell walls. *Commun Biol.* 2025;8(1):72. doi:10.1038/s42003-025-07495-0
139. Hao MJ, Wu D, Xu Y, Tao XM, Li N, Yu XW. A Novel Endo-Polygalacturonase from *Penicillium rolfii* with Prebiotics Production Potential: Cloning, Characterization and Application. *Foods.* 2022;11(21):3469. doi:10.3390/foods11213469
140. Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(4):329-332. doi:10.1016/S0958-1669(02)00330-0
141. Pan Y, Yang J, Wu J, Yang L, Fang H. Current advances of *Pichia pastoris* as cell factories for production of recombinant proteins. *Front Microbiol.* 2022;13. doi:10.3389/fmicb.2022.1059777
142. Sakamoto T, Kawasaki H, Sakai T. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding phosphate-inducible pectin lyase of *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* 1996;398(2-3):269-273. doi:10.1016/S0014-5793(96)01257-4
143. Nasser W, Awadé AC, Reverchon S, Robert-Baudouy J. Pectate lyase from *Bacillus subtilis*: molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme. *FEBS Lett.* 1993;335(3):319-326. doi:10.1016/0014-5793(93)80410-V
144. Hatada Y, Kobayashi T, Ito S. Enzymatic properties of the highly thermophilic and alkaline pectate lyase Pel-4B from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain P-4-N and the entire nucleotide and amino acid sequences. *Extremophiles.* 2001;5(2):127-133. doi:10.1007/s007920100182
145. Basu S, Ghosh A, Bera A, Saha MN, Chattopadhyay D, Chakrabarti K. Thermodynamic characterization of a highly thermoactive extracellular pectate lyase from a new isolate *Bacillus pumilus* DKS1. *Bioresour Technol.* 2008;99(17):8088-8094. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.032
146. Zhou C, Xue Y, Ma Y. Cloning, evaluation, and high-level expression of a thermo-alkaline pectate lyase from alkaliphilic *Bacillus clausii* with potential in ramie degumming. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(9):3663-3676. doi:10.1007/s00253-017-8110-2
147. Vitali J, Schick B, Kester HCM, Visser J, Jurnak F. The Three-Dimensional Structure of *Aspergillus niger* Pectin Lyase B at 1.7-Å Resolution. *Plant Physiol.* 1998;116(1):69-80. doi:10.1104/pp.116.1.69
148. Kita N, Boyd CM, Garrett MR, Jurnak F, Keen NT. Differential Effect of Site-directed Mutations in pelC on Pectate Lyase Activity, Plant Tissue Maceration, and Elicitor Activity. *Journal of Biological Chemistry.* 1996;271(43):26529-26535. doi:10.1074/jbc.271.43.26529

149. Berensmeier S, Singh SA, Meens J, Buchholz K. Cloning of the *pelA* gene from *Bacillus licheniformis* 14A and biochemical characterization of recombinant, thermostable, high-alkaline pectate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;64(4):560-567. doi:10.1007/s00253-003-1446-9
150. Yadav K, Dwivedi S, Gupta S, et al. Recent insights into microbial pectin lyases: A review. *Process Biochemistry.* 2023;134:199-217. doi:10.1016/j.procbio.2023.10.008
151. Payasi A, Sanwal R, Sanwal GG. Microbial pectate lyases: characterization and enzymological properties. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009;25(1):1-14. doi:10.1007/s11274-008-9870-8
152. Martial Didier AK, Hubert KK, Jean Parfait KE, Constant YJ, Kablan T. Partial purification and Characterization of Two Pectinases (Polygalacturonase and Pectin lyase) from Papaya Pericarp (*Carica papaya* cv. solo 8). *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2017;6(6):2729-2739. doi:10.20546/ijcmas.2017.606.326
153. Ortega N, De Diego S, Rodríguez-Nogales JM, Perez-Mateos M, Busto MD. Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. *Int J Food Sci Technol.* 2004;39(6):631-639. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.00822.x
154. Yadav S, Dubey AK, Anand G, Yadav D. Characterization of a neutral pectin lyase produced by *Oidiodendron echinulatum* MTCC 1356 in solid state fermentation. *J Basic Microbiol.* 2012;52(6):713-720. doi:10.1002/jobm.201100326
155. Yadav S, Maurya SK, Anand G, Dwivedi R, Yadav D. Purification and characterization of a highly alkaline pectin lyase from *Fusarium lateritium* MTCC 8794. *Biologia (Bratisl).* 2017;72(3):245-251. doi:10.1515/biolog-2017-0038
156. Babagil A, Nadaroglu, H. Purification of Pectin Lyase Enzyme from *Bacillus pumilus* Bacteria by Three-Phase Partitioning Method (TPP), Nanoflower Preparation and Investigation of Fruit Juice Clarification. *Biointerface Res Appl Chem.* 2021;12(3):3938-3955. doi:10.33263/BRIAC123.39383955
157. Dal Magro L, Kornecki JF, Klein MP, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range. *Enzyme Microb Technol.* 2020;132:109397. doi:10.1016/j.enzmictec.2019.109397
158. Sakamoto T, Hours RA, Sakai T. Purification, Characterization, and Production of Two Pectic Transeliminases with Protopectinase Activity from *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994;58(2):353-358. doi:10.1271/bbb.58.353
159. Mat Jalil MT, Ibrahim D. Partial Purification and Characterisation of Pectinase Produced by *Aspergillus niger* LFP-1 Grown on Pomelo Peels as a Substrate. *Trop Life Sci Res.* 2021;32(1):1-22. doi:10.21315/tlsr2021.32.1.1
160. Davara PR, Varshney AK, Naliapara VA, Sangani VP. Response Surface Modeling of Prickly Pear Juice Clarification. *Advances in Food Science and Engineering.* 2017;1(2). doi:10.22606/afse.2017.12004
161. Bashir O, Hussain SZ, Gani G, et al. Evaluating the physicochemical and antioxidant characteristics of apricot juice prepared through pectinase enzyme-assisted extraction from Halman variety. *Journal of Food Measurement and Characterization.* 2021;15(3):2645-2658. doi:10.1007/s11694-021-00833-w
162. Tapre *, Jain AR. *Optimization of an Enzyme Assisted Banana Pulp Clarification Process.* Vol 21.; 2014.
163. Rajendran NS, Harikumar Thampi BS. Pectin—Extraction from underground stem of banana and its structural, rheological, and textural analyses and grading. *J Food Process Preserv.* 2021;45(4). doi:10.1111/jfpp.15332

164. Canteri-Schemin MH, Fertoni HCR, Waszczynskyj N, Wosiacki G. Extraction of pectin from apple pomace. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2005;48(2):259-266. doi:10.1590/S1516-89132005000200013
165. Singhal S, Swami Hulle NR. Citrus pectins: Structural properties, extraction methods, modifications and applications in food systems – A review. *Applied Food Research*. 2022;2(2):100215. doi:10.1016/j.afres.2022.100215
166. Abdulkhaleq STH, Fadhil NJ, Khalaf S, Alhadithi HJ. Extraction of pectin from quince (*Cydonia oblonga*) fruit husk and using it in jam industry. *Biochem Cell Arch*. 2020;20(1):2163-2166. doi:10.35124/bca.2020.20.1.2163
167. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292
168. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011;48(4):412-422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1
169. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16(3):144-158. doi:10.5344/ajev.1965.16.3.144
170. Sandri IG, Silveira MM da. Production and Application of Pectinases from *Aspergillus niger* Obtained in Solid State Cultivation. *Beverages*. 2018;4(3):48. doi:10.3390/beverages4030048
171. Bashir O, Hussain SZ, Gani G, et al. Evaluating the physicochemical and antioxidant characteristics of apricot juice prepared through pectinase enzyme-assisted extraction from Halman variety. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021;15(3):2645-2658. doi:10.1007/s11694-021-00833-w
172. Hansen MEZ, Laroze L. Temperature effect on phenolic antioxidant extraction from raspberry wastes assisted by enzymes. *N Biotechnol*. 2009;25:S170. doi:10.1016/j.nbt.2009.06.537
173. Chen J, Yang J, Ma L, Li J, Shahzad N, Kim CK. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Sci Rep*. 2020;10(1):2611. doi:10.1038/s41598-020-59451-z
174. Wang J, Hu S, Nie S, Yu Q, Xie M. Reviews on Mechanisms of *In Vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharides. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016(1). doi:10.1155/2016/5692852
175. Babagil A., & Nadaroglu H. Purification of pectin lyase enzyme from *Bacillus pumilus* bacteria by three-phase partitioning Method (TPP), Nanoflower Preparation and Investigation of Fruit Juice Clarification. *Biointerface Res Appl Chem*. 2021;12(3):3938-3955. doi:10.33263/BRIAC123.39383955
176. Demir N, Nadaroglu H, Tasgin E, Adiguzel A, Gulluce M. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 and its application in fruit juice production. *Ann Microbiol*. 2011;61(4):939-946. doi:10.1007/s13213-011-0217-6
177. Salehi F. Physico-chemical and rheological properties of fruit and vegetable juices as affected by high pressure homogenization: A review. *Int J Food Prop*. 2020;23(1):1136-1149. doi:10.1080/10942912.2020.1781167
178. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Shevchik VE. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environ Microbiol Rep*. 2014;6(5):427-440. doi:10.1111/1758-2229.12166
179. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583-589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2