Bioassay and Molecular Screening of Pectinase Enzyme in halophilic bacteria from Salt Lake, Iran

Zohre Nasrollahzadeh
M.Sc. Student of Genetics, Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran, znzohrenasr00@gmail.com
Ensieh Saleh-Ghamari
Assistant Professor of Microbiology, Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran, ensiehsalehghamari@gmail.com
Mohammad Tahmaseb*
Assistant Professor of Genetics, Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran, tahmaseb@khu.ac.ir
Mohammad Ali Amoozegar
Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of science, Tehran University, Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir

Archive of SID

Abstract

Introduction: Pectinase or pectinolytic enzymes are complex enzymes which include pectin methyl esterase (EC.3.1.1.11), pectin lyase (EC.4.2.2.2) and polygalacturonase (EC.3.3.1.15) which degrade pectin in the cell wall of plant cells. These enzymes have many industrial applications that some of them are active in extreme condition regarding to temperature, pH and salt concentration. In this study, the bacteria with an ability to produce pectinase enzyme in salty condition were identified and the corresponding gene was analyzed.

Materials and methods: Strains from Urmia, Inche boron and Gomeshan Ponds were inoculated in the media containing pectin precursors. By analyzing the clear zones around the colonies based on I_2/KI indicator, the positive strains were selected. Quantification of enzyme activity on all three types of pectinase was carried out by spectrophotometry. In order to molecularly screen the bacterium contained pectinase gene, the bacterium genome was amplified using appropriate primers.

Results: Seventeen positive strains for pectinase (10 from Gomeshan Lake, 6 from Inche Boron Lake and 1 from where Urmia Lake) were identified among 130 studied samples. According to size of clear zone of enzyme activity in the qualitative test, activity level of all three pectinase enzymes in R2S25 strain of Inche Boron Lake was measured and the growth curve was obtained. Molecular study showed that all strains contain desired gene segment.

Discussion and conclusion: Quantitative evaluation showed that production and activity of pectinase enzyme in R2S25 strain increased simultaneously with increasing the growth of selected strain in logarithmic phase. Molecular study also showed that the genuses of Martelella, *Aeromocrobium, Planococcus, Marinobacter, Virgibacillus, Kocuria* and *Micrococcus* contain the pectinase gene.

Key words: Pectinase Enzyme, halophilic bacteria, Molecular sieving

* Corresponding author
Received: July 24, 2016 / **Accepted:** November 18, 2017

www.SID.ir

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۶، تابستان ۱۳۹۷، صفحه ۱۲۲- ۱۱۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۰۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۷

سنجش زیستی و غربال‌گری مولکولی آنزیم پکتیناز در باکتری‌های نمک‌دوست جداشده از دریاچه‌های نمکی ایران

زهره نصرالله‌زاده: کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران، znzohrenasr00@gmail.com
انسیه صالح قمری: استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران، esaleh@khu.ac.ir
محمد طهماسب*: استادیار ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران، tahmaseb@khu.ac.ir
محمدعلی آموزگار: دانشیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: پکتیناز یا آنزیم‌های پکتینولاتیکی، کمپلکس آنزیمی شامل سه آنزیم پکتین‌متیل‌استراز (EC.3.1.1.11)، پکتین‌لیاز (EC.4.2.2.2) و پلی‌گالاکتوروناز (EC.3.2.1.15) هستند که باعث تجزیه پکتین موجود در دیواره سلول‌های گیاهی می‌شوند. این آنزیم‌ها مصرف‌های صنعتی بسیاری دارند که تعدادی از آنها در شرایط حاد از نظر دما، اسیدیته و غظت نمک فعال هستند. در پژوهش حاضر، به بررسی و شناسایی باکتری‌هایی پرداخته شد که آنزیم پکتیناز را در شرایط حاد غلظت نمک تولید می‌کنند و سپس ژن مولد این آنزیم در باکتری‌ها بررسی و شناسایی شد.

مواد و روش‌ها: سویه‌های جمع‌آوری‌شده از دریاچه‌های ارومیه، گمیشان و اینچه‌برون روی محیط حاوی پیش‌ماده پکتین کشت داده شدند و سویه‌های مثبت با معرف یدید/یدیدپتاسیم و با توجه به هاله‌های شفاف ایجادشده انتخاب شدند و سنجش کمی فعالیت آنزیم روی هر سه آنزیم مجموعه پکتینازی به روش اسپکتروفوتومتری انجام شد. برای غربال مولکولی ژن پکتیناز، پرایمرهای مربوطه طراحی شدند و ژن مدنظر تکثیر شد.

نتایج: از بین ۱۳۰ سویه بررسی‌شده، ۱۷ سویه برای این آنزیم مثبت بودند که ۱۰ سویه از دریاچه گمیشان (۵۹ درصد)، ۶ سویه از دریاچه اینچه‌برون (۳۵ درصد) و ۱ سویه از دریاچه ارومیه (۶ درصد) جداسازی شده بود. با توجه به قطر هاله فعالیت آنزیم در آزمون کیفی، میزان فعالیت هر سه آنزیم پکتینازی در سویه R_2S_{25} از دریاچه اینچه‌برون اندازه‌گیری و منحنی رشد ترسیم شد. در بررسی مولکولی، تمام سویه‌ها حاوی قطعه ژنی مدنظر بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: بررسی‌های کمی نشان دادند در سویه R_2S_{25}، تولید و فعالیت آنزیم‌های پکتینازی هم‌زمان با افزایش رشد سویه منتخب در فاز لگاریتمی انجام می‌شود. بررسی‌های مولکولی، حضور ژن این آنزیم را در جنس‌های *مارتلا*، *آئروموکروبیوم*، *پلنوکوکوس*، *مارینوباکتر*، *ویرجی‌باسیلوس*، *کوکوریا* و *میکروکوکوس* تأیید می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: پکتیناز، باکتری‌های نمک‌دوست، غربال‌گری مولکولی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

پکتین و دیگر ترکیبات پکتینی، پلی‌ساکاریدهای پیچیده‌ای هستند که در ساختار و بافت‌های گیاهی و به‌ویژه دیواره میانی سلول‌های گیاهی توزیع شده‌اند. واحد اصلی پیش‌ماده پکتینی، گالاکتورونان و α دی‌گالاکتورونیک‌اسید است (۱). این ماده بر اساس میزان استری‌شدن پیش‌ماده پکتیک به چهار گروه پروتوپکتیک، پکتیک‌اسید، پکتین و پلی‌گالاکتورونیک‌اسید تقسیم می‌شود (۲). عواملی مانند اندازه مولکولی، درجه استری‌شدن و تعداد باقیمانده‌های گالاکتورونیک‌اسید عوامل مهمی در تعیین میزان تنوع پیش‌ماده پکتیک هستند و تنوع پیش‌ماده‌های پکتینی موجود در سلول‌های گیاهی سبب تنوع آنزیم‌های پکتینازی شده است (۳). دسته‌بندی این آنزیم‌ها بر اساس نوع پیش‌ماده و نحوه عملکرد آنهاست. کمپلکس آنزیمی پکتیناز عامل بازیافت کربن در طبیعت است که ابتدا پیش‌ماده پکتینی را به گالاکتورونات اشباع و غیراشباع تجزیه و سپس مواد حاصل را به ۵-کتو۴-دِاُکسی‌اورونات تبدیل و درنهایت به پیروات و ۳-فسفو گلیسرآلدئید تبدیل می‌کند. پکتینازها، نقش اساسی را در شکستن پکتین طی مراحل نهایی رسیدن میوه‌ها بازی می‌کنند (۴).

پلی‌متیل‌گالاکتوروناز، پلی‌گالاکتوروناز و پکتین‌لیاز، پلی‌گالاکتورونازلیاز و پکتین‌متیل‌استراز، پکتینازهای مهم صنعتی هستند. با توجه به اینکه آنزیم پکتیناز کاربردهای صنعتی بسیاری دارد (۵) و بسیاری از این فرآیندهای صنعتی در شرایط حاد مانند میزان زیاد نمک، دماهای غیرمعمول و یا اسیدیته‌هایی با محدوده‌های متغیر انجام می‌شوند و همچنین از آنجا که باکتری‌های ساکن محیط‌های شور آنزیم‌هایی با ویژگی‌های نوین تولید می‌کنند، مطالعه روی این باکتری‌ها برای یافتن آنزیم‌هایی با کاربردهای صنعتی مناسب به نظر می‌رسد (۶).

در پژوهش حاضر، حضور آنزیم پکتیناز در سویه‌های نمک‌دوست جداشده از سه دریاچه نمکی ایران به روش سنجش کمی آنزیم و غربال‌گری مولکولی ژن پکتات‌لیاز انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد: پکتین سیب از شرکت سیگما آلدریچ[1] (آمریکا) و سایر مواد از شرکت مرک[2] آلمان تهیه شدند.

سویه‌ها و محیط کشت: سویه‌های نمک‌دوست جداشده از سه دریاچه نمکی ایران به نام‌های اینچه‌برون (۴۰ سویه)، ارومیه (۲۵ سویه) و گمیشان (۶۵ سویه) روی محیط نمک‌دوست نسبی[3] شامل ۴۰ گرم بر لیتر کلرید کلسیم، ۳ گرم بر لیتر کلریدمنیزیم، ۵ گرم بر لیتر سولفات‌منیزیم، ۰/۵ گرم بر لیتر کلرید کلسیم، ۰/۵ گرم بر لیتر کلریدپتاسیم، ۰/۰۲ گرم بر لیتر بیکربنات سدیم، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۵ گرم بر لیتر پپتون گوشت، ۱ گرم بر لیتر گلوکز و ۱۵ گرم بر لیتر آگار کشت شدند (۷).

سنجش فعالیت پکتیناز خارج‌سلولی: سنجش فعالیت پکتینازی روی پلیت با محیط‌کشت سنجش کیفی این آنزیم شامل ۱۰ گرم بر لیتر پکتین، ۱/۴ گرم بر لیتر آمونیوم‌سولفات، ۲ گرم بر لیتر دی‌پتاسیم‌فسفات، ۰/۰۲ گرم بر لیتر سولفات‌منیزیم و ۱ گرم بر لیتر محلول مغذی (شامل ۵ میلی‌گرم بر لیتر سولفات‌آهن، ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر سولفات‌منگنز، ۱/۴ میلی‌گرم بر لیتر سولفات‌روی و ۲ میلی‌گرم بر لیتر کلرید کلسیم) به همراه ۲۰ گرم بر لیتر آگار و ۵ درصد نمک کلریدسدیم برای سویه‌های نمک‌دوست معتدل انجام شد. سویه‌های نمک‌دوست

Archive of SID

www.SID.ir

روی محیط‌کشت یادشده پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و به مدت ۵ روز رشد کردند و سپس پلیت‌ها با محلول یدید ۰/۳ درصد- یدید پتاسیم ۰/۶ درصد آزمایش شدند. وجود هاله‌های شفاف پیرامون ناحیه رشد باکتری، فعالیت پکتینازی را نشان می‌دهد (۸ و ۹). برای سنجش کمی آنزیم از روش اسپکتوفتومتری استفاده شد. برای آنزیم پکتین‌متیل‌استراز از روش اسپکتوفتومتری پیوسته در طول موج ۶۲۰ نانومتر استفاده و در حضور معرف برموتیمول بلو[۴] فعالیت آنزیم (U/ml) سنجیده شد (۱۰). برای آنزیم پکتین‌لیاز با توجه به ایجاد باند دوگانه در ساختار محصول بر اثر فعالیت آنزیم لیاز، جذب در طول موج ۲۳۵ نانومتر خوانده شد (۱۱). برای آنزیم پلی‌گالاکتوروناز، سنجش در حضور دی‌نیتروسالسیلیک‌اسید[۵] و در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد. مقدار واحد آنزیمی به مقدار آنزیمی گفته می‌شود که در واحد زمان (۱ دقیقه)، ۱ میکرومول از ماده اولیه را به محصول تبدیل کند (۱۲).

طراحی پرایمر: برای شناسایی ژن آنزیم پکتات‌لیاز، با استفاده از داده‌های موجود در پایگاه NCBI[۶] و نرم‌افزارهای Clustal W[۷] و Gene Runner، یک جفت پرایمر دجنره طراحی شد. ژن مربوطه از سه گونه باکتریایی *باسیلوس هالودورانس*[۸] سویه ATCC، *باسیلوس* سویه P-4-N و *باسیلوس* سویه KSM-P7 از پایگاه داده NCBI استخراج و پس از هم‌ردیف‌سازی با نرم‌افزار Clustal W، یک جفت پرایمر دجنره از نواحی حفظ‌شده طراحی شد. سپس پرایمرها با نرم‌افزار Gene Runner ارزیابی شدند. این پرایمرها شامل پرایمر F۶۰ با توالی $^{5'}$CCACG/ATTAAATGGG/CGGA/TACAAC$^{3'}$ و پرایمر R۲۴۰ با توالی $^{5'}$GCCATACTTTAATACCG/AATCC$^{3'}$ هستند.

غربال مولکولی آنزیم پکتیناز در سویه‌های منتخب: به این منظور، DNA ژنومی سویه‌های پکتیناز مثبت استخراج و به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. این واکنش، شامل بافر 1X، کلریدمنیزیم با ۲/۵ غلظت میلی‌مولار، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی‌مول، آنزیم Taq DNA پلیمراز به میزان ۰/۵ واحد و هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت ۰/۳ میلی‌مول و DNA الگوی رقیق‌شده به میزان مناسب در حجم ۲۰ میکرولیتر بود. واکنش زنجیره‌ای به‌شکل واکنش واسرشت‌سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه تکرارشونده شامل واسرشت‌سازی با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و پس از اتمام ۳۰ چرخه، یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام و محصول نهایی واکنش برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی[۹] ارسال شد.

نتایج

سنجش اولیه فعالیت پکتینازی: فعالیت پکتینازی سویه‌های نمک‌دوست جداشده از سه دریاچه نمکی ایران روی محیط‌کشت کیفی سنجش این آنزیم بررسی شدند (جدول ۱). از ۱۳۰ سویه موجود که ۶۳ سویه از گمیشان، ۲۵ سویه از دریاچه ارومیه و ۴۲ سویه از اینچه‌برون جدا شده بودند، ۱۷ سویه دارای هاله شفاف اطراف کلنی بودند که فعالیت پکتینازی آنها را نشان می‌دهد (شکل ۱). از این ۱۷ سویه، ۱۰ سویه از دریاچه گمیشان، ۶ سویه از دریاچه اینچه‌برون و ۱ سویه از دریاچه ارومیه آنزیم پکتیناز را داشتند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- ویژگی‌های سویه‌های نمک‌دوست دارای آنزیم پکتیناز

سویه‌های مثبت دریاچه گمیشان								
ردیف	علامت اختصاری	شکل سلول	رنگ کلنی	رنگ آمیزی گرم	رشد در ۵ درصد نمک	سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت	درصد میزان شباهت	Accession number
۱	*GAA_x7*	باسیل کوتاه	کرم روشن	-	+	*Martelella mediterranea MACL11(T)*	۹۷	*IBRC-M -4040*
۲	*GAS_x6*	باسیل	سفید	+	+	*Bacillus circulans ATCC4513(T)*	۹۹/۳	*IBRC-M -4069*
۳	*GAS_x9*	باسیل	صورتی- قهوه‌ای	V	-	*Bacillus cohnii DSM 6307(T)*	۹۷	*IBRC-M -4079*
۴	*GBP_y11*	باسیل	زرد تیره	+	+	*Aeromocrobium halocynthiae KME*	۹۹/۷	*IBRC-M -4042*
۵	*GBP_y13*	کوکوس	نارنجی	+	-	*Planococcus rifietoensis M8(T)*	۹۹	*IBRC-M -4022*
۶	*GBP_y16*	باسیل	کرم	+	+	*Bacillus horikoshii DSM 8719(T)*	۹۹/۳	*IBRC-M -4041*
۷	*GCF_y5*	خمیده	کرم	-	-	*Halomonas andesensis LC6(T)*	۹۹/۳	*IBRC-M-4081*
۸	*GCF_y1*	باسیل	کرم	-	-	*Marinobacter lipoliticus SM19(T)*	۹۶/۵	*IBRC-M -4081*
۹	*GBW_y1*	باسیل	کرم	+	+	*Bacillus horikoshii SW-72(T)*	۹۸/۹	*IBRC-M -4021*
۱۰	*GBW_x15*	باسیل	کرم تیره	+	-	*Bacillus hwajinpoensis SW-72*	۹۹/۴	*IBRC-M -4023*
سویه‌های مثبت دریاچه اینچه برون								
ردیف	علامت اختصاری	شکل سلول	رنگ کلنی	رنگ آمیزی گرم	رشد در ۵٪ نمک	سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت	درصد میزان شباهت	Accession number
۱	*W4S38*	باسیل	شیری	+	+	*Bacillus safensis FO-036b(T)*	۱۰۰	*IBRC-M 4092*
۲	*LbS2*	باسیل	شیری	+	+	*Virgibacillus salarius SA-Vb1(T)*	۱۰۰	*IBRC-M 4091*
۳	R3A34	کوکوس	نارنجی	+	+	*Kocuria rosea* DSM 20447(T)	۹۹/۷	IBRC-M 4166
۴	R2S25	باسیل	شیری	+	+	*Bacillus sonorensis* NRRL B-23154(T)	۹۹/۲	IBRC-M 4099
۵	R1S1	کوکوس	زرد	+	+	*Micrococcus yunnanensis* YIM 65004(T)	۹۹/۸	IBRC-M 4090
۶	LbA49	باسیل	کرم	-	-	*Marinobacter pelagius* HS225(T)	۹۷/۴	
سویه‌های مثبت دریاچه ارومیه								
ردیف	علامت اختصاری	شکل سلول	رنگ کلنی	رنگ آمیزی گرم	رشد در ۵٪ نمک	سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت	درصد میزان شباهت	Accession number
۱	Wt4	باسیل	کرم	+	+	*Bacillus Vallismortis*	۱۰۰	-

سنجش کمی فعالیت آنزیم پکتینازی: برای رسیدن به بیشترین تولید آنزیم طی رشد باکتری، سویه منتخب R_2S_{25} (حاصل از دریاچه اینچه‌برون) از میان سویه‌های مثبت و از باکتری‌های دارای بیشترین قطر هاله شفاف در آزمون کیفی به محیط کشت مایع تلقیح و هم‌زمان منحنی رشد و سنجش فعالیت آنزیم‌ها بررسی شد. فعالیت آنزیم پکتین‌متیل‌استراز، پکتین‌لیاز و پلی‌گالاکتوروناز هم‌زمان با منحنی رشد باکتری R_2S_{25} در شکل ۲ نشان داده شده است. بیشترین میزان فعالیت برای آنزیم پکتین‌متیل‌استراز، ۵۰ ساعت پس از تلقیح و

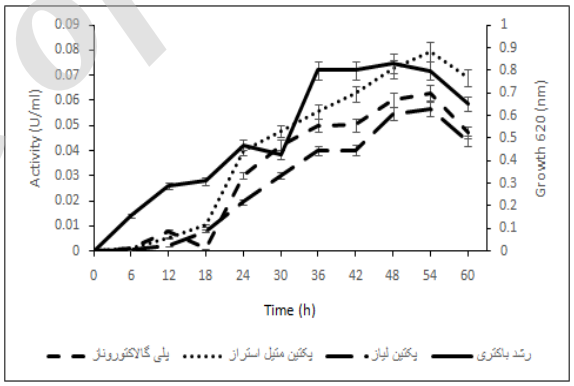
Archive of SID

www.SID.ir

(U/ml) ۰/۰۸ بود. بیشترین میزان فعالیت برای آنزیم پکتین‌لیاز (U/ml) ۰/۰۶ در ۴۸ ساعت پس از تلقیح مشاهده شد و بیشینه فعالیت برای آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در ۴۸ ساعت پس از تلقیح به میزان (U/ml) ۰/۰۵ بود.

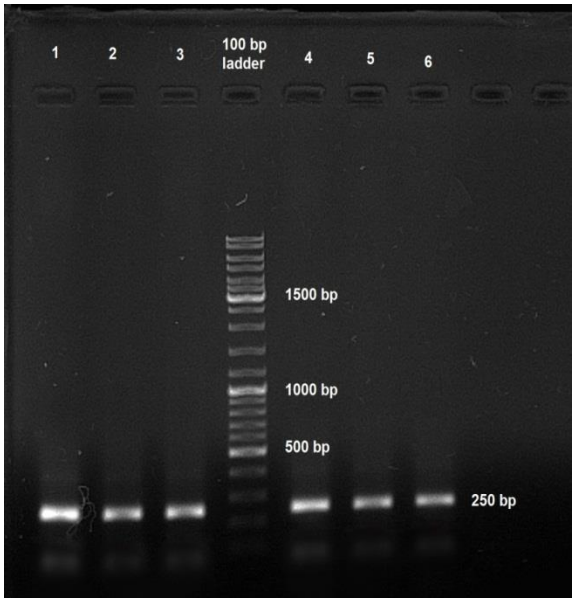
شکل ۱- الف. نمونه شاهد: نبود هاله پس از افزودن معرف یدید- یدیدپتاسیم، ب. نمونه مثبت: وجود هاله شفاف پس از افزودن

معرف یدید- یدید پتاسیم



شکل ۲- منحنی رشد و فعالیت آنزیم‌های پکتین لیاز، پکتین متیل استراز و پلی گالاکتوروناز در سویه R_2S_{25}

تکثیر و بررسی ژن پکتیناز: ۱۳۰ سویه باکتریایی نمک‌دوست برای سنجش فعالیت پکتینازی کشت شدند. سپس برای سویه‌های مثبت، پرایمر طراحی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی انجام شد (شکل ۳). همه سویه‌های منتخب، قطعه ژنی مدنظر به طول ۲۵۰ جفت باز را داشتند.



شکل ۳- تصویر قطعه ژنی ۲۵۵ جفت بازی مربوط به ژن پکتات‌لیاز در ۶ نمونه از باکتری‌های نمک‌دوست

بررسی توالی ژن پکتات‌لیاز: پس از تکثیر ژن لیاز و تعیین توالی مشخص شد به‌طور کلی توالی‌های ژنی حاصل بیشترین شباهت (بیش از ۹۰ درصد) را با توالی ژن لیاز در دو سویه *باسیلوس لیکنیفورمیس*[10] و *باسیلوس پامیلوس*[11] دارند؛ به این ترتیب که سویه‌های GAA_x7 و GCF_y1 جداشده از دریاچه گمیشان بیش از ۹۰ درصد به ژن پکتیناز *باسیلوس پامیلوس* و سویه‌های GAS_x6، GAS_x9، GCF_y5، GBP_y11، GBP_y13، GBP_y16، GBW_x15 و GBW_y1 جداشده از دریاچه گمیشان بیش از ۹۰ درصد به *باسیلوس لیکنیفورمیس* شباهت نشان دادند. سویه WT4 جداشده از دریاچه ارومیه ۸۵ درصد به *باسیلوس لیکنیفورمیس* شباهت نشان داد. سویه‌های W4S38، LbS2، R3A34 و R2S25 جداشده از دریاچه اینچه‌برون بیش از ۹۰ درصد به *باسیلوس لیکنیفورمیس* و دو سویه R1S1 و LbA49 جداشده از این دریاچه ۹۰ درصد به *باسیلوس پامیلوس* شباهت نشان دادند.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

پکتینازها، کمپلکس آنزیمی هستند که نقش ویژه‌ای در تجزیه پکتین موجود در بافت‌های گیاهی ایفا می‌کنند (۱۳). این آنزیم‌ها در صنایع تولید آبمیوه، کاغذ و نساجی نقش (۱۴) و در بررسی فیوژن پروتوپلاست سلول‌های گیاهی و مطالعه بیماری‌زاهای گیاهی کاربرد دارند (۱۵). این آنزیم پتانسیل تجاری خوبی پیش رو دارد، زیرا علاوه بر تجزیه پیش‌ماده ویژه خود (پکتین)، قدرت کاتالیزوری زیادی برای انجام فرآیند تجزیه پکتین از خود نشان می‌دهد (۱۶). در پژوهش حاضر، سه دریاچه اینچه‌برون و گمیشان و ارومیه از دریاچه‌های نمکی ایران انتخاب شدند تا سویه‌های باکتریایی نمک‌دوست آنها برای تولید آنزیم پکتیناز بررسی شوند. در پژوهش حاضر، فقط ۱ سویه (۴ درصد) از ۲۵ سویه جداشده از دریاچه ارومیه، ۶ سویه (۱۵ درصد) از ۴۰ سویه جداشده از اینچه‌برون و ۱۰ سویه نمک‌دوست (۱۵/۳ درصد) از ۶۵ سویه جداشده از گمیشان فعالیت پکتینازی نشان دادند و در مجموع، ۱۷ سویه از ۱۳۰ سویه نمک‌دوست بر اساس روش هاله‌سنجی فعالیت پکتینازی مثبت داشتند. با توجه به این داده‌ها مشخص شد فراوانی سویه‌های دارای پکتیناز در دریاچه‌های گمیشان و اینچه‌برون بیش از دریاچه ارومیه است. در پژوهش‌های روهبان و همکاران (۲۰۰۹)، از ۲۳۱ سویه جداشده از دریاچه نمکی حوض سلطان، ۲۸ سویه مولد پکتیناز (۱۲/۱ درصد) غربال‌گری شدند و درصد سویه‌های تولیدکننده آنزیم پکتیناز این دریاچه از هر سه دریاچه بررسی‌شده در پژوهش حاضر بیشتر بود (۱۷). باباوالیان و همکاران در بررسی تنوع تولید آنزیم‌های هیدرولازی در دریاچه‌های ارومیه و آران و بیدگل دریافتند که سویه‌های نمک‌دوست جداشده از دریاچه آران و بیدگل توانایی زیادی برای تولید این آنزیم دارند. همچنین، آنان در بررسی سویه‌های نمک‌دوست نسبی جداشده از دریاچه آران و بیدگل، در مجموع ۲۳ مولد آنزیم پکتیناز جدا کردند که به جنس‌های *هالوباسیلوس*[12]، *تالازوباسیلوس*[13]، *سالینیکوکوس*[14]، *هالوموناس*[15] و *سالیکولا*[16] تعلق داشتند (۱۸). مخدومی و همکاران (۲۰۱۱)، ۲۹۳ سویه آرکی نمک‌دوست برای تولید آنزیم‌های هیدرولازی متنوع غربال‌گری کردند، هرچند در نتایج آنها هیچ آرکی نمک‌دوستی آنزیم پکتیناز تولید نمی‌کرد (۱۹). در پژوهشی در مکزیک (۲۰۱۴)، ۸ جدایه کوهیولای مکزیک[17] از نظر چند آنزیم هیدرولازی ارزیابی شدند و ۶ جدایه مولد پکتیناز بودند؛ در پژوهش یادشده نیز از روش هاله‌سنجی برای غربال‌گری استفاده شد (۲۰).

در مطالعه کمی پژوهش حاضر روی بررسی هم‌زمان فعالیت آنزیم‌های پکتیناز در سویه R_2S_{25} و رشد باکتری، میزان تولید آنزیم‌ها هم‌زمان با پیشرفت فاز لگاریتمی افزایش یافت و بیشترین مقدار آنها در پایان فاز لگاریتمی و شروع فاز سکون بود. در این سویه، میزان تولید آنزیم پکتیناز در فاز سکون تقریباً ثابت شد. در پروژه‌ای که رفعت اسماعیل و همکاران (۲۰۱۳) روی سویه‌های باسیلوس جداشده از نمونه‌های خاک در کشور سوریه انجام دادند، بیشترین میزان تولید در ۷۲ ساعت پس از تلقیح و شروع فاز لگاریتمی به میزان ۱/۳ واحد آنزیمی بر میلی‌لیتر بود (۲۱).

با توجه به بررسی‌های مولکولی در مطالعه حاضر، برای نخستین بار ژن پکتات‌لیاز در جنس‌های *مارتلا*،

Archive of SID

www.SID.ir

آئروموکروبیوم، پلنوکوکوس، مارینوباکتر، ویرجیباسیلوس، کوکوریا و میکروکوکوس گزارش شد. اگرچه در گذشته، این ژن در جنس *باسیلوس* گونه‌های هالودورانس، لیکنیفورمیس و پامیلوس گزارش شده است (۲۲-۲۴)، در مطالعه حاضر ژن پکتات‌لیاز برای نخستین بار در جنس *باسیلوس* و گونه‌های سیرکولنس[۱۸]، کوهنی[۱۹]، هوریکوشی[۲۰]، هاجینپورنزیز[۲۱]، سافنزیز[۲۲]، سونورنزیز[۲۳] و والیسمورتیزو[۲۴] گزارش شد.

References

(1) Fishman ML., Chau HK., Qi PX., Hotchkiss AT., Rafael AG., Cooke PH. Characterization of the global structure of low methoxyl pectin in solution. *Food Hydrocolloids* 2015; 46: 153-159.

(2) Anderson Charles T. We be jammin': an update on pectin biosynthesis, trafficking and dynamics. *Journal of experimental botany* 2016; 67(2): 495-502.

(3) Ahmed I., Zia MA., Hussain MA., Akram Z., Naveed MT., Nowrouzi A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by Aspergillus niger; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 2016; 9(2): 148-154.

(4) DiCosimo R., McAuliffe J., Poulose AJ., Bohlmann G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews* 2013; 42(15): 6437-6474.

(5) Mei Y., Chen Y., Zhai R., Liu Y. Cloning, purification and biochemical properties of a thermostable pectinase from Bacillus halodurans M29. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2013; 94: 77-81.

(6) De Lourdes Moreno M., Pérez D., García MT., Mellado E. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life* 2013; 3(1): 38-51

(7) Delgado-García M., Nicolaus B., Poli A., Aguilar CA., Rodríguez-Herrera R. Isolation and Screening of Halophilic Bacteria for Production of Hydrolytic Enzymes. In *Halophiles, Springer International Publishing* 2015; 379-401

(8) Soares MCNS., da Silva R., Gomes E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by Bacillus sp. *Revista de Microbiologia* 1999; 30(4): 299-303.

(9) Aaisha GA., Barate DL. Isolation and identification of pectinolytic bacteria from soil samples of Akola region, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2016; 5: 514-521.

(10) Kohli Pooja., Kalia M., Gupta R. Pectin methylesterases: A review. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* 5(5) 2015; 1-7.

(11) Esmail R., Yazaji S., Al Balaa B. Isolation, production and characterization of extracellular pectin lyase from *Bacillus subtilis*. *Advances in Environmental Biology* 2013; 3917-3925.

(12) Pan X., Li K., Ma R., Shi P., Huang H., Yang P., et al. Biochemical characterization of three distinct polygalacturonases from Neosartorya fischeri P1. *Food chemistry* 2015; 188; 569-575.

(13) Satyanarayana T., Sharma A., Mehta D., Puri AK., Kumar V., Nisha M. et al. Biotechnological Applications of Biocatalysts from the Firmicutes *Bacillus* and *Geobacillus* Species In:. Satyanarayana T., Johri BN. Prakash A. *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Springer Science and Business Media B.V; 2012: 343-379.

(14) Buga ML., Ibrahim S., Nok AJ. Physico-chemical characteristics of immobilized polygalacturonase from Aspergillus niger (SA6). *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(52): 8934-8943.

Archive of SID

www.SID.ir

(15) Di Candilo M., Bonatti PM., Guidetti C., Focher B., Grippo C., Tamburini E., et al. Effects of selected pectinolytic bacterial strains on water-retting of hemp and fiber properties. *Journal of applied microbiology* 2010; 108(1): 194-203.

(16) Gomes J., Steiner W., The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food technology and Biotechnology* 2004; 42(4): 223-235.

(17) Rohban R., Amoozegar MA., Ventosa A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2009; 36(3): 333-340.

(18) Babavalian H., Amoozegar MA., Zahraei S., Rohban R., Shakeri F., Moghaddam MM. Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. *Microbiology* 2013; 82(4,): 466-474.

(19) Makhdoumi Kakhki M., Amoozegar MA., Mahmodi Khaledi E. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake. *International Journal of Environmental Science & Technology* 2011; 8(1): 705-714.

(20) Delgado-Garcia M., Aguilar CN., Contreras-Esquivel JC., Rodriguez-Herrera R. Screening for extracellular hydrolytic enzymes production by different halophilic bacteria. *Mycopathology* 2014; 14(1): 17-23.

(21) Esmail R., Yazaji S., Al Balaa B. Isolation, production and characterization of extracellular pectin lyase from *Bacillus subtilis*. *Advances in Environmental Biology* 2013; 3917-3925.

(22) Mei Y., Chen Y., Zhai R., Liu Y. Cloning, purification and biochemical properties of a thermostable pectinase from Bacillus halodurans M29. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2013; 94: 77-81.

(23) Sakka M., Tachino S., Katsuzaki H., van Dyk JS., Pletschke BI., Kimura T., et al. Characterization of Xyn30A and Axh43A of Bacillus licheniformis SVD1 identified by its genomic analysis. *Enzyme and microbial technology* 2012; 51(4): 193-199.

(24) Basu S., Roy A., Ghosh A., Bera A., Chattopadhyay D., Chakrabarti K. Arg235 is an essential catalytic residue of Bacillus pumilus DKS1 pectate lyase to degum ramie fibre. *Biodegradation* 2011; 22(1): 153-161.

[1]-Sigma-Aldrich
[2]-Merck
[3]-*Moderate Halophile*
[4]-Bromothymol blue
[5]-Dinitrosalicylic acid
[6]-http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
[7]-http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
[8]-*Bacillus halodurans*
[9]-Macrogen Korea
[10]-*Bacillus licheniformis*
[11]-*Bacillus pumilus*
[12]-*Halobacillus*
[13]-*Thalassobacillus*
[14]-*Salinicoccus*
[15]-*Halomonas*
[16]-*Salicola*
[17]-*Coahuila Mexico*
[18]-*circulans*
[19]-*cohnii*
[20]-*horikoshii*
[21]-*hwajinpoensis*
[22]-*safensis*
[23]-*sonorensis*
[24]-*Vallismortis*

Archive of SID

www.SID.ir