

## مطالعه آنزیمی و بیوانفورماتیکی باکتری‌های بومی کوتینازی

مجتبی مرتضوی، نسرین پرورش و مسعود ترکزاده ماهانی

گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران  
مسئول مکاتبات: مجتبی مرتضوی، m.mortazavi@kgut.ac.ir

**چکیده.** کوتین پلیمری است که از تراکم و اکسید شدن اسیدهای چرب در گیاهان به وجود آمده و نقش کلیدی در حفاظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کند. کوتیناز یک آنزیم هیدرولازی است که کوتین را تجزیه می‌کند. هدف این پژوهش استخراج کوتین سبب قرمز، بررسی فعالیت باکتری‌های تولیدکننده آنزیم کوتیناز در محیط LB و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی است. بدین منظور، از پوست میوه سبب قرمز و به کمک بافر اگزالات، کوتین جداسازی شد. سپس سویه‌های تولیدکننده آنزیم که قبلاً جداسازی شده‌اند، در داخل پلیت‌های حاوی محیط کشت کوتین تلقیح داده شدند. پس از کشت اولیه، باکتری‌ها را در محیط LB کشت داده و به کمک سوسترای اختصاصی پارانیترو فنول بوتیرات فعالیت کوتینازی نمونه‌ها سنجیده شد. به منظور انجام تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، توالی جداسازی شده شش نمونه باکتریایی تولیدکننده آنزیم کوتیناز در پایگاه‌های محاسباتی تحلیل شد و درخت فیلوژنتیکی هر توالی تهیه شد. سپس، توالی آنزیمی نمونه‌های تولیدکننده کوتیناز بررسی و با رسم درخت فیلوژنتیکی میزان شباهت این توالی‌ها تحلیل شد. نتایج نشان داد که کوتینازهای پروکاریوتی از یوکاریوتی جدا شده‌اند. در ادامه، توالی ناحیه rDNA 16S این نمونه‌ها به همراه توالی نمونه‌های جدید، ارزیابی شده و روابط فیلوژنتیکی این گونه‌ها تعیین شد. این تحلیل نشان داد که توالی جدید در کنار نمونه‌های باکتریایی قرار می‌گیرد؛ بنابراین، احتمالاً آنزیم کوتیناز نمونه‌های شناسایی شده، از نظر ساختار و کارکرد با آنزیم کوتیناز این باکتری‌ها، ممکن است شباهت زیادی داشته باشد.

**واژه‌های کلیدی.** آنزیم کوتیناز، اسپلیت تری فور، اینتروباکتر، درخت فیلوژنتیکی، کلبسیلا

## An enzymatic and bioinformatic study of native cutinase bacteria

Mojtaba Mortazavi, Nasrin Parvaresh, & Masoud Torkzadeh-Mahani

Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Science, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Correspondent author: Mojtaba Mortazavi, m.mortazavi@kgut.ac.ir

**Abstract.** Cutin is a polymer that is constructed in plants by the condensation and oxidation of fatty acids and plays a key role in the protection of plants against pathogens. Cutinase is a hydrolase enzyme that breaks down the cutin. The purpose of this study was to extract cutin from red apples with oxalate buffer, cutinase enzyme activity assay in LB culture, and bioinformatic analysis. To attain these purposes the cutinase-producing strains that had previously been isolated were inoculated in culture medium containing cutin. After initial culture, the bacteria were cultured in LB medium and cutinase activity was measured using the p-Nitrophenyl butyrate. In order to execute bioinformatic analysis, the isolated sequences of six cutinase-producing bacteria were analyzed based on computational data bases and their phylogenetic trees were prepared. Then, the similarities in the sequences of a large number of cutinase-producing samples were analyzed by drawing the phylogenetic tree. The results showed the separation of cutinase-producing prokaryotes from cutinase-producing eukaryotes. Then, the sequence of 16S rDNA of these cutinase-producing samples as well as the samples we had prepared were evaluated and their phylogenetic relationships were determined. This analysis showed that the new sequence stood alongside the bacterial samples. Thus, our cutinases may be similar with these bacterial cutinases in structure and function.

**Keywords.** cutinase enzyme, enterobacter, *Klebsiella*, phylogenetic tree, SplitsTree4

## مقدمه

استفاده از پلیمرهای گیاهی توسط میکروارگانیسم‌ها مستلزم ترشح آنزیم‌های هیدرولازی همانند کوتیناز است (Fich et al., 2016). کوتیناز توانایی هیدرولیز انواع استرها (Heredia, 2003) و پلی-استرهای کوچک مانند کوتین را داراست (Degani et al., 2006). کوتین جزء اصلی تشکیل دهنده کوتیکول بوده و ساختمان چندلایه‌ای دارد که در سطح خارجی دیواره سلول‌های اپیدرم را در قسمت‌های هوایی همه گیاهان علفی می‌پوشاند (Kutschera & Niklas, 2007). کوتین ماده‌ای است که از تراکم و اکسیدشدن اسیدهای چرب در گیاهان به وجود می‌آید و ماده چرب پیچیده‌ای است که به‌طور درخور توجهی در مقابل آب نفوذناپذیر است (Carvalho et al., 1998). کوتیناز متعلق به رسته آنزیمی سرین استرازاها است و یک عضو از بالاخانواده الفا/ بتا هیدرولازها است (Lin & Kolattukudy, 1980). ساختار این آنزیم شامل صفحات بتای مرکزی شامل پنج رشته موازی است که با دو یا سه هلیکس در دو طرف صفحه پوشیده شده است (Tenhaken et al., 1997). کوتیناز یک پروتئین با ۱۹۷ رزیدو و صفحات بتای کشیده بسیار محافظت شده دارد که با چهار سیستمین ثابت تشکیل دو پل سولفیدی می‌دهند که در تمامیت ایجاد ساختار کلی نقش مهمی ایفا می‌کند (Jelsch et al., 1998). استفاده از آنزیم کوتیناز موجب افزایش اثر دارویی مواد شیمیایی کشاورزی شده و همچنین از کوتیناز به‌مثابه آنزیمی لیپولیتیک (Carvalho et al., 1998) در مواد شوینده لباس و ظرف برای چربی‌زدایی و حذف آلودگی‌های زیست‌محیطی به منزله biocatalyst و یک bioprocesses صنعتی در بیوتکنولوژی استفاده شده است (Okkels, 1997). این آنزیم مثل آنزیم سبز توانایی ازبین بردن زباله‌های پلی‌استری را دارد و می‌تواند پلاستیک‌هایی مانند پلی-کاپرولاکتون به محصولات محلول در آب تجزیه کند (Abou-Zeid et al., 2004). دیگر کاربردهای کوتیناز عبارت است از شرکت در واکنش‌های سنتزی و هیدرولیتیک است که ازجمله آنها می‌توان به هیدرولیز چربی شیر در صنایع لبنی و سنتز تری گلیسریدهای ساختاری اشاره کرد (Carvalho et al., 1998). آنزیم‌های کوتیناز در باکتری‌ها و قارچ‌ها مطالعه شده‌اند اما آنزیم‌های کوتیناز گونه‌های باکتریایی تاکنون به میزان کمتری تحت بررسی قرار گرفته‌اند (Van der Vlugt-Bergmans et al., 2004).

در سال‌های اخیر ساختار کریستالی آنزیم کوتیناز از چندین

میکروارگانیسم و لیپاز پستانداران گزارش شده است (Longhi et al., 1996). بیشترین مطالعات روی کوتیناز قارچ فوزاریوم سولانی انجام شده که در *E.coli* کلون و بیان شده است (Martinez et al., 1993). با توجه به گستره کاربردهای بیوتکنولوژی این آنزیم و سنتز و تجزیه ترکیبات مختلف، این آنزیم در حوزه بیوتکنولوژی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Raziyafathima et al., 2016). در همین راستا، به تازگی چند نمونه باکتریایی بومی این آنزیم شناسایی شده‌اند (شماره ثبت: نمونه شماره یک: KP893565.1، نمونه شماره دو: KT795107.1، نمونه شماره سه: KT795108.1، نمونه شماره چهار: KT692943.1، نمونه شماره پنج: KT795109.1، نمونه شماره شش: در حال ثبت) (Parvaresh et al., 2017). در ادامه این مطالعه، میزان کوتین سبب قرمز و میزان فعالیت آنزیمی سویه‌های بومی جداسازی شده در محیط کشت LB بررسی شد. همچنین، مطالعات بیوانفورماتیکی، از قبیل بررسی سویه‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی تولیدکننده آنزیم کوتیناز، رسم درخت فیلوژنتیکی و بررسی جایگاه سویه‌های بومی تولیدکننده این آنزیم در این درخت تکاملی، نیز انجام شد.

## مواد و روش‌ها

## تهیه کوتین و محیط کشت اختصاصی

به‌منظور تهیه کوتین، طبق روش گزارش شده توسط پرورش و همکاران (Parvaresh et al., 2017)، در سه مرحله سبب قرمز تهیه و پوست آن بعد از وزن کردن، در بافر اگزالات (۲ گرم اگزالاتیک اسید، ۸ گرم آمونیوم اگزالات، ۵۰۰ میلی لیتر آب) به مدت چهار ساعت جوشانده و فیلتر شد. سپس، محصول فیلتر شده وزن شده و بعد از خشک شدن (Sebastião et al., 1993) در محلول کلروفرم متانول به نسبت ۲ به ۱ ریخته شد. سپس، با افزودن آب و سانتریفیوژ کردن، فاز زیری جدا شده را خشک کرده تا کوتین حاصل شد. به کمک این کوتین، یک محیط کشت اختصاصی حاوی کوتین برای رشد مجدد نمونه‌های شناسایی شده تولیدکننده آنزیم کوتیناز تهیه شد. سپس نمونه‌های شناسایی شده (Parvaresh et al., 2017) در این محیط اختصاصی کشت داده و به مدت ۳ تا ۵ روز در شیکرانکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ rpm قرار داده شدند (Gerard et al., 1993).

## تهیه محیط کشت LB

شماره ثبت ژن‌ها و توالی اسید آمینه‌ای و سایر اطلاعات آنها جمع-آوری شد. سپس، به کمک نرم‌افزار SplitsTree4 میزان شباهت و هم‌ترادفی آنها تحلیل شد (Huson & Bryant, 2006). همچنین، روابط فیلوژنتیکی این گونه‌ها تعیین شد. نرم‌افزار SplitsTree4 برنامه پیشرو برای محاسبه شبکه‌های فیلوژنتیک بدون ریشه از داده‌های توالی مولکولی است. با توجه به هم‌ترازی توالی‌ها، ماتریس فاصله یا مجموعه‌ای از درختان، این برنامه یک درخت یا یک شبکه فیلوژنتیکی را با استفاده از روش‌هایی مانند تقسیم تقسیم، شبکه همسایه، شبکه اجماع، روش‌های ابرشبکه یا روش‌های محاسبه هیبریداسیون یا شبکه‌های نو ترکیب ساده محاسبه می‌کند. همچنین، این محاسبات در نرم‌افزارهای دیگری همانند MEGA 6 نیز قابل انجام است. در ادامه، میزان شباهت توالی ناحیه srDNA ۱۶ این نمونه‌ها به-همراه توالی ناحیه srDNA ۱۶ سویه بومی تولیدکننده آنزیم ارزیابی شده و درخت فیلوژنتیکی آنها رسم شد.

## نتایج

### مطالعه کوتین

با جوشاندن پوست سیب قرمز به مدت ۴ ساعت در بافر اگزالات ماده‌ای خمیری شکل تهیه شد. سپس این ماده‌ای خمیری شکل در آون خشک شده و با دستگاه آسیاب می‌شود و پودر آرد مانند تهیه شد. پودر حاصل از آسیاب در محلول کلروفرم-متانول مخلوط می‌شود و بعد از سانتریفیوژ فاز زیری جدا می‌شود و در اون خشک می‌شود که همان کوتین است. میزان وزن میوه سیب، وزن پوست میوه، وزن پوست پس از جوشاندن، وزن پوست آسیاب شده، وزن کوتین نهایی و بازده در جدول ۱ گزارش شد. نتایج نشان داد که به‌طور میانگین در هر گرم پوست سیب قرمز ۸/۵ میلی گرم کوتین وجود داشت.

### فعالیت آنزیمی کوتیناز در محیط LB

برای سنجش فعالیت آنزیم باکتری‌های غربالگری شده در محیط کشت اختصاصی کوتین و سپس در محیط LB کشت داده شدند. در یک ویال نمونه و در یک ویال Blank تهیه شد. از لحظه صفر افزایش جذب به دلیل تجزیه سوبسترای PNPB به مدت بیست دقیقه، هر یک دقیقه یک بار میزان تغییرات جذب سوبسترای PNPB در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Pocalyko & Tallman, 1998). سپس با رسم کردارهای مربوطه میزان فعالیت آنزیم‌ها محاسبه شدند.

به‌منظور تهیه محیط کشت LB-Broth، ۵ گرم مخمر، ۱۰ گرم تریپتون و ۵ گرم NaCl به هم اضافه شده و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده و اتوکلاو شد. ۵ میلی لیتر از محیط کشت LB Broth بعد از اتوکلاو در فالكونهای ۵۰ میلی لیتر ریخته شده و نمونه‌های رشد کرده در مرحله قبل، به آنها انتقال داده شدند. سپس آنها را در شیکر انکوباتور قرار داده و بعد از رشد نمونه‌ها، میزان جذب آنها در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در ادامه فعالیت آنزیم کوتیناز در این نمونه‌ها بررسی شد.

### سنجش آنزیمی

به‌منظور سنجش فعالیت آنزیمی از دستگاه اسپکتروفتومتر، که نور ثابت با طول موج دلخواه به‌وجود می‌آورد، استفاده شد. فالكون‌های حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ در ۹۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. برای سنجش فعالیت آنزیمی دو بافر یک و دو طبق مطالعات قبلی تهیه شد (Parvaresh *et al.*, 2017). سپس، در کووت دستگاه ۷۵۰ میکرولیتر بافر یک، ۱۰۰ میکرولیتر بافر دو و ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه موجود در محیط مایع سانتریفیوژ شده مرحله قبل ریخته شد. همچنین، برای تهیه Blank، ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه موجود در فالكون در یک ویال ریخته و به مدت ۵ دقیقه در آب در حال جوش گذاشته و سپس به آنها ۷۰۰ میکرولیتر بافر یک و ۱۰۰ میکرولیتر بافر دو اضافه شد (Parvaresh *et al.*, 2017). بعد از تهیه نمونه و Blank به‌منظور بررسی فعالیت کوتینازی، بیست دقیقه، هر یک دقیقه یک بار میزان جذب نمونه‌ها خوانده شد (Calado *et al.*, 2002). در نهایت داده‌ها وارد برنامه Excel شده و منحنی فعالیت هر آنزیم بررسی شد.

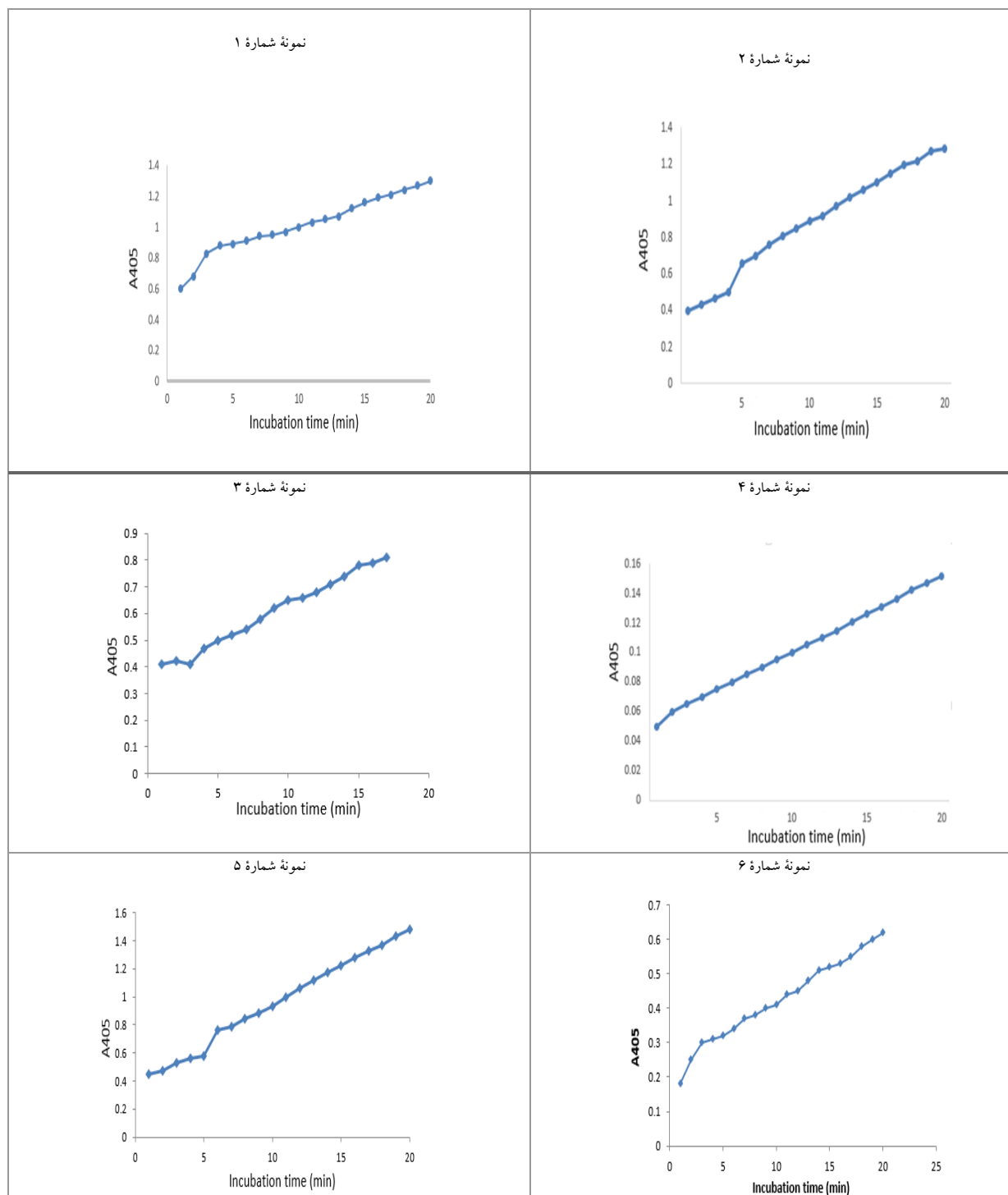
### تحلیل‌های بیوانفورماتیک

به‌منظور تحلیل بیوانفورماتیکی نمونه‌ها در ابتدا به کمک پایگاه اطلاعاتی محاسبه‌ای <http://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi> توالی‌های ناحیه این شش نمونه تحلیل شدند (Flandrois *et al.*, 2015). این سایت روابط فیلوژنتیکی هر توالی را کاملاً مشخص کرده و مجموعه‌ای از پایگاه‌های داده و ابزار وب برای تجزیه و تحلیل خودکار فیلوژنتیک توالی پروکاریوتی فراهم کرده است (Flandrois *et al.*, 2015). در این پایگاه اطلاعاتی جایگاه هر توالی را از نظر شباهت با سایر توالی‌های ثبت شده بررسی شده و به‌صورت درخت فیلوژنتیکی نمایش داده می‌شود. در ادامه، گونه‌های تولیدکننده آنزیم کوتیناز یوکاریوتی و پروکاریوتی مطالعه و

## جدول ۱- بررسی میزان وزن (بر حسب گرم) کوتین.

Table 1. The study of cutin weight (in grams).

بازده	کوتین	پودر پوست	پوست جوشانده	پوست	نمونه
۸/۴	۰/۹۰	۱/۸۸	۸۰/۳	۱۰۶	نمونه ۱
۸/۶	۰/۹۵	۱/۹۵	۸۶/۵	۱۱۰	نمونه ۲
۸/۴	۰/۹۶	۱/۹۹	۸۸/۷	۱۱۴	نمونه ۳



شکل ۱- میزان تغییرات جذب PNPB نمونه‌های جداسازی شده در محیط کشت LB.

Fig. 1. The absorption changes of PNPB of isolated samples in the LB medium.

تکاملی در شکل ۳ نشان داده شده است. این تحلیل نشان می‌دهد که کوتینازهای پروکاریوتی از یوکاریوتی جدا شده‌اند. در ادامه، به منظور ارزیابی نمونه‌های جمع‌آوری شده از نظر آنزیم کوتیناز، توالی ناحیه srDNA ۱۶ نمونه‌هایی که در نمودار بالا قرار داشتند و در ژن بانک ثبت شده بودند به همراه توالی یک نمونه از توالی‌های ثبت شده ارزیابی شدند. با این تحلیل توالی جدید در کنار نمونه‌های باکتریایی قرار داده شد (شکل ۴).

### بحث

گیاهان به خاطر بافت خود قادر نیستند به سادگی از عوامل بیماری‌زای باکتریایی و قارچی دوری کنند بلکه باید از راه‌های دیگری از خویش حفاظت نمایند. یکی از این راه‌ها ایجاد لایه کوتین در سطح گیاه است. کوتین مانع از نفوذ باکتری‌ها و قارچ‌ها به گیاهان شده و از اجزای ساختاری کوتیکول گیاهان عالی محسوب می‌شود (Serrano et al., 2015). گونه‌های گیاهی مناطق خشک نسبت به زیستگاه‌های مرطوب دارای کوتین ضخیم‌تری هستند. ضخامت پلیمر در میان گونه‌ها و اندام‌های یک گیاه متفاوت است. به منظور بررسی فعالیت آنزیم کوتیناز احتیاج به تهیه سوبسترای کوتین و تهیه محیط کشت ویژه‌ای است که به طور اختصاصی فقط یک منبع کربن برای حیات میکروارگانیسم‌ها مانند کوتین داشته باشد. با توجه به مطالعه پرورش و همکاران (Parvaresh et al., 2017)، مشخص شده بود که سبب قرمز میزان بالایی از کوتین را دارا است. به این منظور در سه نوبت میوه سبب قرمز تهیه شد و میزان کوتین آن تحلیل شد. نتایج نشان می‌دهد که سبب قرمز میزان زیادی کوتین در هر گرم پوست میوه داشته و نسبت به سایر میوه‌ها نسبت به بیماری‌ها و آفات مقاوم‌تر است. بنابراین، از کوتین سبب جهت تهیه محیط کشت اختصاصی حاوی کوتین استفاده شد. آنزیم کوتیناز یک آنزیم مدل از خانواده سرین هیدرولازها است که دارای سه گانه کاتالیتیک Ser-His-Asp است (Murphy et al., 1996). به دلیل خواص ساختاری و عمل کردی ویژه، آنزیم کوتیناز در صنعت و بیوتکنولوژی بسیار مطرح است (Zhang et al., 2010). آنزیم کوتیناز در قارچ‌ها (Sebastian et al., 1987) و باکتری‌ها یافت شده است (Kolattukudy et al., 1981). اگرچه کوتینازهای قارچی و باکتریایی دارای خصوصیات کاتالیتیکی و مکانیسم عمل مشابه هستند اما از نظر توالی و ساختار متفاوتند، از این رو پیشنهاد می‌شود به دو زیر خانواده کوتینازهای یوکاریوتی و پروکاریوتی تقسیم

میزان تغییرات جذب PNPB در نمونه‌های مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که نمونه ۴ دارای بیشترین فعالیت کوتینازی و نمونه ۳ دارای کمترین میزان فعالیت کوتینازی است.

### انجام تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

به کمک پایگاه‌های اطلاعاتی و نرم‌افزارهای بیولوژی توالی کامل ناحیه کلون شده این شش سویه مطالعه شد. در ابتدا، به کمک پایگاه اطلاعاتی محاسبه‌ای leBIBI-QBPP این شش توالی تحلیل و آنالیز شدند (Flandrois et al., 2015). این سایت روابط فیلوژنتیکی هر توالی را کاملاً مشخص می‌کند. نتایج این تحلیل در شکل ۲ گزارش شده است.

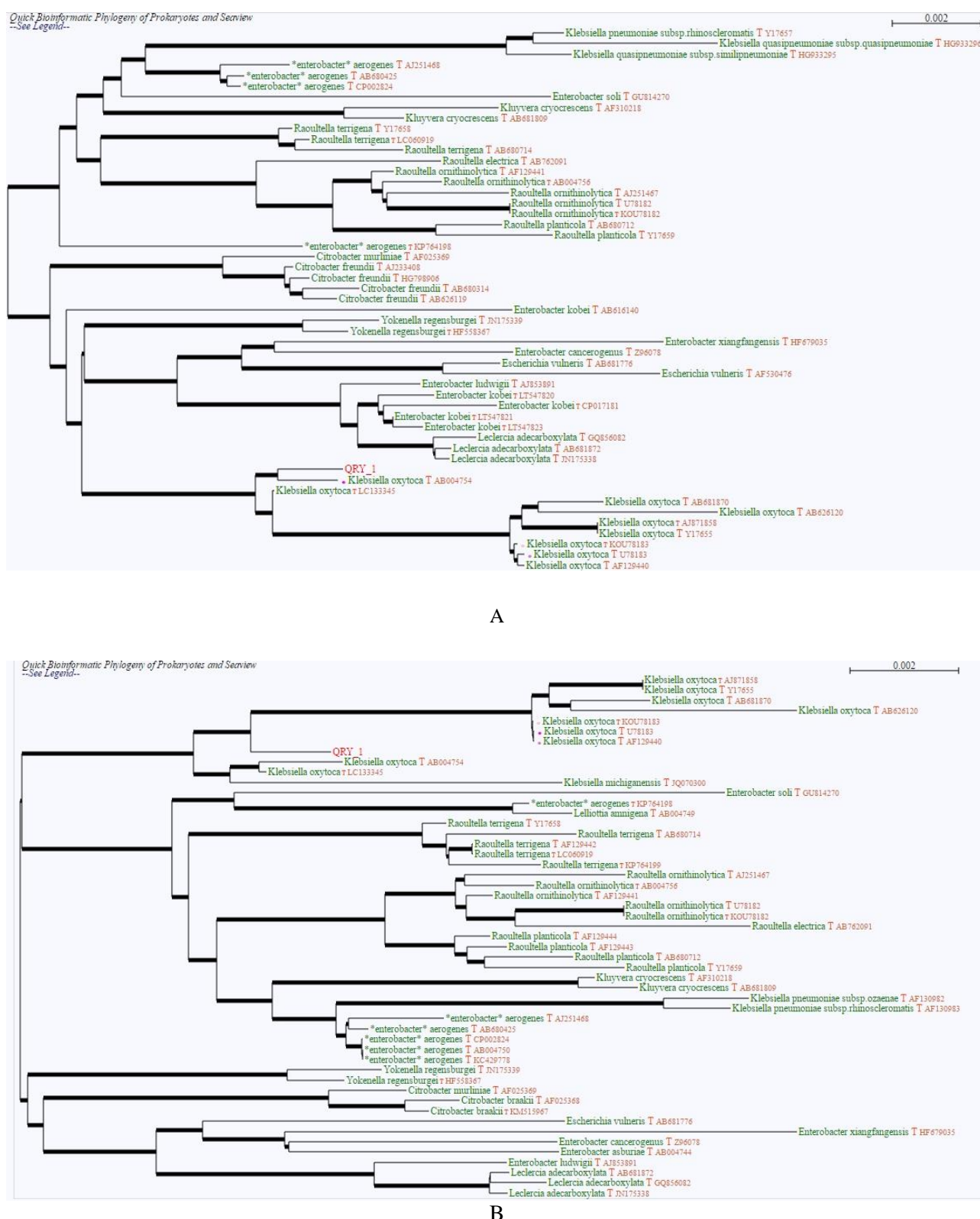
همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، هر کدام از این توالی‌ها با یکسری از گونه‌های باکتریایی ثبت شده در بانک ژنی بیشترین شباهت را دارند. در این دندروگرام‌ها، تحلیل‌ها، شباهت و نزدیکی توالی‌های شناسایی شده با گونه‌هایی از سویه‌های *Klebsiella*، *Yokenella*، *Citrobacter*، *Larouletella*، *Enterobacter* و *Leclercia* و *kluyvera* نشان داده شده است. توالی نمونه شماره یک بیشترین نزدیکی را با گونه *Klebsiella oxytoca* (T AB004754) دارد. توالی نمونه شماره دو بیشترین نزدیکی را با گونه *Klebsiella oxytoca* (T AJ871858) دارد. توالی نمونه شماره سه بیشترین نزدیکی را با گونه *Klebsiella oxytoca* (T JQ0703000) دارد. توالی نمونه شماره چهار بیشترین نزدیکی را با گونه‌هایی از *Escherichia* و *Yokenella*، *Enterobacter* دارد. توالی نمونه شماره پنج بیشترین نزدیکی را با گونه *Klebsiella oxytoca* دارد. توالی نمونه شماره شش نیز بیشترین نزدیکی را با گونه *Klebsiella oxytoca* دارد. این تحلیل‌ها نشان می‌دهند که نمونه‌های شماره یک، دو، سه، پنج و شش در زیر مجموعه باکتری‌های گونه *Klebsiella oxytoca* قرار داشته و نمونه شماره چهار در زیر مجموعه گونه *Enterobacter* قرار گرفته است.

### مطالعه باکتری‌های تولیدکننده آنزیم کوتیناز

به منظور مطالعه باکتری‌های تولیدکننده آنزیم کوتیناز شماره ثبت ژن‌های تولیدکننده آنزیم کوتینازی گونه‌های یوکاریوت و پروکاریوت از پایگاه محاسباتی داده‌ای NCBI مطالعه و جمع‌آوری شد. جدول ۲ این شماره ثبت‌ها را نشان می‌دهد.

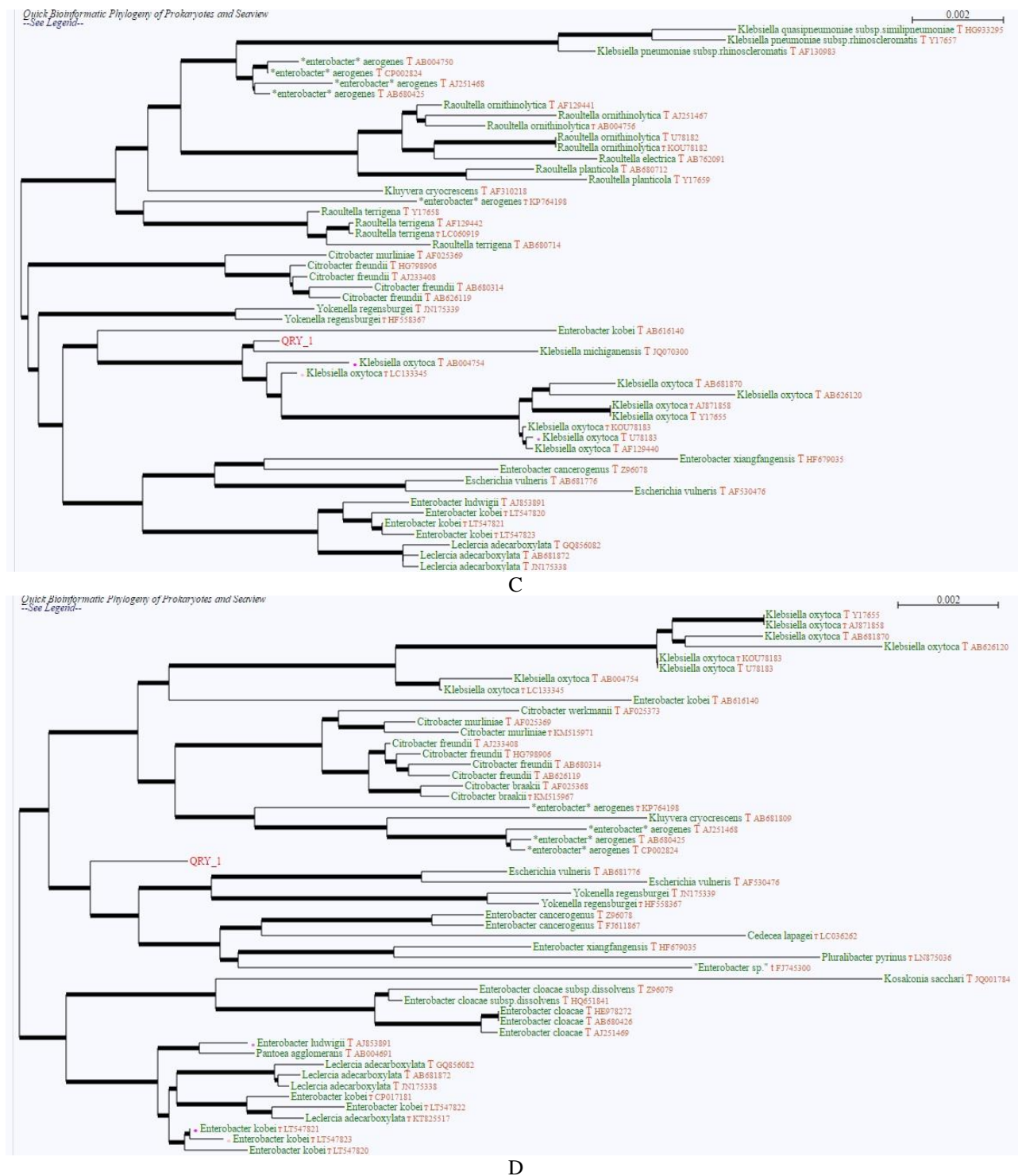
سپس، روابط فیلوژنتیکی این گونه‌ها به کمک نرم‌افزار SplitsTree4 تعیین شد (Huson & Bryant, 2006). شکل ۳ نمودار این درخت





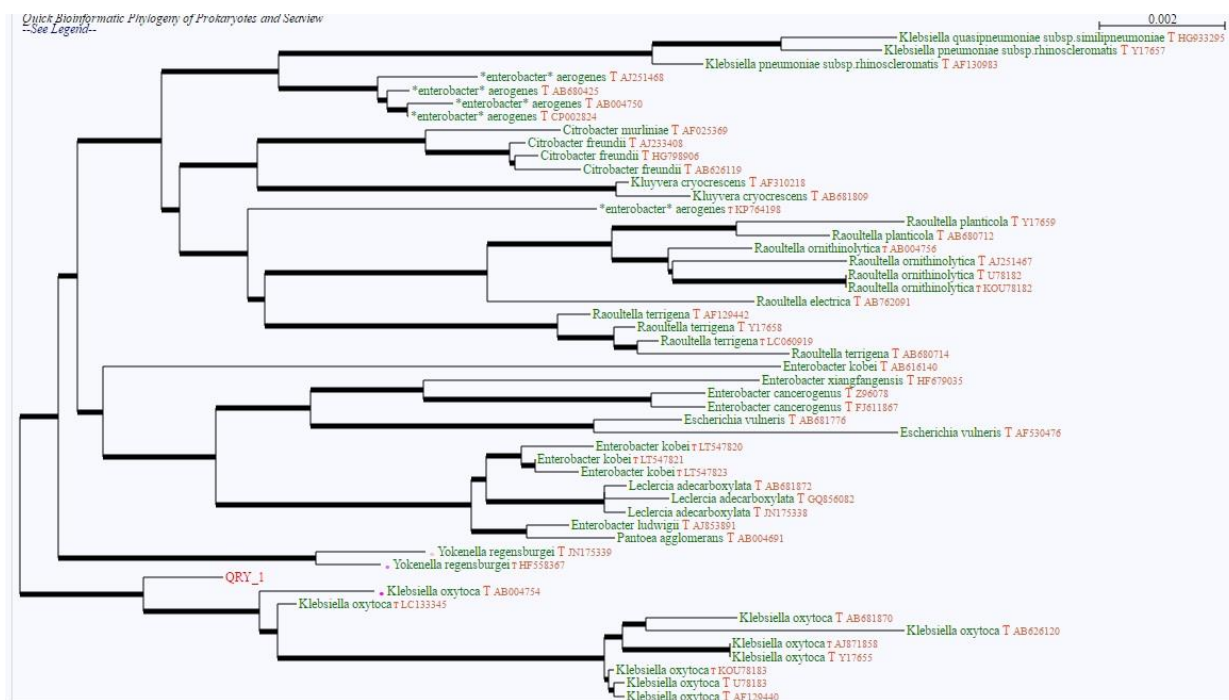
شکل ۲- تحلیل روابط فیلوژنتیکی توالی شش جداسازی شده به صورت مجزا و شناسایی نزدیکترین گونه‌ها به آنها. A. نمونه شماره یک. B. نمونه شماره دو. C. نمونه شماره سه. D. نمونه شماره چهار. E. نمونه شماره پنج. F. نمونه شماره شش.

**Fig. 2.** Phylogenetic relationship analysis of six isolated sequences and identification of their closest species. A. sample: 1. B. sample 2. C. sample 3. D. sample 4. E. sample 5. F. sample 6.

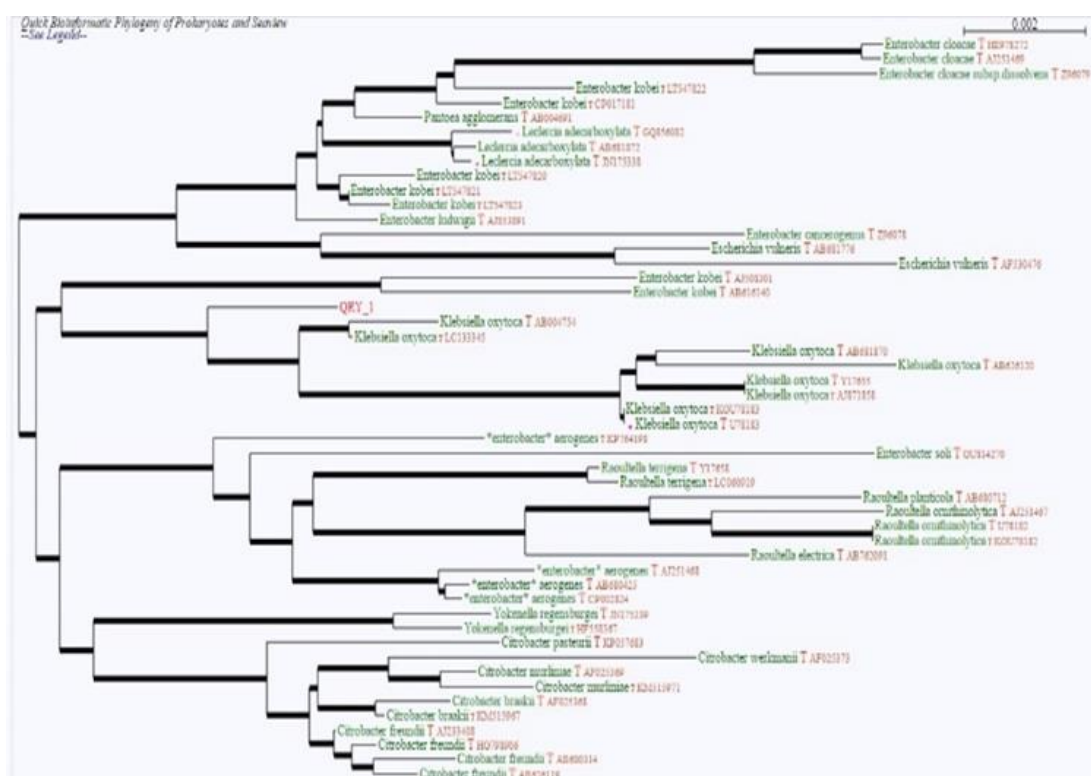


شکل ۲- ادامه.

Fig. 2. Continued.



E



F

شکل ۲- ادامه.

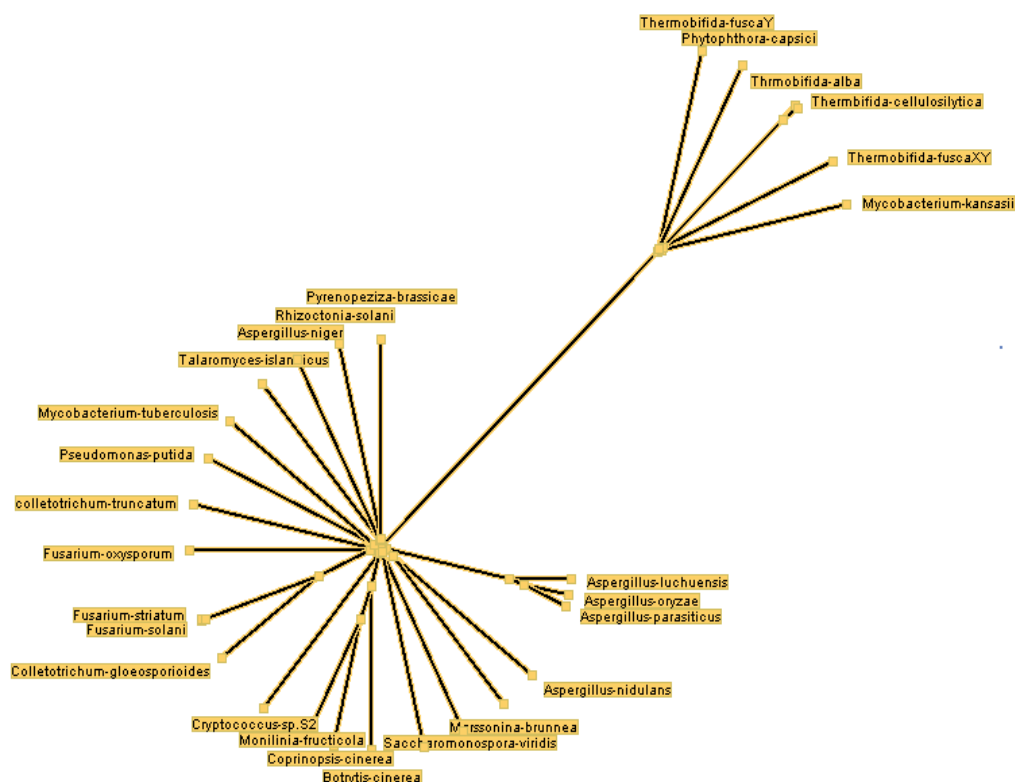
Fig. 2. Continued.



## جدول ۲- کوتینازهای میکروبی و شماره ثبت آنها از پایگاه داده‌ای NCBI.

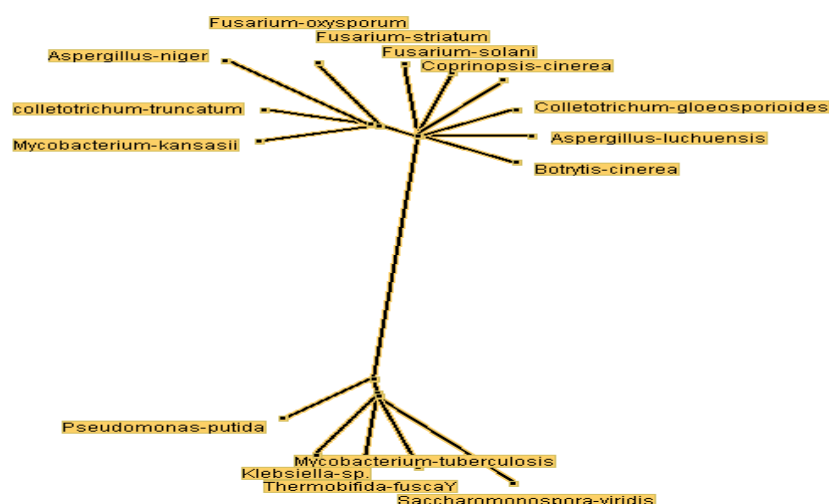
Table 2. Microbial cutinases and their GenBank accession number in NCBI.

Species	GenBank accession number
<i>Thermobifida fusca</i> YX	AAZ54921.1
<i>Fusarium solani</i> pisi	AAA33334.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	AHN19769.1
<i>Aspergillus luchuensis</i>	GAT21998.1
<i>Aspergillus nidulans</i>	ABF50887.1
<i>Aspergillus niger</i>	CAL00335.1
<i>Aspergillus parasiticus</i> SU-1	KJK61323.1
<i>Aspergillus oryzae</i>	BAA07428.1
<i>Monilinia fructicola</i>	AAZ95012.1
<i>Pyrenopeziza brassicae</i>	CAB40372.1
<i>Botrytis cinerea</i>	CAA93255.1
<i>Colletotrichum truncatum</i>	ADQ27862.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	AKH80819.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	CCO31306.1
<i>Pseudomonas putida</i>	WP_023536233.1
<i>Coprinopsis cinerea</i>	EU435153.1
<i>Thermobifida alba</i>	ADV92525.1
<i>Thermobifida cellulolytica</i>	ADV92527.1
<i>Thermobifida fusca</i> YX	AAZ54920.1
<i>Talaromyces islandicus</i>	CRG87219.1
<i>Phytophthora capsici</i>	CAA61622.1
<i>Mycobacterium kansasii</i>	KEP43672.1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> K	AIB50196.1
<i>Saccharomonospora viridis</i>	BAO42836.1
<i>Marssonina brunnea</i>	EKD18956.1



شکل ۳- تحلیل فیلوژنتیک ژن‌های کوتیناز. گونه‌های کوتینازی و شماره ثبت آنها در بانک ژن براساس جدول ۱.

Fig. 3. Phylogenetic analysis of cutinase genes. The species and GenBank accession numbers of the cutinase-producing specimens were based on Table 1.



شکل ۴- تحلیل روابط فیلوژنتیکی شش نمونه براساس توالی 16S DNA.

Fig. 4. Phylogenetic analysis of six samples based on 16S DNA.

سایر نمونه‌ها در کنار سویه *Klebsiella* قرار می‌گیرند. در ادامه، به کمک پایگاه‌های اطلاعاتی - محاسباتی در ابتدا تعداد زیادی از نمونه‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی تولیدکننده آنزیم کوتیناز بررسی و اطلاعات آنها جمع‌آوری و استخراج شد. سپس، میزان هم‌ترادفی و شباهت این توالی‌ها به کمک نرم‌افزار تحت بررسی و تحلیل قرار گرفت. این تحلیل نشان می‌دهد که کوتینازهای پروکاریوتی از یوکاریوتی جدا شدند که علت آن شباهت پایین توالی آنزیم کوتیناز در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها است. این شباهت پایین روابط تکاملی آنها را از هم جدا کرده است. در ادامه، به منظور ارزیابی نمونه‌های جمع‌آوری شده از نظر آنزیم کوتیناز، با بررسی مجدد این نمونه‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی تولیدکننده آنزیم کوتیناز، تعدادی را که توالی ناحیه ۱۶S rDNA آنها در ژن بانک ثبت شده بودند به همراه توالی‌های جدید تحت ارزیابی مجدد در نرم‌افزار قرار گرفتند و روابط فیلوژنتیکی این گونه‌ها به تعیین شد. این تحلیل نشان می‌داد که توالی جدید در کنار نمونه‌های باکتریایی قرار می‌گیرد. بنابراین، به احتمال زیاد، آنزیم کوتیناز نمونه‌های شناسایی شده از نظر ساختار و کارکرد با آنزیم کوتیناز این باکتری‌ها شباهت زیادی می‌تواند داشته باشد.

### سپاسگزاری

از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان به دلیل فراهم کردن امکانات و حمایت مالی از این پژوهش کمال تشکر را داریم. این پژوهش از محل اعتبارات طرح پژوهشی به شماره قرارداد ۱/۶۸۸۶ انجام گرفته است.

تقسیم شوند (Calado *et al.*, 2002). بیشتر قارچ‌ها و تعدادی از باکتری‌ها تولیدکننده آنزیم‌های کوتیناز هستند (Liu *et al.*, 2017). بیشتر مطالعات روی آنزیم‌های قارچی صورت گرفته است، اما آنزیم‌های باکتریایی از پایداری و مقاومت بیشتری برخوردارند. کوتیناز توانایی هیدرولیز انواع استرها و پلی‌استرهای کوچک را داراست. یکی از مشکلات زیست محیطی در جوامع امروزی تجزیه زباله‌های پلی‌استری و پلاستیک در محیط زیست است (Yoshida *et al.*, 2016). کوتیناز به‌مثابه آنزیمی سبز قادر به از بین بردن زباله‌های پلی‌استرهای قابل تجزیه در طبیعت است و شناسایی سویه‌های بومی این آنزیم نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در بررسی مجدد ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت حاوی کوتین و سپس، نمونه‌ها در محیط کشت LB کشت داده شدند. بعد از رشد باکتری‌ها، میزان فعالیت آنزیم کوتیناز به کمک دستگاه اسپکتوفوتومتری و در طول موج ۴۰۵ نانومتر بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که میزان فعالیت این نمونه‌ها با هم متفاوت است که از دلایل آن می‌توان به سطح بیان متفاوت آنزیم کوتیناز و فاکتورهای محیطی اشاره کرد. مشابه مطالعه مطالعات پرورش و همکاران (Parvaresh *et al.*, 2017)، در این مطالعه نیز میزان فعالیت نمونه شماره ۴ از جنس *Enterobacter* نسبت به سایر نمونه‌ها بالاتر است که احتمالاً به ساختار آنزیم و یا سطح بیان آنزیم ارتباط دارد. به‌منظور انجام تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، در ابتدا توالی هر کدام از این شش نمونه در پایگاه محاسباتی leBIBI-QBPP تحلیل شد و نتایج نشان می‌دهد که با رسم درخت فیلوژنتیکی نمونه شماره چهار در کنار سایر باکتری‌های سویه *Enterobacter* قرار می‌گیرد در حالیکه

## REFERENCES

- Abou-Zeid, D.-M., Müller, R.-J. and Deckwer, W.-D. 2004. Biodegradation of aliphatic homopolyesters and aliphatic- aromatic copolyesters by anaerobic microorganisms. – *Biomacromolecules*. 5: 1687-1697.
- Calado, C.R., Monteiro, S.M., Cabral, J.M. and Fonseca, L.P. 2002. Effect of pre-fermentation on the production of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. – *J. Biosci. Bioeng.* 93: 354-359.
- Carvalho, C.M., Aires-Barros, M.R. and Cabral, J. 1998. Cutinase structure, function and biocatalytic applications. – *Electron. J. Biotechnol.* 1: 28-29.
- Degani, O., Salman, H., Gepstein, S., Dosoretz, C.G. 2006. Synthesis and characterization of a new cutinase substrate, 4-nitrophenyl (16-methyl sulfone ester) hexadecanoate. – *J. Biotechnol.* 121: 346-350.
- Fich, E.A., Segerson, N.A. and Rose, J.K. 2016. The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological roles. – *Annu. Rev. Plant Biol.* 67: 207-233.
- Flandrois, J.-P., Perrière, G. and Gouy, M. 2015. LeBIBI QBPP: a set of databases and a web tool for automatic phylogenetic analysis of prokaryotic sequences. – *BMC bioinformatics*. 16: 251.
- Gerard, C.H., Fett, F.W., Osman, F.S. and Moreau, A.R. 1993. Evaluation of cutinase activity of various industrial lipases. – *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17: 181-189.
- Heredia, A. 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. – *Biochim. Biophys. Acta* 1620: 1-7.
- Huson, D.H. and Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. – *Mol. Biol. Evol.* 23: 254-267.
- Jelsch, C., Longhi, S. and Cambillau, C. 1998. Packing forces in nine crystal forms of cutinase. – *Proteins* 31: 320-333.
- Kolattukudy, P., Purdy, R. and Maiti, I. 1981. Cutinases from fungi and pollen. – *Methods Enzymol.* 71: 652-664.
- Kutschera, U. and Niklas, K. 2007. The epidermal-growth-control theory of stem elongation: an old and a new perspective. – *J. Plant Physiol.* 164: 1395-1409.
- Lin, T.S. and Kolattukudy, P. 1980. Structural studies on cutinase, a glycoprotein containing novel amino acids and glucuronic acid amide at the N terminus. – *Eur. J. Biochem.* 106: 341-351.
- Liu, S.-H., Zeng, G.-M., Niu, Q.-Y., Liu, Y., Zhou, L., Jiang, L.-H., Tan, X.-F., Xu, P., Zhang, C. and Cheng, M. 2017. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. – *Bioresour Technol.* 224: 2.
- Longhi, S., Nicolas, A., Creveld, L., Egmond, M., Verrips, C.T., de Vlieg, J., Martinez, C. and Cambillau, C. 1996. Dynamics of *Fusarium solani* cutinase investigated through structural comparison among different crystal forms of its variants. – *Proteins* 26: 442-458.
- Martinez, C., de Geus, P., Stanssens, P., Lauwereys, M. and Cambillau, C. 1993. Engineering cysteine mutants to obtain crystallographic phases with a cutinase from *Fusarium solani* pisi. – *Protein Eng.* 6: 157-165.
- Murphy, C.A., Cameron, J., Huang, S.J. and Vinopal, R.T. 1996. *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. – *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 456-460.
- Okkels, J. 1997. Preparing polypeptide variants with improved functional properties. US patent, 97-09664.
- Parvaresh, N., Mortazavi, M. and Torkzadeh, M.M. 2017. Isolation and identification of cutinase enzyme production bacteria. – *Nova Biol. Reperta* 4: 38-46.
- Pocalyko, D.J. and Tallman, M. 1998. Effects of amphipaths on the activity and stability of *Fusarium solani* pisi cutinase. – *Enzyme Microb. Technol.* 22: 647-651.
- Raziyaathima, M., Praseetha, P. and Rimal Isaac, R. 2016. Microbial degradation of plastic waste: a review. – *J. Pharma. Chem. Biol. Sci.* 4: 231-242.
- Sebastian, J., Chandra, A. and Kolattukudy, P. 1987. Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere. – *J. Bacteriol.* 169: 131-136.
- Sebastião, M., Cabral, J. and Aires-Barros, M. 1993. Synthesis of fatty acid esters by a recombinant cutinase in reversed micelles. – *Biotechnol. Bioeng.* 42: 326-332.
- Serrano, M., Coluccia, F., Martha, T., Lhardion, F. and Métraux, J. 2014. The cuticle and plant defense to pathogens. – *Front. Plant Sci.* 5: 6-13.
- Tenhaken, R., Arnemann, M., Köhler, G. and Barz, W. 1997. Characterization and cloning of cutinase from *Ascochyta rabiei*. – *Z. Naturforsch. C* 52: 197-208.
- Van der Vlugt-Bergmans, C., Wagemakers, C. and Van Kan, J. 1997. Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. – *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 21-29.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y. and Oda, K. 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). – *Science* 351: 1196-1199.
- Zhang, Y., Chen, S., Xu, M., Cavoco-Paulo, A., Wu, J. and Chen, J. 2010. Characterization of *Thermobifida fusca* cutinase-carbohydrate-binding module fusion proteins and their potential application in bioscouring. – *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 6870-6876.

\*\*\*\*\*

## How to cite this article:

Mortazavi, M., Parvaresh, N. and Torkzadeh-Mahani, N. 2019. An enzymatic and bioinformatic study of native cutinase bacteria. – *Nova Biol. Reperta* 6: 39-49.

مرتضوی، م.، پرورش، ن. و ترکزاده ماهانی، م. ۱۳۹۸. مطالعه آنزیمی و بیوانفورماتیک بکتری‌های بومی کوتینازی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۳۹-۴۹.