جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز

نسرین پرورش، مجتبی مرتضوی* و مسعود ترکزاده ماهانی

دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۷ / پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۴/ چاپ: ۱۳۹۶/۳/۳۱

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

*مسئول مکاتبات: m.mortazavi@kgut.ac.ir

چکیده. آنزیم کوتیناز جزء خانوادهٔ آنزیمی سرین هیدرولازها بوده که توانایی هیدرولیز انواع استرها و پلی‌استرهای کوچک مانند کوتین را دارد. کوتین گیاهان از ترکیبات پلی‌استری هیدروکسی و اپوکسی اسید چرب تشکیل شده است که در مقابل آب نفوذناپذیر است و تنها باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی قادر به تجزیهٔ آن هستند. به‌منظور شناسایی این مقاومت، در ابتدا میوه‌های خیار ('Cucumis sativus- *C. sativus*')، سیب زرد ('Golden Delicious apple *Malus domestica*')، سیب قرمز ('Red Delicious apple *'Malus domestica*') و گوجه فرنگی ('*Solanum lycopersicum* Mill. Commun *' S. lycopersicum*') تهیه و از پوست این میوه‌ها به روش کلرفرم متانول، کوتین استخراج و میزان آن در این میوه‌ها مقایسه شد. سپس، با استفاده از محیط کشتی اختصاصی حاوی کوتین و سنجش فعالیت آنزیمی، جداسازی سویه‌های تولیدکنندهٔ آنزیم انجام شد. از نمونه‌های غربال شده، DNA استخراج شد و واکنش PCR به‌کمک پرایمرهای یونیورسال براساس 16s DNA جهت شناسایی نمونه‌ها انجام گرفت. در ادامهٔ مطالعات بیوانفورماتیک، شناسایی و ثبت نمونه‌ها در ژن بانک انجام شد. نتایج نشان می‌داد که درصد کوتین استخراج‌شده در سیب بیشتر است و احتمالاً سیب درمقابل آفات و بیماری‌ها مقاوم‌تر است. همچنین، شش سویهٔ تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز از جنس *Klebsiella* و *Enterobacter* به‌کمک بررسی فعالیت آنزیمی و محیط کشت اختصاصی حاوی کوتین جداسازی و توالی کدکنندهٔ ناحیهٔ 16s DNA این باکتری‌ها در ژن بانک ثبت شد.

واژه‌های کلیدی. کوتین، سنجش فعالیت، بیوانفورماتیک، پارا نیتروفنل بوتیرات، 16s DNA

Isolation and identification of cutinase enzyme producing bacteria

Nasrin Parvaresh, Mojtaba Mortazavi* & Masoud Torkzadeh-Mahani

Received 16.05.2016/ Accepted 25.10.2016/ Published 21.06.2017

Department of Biotechnology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
*Correspondent author: m.mortazavi@kgut.ac.ir

Abstract. Cutinase belongs to the family of serine hydrolases which are capable of hydrolysis of esters and small polyester such as cutin. The cutin of plants is composed of hydroxy and epoxy fatty acids and is substantially impermeable to water and only the plant pathogenic bacteria are capable of degrading it. Initially, in order to identify the extent of cutin in cucumber (Cucumis sativus' *C. sativus*'), golden apples (Golden Delicious apple '*Malus domestica*'), red apples (Red Delicious apple *'Malus domestica*") and tomatoes (*Solanum lycopersicum* Mill. Commun ' *S. lycopersicum'*), their fruits were obtained. Cutin was extracted from the fruit skin of each studied specimen and compared by chloroform-methanol method. Then, isolation of enzyme-producing strains was performed by the use of the specific medium containing cutin and enzyme activity assay. DNA of the specimens was extracted, and PCR were performed with universal primers for 16s DNA. The remainder was devoted to bioinformatic analysis, identification and registration of samples in the gene bank. The results showed that the percentage of extracted cutin in red apple was more than other samples and as a result, red apple are expected to be more resistant against diseases and pests. Also, six cutinase-producer strains of *Klebsiella* and *Enterobacter* were isolated with the help of enzyme activity and special culture medium containing cutin, and their 16s DNA region coding sequences were recorded in the GenBank.

Keywords. cutin, activity assay, bioinformatics, PNPB, 16s DNA

مقدمه

کوتین در بیشتر گیاهان وجود دارد و دارای ترکیبات پلی‌استری هیدروکسی و اپوکسی اسید چرب است (Carvalho *et al.,* 1998). کوتین یک پلی‌استر بسیار هیدروفوب غیر محلول در آب و از مشتقات گاما هیدروکسی اسید چرب است که در ساختار کوتیکول گیاهان وجود دارد (Heredia, 2003). کوتین گیاهان عالی از ترکیبات پلی‌استری هیدروکسی و اپوکسی‌اسید چرب تشکیل شده که غالباً توسط باندهای استری پیوند یافته‌اند (Martin & Juniper, 1970). اسیدهای چرب کوتین معمولا n-c16 و n-c18 هستند و یک تا سه گروه هیدروکسیل دارند. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها روی مواد پلیمری به‌مثابهٔ تنها منبع کربن خود رشد می‌کنند (LIN & Kolattukudy, 1980). آنزیم کوتیناز، کوتین را تجزیه می‌کند و از منابع مختلف باکتریایی (Kolattukudy *et al.,* 1981) و به‌طور عمده قارچ

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.1.5.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.1.39]

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.1.5.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.1.39]

(Dantzig *et al.,* 1986) تخلیص و جدا می‌شود. کوتین در حفاظت از گیاهان دربرابر عوامل بیماری‌زا نقشی کلیدی ایفا می‌کند و تجزیهٔ آنزیمی آن اولین گام در فرایند آلودگی بافت گیاهی است. میزان بالای کوتین در گیاهان و به‌خصوص میوه‌ها، مقاومت بیشتری دربرابر آفات میکروبی فراهم می‌آورد و به شناسایی حساسیت میوه‌ها دربرابر آفات کمک می‌کند (Saladié *et al.,* 2007). استفاده از پلیمرهای گیاهی توسط میکروارگانیسم‌ها مستلزم ترشح آنزیم‌های هیدرولازی است که مهم‌ترین آنها کوتیناز است که کوتین را تجزیه می‌کند. کوتیناز همچنین می‌تواند به‌عنوان رابط بین استرازها و لیپازها مطرح شود؛ چراکه استرهای محلول مؤثر و تری‌اسیل گلیسرول‌های امولوسیون را هیدرولیز می‌کند (Lopes *et al.,* 2011). از مهم‌ترین شاخصه‌های این آنزیم توانایی هیدرولیز انواع استرها و پلی‌استرهای کوچک است. علاوه‌براین کوتیناز می‌تواند در سنتز پلیمرها، سورفاکتانت‌ها، محصولات محافظت شخصی، دارو و مواد شیمیایی شامل یک یا چند مرکز کایرال استفاده شود (Murphy *et al.,* 1996). ترانس استریفیکاسیون چربی‌ها و روغن‌ها (stereo) یا استریفیکاسیون‌های انتخابی الکل‌ها را می‌توان به‌کمک آنزیم کوتیناز به‌دست آورد (Shah *et al.,* 2003). آنزیم کوتیناز همچنین یک کاتالیست مؤثر در محیط‌های آبی یا ارگانیک است. با توجه به نقش مهم کوتین در گیاهان و طیف وسیع عملکردی آنزیم کوتیناز و قابلیت تجزیه و سنتز انواع ترکیبات پلی‌استری، مطالعهٔ کوتین گیاهان و شناسایی سویه‌های بومی تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز از اهمیت خاصی برخوردار است. بدین‌منظور، در این مطالعه، کوتین میوه‌های خیار، گوجه‌فرنگی، سیب‌زرد و سیب‌قرمز استخراج و مقایسه شد. در ادامه، نمونه‌برداری از پوست میوه، خاک باغچه، خاک سطح برگ، میوه‌های مشکوک به آلودگی و ورمی‌کمپوست انجام گرفت. از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به‌کمک محیط کشت اختصاصی حاوی کوتین و سنجش فعالیت آنزیمی، سویه‌های باکتریایی تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز جدا شدند. شناسایی اولیهٔ این شش سویه با استفاده از استخراج DNA ژنومی و انجام واکنش PCR و به کمک تحلیل توالی‌یابی ژن ناحیه 16sDNA انجام شد. در انتها تحلیل بیوانفورماتیکی توالی نمونه‌های به‌دست‌آمده به‌کمک پایگاه‌های اطلاعاتی– محاسبه‌ای، رسم درخت فیلوژنتیکی و ثبت توالی‌های در ژن بانک انجام شد.

مواد و روش‌ها

استخراج کوتین

به‌منظور شناسایی گونه‌های تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز، تهیهٔ سوبسترای کوتین لازم است. باتوجه به دردسترس کوتین و نیاز به مطالعهٔ آن، کوتین موردنظر از میوه‌ها تهیه شد. به‌این‌منظور میوه‌های سیب‌قرمز، سیب‌زرد، گوجه‌فرنگی و خیار سبز تهیه شدند. میوه‌ها شست‌وشو داده و وزن شدند. پوست میوه‌ها جدا شده و بعد از وزن‌کردن پوست میوه‌ها، در بافر اگزالات (۲ گرم اگزالیک اسید، ۸ گرم آمونیوم اگزالات، ۵۰۰ میلی‌لیتر آب) به مدت ۴ ساعت جوشانده شد تا پالپ‌ها کاملاً جدا شوند. پوست میوه‌ها فیلتر شده و با آب‌مقطر شست‌وشو داده شد. سپس، آنها را وزن کرده و در آون ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک و آسیاب شد. پودر به‌دست‌آمده را در محلول کلرفرم متانول به نسبت۲ به ۱ ریخته و به‌مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت شیک شد. سپس، به محلول به‌دست‌آمده آب اضافه شد و با دور ۱۲۰۰۰ و به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سه فاز در این حالت تشکیل می‌شود که فازهای رویی دور ریخته می‌شود. فاز زیری درون پتری ریخته شد و در آون ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک شد. پودر به‌دست‌آمده همان کوتین است (Gerard *et al.,* 1993).

نمونه‌برداری، غربال‌گری و جداسازی گونه‌های تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز

نمونه‌برداری در شهر کرمان و ماهان انجام گرفت. این نمونه‌ها از پوست میوه و خاک باغچه (مرطوب و از برگ‌های در حال تجزیه) نمونهٔ معمولی خاک سطح برگ یا میوه‌های مشکوک به آلودگی تودهٔ باکتری و ورمی‌کمپوست جمع‌آوری شدند. بعد از نمونه‌برداری اولیه، از محیط کشت اختصاصی به‌منظور غربال‌گری و جداسازی نمونه‌های تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز استفاده شد. در این محیط کشت کوتین تنها منبع کربن برای استفادهٔ میکروارگانیسم‌ها است و تنها میکروارگانیسم‌هایی در این محیط رشد می‌کنند که قادر به تجزیهٔ کوتین باشند. این محیط کشت حاوی ترکیبات ذیل بود: ۰/۰۳ گرم سدیم‌کلرید، ۰/۰۳ گرم آهن نیترات، ۰/۰۳گرم پتاسیم‌کلرید، ۰/۵ گرم آمونیوم‌کلرید، ۰/۰۱ گرم آهن‌سولفات، ۰/۰۶ گرم پتاسیم‌دی‌هیدروژن فسفات، ۰/۰۲

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.1.5.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.1.39]

گرم منیزیم‌سولفات. این مواد در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل شدند سپس، pH محیط به ۷/۲ رسانده و به آن ۰/۴ گرم کوتین اضافه و اتوکلاو شد (Liu *et al.,* 2009). سپس، در ۹ فالکون در هرکدام ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت اختصاصی ریخته شد و از خاک باغچه، خاک کمپوست، خاک باغچه (پای درخت توت)، ناحیهٔ آلودهٔ پوست سیب‌قرمز، از ناحیهٔ آلودهٔ پوست سیب‌زرد، پوست گوجهٔ آلوده، پوست آلوده به میکروب سیب‌زرد و پوست آلودهٔ سیب‌زرد در آنها کشت داده شد. یک محیط کشت هم نمونهٔ شاهد قرار گرفت. سپس، نمونه‌ها ۳ تا ۵ روز در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه و ۱۵۰ rpm قرار داده شدند (Gerard *et al.,* 1993; Trail & Köller, 1993). بعد از رشدکردن اولیهٔ نمونه ها، غربال‌گری آنها روی پلیت‌های محیط کشت جامد اختصاصی (حاوی ترکیبات محیط کشت اختصاصی به همراه ۳/۵ گرم آگار) و در انکوباتور ۳۰ درجه انجام شد. به‌دلیل رشد نمونه‌های مختلف، کشت ثانویهٔ کلنی‌های رشدکرده روی پلیت‌های محیط کشت جامد اختصاصی انجام گرفت. از این نمونه‌های رشدکرده در مراحل بعد استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیمی

برای سنجش فعالیت آنزیم، نمونه‌های جدا شده کشت داده شدند و بعد از رشد کردن سانتریفیوژ شدند. سپس، دو بافر ۱ (۰/۰۱۷ گرم KH_2PO_4 و ۲/۵میکرولیتر تریتون X100 در ۵ میلی لیتر آب) و بافر ۲ (۰/۰۱۷ گرم KH_2PO_4 و ۲/۵میکرولیتر تریتون X100 و ۸ میکرولیتر PNPB در ۵ میلی‌لیتر آب) تهیه شد. در یک ویال ۷۰۰ میکرولیتر بافر ۱، ۱۰۰ میکرولیتر بافر ۲ و ۲۰۰ میکرولیتر از نمونهٔ موجود در محیط مایع سانتریفیوژ شده مرحلهٔ قبل ریخته شد. بعد از تهیهٔ نمونه، نیم‌ساعت تأخیر، میزان جذب نمونه‌ها خوانده شد. نمونه‌های دارای جذب، نشان‌دهندهٔ وجود آنزیم کوتیناز است. درنهایت، از طریق معادلات آنزیمی میزان فعالیت هر آنزیم محاسبه شد. ضریب خاموشی پارا نیتروفنل برابر با ε_{405} =18000 $M^{-1}cm^{-1}$ بود و فرمول $A=\varepsilon bc$ جهت محاسبهٔ میزان فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت (Calado *et al.*, 2002).

شناسایی نمونه‌ها براساس 16sDNA ژنومی

جهت تحلیل 16sDNA، با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Bioneer کشور کرهٔ جنوبی و از سویه‌های تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز، DNA استخراج شد. عمل فرایند PCR با دو عدد پرایمر 8F(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و 1541R- (AAGGAGGTGATCCAGCCGGA) انجام شد. DNA ژنومی با غلظت ۵۰ ng/µl به‌عنوان الگو به‌کار رفت و واکنش PCR به این صورت انجام گرفت: دمای مرحلهٔ تک‌رشته-ای‌شدن اولیه ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه و برای یک چرخه، ۳۵ چرخه بعدی دمای دناتوره شدن ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۴ درجه به مدت ۱ دقیقه و دمای سنتز ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه بود. در نهایت، باند مورد نظر بر روی ژل در محصولات PCR در دستگاه ژل داک بریده‌شده و جهت توالی‌یابی ارسال شد.

تحلیل و ثبت توالی‌ها

به‌منظور تحلیل بیوانفورماتیکی نمونه‌ها، توالی‌های حاصل از تعیین توالی شش نمونه در پایگاه محاسباتی-داده‌ای http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi بلاست شد و نام علمی جنس نمونه‌های تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز مشخص شد. سپس، جهت ثبت نمونه‌ها، ابتدا نتایج تعیین توالی به‌کمک نرم‌افزار FinchTV 1.4.3 تحت آنالیز قرار گرفتند. نواحی دارای طیف کروماس مناسب انتخاب شده و در پایگاه NCBI به نشانی http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi تجزیه‌وتحلیل شدند. سپس، توالی‌های نهایی به‌کمک نرم‌افزار sequin در ژن بانک به نشانی http://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/submit.shtml ثبت شدند. در ادامهٔ این شش توالی در پایگاه محاسبه‌ای http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw تحت آنالیز قرار گرفتند که میزان Score نمونه‌ها درمقابل همدیگر و طول توالی تعیین می‌شود. همچنین، توالی این شش نمونه در پایگاه محاسبه‌ای http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview/ تحلیل شده و میزان Identities با طول بلاست شده و همچنین consensus توالی نمونه‌ها تعیین شد.

نتایج

بررسی میزان کوتین در میوه‌های مختلف

به‌منظور تهیهٔ کوتین و بررسی فعالیت کوتینازی نمونه‌ها، میوه-های گوجه‌فرنگی، خیارسبز و میوه‌های سیب‌قرمز، سیب‌زرد تهیه شد و میزان کوتین آنها تحت مطالعه قرار گرفت. بعد از جوشاندن پوست‌های این میوه‌ها در بافر اگزالات ماده‌ای خمیری‌شکل به-

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.1.5.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.1.39]

دست می‌آید که خشک و آسیاب‌شده و با روش کلروفرم-متانول استخراج کوتین انجام شد. در جدول ۱، میزان وزن میوه-های اولیه، وزن پوست میوه، وزن پوست پس‌از جوشاندن، وزن پوست آسیاب شده، وزن کوتین نهایی، بازده و در نهایت رنگ کوتین به‌ترتیب در گوجه‌فرنگی، خیار، سیب‌زرد و قرمز گزارش شده است. در جدول ۲، میانگین وزن‌های مختلف، بازده و رنگ کوتین نهایی این چهار میوه گزارش شده است. جدول تجزیهٔ واریانس وزن کوتین نهایی بین میوه‌ها نشان داد که بین میوه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری از لحاظ صفت وزن کوتین نهایی وجود دارد، بنابراین، با معنی‌دار شدن تیمارها در سطح احتمال ۱ درصد برای صفت وزن کوتین نهایی مقایسهٔ میانگین داده‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد. مقایسهٔ میانگین داده‌ها به‌روش دانکن نشان داد (جدول ۳) که خیارسبز و گوجه‌فرنگی دارای کمترین میزان کوتین به ترتیب ۰/۲۷ و ۰/۱۲ هستند. سیب‌قرمز دارای بیشترین میانگین کوتین (۰/۹۴) است که اختلاف معنی‌داری با دیگر میوه‌ها داشت، سیب زرد نیز دارای میانگین کوتین ۰/۵ بود. نتایج نشان داد که در هر گرم پوست سیب‌قرمز، سیب‌زرد، خیارسبز و گوجه‌فرنگی به ترتیب ۸/۷ ، ۴/۲۸، ۱/۲۹ و ۱/۷۵میلی‌گرم کوتین وجود دارد که در نتیجه درصد کوتین سیب‌قرمز بیشتر از سیب‌زرد و سیب‌زرد بیشتر از خیارسبز و خیارسبز بیشتر از گوجه فرنگی است و به‌طور خلاصه، درصد کوتین در سیب‌قرمز درمقابل سیب‌زرد، گوجه و خیارسبز بیشتر است.

جداسازی سویه‌ها و سنجش فعالیت آنزیمی

بعد از تهیهٔ کوتین، مرحلهٔ بعد مطالعهٔ سویه‌های دارای فعالیت کوتینازی است. به‌این‌منظور از نواحی مختلف نمونه‌برداری انجام شد و بعد از مطالعهٔ اولیه، ۶ سویه از نمونه‌های اولیه جدا شد. تمام سویه‌های جداشده روی محیط اختصاصی به‌خوبی رشد کردند و تشکیل کلنی دادند. مطالعهٔ اولیهٔ شکل کلنی‌ها نشان داد که شکل کلنی‌های جداشده مشابهٔ کلنی باکتری‌ها است. برای سنجش فعالیت آنزیم، ابتدا نمونه‌ها در محیط کشتی که کوتین تنها منبع کربن آن برای استفادهٔ میکروارگانیسم‌ها است کشت داده شدند. در یک ویال نمونه و در یک ویال Blank را تهیه می‌کنیم. از لحظهٔ صفر افزایش جذب به دلیل تجزیهٔ سوبسترای PNPB به مدت نیم‌ساعت، هر دقیقه یک‌بار میزان فعالیت آنزیم بررسی شد. درنهایت، از طریق معادلات آنزیمی میزان فعالیت هر آنزیم محاسبه شد. به‌کمک ضریب خاموشی پارا نیتروفنل و از فرمول A=Ɛbc جهت محاسبهٔ میزان فعالیت آنزیم استفاده شد (جدول ۴). نتایج نشان داد که نمونهٔ ۴ دارای بیشترین فعالیت کوتینازی و نمونهٔ ۳ دارای کمترین میزان فعالیت کوتینازی است.

جداسازی شناسایی و توالی یابی سویه‌ها با استفاده از تحلیل توالی‌یابی ژن 16S rDNA

به‌منظور شناسایی گونه به‌کمک مطالعات ژنتیکی، DNA سویه-ها با استفاده از روش کیت DNA استخراج شد. عمل PCR با دو پرایمر F8 و R۱۵۴۱ انجام شد. سپس، به‌منظور تأیید تکثیر باند مورد نظر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد (شکل ۱). سپس، باند مورد نظر از روی ژل استخراج و جهت توالی‌یابی ارسال شد. همهٔ سویه‌ها با استفاده از روش 16s rDNA شناسایی شدند و با توجه به تحلیل مولکولی، پنج سویه از جنس *Klebsiella* و یک سویه از جنس *Enterobacter* شناسایی شدند. این سویه‌ها با نام‌ها و شماره‌های دسترسی KT692943، KT795107، KT795108 ، KT795109 و KP893565 در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ثبت رسیدند (جدول ۵). همچنین، به-کمک پایگاه اطلاعاتی محاسبه‌ای http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw. این شش توالی تحلیل شدند که نتایج آن تحلیل در جدول ۶ گزارش شده است. همچنین، روابط فیلوژنتیکی این شش توالی براساس این پایگاه نیز تحلیل شد که در شکل ۲ نشان داده شده است. این توالی‌ها همچنین در پایگاه محاسباتی http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview هدف تحلیل قرار گرفت که به‌دلیل زیادبودن حجم تحلیل در اینجا تنها نتایج تحلیل‌ها بخش انتهایی توالی‌ها گزارش شده است (شکل ۳).

بحث

کوتین جزء ساختاری کوتیکول گیاهان عالی را تشکیل می‌دهد. کوتین دربرابر نفوذ باکتری‌ها و قارچ‌ها سدهایی ایجاد می‌کند. حتی گیاهان عالی که در زیر آب زندگی می‌کنند، مانند چمن دریا، زئوسترا مارینا دارای کوتین هستند که از همان نوع مونومرهایی که در گیاهان خشکی یافت می‌شود تشکیل شده‌اند (Kolattukudy, 2005).

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.1.5.6]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.1.39]

جدول ۱- میزان میوه، وزن پوست میوه، وزن پوست پس از جوشاندن، وزن پوست آسیاب شده، وزن کوتین نهایی و رنگ کوتین در میوه‌های گوجه‌فرنگی، خیار، سیب زرد و قرمز.

Table 1. The amount of fruits, peel weight, peel weight after boiling, peel powder weight, the weight of the final cutin and color of cutin in tomato, cucumber, yellow and red apple fruits.

	وزن میوه	وزن پوست میوه (گرم)	وزن پوست پس از جوشاندن (گرم)	وزن پوست آسیابی (گرم)	وزن کوتین نهایی (گرم)	بازده	رنگ کوتین
خیار سبز	۱	۲۰۸	۴۲/۵۷	۲/۴	۰/۲۷	۱/۲۹	سبز تیره
سیب قرمز	۱	۱۰۷	۸۳/۳	۱/۹۵	۰/۹۴	۸/۷	زرد
سیب زرد	۱	۱۱۵	۴۳/۳	۲/۲	۰/۵	۴/۲۸	زرد
گوجه‌فرنگی	۱	۱۷۰	۱۴/۳۴	۱/۵	۰/۱۲	۰/۷۱	قرمز

جدول ۲- تجزیه واریانس وزن کوتین نهایی بین میوه‌ها. **بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱٪ بین تیمارها می‌باشد.

Table 2. Variance analysis between the weights of the final cutin of fruits. ** Represents the difference between treatments is statistically significant at 1%.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تیمار	۳	۰/۳۸	**۲۷/۵۹
خطا	۸	۰/۰۰۶	
کل	۱۱		

.

جدول ۳- مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۱٪ برای صفت وزن کوتین نهایی.

Table 3. Comparison of the data average by Duncan method at probability level of 1% for the final cutin weight.

تیمار	میانگین
گوجه‌فرنگی	۰/۱۲[c]
خیارسبز	۰/۲۷[c]
سیب زرد	۰/۵[b]
سیب قرمز	۰/۹۴[a]

جدول ٤- فعالیت کوتینازی نمونه‌های غربالگری شده.

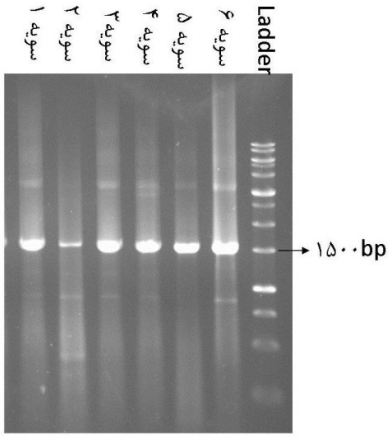
Table 4. Cutinase activity of screened samples.

نمونه	میزان فعالیت (µmol/min/mL)
۱	۲
۲	۳/۴
۳	۱
٤	۳/۸
٥	۳/۶
٦	۱/۶

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.1.5.6]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.1.39]



شکل ۱- ژل الکتروفورز با پرایمرهای 16S rDNA.

Fig. 1. Gel electrophoresis with 16S rDNA primers.

ضخامت کوتین با تغییر محیط نیز تغییر می‌کند. همان‌طور که اشاره شد، به‌منظور بررسی فعالیت کوتینازی نمونه‌ها به تهیهٔ سوبسترای کوتین نیاز است. برای بررسی این سویه ها به محیط کشتی نیاز است که کوتین تنها منبع کربن آن برای استفادهٔ میکروارگانیزم‌ها باشد. به‌این‌منظور میوه‌های گوجه‌فرنگی، سیب-قرمز، سیب‌زرد و خیارسبز تهیه شد. نتایج نشان می‌دهد که درصد کوتین سیب قرمز بیشتر از سیب‌زرد و سیب‌زرد بیشتر از خیارسبز و خیارسبز بیشتر از گوجه‌فرنگی است.

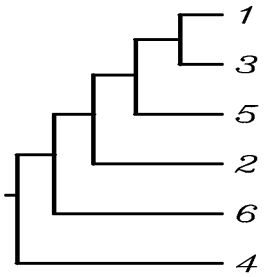
به‌طور خلاصه، درصد کوتین در سیب‌قرمز درمقابل سیب‌زرد، گوجه و خیارسبز بیشتر است. همان‌طور که قبلاً نیز در منابع گزارش شده است، سیب قرمز بالاترین بازده را در هر گرم پوست میوه دارد (Fett *et al.*, 1992). در مطالعه‌ای دیگر نیز که دربارهٔ سب فوجی، انبهٔ قهوه‌ای، خیار و پرتقال انجام شد بیشترین میزان استخراج کوتین در سیب مشاهده شد (Macedo & Pio, 2005). درنتیجه به‌نظر می‌رسد که سیب‌قرمز درمقابل بیماری‌ها و آفات بسیار مقاوم‌تر از خیارسبز و گوجه و سیب زرد است. میزان پایین کوتین در گوجه‌فرنگی نشان‌دهندهٔ حساسیت زیاد آن دربرابر آلودگی‌های باکتریایی و نیاز به مراقبت بیشتر است. به‌نظر می‌رسد به‌کمک تغییرات ژنتیکی و افزایش میزان کوتین در گوجه‌فرنگی می‌توان میزان پایداری آن را دربرابر عفونت‌های باکتریایی و قارچی افزایش داد. بعد از استخراج، کوتین سیب یک پودرخشک بود، درحالی‌که کوتین میوه‌های دیگر به‌صورت امولسیون بود و این باعث می‌شود که استفاده از آنها سخت شود. در بقیهٔ موارد، چربی استخراج‌شده با کوتین احتمالاً موجب تشکیل امولسیون می‌شود؛ بنابراین، کوتین سیب به دلیل بیشترین بازده و پودر حاصل بهترین گزینه برای مطالعات است.

یکی از مشکلات زیست‌محیطی در جوامع امروزی، تجزیهٔ زباله-های پلی‌استری و پلاستیک در محیط زیست است. از کوتیناز همچون یک آنزیم سبز می‌توان برای از بین بردن زباله‌های پلی-استرهای تجزیه‌شدنی در طبیعت استفاده کرد (Leja & Lewandowicz, 2010). امروزه، شناسایی سویه‌های بومی تولیدکنندهٔ آنزیم‌های صنعتی از اهمیت ویژه‌ای در مباحث علمی و خودکفایی ملی برخوردار است و آنزیم کوتیناز از جملهٔ این آنزیم‌های صنعتی است. در بررسی نمونه‌های تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز از محیط کشتی استفاده شد که کوتین تنها منبع کربن آن برای استفادهٔ میکروارگانیزم‌ها بود. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در این محیط کشت اختصاصی کشت داده شدند و سپس، در محیط کشت مایع درون تلقیح داده شدند. سنجش فعالیت آنزیم کوتیناز به‌کمک دستگاه اسپکتوفوتومتری و به‌وسیلهٔ سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنول بوتیرات انجام شد. نتایج این سنجش نشان داد که شش نمونه دارای فعالیت کوتینازی و قادر به تجزیهٔ سوبسترای اختصاصی کوتیناز هستند. البته، میزان این فعالیت تفاوت‌هایی داشت که دلیل آن می‌تواند به سطح بیان آنزیم، پایداری آنزیم بیان‌شده، تفاوت‌های ساختاری و فاکتورهای محیطی مربوط باشد. همچنین، در مقایسه با دیگر مطالعات و درمقابل باکتری‌های جداشده از *Fusarium oxysporum*، میزان فعالیت نمونه‌های

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.1.5.6]

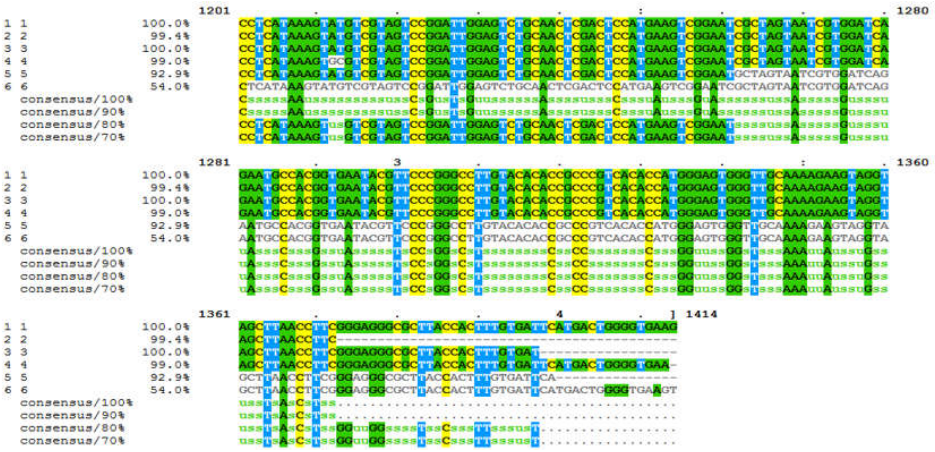
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.1.39]



شکل ۲- رسم درخت فیلوژنیکی بر اساس توالی 16sDNA.

Fig. 2. The phylogenetic tree based on the sequences of 16sDNA.

Reference sequence (1): 1
Identities normalised by aligned length.
Colored by: identity + property.



شکل ۳- آنالیز شش توالی در پایگاه محاسباتی داده‌ای EBI .

Fig. 3. Sequence analysis in the EBI data-base.

جدول ۵- مشخصات توالی‌های ثبت شده در ژن بانک.

Table 5. Details of registered sequences in the GenBank.

	گونه شناسایی شده	کد ثبت شده	بخش توالی شده	توضیحات	تعداد نوکلئوتیدها
نمونه ۱	*Klebsiella* sp.	KP893565.1	16S ribosomal RNA gene,	No.8 .partial sequence	۱٤٤۰
نمونه ۲	*Klebsiella* sp.	KT795107.1	16S ribosomal RNA gene,	MM3. partial sequence	۱۳۷۲
نمونه ۳	*Klebsiella* sp.	KT795108.1	16S ribosomal RNA gene,	MM1. partial sequence	۱٤۰۷
نمونه ۴	*Enterobacter* sp.	KT692943.1	16S ribosomal RNA gene,	No.1. partial sequence	۱٤۳۰
نمونه ۵	*Klebsiella* sp.	KT795109.1	16S ribosomal RNA gene,	MM2. partial sequence	۱٤۰۹
نمونه ۶	*Klebsiella* sp.	در حال ثبت	در حال ثبت	در حال ثبت	

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.1.5.6]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.1.39]

جدول ٦- نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی شش توالی .

Table 6. Results of bioinformatics analysis of six sequences.

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments **Sequence type explicitly set to DNA** **Sequence format is Pearson** **Sequence 1: 1 1440 bp** **Sequence 2: 2 1372 bp** **Sequence 3: 3 1407 bp** **Sequence 4: 4 1430 bp** **Sequence 5: 5 1409 bp** **Sequence 6: 6 1451 bp** **Start of Pairwise alignments** **Aligning...**	**Sequences (1:2) Aligned. Score: 99.344** **Sequences (1:3) Aligned. Score: 100** **Sequences (1:4) Aligned. Score: 98.951** **Sequences (1:5) Aligned. Score: 99.5032** **Sequences (1:6) Aligned. Score: 98.6806** **Sequences (2:3) Aligned. Score: 99.344** **Sequences (2:4) Aligned. Score: 98.7609** **Sequences (2:5) Aligned. Score: 99.1254** **Sequences (2:6) Aligned. Score: 98.688** **Sequences (3:4) Aligned. Score: 98.9339** **Sequences (3:5) Aligned. Score: 99.4314** **Sequences (3:6) Aligned. Score: 98.6496** **Sequences (4:5) Aligned. Score: 98.7225** **Sequences (4:6) Aligned. Score: 98.5315** **Sequences (5:6) Aligned. Score: 98.4386** **Guide tree file created: [clustalw.dnd]**	**There are 5 groups** **Start of Multiple Alignment** **Aligning...** **Group 1: Sequences: 2 Score:26733** **Group 2: Sequences: 3 Score:26686** **Group 3: Sequences: 4 Score:25968** **Group 4: Sequences: 5 Score:26525** **Group 5: Sequences: 6 Score:26636** **Alignment Score 150303** **CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.aln]**

جداشده در این پژوهش چندبرابر بوده است که این ویژگی در فرایند غربال‌گری و مطالعات بعدی بسیار حائز اهمیت است (Macedo & Pio, 2005). به‌منظور فهم دقیق این موضوع کلون‌کردن ژن آنزیم کوتیناز و مطالعهٔ آن لازم است.

به‌منظور استخراج DNA از روش‌های مختلفی استفاده شد که درنهایت مشخص شد کیفیت و کمیت DNA حاصل با کیت بهتر ومطلوب‌تر از روش جوشاندن و CTAB است و از نظر فیزیکی نیز کمتر باعث فرسودگی DNA می‌شود. علاوه‌براین، مواد مصرفی در این روش کمتر است و در زمان کوتاه امکان کار با نمونه‌های انبوه وجود دارد و آلودگی در آزمایشگاه نیز کمتر خواهد بود. تحلیل توالی 16s rDNA در NCBI نشان می‌دهد که بیشترین میزان شباهت پنج تا از نمونه‌ها با باکتری از جنس و گونه *Klebsiella oxytoca* و یک نمونه هم از جنس و گونه *Enterobacter cloacae* است. هرچند تاکنون فعالیت‌های زیادی برای این باکتری‌ها گزارش شده است، برطبق مطالعات ما تاکنون وجود فعالیت کوتینازی در این گونه از باکتری‌ها گزارش نشده است و ما برای اولین‌بار وجود فعالیت کوتینازی را در باکتری‌های *Klebsiella oxytoca* و *Enterobacter cloacae* نشان داده‌ایم. این از آن جهت حائز اهمیت است که این باکتری‌ها بومی بوده و جزء ذخایر ژنتیکی ایران به حساب می‌آیند. هر چند برطبق تحلیل 16s rDNA، بیشترین شباهت نمونه‌ها با باکتری‌های *Klebsiella oxytoca* و *Enterobacter cloacae* است، جهت تعیین نهایی جنس آنها آزمایش‌های میکروبیولوژی ضروری است.

در ادامهٔ این مطالعه، بررسی شش توالی 16s rDNA حاصل نشان می‌دهد که با رسم درخت فیلوژنتیکی پنج سویه متعلق به جنس *Kelebsiella* در یک دسته و تنها یک سویه متعلق به جنس *Enterobacter* در دسته‌ای دیگر قرار می‌گیرند. این تحلیل نیز به‌خوبی نشان می‌دهد که نمونهٔ شمارهٔ ۴ از یک جنس دیگر است.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفتهٔ کرمان به‌دلیل 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 شده است.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.1.5.6]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.4.1.39]

REFERENCES

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.

Dantzig, A.H., Zuckerman, S.H. and Andonov-Roland, M.M. 1986. Isolation of a *Fusarium solani* mutant reduced in cutinase activity and virulence. – J. Bacteriol. 168: 911-916.

Fett, W., Gerard, H., Moreau, R., Osman, S. and Jones, L. 1992. Screening of nonfilamentous bacteria for production of cutin-degrading enzymes. – Appl. Environ. Microbiol. 58: 2123-2130.

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. (BBA)-General Subjects 1620: 1-7.

Kolattukudy, P., Purdy, R. and Maiti, I. 1981. Cutinases from fungi and pollen. – Methods Enzymol. 71: 652-664.

Kolattukudy, P.E. 2005. Cutin from plants. – Biopolymers Online. doi: 10.1002/3527600035.bpol3a01

Leja, K. and Lewandowicz, G. 2010. Polymer biodegradation and biodegradable polymers- a review. – Polish J. Environ. Stud. 19: 255-266.

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, Z., Gosser, Y., Baker, P.J., Ravee, Y., Lu, Z., Alemu, G., Li, H., Butterfoss, G.L., Kong, X.-P. and Gross, R. 2009. Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. – J. Am. Chem. Soc. 131: 15711-15716.

Lopes, D.B., Fraga, L.P., Fleuri, L.F. and Macedo, G.A. 2011. Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? – Food Sci. Technol. (Campinas) 31: 603-613.

Macedo, G.A. and Pio, T.F. 2005. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. – Braz. J. Microbiol. 36: 388-394.

Martin, J.T. and Juniper, B.E. 1970. The Cuticles of Plants. – Hodder & Stoughton Educational. 347 pp.

Murphy, C.A., Cameron, J., Huang, S.J. and Vinopal, R.T. 1996. Fusarium polycaprolactone depolymerase is cutinase. – Appl. Environ. Microbiol. 62: 456-460.

Saladié, M., Matas, A.J., Isaacson, T., Jenks, M.A., Goodwin, S.M., Niklas, K.J., Xiaolin, R., Labavitch, J.M., Shackel, K.A. and Fernie, A.R. 2007. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. – Plant Physiol. 144: 1012-1028.

Shah, S., Sharma, S. and Gupta, M. 2003. Enzymatic transesterification for biodiesel production. – Indian J. Bioph. 40: 392-399.

Trail, F. and Köller, W. 1993. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: purification and characterization of two cutinases from *Alternaria brassicicola*. – Physiol. Mol. Plant Pathol. 42: 205-220.

*****

How to cite this article:

Parvaresh, N., Mortazavi, M. and Torkzadeh-Mahani, M. 2017. Isolation and identification of cutinase enzyme producing bacteria. – Nova Biol. Rep. 4: 38-46.

پرورش، ن.، مرتضوی، م. و ترکزاده ماهانی، م. ۱۳۹۶. جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۴: ۴۶-۳۸.