

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده 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 خانواده 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 تجزیه 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 تولیدکننده آنزیم انجام شد. از نمونه‌های غربال شده، DNA استخراج شد و واکنش PCR به کمک پرایمرهای یونیورسال براساس 16s DNA جهت شناسایی نمونه‌ها انجام گرفت. در ادامه مطالعات بیوانفورماتیک، شناسایی و ثبت نمونه‌ها در ژن بانک انجام شد. نتایج نشان می‌داد که درصد کوتین استخراج شده در سیب بیشتر است و احتمالاً سیب درمقابل آفات و بیماری‌ها مقاوم‌تر است. همچنین، شش سویه تولیدکننده آنزیم کوتیناز از جنس *Klebsiella* و *Enterobacter* به کمک بررسی فعالیت آنزیمی و محیط کشت اختصاصی حاوی کوتین جداسازی و توالی کدکننده ناحیه 16s DNA این باکتری‌ها در ژن بانک ثبت شد.

واژه‌های کلیدی. کوتین، سنجش فعالیت، بیوانفورماتیک، پارا نیتروفل 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

تشکیل شده که غالباً توسط باندهای استری پیوند یافته‌اند (Martin & Juniper, 1970). اسیدهای چرب کوتین معمولاً n-16 و c18 هستند و یک تا سه گروه هیدروکسیل دارند. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها روی مواد پلیمری به‌مثابه 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

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 اپوکسی اسید چرب

در ژن بانک انجام شد.

مواد و روش‌ها

استخراج کوتین

به منظور شناسایی گونه‌های تولیدکننده آنزیم کوتیناز، تهیه سوسترای کوتین لازم است. با توجه به دردسترس کوتین و نیاز به مطالعه آن، کوتین موردنظر از میوه‌ها تهیه شد. به این منظور میوه‌های سیب قرمز، سیب‌زرد، گوجه‌فرنگی و خیار سبز تهیه شدند. میوه‌ها شست‌وشو داده و وزن شدند. پوست میوه‌ها جدا شده و بعد از وزن کردن 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 آب مقطر شست‌وشو داده شد. سپس، آنها را وزن کرده و در آن ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و آسیاب شد. پودر به دست آمده را در محلول کلرفرم متانول به نسبت ۲ به ۱ ریخته و به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت شیک شد. سپس، به محلول به دست آمده آب اضافه شد و با دور ۱۲۰۰ و به مدت 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 آن ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. پودر به دست آمده همان کوتین است (Gerard et al., 1993).

نمونه‌برداری، غربال‌گری و جداسازی گونه‌های تولیدکننده 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) نمونه معمولی خاک سطح برگ یا میوه‌های مشکوک به آلودگی توده باکتری و ورمی کمپوست جمع‌آوری شدند. بعد از نمونه‌برداری اولیه، از محیط کشت اختصاصی به منظور غربال‌گری و جداسازی نمونه‌های تولیدکننده آنزیم کوتیناز استفاده شد. در این محیط کشت کوتین تنها منبع کربن برای استفاده میکروارگانیسم‌ها است و تنها میکروارگانیسم‌هایی در این محیط رشد می‌کنند که قادر به تجزیه کوتین باشند. این محیط کشت حاوی ترکیبات ذیل بود: ۰/۰۳ گرم سدیم کلرید، ۰/۰۳ گرم آهن نترات، ۰/۰۳ گرم پتاسیم کلرید، ۰/۵ گرم آمونیوم کلرید، ۰/۰۱ گرم آهن سولفات، ۰/۰۶ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، ۰/۰۲

(Dantzig et al., 1986) تخلیص و جدا می‌شود. کوتین در حفاظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا نقشی کلیدی ایفا می‌کند و تجزیه آنزیمی آن اولین گام در فرایند آلودگی بافت گیاهی است. میزان بالای کوتین در گیاهان و به خصوص میوه‌ها، مقاومت بیشتری در برابر آفات میکروبی فراهم می‌آورد و به شناسایی حساسیت میوه‌ها در برابر 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 به عنوان رابط بین استرازاها و لیازها مطرح شود؛ چراکه استراهای محلول مؤثر و تری‌اسیل گلیسرول‌های امولسیون را هیدرولیز می‌کند (Lopes et al., 2011). از مهم‌ترین شاخصه‌های این آنزیم توانایی هیدرولیز انواع استرها و پلی‌استرهای کوچک است. علاوه بر این 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 به کمک آنزیم کوتیناز به دست آورد (Shah et al., 2003). آنزیم کوتیناز همچنین یک کاتالیز 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، مطالعه کوتین گیاهان و شناسایی سویه‌های بومی تولیدکننده آنزیم کوتیناز از اهمیت خاصی برخوردار است. بدین منظور، 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 ورمی کمپوست انجام گرفت. از نمونه‌های جمع‌آوری شده به کمک محیط کشت اختصاصی حاوی کوتین و سنجش فعالیت آنزیمی، سویه‌های باکتریایی تولیدکننده آنزیم کوتیناز جدا شدند. شناسایی اولیه 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 به دست آمده به کمک پایگاه‌های اطلاعاتی - محاسبه‌ای، رسم درخت فیلوژنتیکی و ثبت توالی‌های

آنزیم کوتیناز، DNA استخراج شد. عمل فرایند PCR با دو عدد پرایمر (8F(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و (AAGGAGGTGATCCAGCCGGA) 1541R- انجام شد. DNA ژنومی با غلظت ۵۰ ng/μl به عنوان الگو به کار رفت و واکنش PCR به این صورت انجام گرفت: دمای مرحله تک‌رشته‌ای شدن 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 بریده شده و جهت توالی‌یابی ارسال شد.

تحلیل و ثبت توالی‌ها

به منظور 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 تولیدکننده آنزیم کوتیناز مشخص شد. سپس، جهت ثبت نمونه‌ها، ابتدا نتایج تعیین توالی به کمک نرم‌افزار FinchTV 1.4.3 تحت آنالیز قرار گرفتند. نواحی دارای طیف کروماتاس مناسب انتخاب شده و در پایگاه NCBI به نشانی <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> تجزیه و تحلیل شدند. سپس، توالی‌های نهایی به کمک نرم‌افزار sequin در ژن بانک به نشانی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/su> bmit.shtml ثبت شدند. در ادامه این شش توالی در پایگاه محاسبه‌ای <http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw> تحت آنالیز قرار گرفتند که میزان Score نمونه‌ها در مقابل همدیگر و طول توالی تعیین می‌شود. همچنین، توالی این شش نمونه در پایگاه محاسبه‌ای <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview> Identities با طول بلاست شده و همچنین consensus توالی نمونه‌ها تعیین شد.

نتایج

بررسی میزان کوتین در میوه‌های مختلف

به منظور تهیه کوتین و بررسی فعالیت کوتینازی نمونه‌ها، میوه‌های گوجه‌فرنگی، خیارسبز و میوه‌های سیب‌قرمز، سیب‌زرد تهیه شد و میزان کوتین آنها تحت مطالعه قرار گرفت. بعد از جوشاندن پوست‌های این میوه‌ها در بافر اگرالات ماده‌ای خمیری شکل به-

گرم منیزیم سولفات. 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 هر کدام ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت اختصاصی ریخته شد و از خاک باغچه، خاک کمپوست، خاک باغچه (پای درخت توت)، ناحیه آلوده پوست سیب‌قرمز، از ناحیه آلوده پوست سیب‌زرد، پوست گوجه آلوده، پوست آلوده به میکروب سیب‌زرد و پوست آلوده سیب‌زرد در آنها کشت داده شد. یک محیط کشت هم نمونه 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 رشد کردن اولیه نمونه‌ها، 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. به دلیل رشد نمونه‌های مختلف، کشت ثانویه کلنی‌های رشد کرده روی پلیت‌های محیط کشت جامد اختصاصی انجام گرفت. از این نمونه‌های رشد کرده در مراحل بعد استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیمی

برای سنجش فعالیت آنزیم، نمونه‌های جدا شده کشت داده شدند و بعد از رشد کردن ساتریفیوژ شدند. سپس، دو بافر ۱ (۰/۱۷ گرم KH_2PO_4 و ۲/۵ میکرولیتر تریتون X100 در ۵ میلی‌لیتر آب) و بافر ۲ (۰/۱۷ گرم KH_2PO_4 و ۲/۵ میکرولیتر 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 نمونه موجود در محیط مایع ساتریفیوژ شده مرحله قبل ریخته شد. بعد از تهیه نمونه، نیم‌ساعت تأخیر، میزان جذب نمونه‌ها خوانده شد. نمونه‌های دارای جذب، نشان‌دهنده وجود آنزیم کوتیناز است. در نهایت، از طریق معادلات آنزیمی میزان فعالیت هر آنزیم محاسبه شد. ضریب خاموشی پارا نیتروفل برابر با $\epsilon = 18000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ بود و فرمول $A = \epsilon bc$ جهت محاسبه 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 کره جنوبی و از سوبه‌های تولیدکننده

در نهایت، از طریق معادلات آنزیمی میزان فعالیت هر آنزیم محاسبه شد. به کمک ضریب خاموشی پارا نیتروفل و از فرمول $A = \epsilon bc$ جهت محاسبه میزان فعالیت آنزیم استفاده شد (جدول ۴). نتایج نشان داد که نمونه ۴ دارای بیشترین فعالیت کوتینازی و نمونه ۳ دارای کمترین میزان فعالیت کوتینازی است.

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

به منظور شناسایی گونه به کمک مطالعات ژنتیکی، DNA سویه‌ها با استفاده از روش کیت DNA استخراج شد. عمل PCR با دو پرایمر F8 و R1541 انجام شد. سپس، به منظور 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 توالی یابی ارسال شد. همه 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، و 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 به دلیل زیاد بودن 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 در برابر نفوذ باکتری‌ها و قارچ‌ها سدهایی ایجاد می‌کند. حتی گیاهان عالی که در زیر آب زندگی می‌کنند، مانند چمن دریای، زئوسترا مارینا دارای کوتین هستند که از همان نوع مونومرهای که در گیاهان خشکی یافت می‌شود تشکیل شده‌اند (Kolattukudy, 2005).

دست می‌آید که خشک و آسیب‌شده و با روش کلروفرم-متانول استخراج کوتین انجام کوتین شد. در جدول ۱، میزان وزن میوه‌های اولیه، وزن پوست میوه، وزن پوست پس از جوشاندن، وزن پوست آسیب‌شده، وزن کوتین نهایی، بازده و در نهایت رنگ کوتین به ترتیب 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 تجزیه 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 مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها به روش 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، سیب‌زرد 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 ۱/۷۵ میلی‌گرم کوتین وجود دارد که در نتیجه درصد کوتین سیب‌قرمز بیشتر از سیب‌زرد و سیب‌زرد بیشتر از خیارسبز و خیارسبز بیشتر از گوجه‌فرنگی است و به طور خلاصه، درصد کوتین در سیب‌قرمز در مقابل سیب‌زرد، گوجه و خیارسبز بیشتر است.

جداسازی سویه‌ها و سنجش فعالیت آنزیمی

بعد از تهیه کوتین، مرحله بعد مطالعه سویه‌های دارای فعالیت کوتینازی است. به این منظور از نواحی مختلف نمونه‌برداری انجام شد و بعد از مطالعه اولیه، ۶ سویه از نمونه‌های اولیه جدا شد. تمام سویه‌های جدا شده روی محیط اختصاصی به خوبی رشد کردند و تشکیل کلنی دادند. مطالعه اولیه شکل کلنی‌ها نشان داد که شکل کلنی‌های جدا شده مشابه کلنی باکتری‌ها است. برای سنجش فعالیت آنزیم، ابتدا نمونه‌ها در محیط کشتی که کوتین تنها منبع کربن آن برای استفاده میکروارگانیسم‌ها است کشت داده شدند. در یک ویال نمونه و در یک ویال Blank را تهیه می‌کنیم. از لحظه صفر افزایش جذب به دلیل تجزیه سوبسترای PNPB به مدت نیم ساعت، هر دقیقه یک بار میزان فعالیت آنزیم بررسی شد.

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
۱	۲۰۸	۴۲/۵۷	۲/۴	۰/۲۷	۱/۲۹	سبز تیره
۱	۱۰۷	۸۳/۳	۱/۹۵	۰/۹۴	۸/۷	زرد
۱	۱۱۵	۴۳/۳	۲/۲	۰/۵	۴/۲۸	زرد
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.

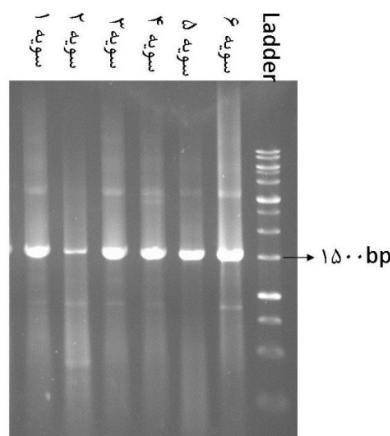
Table 3. Comparison of the data average by Duncan method at probability level of 1% for the final cutin weight.

تیمار	میانگین
گوجه‌فرنگی	۰/۱۲ ^c
خیار سبز	۰/۲۷ ^c
سیب زرد	۰/۵ ^b
سیب قرمز	۰/۹۴ ^a

جدول ۴- فعالیت کوتیناز نمونه‌های غربالگری شده.

Table 4. Cutinase activity of screened samples.

نمونه	میزان فعالیت (μmol/min/mL)
۱	۲
۲	۳/۴
۳	۱
۴	۳/۸
۵	۳/۶
۶	۱/۶



شکل ۱- ژل الکتروفورز با پرایمرهای 16S rDNA.

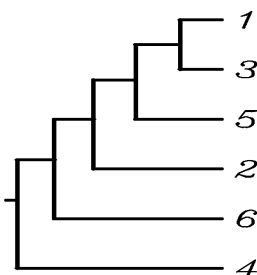
Fig. 1. Gel electrophoresis with 16S rDNA primers.

چربی استخراج شده 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 زیست محیطی در جوامع امروزی، تجزیه زباله‌های پلی‌استری و پلاستیک در محیط زیست است. از کوتیناز همچون یک آنزیم سبز می‌توان برای از بین بردن زباله‌های پلی‌استرهای تجزیه‌شدنی در طبیعت استفاده کرد (Leja & Lewandowicz, 2010). امروزه، شناسایی سویه‌های بومی تولیدکننده آنزیم‌های صنعتی از اهمیت ویژه‌ای در مباحث علمی و خودکفایی ملی برخوردار است و آنزیم کوتیناز از جمله این آنزیم‌های صنعتی است. در بررسی نمونه‌های تولیدکننده آنزیم کوتیناز از محیط کشتی استفاده شد که کوتین تنها منبع کربن آن برای استفاده میکروارگانیسم‌ها بود. نمونه‌های جمع‌آوری شده در این محیط کشت اختصاصی کشت داده شدند و سپس، در محیط کشت مایع درون تلقیح داده شدند. سنجش فعالیت آنزیم کوتیناز به کمک دستگاه اسپکتوفوتومتری و به وسیله سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنول بوتیرات انجام شد. نتایج این سنجش نشان داد که شش نمونه دارای فعالیت کوتینازی و قادر به تجزیه سوبسترای اختصاصی کوتیناز هستند. البته، میزان این فعالیت تفاوت‌هایی داشت که دلیل آن می‌تواند به سطح بیان آنزیم، پایداری آنزیم بیان شده، تفاوت‌های ساختاری و فاکتورهای محیطی مربوط باشد. همچنین، در مقایسه با دیگر مطالعات و درمقابل باکتری‌های جدا شده از *Fusarium oxysporum*، میزان فعالیت نمونه‌های

ضخامت کوتین با تغییر محیط نیز تغییر می‌کند. همان‌طور که اشاره شد، به منظور بررسی فعالیت کوتینازی نمونه‌ها به تهیه سوبسترای کوتین نیاز است. برای بررسی این سویه‌ها به محیط کشتی نیاز است که کوتین تنها منبع کربن آن برای استفاده میکروارگانیسم‌ها باشد. به این منظور میوه‌های گوجه‌فرنگی، سیب‌قرمز، سیب‌زرد و خیار سبز تهیه شد. نتایج نشان می‌دهد که درصد کوتین سیب قرمز بیشتر از سیب‌زرد و سیب‌زرد بیشتر از خیار سبز و خیار سبز بیشتر از گوجه‌فرنگی است.

به طور خلاصه، درصد کوتین در سیب قرمز درمقابل سیب‌زرد، گوجه و خیار سبز 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 درباره سب فوجی، انبه قهوه‌ای، خیار و پرتقال انجام شد بیشترین میزان استخراج کوتین در سیب مشاهده شد (Macedo & Pio, 2005). در نتیجه به نظر می‌رسد که سیب قرمز درمقابل بیماری‌ها و آفات بسیار مقاوم‌تر از خیار سبز و گوجه و سیب زرد است. میزان پایین کوتین در گوجه‌فرنگی نشان‌دهنده حساسیت زیاد آن در برابر آلودگی‌های باکتریایی و نیاز به مراقبت بیشتر است. به نظر می‌رسد به کمک تغییرات ژنتیکی و افزایش میزان کوتین در گوجه‌فرنگی می‌توان میزان پایداری آن را در برابر عفونت‌های باکتریایی و قارچی افزایش داد. بعد از استخراج، کوتین سیب یک پودر خشک بود، درحالی‌که کوتین میوه‌های دیگر به صورت امولسیون بود و این باعث می‌شود که استفاده از آنها سخت شود. در بقیه موارد،



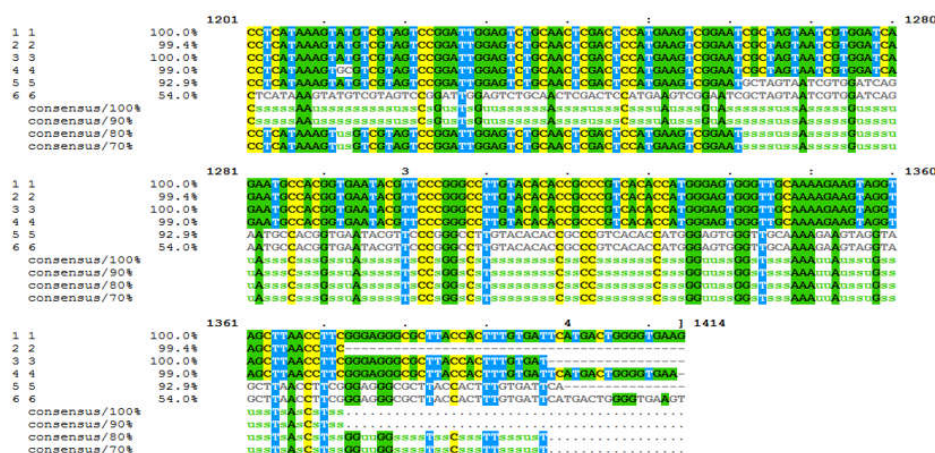
شکل ۲- رسم درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی 16S DNA.

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

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.

تعداد نوکلئوتیدها	توضیحات	بخش توالی شده	کد ثبت شده	گونه شناسایی شده	نمونه
۱۴۴۰	No.8. partial sequence	16S ribosomal RNA gene,	KP893565.1	<i>Klebsiella</i> sp.	نمونه ۱
۱۳۷۲	MM3. partial sequence	16S ribosomal RNA gene,	KT795107.1	<i>Klebsiella</i> sp.	نمونه ۲
۱۴۰۷	MM1. partial sequence	16S ribosomal RNA gene,	KT795108.1	<i>Klebsiella</i> sp.	نمونه ۳
۱۴۳۰	No.1. partial sequence	16S ribosomal RNA gene,	KT692943.1	<i>Enterobacter</i> sp.	نمونه ۴
۱۴۰۹	MM2. partial sequence	16S ribosomal RNA gene,	KT795109.1	<i>Klebsiella</i> sp.	نمونه ۵
	در حال ثبت	در حال ثبت	در حال ثبت	<i>Klebsiella</i> sp.	نمونه ۶

جدول ۶- نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی شش توالی .

Table 6. Results of bioinformatics analysis of six sequences.

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments	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]
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...		

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

سپاسگزاری

از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته 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.

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 کلون کردن ژن آنزیم کوتیناز و مطالعه آن لازم است.

به‌منظور استخراج DNA از روش‌های مختلفی استفاده شد که در نهایت مشخص شد کیفیت و کمیت DNA حاصل با کیت بهتر و مطلوب‌تر 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 اولین بار وجود فعالیت کوتینازی را در باکتری‌های *Klebsiella oxytoca* و *Enterobacter cloacae* نشان داده‌ایم. این از آن جهت حائز اهمیت است که این باکتری‌ها

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.
- Saladić, 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:

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

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