Nova Biologica Reperta 6(1): 39-49 (2019)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۱، صفحات ۳۹ الی ۴۹ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

مطالعهٔ آنزیمی و بیوانفورماتیکی باکتری‌های بومی کوتیناز

مجتبی مرتضوی، نسرین پرورش و مسعود ترکزاده ماهانی
گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده 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 اکسیدشدن اسیدهای چرب در گیاهان به‌وجود 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 سیب قرمز، بررسی فعالیت باکتری‌های تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز در محیط LB و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی است. بدین منظور، از پوست میوه سیب قرمز و به کمک بافر اگزالات، کوتین جداسازی شد. سپس سویه‌های تولیدکنندهٔ 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 سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنول بوتیرات فعالیت کوتینازی نمونه‌ها سنجیده شد. به‌منظور انجام تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، توالی جداسازی‌شده شش نمونهٔ باکتریایی تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز در پایگاه‌های محاسباتی تحلیل شد و درخت فیلوژنتیکی هر توالی تهیه شد. سپس، توالی آنزیمی نمونه‌های تولیدکنندهٔ 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 16S rDNA 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 شناسایی‌شده، 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

Received 05.04.2017/ Revised 10.09.2018/ Accepted 25.09.2018 / Published 01.05.2019
دریافت ۱۳۹۶/۰۱/۱۶/ اصلاح ۱۳۹۷/۰۶/۱۹/ پذیرش ۱۳۹۷/۰۷/۰۳/ انتشار ۱۳۹۸/۰۲/۱۱

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.5.0]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.39]

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 تشکیل‌دهندهٔ کوتیکول بوده و ساختمان چندلایه‌ای دارد که در سطح خارجی دیوارهٔ 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 مادهٔ چرب پیچیده‌ای است که به‌طور درخور توجهی در مقابل آب نفوذناپذیر است (Carvalho *et al*., 1998). کوتیناز متعلق به رستهٔ آنزیمی سرین استرازها 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 کشیدهٔ بسیار محافظت‌شده دارد که با چهار سیستئین 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 به‌مثابهٔ آنزیمی لیپولیتیک (Carvalho *et al*., 1998) در مواد شویندهٔ لباس و ظرف برای چربی‌زدایی و حذف آلودگی‌های زیست‌محیطی به منزلهٔ 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 ازجملهٔ آنها می‌توان به هیدرولیز چربی شیر در صنایع لبنی و سنتز تری‌گلیسریدهای 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 میکروارگانیزم 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 گسترهٔ کاربردهای بیوتکنولوژی این آنزیم و سنتز و تجزیهٔ ترکیبات مختلف، این آنزیم در حوزهٔ بیوتکنولوژی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Raziyafathima *et al*., 2016). در همین راستا، به تازگی چند نمونهٔ باکتریایی بومی این آنزیم شناسایی شده‌اند (شماره ثبت: نمونهٔ شمارهٔ یک: KP893565.1 نمونهٔ شمارهٔ دو: KT795107.1، نمونهٔ شمارهٔ سه: KT795108.1، نمونهٔ شمارهٔ چهار: KT692943.1، نمونهٔ شمارهٔ پنج:KT795109.1 ، نمونهٔ شمارهٔ شش: در حال ثبت) (Parvaresh *et al*., 2017). در ادامهٔ این مطالعه، میزان کوتین سیب قرمز و میزان فعالیت آنزیمی سویه‌های بومی جداسازی‌شده در محیط کشت LB بررسی شد. همچنین، مطالعات بیوانفورماتیکی، از قبیل بررسی سویه‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز، رسم درخت فیلوژنتیکی و بررسی جایگاه سویه‌های بومی تولیدکنندهٔ این آنزیم در این درخت تکاملی، نیز انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ کوتین و محیط کشت اختصاصی

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

تهیهٔ محیط کشت LB

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.5.0]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.39]

به‌منظور تهیهٔ 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 میلی‌لیتر از محیط کشت LB Broth بعد از اتوکلاو در فالکونهای ۵۰ میلی‌لیتر ریخته شده و نمونه‌های رشدکرده در مرحلهٔ 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. فالکون‌های 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 نمونهٔ موجود در محیط مایع سانتریفیوژ شدهٔ مرحلهٔ قبل ریخته شد. همچنین، برای تهیهٔ Blank، ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونهٔ موجود در فالکون 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 تهیهٔ 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 برنامهٔ 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 ناحیهٔ این شش نمونه تحلیل شدند (Flandrois *et al.*, 2015). این سایت روابط فیلوژنتیکی هر توالی را کاملاً مشخص کرده و مجموعه ای از پایگاه های 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 ثبت‌شده بررسی شده و به‌صورت درخت فیلوژنتیکی نمایش داده می‌شود. در ادامه، گونه‌های تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز یوکاریوتی و پروکاریوتی مطالعه و شمارهٔ ثبت ژن‌ها و توالی اسید آمینه‌ای و سایر اطلاعات آنها جمع‌آوری 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، شبکهٔ همسایه، شبکهٔ اجماع، روش‌های ابرشبکه یا روش‌های محاسبه هیبریداسیون یا شبکه‌های نوترکیب 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 به‌همراه توالی ناحیهٔ srDNA ۱۶ سویهٔ بومی تولیدکنندهٔ آنزیم ارزیابی شده و درخت فیلوژنتیکی آنها رسم شد.

نتایج

مطالعهٔ کوتین

با جوشاندن پوست سیب قرمز به‌مدت 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 میوهٔ سیب، وزن پوست میوه، وزن پوست پس از جوشاندن، وزن پوست آسیاب‌شده، وزن کوتین نهایی و بازده در جدول ۱ گزارش شد. نتایج نشان داد که به‌طور میانگین در هر گرم پوست سیب قرمز ۸/۵ میلی‌گرم کوتین وجود داشت.

فعالیت آنزیمی کوتیناز در محیط LB

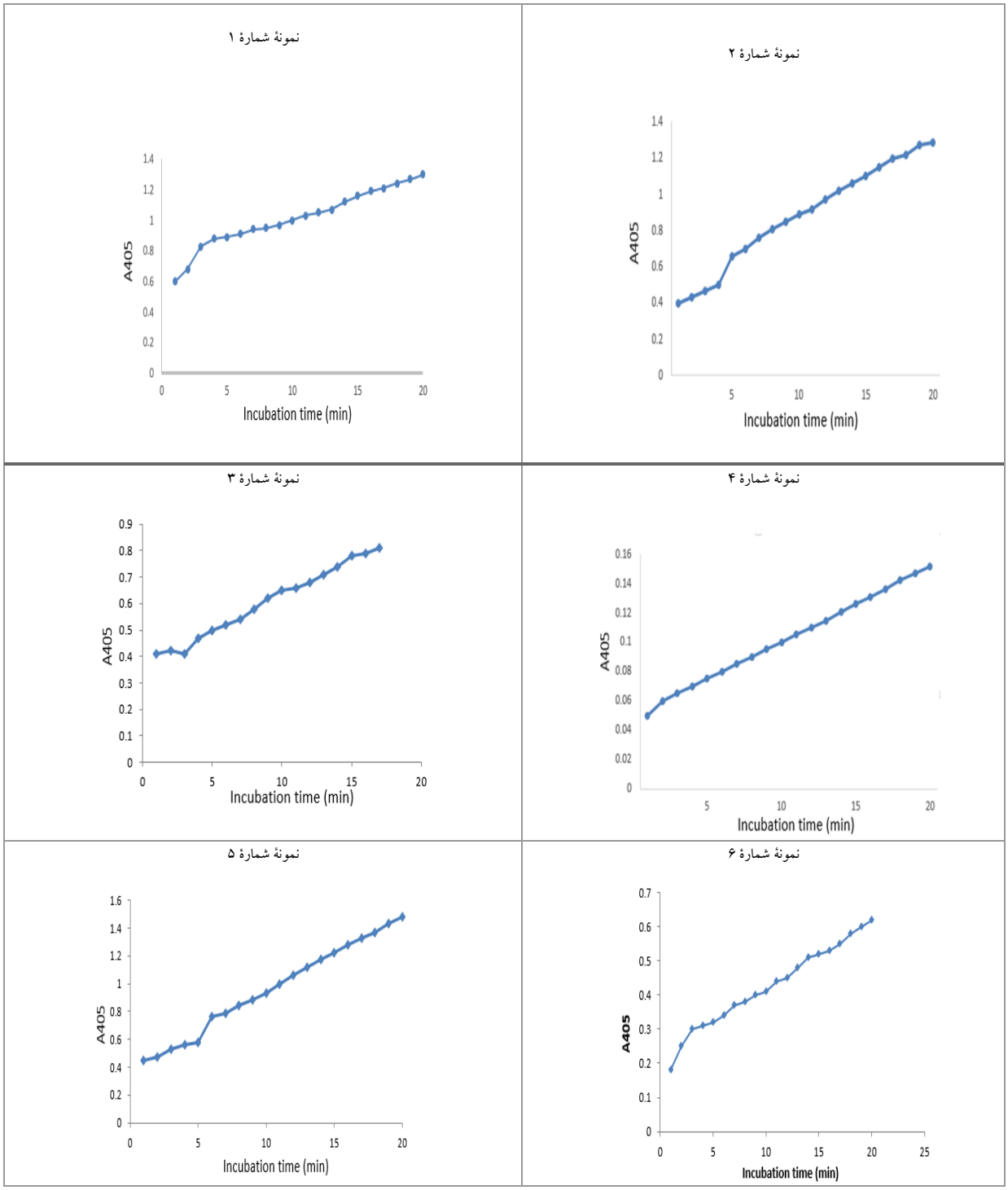
برای سنجش فعالیت آنزیم باکتری‌های غربالگری‌شده در محیط کشت اختصاصی کوتین و سپس در محیط LB کشت داده شدند. در یک ویال نمونه و در یک ویال Blank تهیه شد. از لحظه صفر افزایش جذب به‌دلیل تجزیه سوبسترای PNPB به مدت بیست دقیقه، هر یک دقیقه یک بار میزان تغییرات جذب سوبسترای PNPB در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری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

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.5.0]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.39]

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

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

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



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

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

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.5.0]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.39]

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

انجام تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

به کمک پایگاه‌های اطلاعاتی و نرم‌افزارهای بیولوژی توالی کامل ناحیهٔ کلون‌شده این شش سویه مطالعه شد. در ابتدا، به کمک پایگاه اطلاعاتی محاسبه‌ایleBIBI-QBPP این شش توالی تحلیل و آنالیز شدند (Flandrois *et al*., 2015). این سایت روابط فیلوژنتیکی هر توالی را کاملا 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 ثبت‌شده در بانک ژنی بیشترین شباهت را دارند. در این دندروگرام‌ها، تحلیل‌ها، شباهت و نزدیکی توالی‌های شناسایی‌شده با گونه‌هایی از سویه های *Klebsiella*، *Enterobacter*، *Larouletlla*، *Citrobacte*، *Yokenella*، *Leclercia* و *kluyvera* نشان داده شده است. توالی نمونهٔ شمارهٔ یک بیشترین نزدیکی را با گونه *Klebsiella oxytoca* (T AB004754) دارد. توالی نمونهٔ شمارهٔ دو بیشترین نزدیکی را با گونه *Klebsiella oxytoca* (T AJ871858) دارد. توالی نمونهٔ شمارهٔ سه بیشترین نزدیکی را با گونه *Klebsiella oxytoca* (T JQ0703000) دارد. توالی نمونهٔ شمارهٔ چهار بیشترین نزدیکی را با گونه‌هایی از *Enterobacter*، *Yokenella* و *Escherichia* دارد. توالی نمونهٔ شمارهٔ پنج بیشترین نزدیکی را با گونه *Klebsiella oxytoca* دارد. توالی نمونهٔ شمارهٔ شش نیز بیشترین نزدیکی را با گونه *Klebsiella oxytoca* دارد. این تحلیل‌ها نشان می‌دهند که نمونه‌های شمارهٔ یک، دو، سه، پنج و شش در زیر مجموعه باکتری‌های گونه *Klebsiella oxytoca* قرار داشته و نمونهٔ شمارهٔ 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.

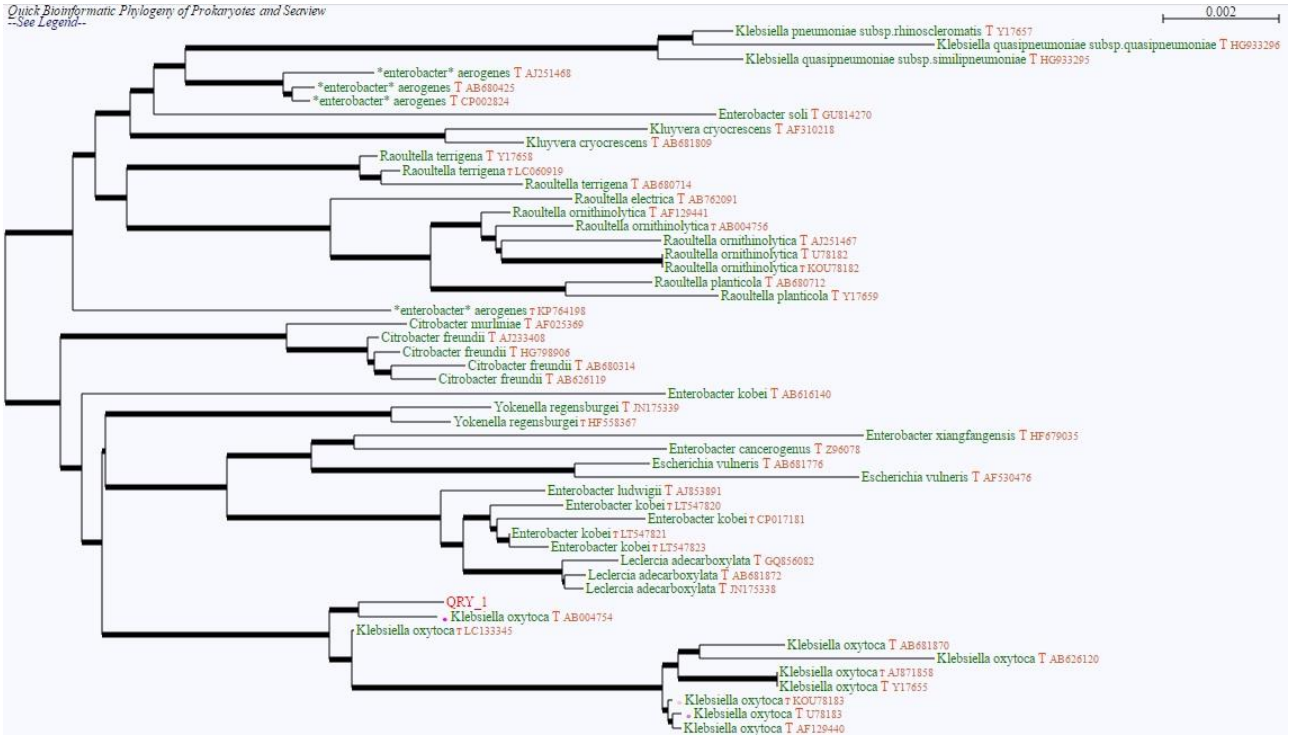
سپس، روابط فیلوژنتیکی این گونه‌ها به کمک نرم‌افزار SplitsTree4 تعیین شد (Huson & Bryant, 2006). شکل ۳ نمودار این درخت تکاملی در شکل ۳ نشان داده شده است. این تحلیل نشان می‌دهد که کوتینازهای پروکاریوتی از یوکاریوتی جدا شده‌اند. در ادامه، به منظور ارزیابی نمونه‌های جمع‌آوری شده از نظر آنزیم کوتیناز، توالی 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

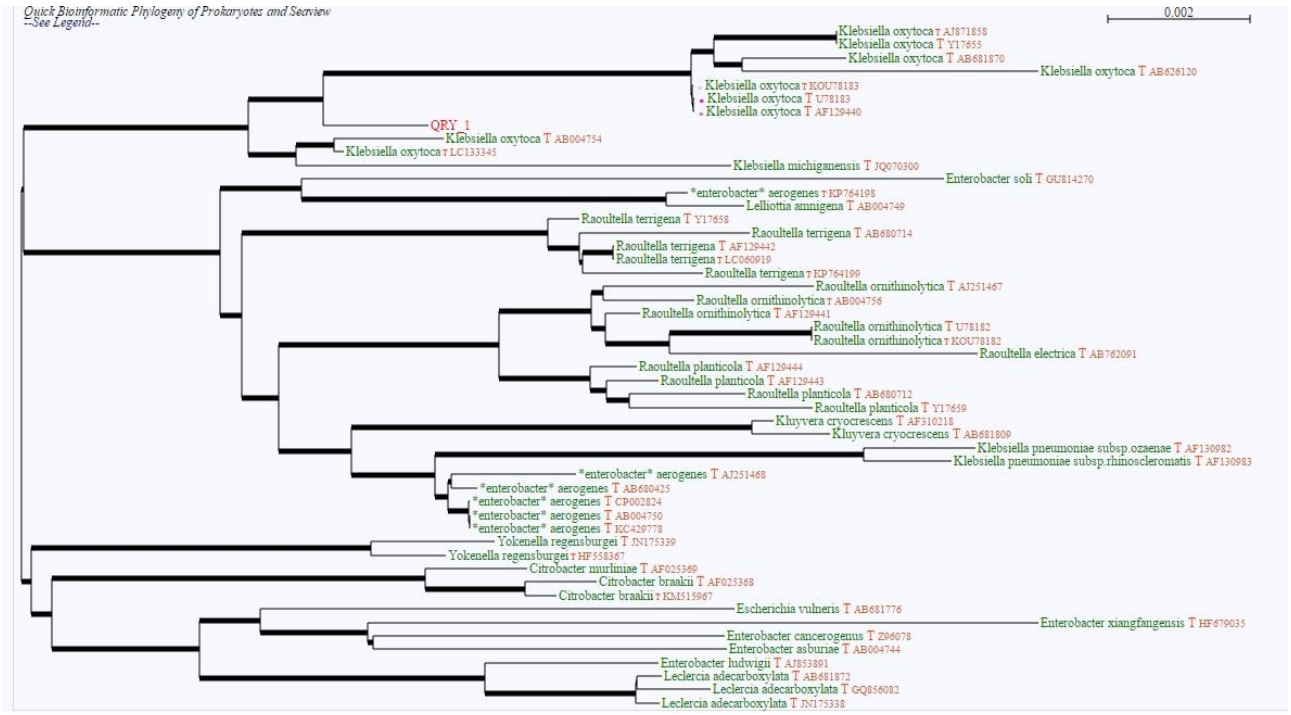
گیاهان به خاطر بافت خود قادر نیستند به سادگی از عوامل بیماری‌زای باکتریایی و قارچی دوری کنند بلکه باید از راه‌های دیگری از خویش حفاظت نمایند. یکی از این راه‌ها ایجاد لایه کوتین در سطح گیاه است. کوتین مانع از نفوذ باکتری‌ها و قارچ‌ها به گیاهان شده و از اجزای ساختاری کوتیکول گیاهان عالی محسوب می شود (Serrano *et al*., 2015). گونه‌های گیاهی مناطق خشک نسبت به زیستگاه‌های مرطوب دارای کوتین ضخیم‌تری هستند. ضخامت پلیمر در میان گونه‌ها واندام‌های 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 میکروارگانیزم‌ها مانند کوتین داشته باشد. با توجه به مطالعه پرورش و همکاران (Parvaresh *et al*., 2017) ، مشخص شده بود که سیب قرمز میزان بالایی از کوتین را دارا است. به این منظور در سه نوبت میوه سیب قرمز تهیه شد و میزان کوتین آن تحلیل شد. نتایج نشان می‌دهد که سیب 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 سیب 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 عمل‌کردی 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 خانوادهٔ کوتینازهای یوکاریوتی و پروکاریوتی تقسیم

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.5.0]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.39]



A

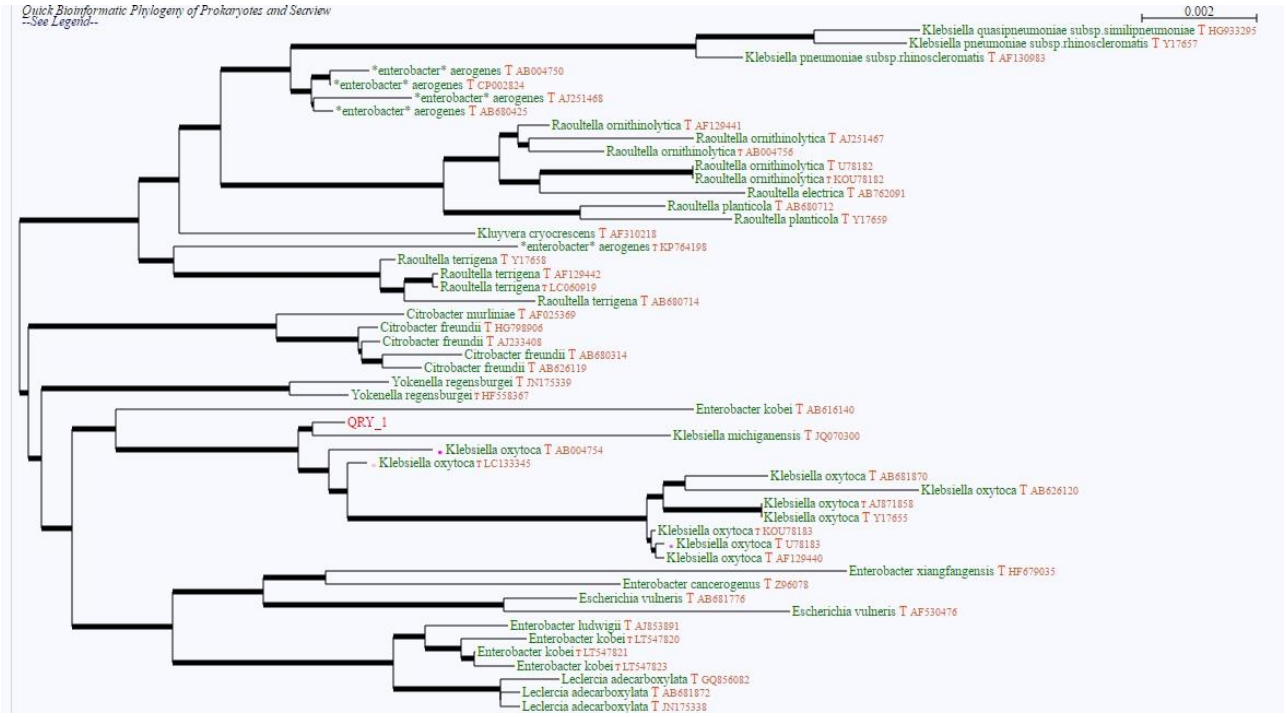


B

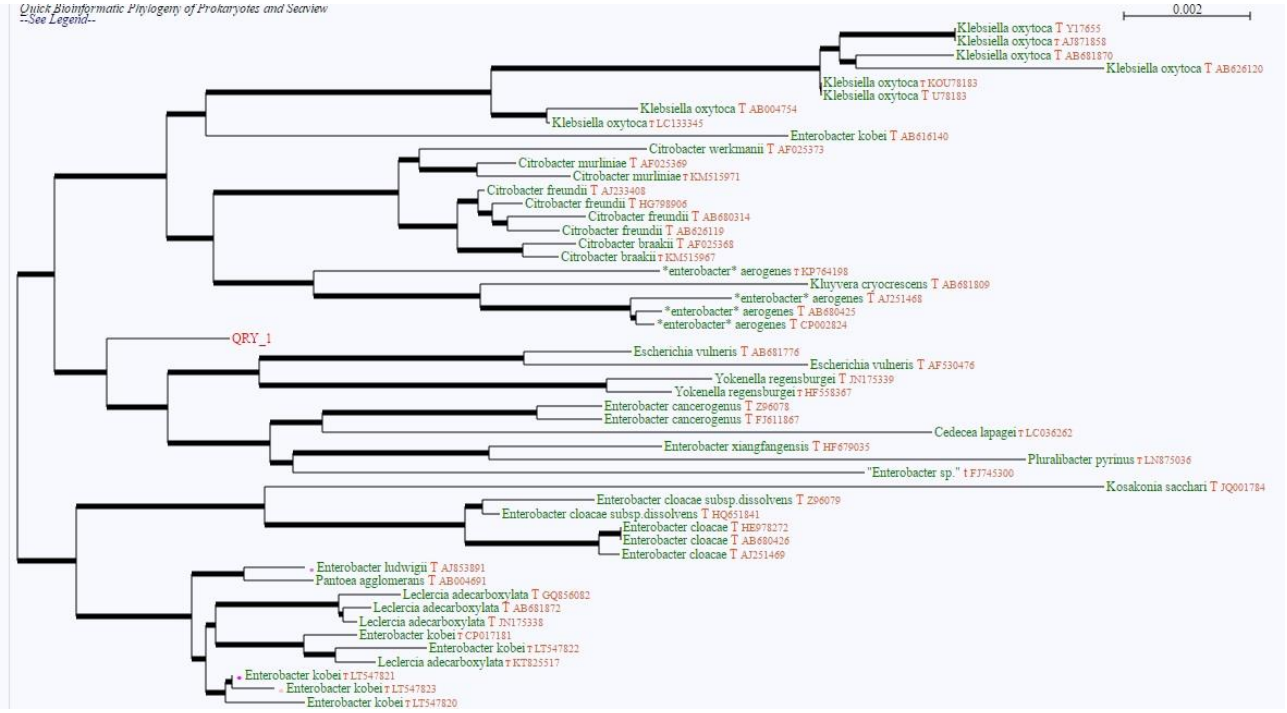
شکل ۲- تحلیل روابط فیلوژنتیکی توالی شش جداسازی شده به صورت مجزا و شناسایی نزدیکترین گونه‌ها به آنها. **A.** نمونهٔ شمارهٔ یک. **B.** نمونهٔ شمارهٔ دو. **C.** نمونهٔ شمارهٔ سه. **D.** نمونهٔ شمارهٔ چهار. **E.** نمونهٔ شمارهٔ پنج. **F.** نمونهٔ شمارهٔ شش.

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.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.5.0]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.39]



C

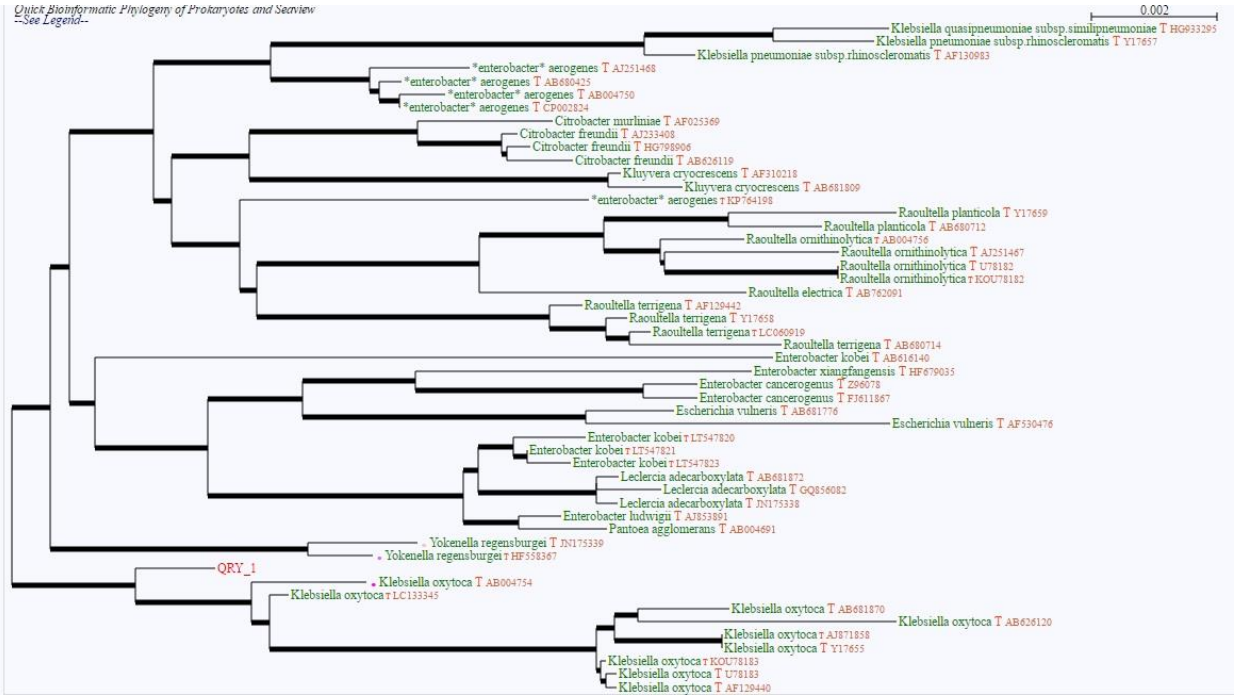


D

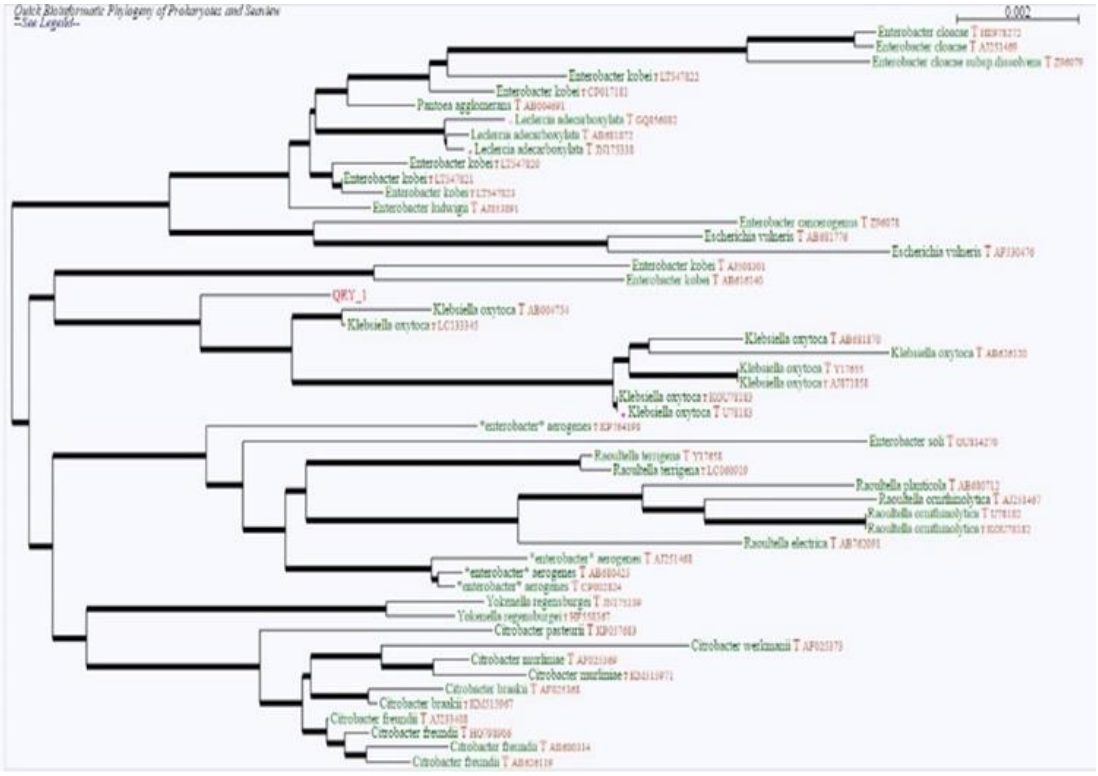
شکل ۲- ادامه.

Fig. 2. Continued.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.5.0]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.39]



E



F

شکل ۲- ادامه.

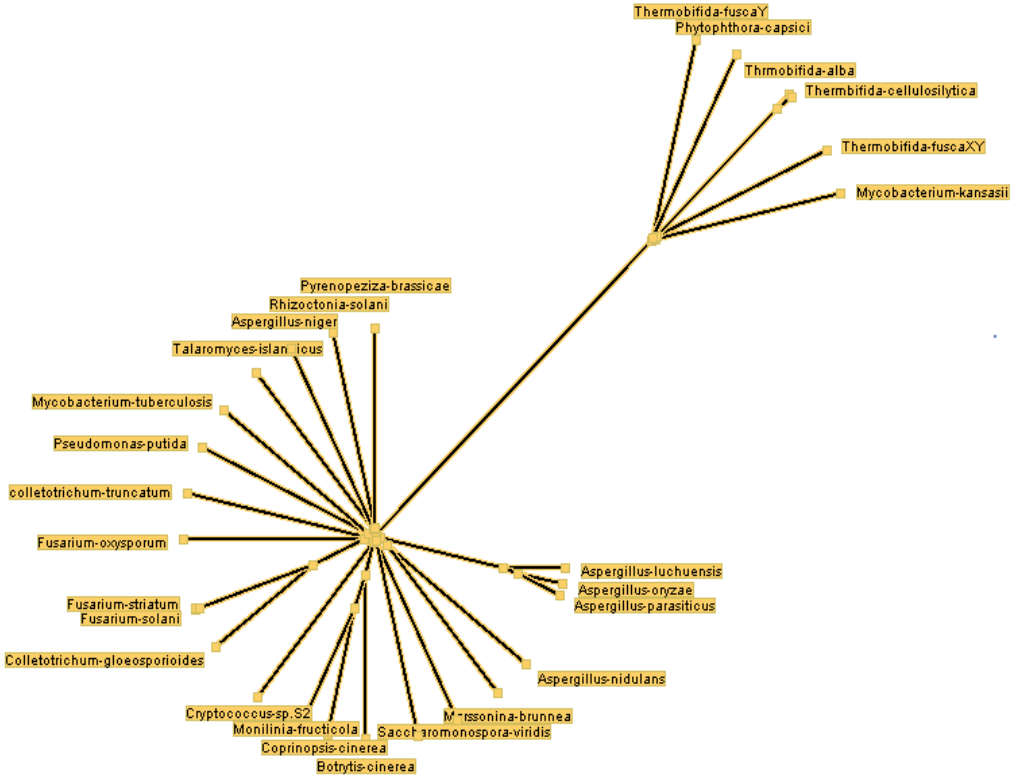
Fig. 2. Continued.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.5.0]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.39]

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

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

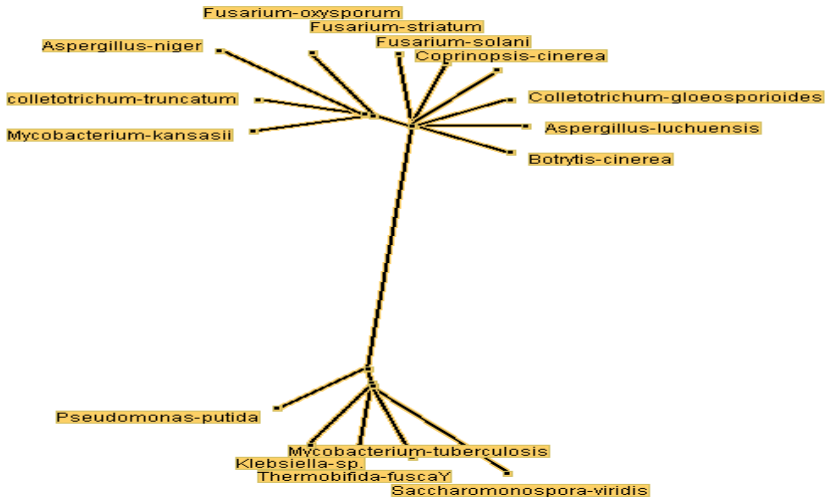
Species	GenBank accession number
Thermobifida fusca YX	AAZ54921.1
Fusarium solani pisi	AAA33334.1
Fusarium oxysporum	AHN19769.1
Aspergillus luchuensis	GAT21998.1
Aspergillus nidulans	ABF50887.1
Aspergillus niger	CAL00335.1
Aspergillus parasiticus SU-1	KJK61323.1
Aspergillus oryzae	BAA07428.1
Monilinia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

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.5.0]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.39]



شکل ۴- تحلیل روابط فیلوژنیکی شش نمونه براساس توالی 16sDNA.
Fig. 4. Phylogenetic analysis of six samples based on16sDNA.

تقسیم شوند (Calado *et al*., 2002). بیشتر قارچ‌ها و تعدادی از باکتری‌ها تولیدکنندهٔ 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 تجزیهٔ زباله‌های پلی‌استری و پلاستیک در محیط زیست است (Yoshida *et al*., 2016). کوتیناز به‌مثابهٔ آنزیمی سبز قادر به ازبین بردن زباله‌های پلی‌استرهای قابل تجزیه در طبیعت است و شناسایی سویه‌های بومی این آنزیم نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در بررسی مجدد ابتدا نمونه ها در محیط کشت حاوی کوتین وسپس، 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 مطالعهٔ مطالعات پرورش و همکاران (Parvaresh *et al*., 2017) ، در این مطالعه نیز میزان فعالیت نمونهٔ شمارهٔ 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 نمونهٔ شمارهٔ چهار در کنار سایر باکتری‌های سویه *Enterobacter* قرار میگیرد در حالیکه سایر نمونه‌ها در کنار سویه *Klebsiella* قرار می‌گیرند. در ادامه، به کمک پایگاه‌های اطلاعاتی- محاسباتی در ابتدا تعداد زیادی از نمونهٔ‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی تولیدکننده آنزیم کوتیناز بررسی و اطلاعات آنها جمع‌آوری و استخراج شد. سپس، میزان هم ترادفی و شباهت این توالی‌ها به‌کمک 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، به‌منظور ارزیابی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از نظر آنزیم کوتیناز، با بررسی مجدد این نمونه‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی تولیدکنندهٔ آنزیم کوتیناز، تعدادی را که توالی ناحیه ۱۶ srDNA آنها در ژن بانک ثبت شده بودند به همراه توالی‌های جدید تحت ارزیابی مجدد در نرم افزار 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 شناسایی‌شده 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 به‌دلیل فراهم‌کردن 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.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.5.0]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.39]

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.

Raziyafathima, 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. مطالعهٔ آنزیمی و بیوانفورماتیکی باکتری‌های بومی کوتینازی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۴۹-۳۹.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.5.0]

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.39]