

تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر  
*Microsporium canis* وفعالية إنزيم البروتيز

رسالة مقدمة إلى  
كلية العلوم – جامعة بابل  
و هي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في  
علوم الحياة/الأحياء المجهرية

قدمها  
حيدر شخير عبيس الجنابي  
بكالوريوس علوم الحياة/ أحياء مجهرية / كلية العلوم/ جامعة بابل  
٢٠٠١

محرم الحرام

شباط ٢٠٠٥ م  
٥١٤٢٦ هـ

# إقرار المشرفين

نشهد أن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم / جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة .

التوقيع:

الاسم: د. جواد كاظم الجنابي

التوقيع:

الاسم: د. رباب عمران راضي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم – جامعة بابل

التاريخ: / / ٢٠٠٥

المرتبة العلمية: مدرس

العنوان: كلية العلوم - جامعة بابل

التاريخ: / / ٢٠٠٥

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية التي قدمها الاستاذان المشرفان أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: د. علي شعلان الاعرجي

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية العلوم – جامعة بابل

التاريخ

## قرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة نشهد أننا أطلعنا على رسالة الطالب حيدر شخير عبيس في محتوياتها و فيما له علاقة بها و ذلك بتاريخ ١٣ / ٢ / ٢٠٠٥ ووجدنا أنها جديرة بالقبول بتقدير ( امتياز ) لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة/الأحياء المجهرية.

التوقيع:

رئيس اللجنة: **د.فائز صاحب غالي**

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم /جامعة القادسية

التاريخ: / / ٢٠٠٥

التوقيع:

عضو اللجنة: **د.سامي عبد الرضا**

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم / جامعة الكوفة

التاريخ: / / ٢٠٠٥

التوقيع:

عضو اللجنة: **د. حسن فاضل ناجي**

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم / جامعة بابل

التاريخ: / / ٢٠٠٥

التوقيع:

عضو اللجنة (المشرف): **د. جواد كاظم الجنابي**

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم /جامعة بابل

التاريخ: / / ٢٠٠٥

التوقيع:

عضو اللجنة (المشرف): **د. رباب عمران راضي**

المرتبة العلمية: مدرس

العنوان: كلية العلوم /جامعة بابل

التاريخ: / / ٢٠٠٥

مصادقة عمادة كلية العلوم – جامعة بابل

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع:

الأسم: **د. عودة مزعل الياسري**

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم / جامعة بابل

التاريخ: / / ٢٠٠٥

**Effect of some environmental factors on growth of  
*Microsporium canis* and protease activity**

**A Thesis**

**Submitted to the College of Science  
Babylon University  
In Partial Fulfillment of the Requirements  
For the Degree of Master of Science in  
Biology/Microbiology**

**By**

**Haider Shkheir Aubais Al-jenabi  
B.Sc.Biology/Micobiology, College of Science  
Babylon University**

**٢٠٠١**

## شكر وتقدير

الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي لولا ان هدانا الله هو مولانا وعلى الله فليتوكل المؤمنون والصلاة والسلام على خاتم الانبياء والمرسلين محمد واله الطيبين الطاهرين.

بينما اضع اللمسات الأخيرة بعد المشوار الطويل من العمل والبحث لا يسعني الا ان اتقدم بالشكر والعرفان الجميل الى استاذي الفاضلين الدكتور جواد الجنابي والدكتورة رباب عمران الجيلاوي لاقتراحهما موضوع البحث و دعمهما العلمي المتواصل خلال فترة البحث الطويل. واساءل الله تعالى ان يحفظهم من كل سوء وان يوفقهم لما فيه رضاه ومافيه خير لهم وصلاح في الدنيا والاخره انه سميع مجيب.  
كما اشكر رئاسة جامعة بابل وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة لاتاحتهم لي الفرصة في اكمال الدراسة.

واتقدم بالشكر الجزيل والامتنان الكبير الى كل من الدكتور سعد حنظل طارش والدكتور علي الهلالي/ مستشفى الهاشمية والدكتورة كريمة الخفاجي والدكتور هادي المرزوك/ مستشفى مرجان التعليمي لمساعدتهم في اخذ العينات السريرية. والدكتور عدنان الحمداني/جامعة القادسية و الدكتور ميكنون /بلجيكا لارسالهما الي البحوث العلمية العديدة. كما اشكر العاملين في مختبرات مستشفى الولادة للاطفال ومرجان والحلة الجراحي. ولايسعني إلا ان اشكر كلاً من الدكتور زيدان خليف المعموري والدكتور محسن حسين الخفاجي لتقويم الرسالة علمياً ولغويًا.

ويسرني أن أتقدم بالشكر لكل من الاخوة طلبة الماجستير محمود حسين هدوان واحمد علي ومحمد غانم والاخت طالبة الدكتوراه خالدة كاظم والى الانسه لى مجيد الاخ بسام الياسين لمساعدتهم في طباعة الرسالة، والى كل زملائي طلبة الدراسات العليا في قسم علوم الحياة و كل من مد لي يد العون اونطق بكلمة طيبة اتخذتها نصيحة.

## Summary

The specimens were collected from patient infected with tinea corporis and the causal agent was identified as *Microsporum canis*, the identification based on macroscopic and microscopic features. The fungus produces septate hyphae and wooly colonies. The color of the colony is white to deep yellow and brown from the reverse. Macroconidia were spindle shaped (3-8 cells), often with a predominant apical knob, with outer cell walls thicker than septal walls.

The effect of environmental factors e.g. nutrient compositions, temperature, pH and incubation period on the growth of *M. canis* were investigated. The growth of this fungus was substantially increased in sabouraud glucose agar compared with that in potato glucose agar and in mycobiotic media. The optimum temperature of growth was 20 °C but the growth was ceased at 27 °C and reduced at temperature below 20 °C.

The enzyme activity of *M. canis* was markedly varied according to the pH, temperature, substrate concentrations and to the nitrogen source amended to the culture medium.

The results showed that the environmental parameters have apparent effect on protease production. The optimal pH and temperature of enzyme production were 9 and 30 °C, respectively, by the use of human hair as a nitrogen source. Synthesis of protease was significantly higher in medium supplemented with peptone (125 unit/ml) at a concentration 0.26% than medium which containing wheat bran (58.0 unit /ml) at a concentration 0.26% and medium included human hair (50 unit /ml) at a concentration (0.02%).

Airing conditions have also substantial effect on enzyme production, as the highest amount of enzyme (59.0 unit/ml) was obtained after incubation fungal isolate for 5 days without shaking followed with 5 days shaking at 100 rpm/min., compared with that in continuous aeration (55 unit/ml) or without aeration (9 unit/ml). In addition to that, the results demonstrated that the optimum incubation period of enzyme production was 9 days.

The enzyme was partial purified (30.0 folds) from culture filtrated by sequential steps salting out with 80% saturation ammonium sulfate precipitation ( the specific activity was 836 unit/ mg protein) and stepwise of Diethyl amino ethyl- cellulose chromatography. The enzyme was apply on DEAE-cellulose column (0.0x7 cm) and the specific activity reached to 2053 unit/mg protein with recovery 72% and purification degree 30.0 folds.

The electrophoresis of the partial purified protease fraction in polyacrylamid gel with SDS was revealed that it was more than one protein bands. Characterization study of the partial purified enzyme was revealed that the enzyme had optimum activity at pH of 11 and the activity was stable in the alkaline pH range (8- 11 for 30 min). Enzyme activity toward casein increased with temperature up to 50°C and the maximum activity at 60°C. The enzyme was stable at temperature under 50°C and approximately 80% of the activity was abolished by incubation of the enzyme at 70 °C for 30 min.

## الخلاصة

عزل الفطر *Microsporium canis* من شخص مصاب بالسعفة الحلقية في الذراع وشخص اعتمادا على الصفات المظهرية والمجهريه. كون هذا الفطر على وسط سابرويد كلوكوز اكار مستعمرات بيضاء مصفرة من الجهة الاماميه وذات لون بني محمر من الجهة الخلفية للمستعمرة مع غزل صوفي كثيف وتكوين كونيادات كبيرة مغزليه الشكل مقسمه إلى خلايا (٣-٨) مع وجود عقد في نهاية الكونيده الطرفية .

أظهرت دراسة تأثير بعض الظروف البيئية في نمو الفطر بان أفضل وسط غذائي للنمو هو سابرويد كلوكوز أكار مقارنة مع وسطي البطاطا كلوكوز أكار والمايكوبايوتك أكار أما تأثير درجه الحرارة فقد توقف نمو الفطر عند ٣٧ م ووصل النمو إلى ذروته في درجه حرارة ٢٥ م. بينت الدراسة إن للعوامل البيئية تأثير واضحا على إنتاج إنزيم البروتيز باستعمال شعر الإنسان مصدرا للنتروجين حيث كان أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج الإنزيم هو ٩ وكانت درجه الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم هي ٣٥ م في حين كان أفضل مصدر نتروجيني للإنتاج هو البيبتون ٠.٢٦ % فقد بلغت الانتاجيه ١٢٤ وحده / مل ويليه نخاله الحنطة ٠.٢٦ % التي بلغت الفعالية الانزيميه عند استخدامها ٤٨.٥ وحده / مل كذلك الحال بالنسبة لشعر الإنسان إذ بلغت الفعالية ٤٠ وحده / مل. أظهرت النتائج إن الحضانه لمدته ٥ أيام بدون مزج تليها ٥ أيام مع المزج في الحضانه الهزازة بسرعة ١٥٠ دوره / دقيقه هي أفضل للإنتاج إذا بلغت الفعالية ٤٩.٥ وحده / مل بالمقارنة مع ظروف المزج المستمرة أو بدون المزج التي بلغت عندها الفعالية ٤٤ و ٩ وحده / مل على التوالي كما وجد إن مدته الحضانه المثلى لإنتاج الإنزيم هي ٩ أيام. تم تنقيه الإنزيم جزئياً بخطوتين متعاقبتين هما الترسيب في كبريتات الامونيوم بنسبه إشباع ٨٠% وبلغت الفعالية النوعية بعد الترسيب ٨٣٦ وحده/ ملغ بروتين وبعد عمليه الفرز الغشائي لنتاج عمليه الترسيب تم امرار الناتج خلال عمود من المبادل الأيوني Diethyl amino-ethyl-cellulose بـ ٠.٥ × ٧ سم ووجد إن الإنزيم المنقى جزئياً يمتلك فعالية نوعيه ٢٠٤٣ وحده / ملغ بروتين وبحصيله أنزيميه بلغت ٦٢ % ودرجه نقاوة ٣٥.٥ . درست بعض الخصائص الحركية للإنزيم وأجريت عملية الترحيل الكهربائي للمستخلص الأنزيمي المنقى جزئياً في هلام متعدد إكريل أميد بوجود الـ Sodium dodecyl sulphate (SDS) ووجد أن المستخلص يحتوي أكثر من حزمة بروتينية. إن درجه الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم تجاه ركيزة الكازئين هي ٥٥ م وإن الإنزيم يحتفظ بـ ١٠٠% من فعاليته الاصلية عند درجات حرارة تتراوح بين صفر-٢٥ م أما الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الإنزيم تجاه ركيزة الكازئين فهو ١١ وكان الإنزيم محتفظاً بـ ١٠٠% من فعاليته الاصلية عند الرقم الهيدروجيني ٩ كما إن أعلى ثباتيه للإنزيم كانت ضمن الحدود القاعدية من الرقم الهيدروجيني ٨-١٠.

## فهرست الأشكال

رقم الصفحة	العنوان	رقم الشكل
٣٦	مستعمرة الفطر <i>M. canis</i> على وسط سابروييد كلوكوز اكار بعد ١٤ يوم من الحضان و بدرجة حرارة ٢٥°م.	٤-١-أ
٣٧	مستعمرة الفطر <i>M. canis</i> من الجهة الخلفية على وسط سابروييد كلوكوز اكار بعد ١٤ يوم من الحضان و بدرجة حرارة ٢٥°م.	٤-١-ب
٣٨	العزل الفطري و الكونيدية الكبيرة (Macroconidia) لفطر <i>M. canis</i> على الوسط الغذائي سابروييد كلوكوز اكار بعد مدة حضان ١٤ يوما و بدرجة حرارة ٢٥°م (٢٥µm X ٤٠٠).	٤-١-ج
٣٩	تأثير نوع الوسط الغذائي الصلب على معدل نمو الفطر <i>M. canis</i> بدرجة حرارة ٢٥°م ولمدة ١٤ يوما من الحضان و قطر القرص المستخدم لقاحا ١٠ ملمتر.	٤-٢
٤٠	تأثير درجة الحرارة في نمو الفطر <i>M. canis</i> على وسط <i>SGA</i> ولمدة حضان ١٤ يوما و قطر القرص المستخدم لقاحا ١٠ ملمتر.	٤-٣
٤١	تأثير مدة الحضان في نمو الفطر <i>M. canis</i> على وسط <i>SGA</i> وفي درجة حرارة ٢٥°م و قطر القرص المستخدم لقاحا ١٠ ملمتر.	٤-٤
٤٢	تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر <i>M. canis</i> باستخدام وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) باستخدام شعر الإنسان مصدرا وحيد للنيتروجين بتركيز ٠.٥٢% عند درجة حرارة ٢٧°م بعد ١٠ أيام من النمو (٥ أيام ساكنة و ٥ أيام متحركة).	٤-٥
٤٣	تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر <i>M. canis</i> باستخدام وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) وباستخدام شعر الإنسان بتركيز ٠.٥٢% برقم هيدروجيني ٩ ولمدة ١٠ أيام (ساكنة).	٤-٦
٤٤	تأثير المصدر النيتروجيني في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر <i>M. canis</i> باستخدام وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) في درجة حرارة ٣٥°م ورقم هيدروجيني ٩ ومدة حضان ١٠ أيام (٥ أيام ساكنة و ٥ أيام متحركة).	٤-٧
٤٣	تأثير النسبة المئوية للشعر في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر <i>M. canis</i> باستخدام وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) في درجة حرارة ٣٥°م ورقم هيدروجيني ٩ ومدة حضان ١٠ أيام (٥ أيام ساكنة و ٥ أيام متحركة).	٤-٨
٤٦	تأثير مدة الحضان في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر في وسط <i>M. canis</i> Lee وجماعته (١٩٨٧) و برقم هيدروجيني ٩ و بدرجة حرارة ٣٥°م وباستخدام شعر الإنسان بتركيز ٠.٥٢% وفي ظروف التهوية المختلفة.	٤-٩
٤٩	الترحيل الكهربائي لإنزيم البروتيز المنقى جزئيا في هلام الاكريل امايد بوجود SDS-PAGE SDS بعد مرحلة كروماتوغرافيا التبادل الايوني (تركيز هلام اكريل امايد = ١٠%، الزمن = ٥ ساعات، الفولتية = ٥٠ فولت).	٤-١٠
٥٠	تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتيز المنتج من الفطر <i>M. canis</i> على وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) والمنقى جزئيا عند درجة حرارة ٣٧°م ومدة تفاعل ٢٠ دقيقة.	٤-١١
٥١	تأثير الرقم الهيدروجيني في نبات إنزيم البروتيز المنقى جزئيا من الفطر <i>M. canis</i> .	٤-١٢
٥٢	تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم البروتيز المنتج من الفطر <i>M. canis</i> على وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) والمنقى جزئيا برقم هيدروجيني ١١ ومدة تفاعل ٢٠ دقيقة.	٤-١٣
٥٣	تأثير درجة الحرارة في نبات إنزيم البروتيز المنقى جزئيا من	٤-١٤

## فهرست الجداول

رقم الصفحة	العنوان	رقم الجدول
٦	توزيع انواع الـ <i>Microsporium</i> على اساس المضيف الطبيعي لها	١-٢
٦	السلم التصنيفي للطور الجنسي وغير الجنسي للفطريات الخيطية الجلدية	٢-٢
٤٧	مراحل التنقية الجزيئية لإنزيم البروتيز المنتج من الفطر <i>M. canis</i>	١-٤

## فهرست المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع	ت
١	الفصل الأول/المقدمة	١
٤	الفصل الثاني/استعراض المصادر	٢
٤	الفطريات الجلدية الخيطيه وإصاباتهما	١-٢
٥	تقسيم الفطريات الجلدية الخيطيه على أساس المضيف الطبيعي لها	٢-٢
٦	تصنيف الفطريات الجلدية الخيطيه	٣-٢
٧	الفطر <i>Microsporum spp.</i>	٤-٢
٨	الاهمية الطبية	٥-٢
٩	إصابات الفطر <i>Microsporum spp.</i>	٦-٢
١٠	بعض العوامل البيئية المؤثرة في نمو الفطريات	٧-٢
١٠	الوسط الغذائي	١-٧-٢
١٢	درجة الحرارة	٢-٧-٢
١٢	الرقم الهيدروجيني	٣-٧-٢
١٣	مدة الحضانه	٤-٧-٢
١٣	بعض العوامل المؤثرة في إنتاج إنزيمات البروتيز	٨-٢
١٣	الرقم الهيدروجيني	١-٨-٢
١٤	درجة الحرارة	٢-٨-٢
١٤	مكونات الوسط الزراعي	٣-٨-٢
١٥	التهوية والمزج	٤-٨-٢
١٦	مدة الحضانه	٥-٨-٢
١٦	أنواع إنزيمات البروتيز وخصائصها	٩-٢
١٧	الأحياء المجهرية المنتجة لأنزيم الكيراتينيز	١٠-٢
١٨	دور إنزيمات البروتيز في الأمراض	١١-٢
١٩	تنقيه إنزيمات البروتيز	١٢-٢
٢١	دراسة بعض حركيات إنزيم البروتيز	١٣-٢
٢١	تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم البروتيز المنقى جزئيا وثباته	١-١٣-٢
٢٢	تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتيز المنقى جزئيا وثباته	٢-١٣-٢
٢٣	الفصل الثالث/ المواد وطرائق العمل	٣
٢٣	المواد الكيمياويه	١-٣
٢٣	الأوساط الزراعيه والمحاليل	٢-٣
٢٣	الأوساط الزراعيه	١-٢-٣
٢٤	المحاليل	٢-٢-٣
٢٧	طرائق العمل	٣-٣
٢٧	جمع العينات السريه	١-٣-٣
٢٧	عزل الفطر والفحص المباشر	٢-٣-٣
٢٧	نمو الفطر	٣-٣-٣

٢٧	تنقية الفطر وحفظه	٤-٣-٣
٢٧	تشخيص الفطر	٥-٣-٣
٢٨	تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر <i>Mirosporium canis</i>	٦-٣-٣
٢٨	الوسط الغذائي	١-٦-٣-٣
٢٨	درجة الحرارة	٢-٦-٣-٣
٢٨	مدة الحضانة	٣-٦-٣-٣
٢٩	تقدير فعالية إنزيم البروتيز	٧-٣-٣
٢٩	تقدير تركيز البروتين	٨-٣-٣
٣٠	تأثير بعض العوامل في إنتاج إنزيم البروتيز	٩-٣-٣
٣٠	الرقم الهيدروجيني	١-٩-٣-٣
٣٠	درجة الحرارة	٢-٩-٣-٣
٣٠	المصدر النيتروجيني	٣-٩-٣-٣
٣١	مدة الحضانة	٤-٩-٣-٣
٣١	التهوية	٥-٩-٣-٣
٣١	مراحل التنقية الجزئية لأنزيم البروتيز	١٠-٣-٣
٣١	الترسيب بكبريتات الأمونيوم	١-١٠-٣-٣
٣٢	الفرز الغشائي	٢-٨-٣-٣
٣٢	كروماتوغرافيا التبادل الايوني	٣-١٠-٣-٣
٣٢	تحضير المبادل الايوني	أ-٣-١٠-٣-٣
٣٢	المبادل الايوني كاربوكسي مثيل سيليلوز (CM <sub>١</sub> - cellulose)	١-أ-٣-١٠-٣-٣
٣٢	المبادل ثنائي اثيل امينو اثيل سيليلوز (DEAE <sub>١</sub> -cellulose)	٢-أ-٣-١٠-٣-٣
٣٣	عملية التنقية باستعمال المبادل الايوني	ب-٣-١٠-٣-٣
٣٣	التركيز بالأسيتون	٤-١٠-٣-٣
٣٤	توصيف الإنزيم	١١-٣-٣
٣٤	الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل امايد بوجود SDS (SDS.PAGE)	١-١١-٣-٣
٣٤	تحضير هلام الفصل (١٠%)	١-١-١١-٣-٣
٣٤	تحضير محلول الإنزيم	٢-١-١١-٣-٣
٣٤	تحضير محلول البروتينيات القياسية	٣-١-١١-٣-٣
٣٤	الترحيل الكهربائي	٤-١-١١-٣-٣
٣٥	دراسة بعض الخصائص الحركية لأنزيم البروتيز المنقى جزئياً	٢-١١-٣-٣
٣٥	تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم وثنائته	١-٢-١١-٣-٣
٣٥	تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم وثنائته	٢-٢-١١-٣-٣
٣٦	الفصل الرابع /النتائج	٤
٣٦	عزل وتشخيص الفطر	١-٤
٣٩	تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر <i>Microsporium canis</i>	٢-٤
٣٩	الوسط الغذائي	١-٢-٤
٤٠	درجة الحرارة	٢-٢-٤

٤١	مدة الحضانة	٣-٢-٤
٤٢	تأثير بعض العوامل في انتاج انزيم البروتيز	٣-٤
٤٢	الرقم الهيدروجيني	١-٣-٤
٤٣	درجة الحرارة	٢-٣-٤
٤٣	المصدر النتروجيني	٣-٣-٤
٤٥	التهوية والمزج ومدة الحضانة	٤-٣-٤
٤٦	التنقية الجزئية لانزيم البروتيز	٤-٤
٤٦	الترسيب بكبريتات الامونيوم	١-٤-٤
٤٨	كروماتوغرافيا التبادل الايوني	٢-٤-٤
٤٨	توصيف الانزيم	٥-٤
٤٨	الترحيل الكهربائي	١-٥-٤
٥٠	دراسة بعض الخصائص الحركية لانزيم البروتيز المنقى جزئيا	٢-٥-٤
٥٠	تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم وثباته	١-٢-٥-٤
٥٢	تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم وثباته	٢-٢-٥-٤
٥٤	الفصل الخامس/ المناقشة	٥
٥٤	عزل و تشخيص الفطر	١-٥
٥٤	تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر <i>M. canis</i>	٢-٥
٥٤	الوسط الغذائي	١-٢-٥
٥٥	درجة الحرارة	٢-٢-٥
٥٦	مدة الحضن	٣-٢-٥
٥٧	تأثير بعض العوامل في انتاج انزيم البروتيز من الفطر <i>M. canis</i>	٣-٥
٥٧	الرقم الهيدروجيني	١-٣-٥
٥٨	درجة الحرارة	٢-٣-٥
٥٨	الوسط الغذائي(المصدر النتروجيني)	٣-٣-٥
٦٠	مدة الحضن	٤-٣-٥
٦١	التهوية والمزج	٥-٣-٥
٦٢	مراحل التنقية الجزئية لانزيم البروتيز	٤-٥
٦٢	الترسيب بكبريتات الامونيوم	١-٤-٥
٦٣	تنقية انزيم البروتيز باستعمال كروماتوغرافيا التبادل الايوني	٢-٤-٥
٦٤	توصيف الانزيم	٥-٥
٦٤	الترحيل الكهربائي	١-٥-٥
٦٤	بعض الخصائص الحركية لانزيم البروتيز المنقى جزئيا	٢-٥-٥
٦٤	تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتيز وثباته	١-٢-٥-٥
٦٦	تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم البروتيز	٢-٢-٥-٥

	وثباته	
٦٨	الاستنتاجات	
٦٨	التوصيات	
٦٩	المصادر	

## CHAPTER ONE الفصل الأول

### 1- المقدمة Introduction

إن الفطريات الخيطية الجلدية dermatophytes هي مجموعة من الفطريات المترابطة القادرة على غزو الأنسجة الكيراتينية من الشعر والجلد والأظافر للإنسان والحيوانات , والإصابة التي تحدثها هذه الفطريات تعرف بـ dermatophytoses. وتضم هذه المجموعة ثلاثة أجناس هي: *Trichophyton* و *Microsporum* و *Epidermophyton*. (Matsumato, 1996).

تقسم الفطريات الخيطية الجلدية على أساس المضيف الطبيعي لها إلى ثلاث مجاميع رئيسية هي: الأنواع التي يكون المضيف الطبيعي لها هو الإنسان Anthrophilic والأنواع التي يكون المضيف الطبيعي لها الحيوانات Zoophilic ومنها تصيب الإنسان أما الأنواع التي تعيش مترمة في التربة على المواد الكيراتينية فيها تعرف Geophilic ومنها تصيب الإنسان أو الحيوانات. تتميز الإصابات الجلدية التي تحدثها الأنواع ذات الأصل الحيواني Zoophilic مثل *Microsporum canis* بأنها أشد التهاباً من الأنواع التي مصدرها الإنسان (Kwon-Chung and Benett, 1992; Weitzman and Summerbell, 1995).

يعدّ فطر *Microsporum canis* العامل الرئيس المسبب للإصابات الجلدية في القطط والكلاب وينتقل إلى الإنسان (Muller et al., 1989). وتزداد نسبة الإصابة في الإنسان في الدول الأوروبية نتيجة التماس المباشر مع الحيوانات المصابة (Lunder et al., 1992). إذ أصبح العامل السائد المسبب للسعفة الرأسية (*Tinea capitis*) في الدول الأوروبية وأمريكا الجنوبية والشرق الأوسط (Ali, 1990; El-Benhawi, 1991; Marchisio et al., 1996; De Meraes et al., 2000; Velho et al., 2000).

ومن الإصابات الجلدية التي يسببها هذا الفطر هي السعفة الحلقية (*Tinea corporis*) والسعفة الرأسية (*Tinea capitis*) والقرع (*Tinea favosa*) وسعفة الذقن (*Tinea barbea*) والأورام الحبيبية (*Mycetoma*) (Kwon-chung and Bennett, 1992).

تنتج الفطريات الخيطية الجلدية العديدة من الإنزيمات مثل البروتيز والكيراتينيز والايلاستيز واللايبيز والفوسفولايبيز والاميليز وانزيم DNAase (Muhsin and Salih, 2001; Viani et al., 2001). إن لإنزيمات البروتيز دوراً مهماً في زيادة ضراوة الفطريات الجلدية و امراضها نتيجة لنموها على الطبقة المتقرنة مثل الجلد والشعر والأظافر لتزودها بمصادر الكربون والنتروجين (Tsubio et al., 1989; Monod et al., 2002).

ينتج النوع *M. canis* عدداً من إنزيمات البروتيز. تقسم هذه الإنزيمات على أساس تركيب الموضع الفعال لها إلى بروتيز السيرين وبروتيز السيستين وبروتيز الاسبارتك والبروتيز المفلز او المعدني (Rao et al., 1998; Ward, 1983), وجميع هذه الأنواع تساهم في امراضية عدد كبير من الأحياء المجهرية (Simpanya and Baxter, 1996). كذلك تقسم إنزيمات البروتيز حسب الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها إلى حامضية وقاعدية ومتعادلة (Borriss, 1987).

يؤثر العديد من العوامل البيئية في نمو الأحياء المجهرية وإنتاجها لإنزيمات البروتيز مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني للوسط الزراعي ومكونات الوسط الزراعي فضلاً عن التهوية وطريقة التخمر المتبعة (Aunstrup *et al.*, ١٩٧٩).

وقد قام العديد من الباحثين بإنتاج إنزيمات البروتيز وتنقيتها من الفطريات الجلدية بعدة خطوات, شملت الترشيح المستدق (Ultrafiltration) والترشيح الهلامي (Gel filtration) وطريقة تبادل الشوارد (Ion-exchange) والترسيب بالأملاح اللاعضوية والمذيبات العضوية والتجفيد والهجرة الكهربائية (Lee *et al.*, ١٩٨٧; Tsubio *et al.*, ١٩٩٧; Mignon *et al.*, ١٩٩٨; Brouta *et al.*, ٢٠٠١).

ونظراً لأهمية فطر *M. canis* الطبية لما يحدثه من إصابات جلدية كثيرة ومتنوعة للإنسان ولقلة الدراسات حول هذا الجنس في القطر سيما في ما يتعلق بأهمية الظروف البيئية في نمو الفطر وفي قدرته على إنتاج إنزيمات البروتيز (Proteases) ودور هذه الإنزيمات في زيادة ضراوة الفطر من خلال مساهمتها في غزو الأنسجة الكيراتينية لتوفير المغذيات له، لذلك هدفت الدراسة إلى:-

١- دراسة تأثير بعض الظروف البيئية مثل الوسط الغذائي ودرجة الحرارة ومدة الحضان في نمو عزلة محلية من الفطر *M. canis*.

٢- دراسة بعض الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز من الفطر مثل الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة والمصدر النتروجيني وتركيزه والتهوية ومدة الحضان لإنتاج إنزيم البروتيز من الفطر.

٣- تنقية الإنزيم جزئياً ودراسة بعض حركياته.

## CHAPTER TWO الفصل الثاني

### ٢- استعراض المصادر Literatures review

#### ٢-١- الفطريات الخيطية الجلدية وإصاباتهما

إن الفطريات الخيطية الجلدية (Dermatophytes) لها القدرة على غزو الأنسجة الكيراتينية للإنسان والحيوان كالجلد والشعر والأظافر، لامتلاكها إنزيمات خارجية تقوم بتحطيم مادة الكيراتين مثل البروتينات. وتعد هذه الإنزيمات من العوامل المهمة التي تساهم في امراض وتنقية الكثير من الأحياء المجهرية (Samdani and Al-Bitar, ٢٠٠٣). (Simpanya and Baxter, ١٩٩٦). لاستطيع الفطريات الجلدية الخيطية مهاجمة الانسجة الحية تحت البشرة إلا في حالات نادرة مثل التقيحات (Abscesses) والأورام الحبيبية (Mycetoma) التي تحدثها هذه الفطريات في الأنسجة العميقة. ويعود سبب عدم غزو هذه الفطريات للأنسجة العميقة هو انخفاض تركيز الحديد فيها وتنافس الفطريات على الحديد مع بروتينات المصل مثل الترانسفيرين (Transferrin) أو تنشيط المتمم الذي يؤدي الى تحديد نمو الفطريات الجلدية او منعه في المرضى حتى لو كانوا يعانون من ضعف في الجهاز المناعي (Immunosupressed)، كما ان بعض الفطريات الخيطية الجلدية لا تستطيع احتمال درجة حرارة أعلى من ٣٥°م (Myrvik and Weiser, ١٩٨٨).

تختلف تفاعلات المضيف باختلاف مصدر الفطريات الخيطية الجلدية واختلاف النواتج الايضية للفطر وضراوة النوع أو السلالة والموضع التشريحي للإصابة والعوامل البيئية الموقعية، إذ ان السلالات أو الانواع ذات الاصل الحيواني Zoophilic تكون اشد ضراوة في الإصابة وإثارة للاستجابة المناعية والالتهابية مقارنة بالانواع ذات الاصل البشري Anthropophilic وهذا يلاحظ في السعفة الرأسية (Tinea capitis) التي يسببها الفطر *Microsporum canis* (Weitzman and Summerbell, ١٩٩٥)، وتفاعلات المضيف الناتجة من تحطيم الكيراتين واستجابة المضيف الالتهابية تشمل حكة (Itch) وتقشرا (Squamation) وأحيانا لطاخا التهابية (Inflammatory patches) في الجلد وفقدان الشعر (Ellis, ١٩٩٤).

#### ٢-٢- تقسيم الفطريات الخيطية الجلدية على أساس البيئة الطبيعية لها

تم توزيع الفطريات الخيطية الجلدية على أساس البيئة الطبيعية لها (Natural habitat) إلى ثلاث مجاميع رئيسية هي :

أ- الأنواع التي يكون المضيف الطبيعي لها هو الانسان Anthropophilic species مثل *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum audouinii*.

ب- الأنواع التي يكون المضيف الطبيعي لها هو الحيوان Zoophilic species ومنها تنتقل إلى الانسان وتحدث الإصابة فيه مثل الفطريات *Trichophyton mentagrophtes*, *Microsporum canis*.

جـ الأنواع التي يكون المضيف الطبيعي لها التربة Geophilic species ومنه تنتقل الى الانسان او الحيوانات لتحدث الإصابة مثل *Epidermophyton stockdaleae*, *Trichophyton ajelloi*, *Microsporium gypseum* ويمكن توزيع الأنواع العائدة إلى الجنس *Microsporium* على أساس المضيف الطبيعي لها (Kwon-Chung and Benett, ١٩٩٢; Weitzman and Summerbell, ١٩٩٥) كما هو مبين في الجدول الآتي:-

جدول (٢-١): توزيع أنواع *Microsporium* على أساس المضيف الطبيعي لها.

الأنواع التي يكون المضيف الطبيعي لها الإنسان Anthrophilic species	الأنواع التي يكون المضيف الطبيعي لها الحيوانات Zoophilic species	الأنواع التي يكون المضيف الطبيعي لها التربة Geophilic species
<i>Microsporium audouinii</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. amazonicum</i>
<i>M. ferruginum</i>	<i>M. equinum</i>	<i>M. boullardii</i>
	<i>M. gallinae</i>	<i>M. cookei</i>
	<i>M. Persicolor</i>	<i>M. gypseum</i>
		<i>M. nanum</i>
		<i>M. Paraecox</i>
		<i>M. racemosum</i>
		<i>M. ripariae</i>
		<i>M. vanbreuseghemii</i>
		<i>M. fulvum</i>

### ٣-٢- تصنيف الفطريات الخيطية الجلدية

تمتلك بعض الفطريات الخيطية الجلدية طورين أساسيين هما الطور الجنسي (Teleomorph state) والطور غير الجنسي (Anomorph state) ويبين الجدول (٢-٢) المفتاح التصنيفي للطورين (Weitzman, ١٩٨٦):-

جدول (٢-٢): السلم التصنيفي للطور الجنسي وغير الجنسي للفطريات الخيطية الجلدية.

الطور الجنسي Teleomorph state	الطور غير الجنسي Anomorph state
Kingdom: Fungi	Kingdom : Fungi
Phylum: Ascomycota	Phylum: Deutromycota
Order: Onygenales	Class: Hyphomycetes
Family: Arthrodermataceae	Family: Moniliaceae
Genus: <i>Arthroderma</i>	Genus: <i>Microsporum, Trichophyton, Epidermophyton</i>

٢-٤-٤ - الفطر *Microsporum spp.*

٢-٤-٤-١ - الخصائص المظهرية للفطر

يمتاز النوع *M. canis* بنموه السريع على الوسط الصلب سابرويد المحور (Modified Sabouraud's Agar) مكوناً مستعمرات بيضاء إلى صفراء أو بييجي مع غزل فطري هوائي صوفي كثيف، ويكون لون المستعمرة الفطرية من الجهة الخلفية للتطبيق صفراء إلى بنية محمرة. يحتوي هذا النوع المعقد على عدة ضروب مثل *M. canis var. canis* الذي يتميز بانتشاره الواسع وكثرة إصاباته للإنسان. والضرب الثاني هو *M. canis var. distortum* المعزول من مناطق من نيوزيلندا وأستراليا وأمريكا الجنوبية والولايات المتحدة. أما الضرب الثالث هو *M. canis var. obesum* ، والمضيف الطبيعي لفطر *M. canis* هو القطط والكلاب ومنها ينتقل إلى الإنسان ويحدث الإصابة (Kwon-Chung and Bennett, ١٩٩٢).

٢-٤-٤-٢ - الخصائص المجهرية للفطر

يمتاز جنس *Microsporum* بامتلاكه كونيدات كبيرة (Macroconidia) مغزلية الشكل (Spindle shape) ذات أبعاد تتراوح بين ٧ - ٢٠ × ٣٥-١٢٥ مايكرومتر مع تثخن في جدرانها واحتوائها على الأشواك ، ويزداد تثخن الجدران في النهاية البعيدة من الكونيدة في بعض الأنواع مثل *M. canis* و *M. audouinii* . كذلك تكون بعض أنواع *Microsporum* كونيدات صغيرة (Microconidia) صولجانية الشكل (Clavate shape) ذات أبعاد تتراوح بين ٢.٥-٣.٥ × ٤-٧ مايكرومتر. وتكون معظم عزلات النوع *M. canis* كونيدات كبيرة مغزلية الشكل أبعادها تتراوح بين ١٥-٢٠ × ٦٠-١٢٥ مايكرومتر وذات جدران خشنة أو شوكية سميكة. تحتوي الكونيدات الكبيرة عادة عقداً (Knob) غير متناسقة وتكون جدران الكونيدة أكثر خشونة عندها. تقسم الكونيدات الكبيرة بحواجز عرضية إلى ٣-١٥ خلية. كذلك تكون كونيدات صغيرة صولجانية الشكل أبعادها تتراوح بين ٢.٥-٣.٥ × ٤-٧ مايكرومتر . ويمتلك هذا النوع طوراً جنسياً يعرف *Arthroderma otae* (Kwon-Chung and Benett, ١٩٩٢).

## ٢-٥- الأهمية الطبية

لا بد من الإشارة قبل التحدث عن الأهمية الطبية لجنس *Microsporum* الى ان الاصابات التي تحدثها الفطريات الجلدية يمكن تلخيصها بما يلي:

١- الإصابات الفطرية الجلدية السطحية *Superficial mycosis*، وهي الإصابات التي تقتصر على الطبقة السطحية الميتة من البشرة والشعر ولا تمتد إلى الأنسجة الحية.

٢- الإصابات الفطرية الجلدية *Cutaneous mycosis*، وهي اصابات الطبقة المتقرنة من الجلد والشعر والاطافر و تمتد لتصيب الأنسجة الحية من البشرة.

٣- الإصابات الفطرية تحت الجلد *Subcutaneous mycosis*، وهي الإصابات التي تمتد إلى الأنسجة العميقة تحت البشرة.

يسبب *Microsporum* الإصابات الفطرية (*Cutaneous mycosis*) للجلد والشعر التي تعرف بالسعفة (*Tinea*). ونادرا ما يسبب اصابة الانسجة الحية تحت الجلد وتعرف بالاورام الحبيبية (*Mycetoma*) (Wagner and Bennett, ١٩٩٢; Kwon-Chung and Sohnle, ١٩٩٥).

إن التباين الواسع في الاعراض السريرية يعتمد على الانواع والسلالات وحجم اللقاحات وموضع الاصابة والحالة المناعية للمضيف (Ellis, ١٩٩٤). ويمكن ايجاز الاعراض السريرية التي يسببها الفطر *Microsporum* بما يأتي:

### أ- السعفة الرأسية *Tinea capitis*

هي اصابة فطرية جلدية لفروة الرأس وأكثر الانواع التي تسبب اصابات السعفة الرأسية غير الملتهبة (*Gray patch type*) هي *M. audouinii*, *M. ferruginum* أما الاصابات الملتهبة (*Kerion*) فتسببها الانواع ذات الاصل الحيواني مثل فطر *M. canis* والانواع التي مصدرها التربة مثل فطر *M. gypseum* (Matsumoto, ١٩٩٦; De Moraes et al, ٢٠٠٠).

### ب- السعفة الحلقية *Tinea corporis*

تشمل جميع الاصابات الفطرية الخيطية للجلد الاملس (*Glabrous skin*) من الجسم عدا بعض المناطق مثل راحة اليد وباطن القدم والمنطقة الاربية. وأكثر الانواع شيوعاً في احداث الاصابة هو *M. canis* (Marchiso et al., ١٩٩٦; Velho et al., ٢٠٠٠).

### ج- القرع *Tinea Favosa (Favus)*

هو اصابات فطرية مزمنة لفروة الرأس تتميز هذه الاصابات بتكوين غلاف من قشرة صفراء في فروة الراس تدعى الصفائح (*Scatula*). والمسبب للقرع النوع *M. gypseum* (Matsumoto, ١٩٩٦).

### د- سعفة الذقن *Tinea barbea*

هي اصابات فطرية تحدث في منطقة اللحية في الذكور البالغين ويصاحب المرض التهاب جريبات الشعر مع بثور. وتكون الانواع ذات الاصل الحيواني اشد التهاباً. (Kwon-Chung and Benett, ١٩٩٢; Weitzman and Summerbell, ١٩٩٥).

### هـ- الاورام الحبيبية *Mycetoma*

هي اصابة الانسجة الحية تحت الجلد مع تكوين حبيبات بيضاء مصفرة ذات قطر ٥٠-٨٠ مايكرومتر وتحتوي هذه الحبيبات الغزل الفطري المقسم وقد تحتوي مادة تشبه

الاسمنت (Cement like materail) تربط الغزل الفطري وتكون بشكل ورم في فرو الرأس وقد تمتد الاصابة الى الجهة الخلفية من العنق (Kwon-Chung and Bennett, 1992). ومن الانواع المعزولة هي *M. audouinii* و *M. canis* (King et al., 1999). (Ajello et al., 1980; Barson, 1985).

## ٦-٢- إصابات الفطر *Microsprum spp.*

اشار Di-Silverio وجماعته (1989) الى أن أكثر الاصابات الفطرية الجلدية في ايطاليا يسببها النوع *M. canis*. فقد بلغت نسبة الاصابات الجلدية بهذا النوع في مدينة تورين الايطالية حوالي ٣٤.٦% مقارنة بالانواع الاخرى بصورة عامة وشكل نسبة ٩٤.٢% من بين الانواع الاخرى في احداث السعفة الراسية (Marchisio et al., 1996). ووجد ان اعلى نسبة من الاصابات بالفطريات الجلدية الخيطية تسببها الانواع ذات الاصل الحيواني Zoophilic وهي *M. canis* و *T. mentagrophytes* إذ بلغت ٨١% (Attapatu, 1989). وفي دراسة عن السعفة الراسية في دولة قطر كانت نسبة الاصابة التي يحدثها الفطر *M. canis* قد بلغت اعلى مستوى وهي ٨٦.٨% يليه الفطر *M. ferruginum* (El-Benhawi et al., 1991).

لوحظ في دراسة عن السعفة في البرازيل ان النوع *M. canis* هو العامل السائد المسبب للسعفة الحلقية وبلغت نسبته ٧٠.٥% وبلغ النوع الملتهب Kerion الذي يحدثه النوع نفسه حوالي ٤٤.٤% (De Moraes et al, 2000). وقد سبق ذلك عزل النوع *M. gypseum* من شخصين مصابين بمرض الايدز ومن اصابة بالسعفة الحلقية في البرازيل (Porro et al., 1997). اما في مدينة بورتو البرتغالية فقد بلغت الاصابة بالسعفة التي يسببها النوع *M. canis* حوالي ٢٢.٧% مقارنة مع الانواع الاخرى (Velho et al., 2000).

اما بالنسبة الى الاصابات الفطرية في العراق فقد لوحظ ان الجنسين *M. ferruginum* و *T. schoenleinii* هما اكثر مسببات السعفة الراسية في الموصل (Yehia, 1980). وسجل النوع *M. canis* مسبباً للسعفة الراسية لأول مرة في العراق من قبل كل من Sharquie و Al-Zubaidi (1985). وفي دراسة اخرى في بغداد وجد ان نسبة الاصابة بالسعفة الراسية التي يسببها الفطر *M. canis* قد بلغت ٥٥.١% (Ali, 1990).

## ٧-٢- بعض العوامل البيئية المؤثرة في نمو الفطريات

### ١-٧-٢ الوسط الغذائي

تؤثر محتويات الاوساط الزراعية بصورة مباشرة في نمو الاحياء المجهرية عندما تكون تراكيز مكوناتها قليلة جداً، ففي الاوساط الزرعية المخففة تتناسب سرعة النمو تناسباً طردياً مع تراكيز المواد المغذية للاحياء المجهرية (السعد، 1990). ان من اهم مكونات الوسط الزرعى الضرورية لنمو الاحياء المجهرية مصدرى الكربون والنتروجين، اللذين يؤثران بشكل فعال في معدل نمو الفطريات باختلاف أنواعها وتراكيزها (Cuenca-Estrella et al., 2001; Meletiadis et al., 2001). يعد الكلوكوز من مصادر الكربون المهمة المستعملة في تنمية الفطريات المختلفة اذ انه يؤثر بشكل ملحوظ على معدل نمو الفطريات (Meletiadis et al., 2001). كما تستخدم بعض الزيوت النباتية مصدراً للكربون في أثناء نمو بعض الفطريات المنتجة لانزيم اللايباز (Lipase) كما في فطر *Penicillim aurantiogriseum* (Lima et al., 2003). تستعمل المصادر النتروجينية العضوية وغير العضوية في تنمية الفطريات المختلفة تشمل المصادر العضوية البيبتون وخالصة الخميرة والاحماض الامينية الحرة Larcher et

(Drori et al., 2003; Takasuka et al., 2000; al., 1996). أما المصادر النترولوجينية غير العضوية فتكون بشكل كبريتات او كلوريدات او فوسفات الامونيوم (السعد، 1990). يؤثر النقص او التجويع في مصادر الكربون والنتروجين على معدل نمو الفطريات وشكلها اذ تتحول الفطريات ثنائية الشكل (Dimorphism) من شكل الخميرة (Yeast form) الى الشكل الخيطي (Filamentous form) (Palecek et al., 2002). تقوم الفطريات المحبة للكيراتين (Keratinophilic fungi) باستغلال البروتينات مصدراً للكربون والنتروجين معاً لكنها تنمو بشكل افضل عند وجود السكريات مثل الكلوكوز مصدراً للكربون مع البروتينات (Kunert, 2000). استعملت الاوساط الحاوية للبيتون مصدراً وحيداً للنتروجين في عزل الفطريات الجلدية مثل وسط سابرويد كلوكوز اكار (Sabouraud Glucose agar) ووسط مايكوبايوتك اكار (Mycobiotic agar) (Mignon et al., 1998; Marchisio et al., 1998; Aubaid, 1997; , 1998).

لقد قام Sinski وجماعته (1977) بدراسة تاثير نوع الوسط الغذائي في عملية عزل النوعين *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* باستخدام وسط سابرويد كلوكوز اكار ووسط Taplin dermatophyte test medium ووسط Yossef ولاحظوا ان كل الاوساط المستخدمة تدعم نمو الفطريات ولا توجد اختلافات معنوية في عدد المستعمرات الناتجة. في حين وجد ان هذين النوعين ينموان في وسط مرق السابرويد ديكستروز بشكل افضل من وسط Yeast nitrogen base (Takasuka, 2000). ووجد ان معدل نمو الكونيدات في الفطريات الجلدية يعتمد على نوع الوسط الغذائي اذ لوحظ ان معدل انتاج الكونيدات للنوع *M. canis* كان كبيراً مقارنة بوسط Heinz oatmeal cereal agar ثم تلاه وسط Potato dextrose agar واخيراً وسط Mycoseal agar الحاوي على 1% خلاصة الخميرة (Jessup et al., 2000). وأشار Meletiadis وجماعته (2001) ان وسط مرق السابرويد كلوكوز هو افضل الاوساط المستخدمة في تحفيز معدل نمو الغزل الفطري ونسبة الانبات في الفطريات *A. fumigatus* و *Rhizopus microsporus* مقارنة بالوسط Yeast nitrogen base والوسط 1640 RPMI (Rose well parls memorial instudiant) والوسط 3 Antibiotic medium.

## ٢-٧-٢ درجة الحرارة

تؤثر درجة حرارة الوسط الغذائي في الفعاليات الحيوية في الخلية، اذ ان لكل فعالية حيوية تقوم بها الاحياء المجهرية درجة حرارة دنيا ومثلى وعليا، فقد قسمت الاحياء المجهرية الى ثلاث مجاميع هي الاليفة للحرارة العالية (Thermophilic) التي تنمو في شكل افضل في درجة حرارة اعلى من 40م والاليفة للحرارة المتوسطة (Mesophilic) التي تنمو في شكل افضل بين درجتي الحرارة 25-40م اما الاليفة للبرودة (Psychrophilic) فانها تنمو في درجة حرارة اقل من 25م (السعد، 1990). الفطريات الاليفة لدرجات الحرارة المتوسطة (Mesophilic) تنمو جيداً بين درجتي حرارة 23-30م (Bull and Bushnell, 1976). ان الفطريات الجلدية متوسطة التحمل الحراري (Moderately thermophilic) ومعظمها تنمو جيداً بدرجة حرارة 37م خارج الجسم الحي، كما ان درجة الحرارة المثلى لنمو الفطريات الجلدية تتراوح بين 25-35م ولا تستطيع النمو بدرجة حرارة 40م، في حين بعض الانواع لا تنمو بدرجة حرارة 37م (Weitzman and Summerbell, 1995). كما ان درجة الحرارة المثلى المستخدمة في تنمية الفطريات الجلدية تتراوح بين 25-27م (Marchisio et al., 1998; Norris et al., 1997; Muhsin et al., 1996; al., 1996). أشار Norris وجماعته

(١٩٩٩) الى عدم وجود اختلافات على مستوى النمو لكل من النوعين *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* عند تنميتها في درجة ٣٧ و ٣٠م. وقد استخدمت درجة الحرارة ٣٠م لتقدير معدل نمو الكونيدات في عزلات سريرية من الفطريات الجلدية ومنها النوع *M. canis* واستخدمت درجة الحرارة ٣٥م في اختبار فعالية بعض المضادات الحيوية في نمو هذه الفطريات الجلدية (Jessup et al., ٢٠٠٠).

#### ٣-٧-٢ الرقم الهيدروجيني

يتأثر نمو الفطريات والعديد من فعاليتها الحيوية الاخرى بالرقم الهيدروجيني للوسط الزراعي , إذ إنه يؤثر في الحالة الايونية لمكونات الوسط الزراعي وجهازية الاحماض الامينية والمغذيات الاخرى في الوسط وامكانية ان تستغلها الفطريات Danew and (Klossek, ١٩٨٩). إن نمو الفطريات الجلدية في وسط غني بالسكريات يؤدي الى جعل الوسط حامضياً مما يؤدي إلى تثبيط نموها (Kunert, ١٩٨٨) , لذلك تضاف املاح الدوارىء للاوساط الزراعية للمحافظة على الرقم الهيدروجيني للوسط ضمن المدى الامثل للنمو. تتميز الفطريات الجلدية بنموها في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني (٤-١١) إلا أنها تنمو في شكل افضل في الاوساط الزراعية المحتوية املاح الدوارىء وبرقم هيدروجيني يتراوح بين ٦-٧.٥ وقد يتحول الوسط الى القاعدية حول الغزل الفطري في اثناء نموها (Kunert, ٢٠٠٠). وجد أن الرقم الهيدروجيني يؤثر في عملية التعبير الجيني لبعض الجينات المسؤولة عن تغيير الشكل في خميرة *Candida spp.* (Ramon et al., ١٩٩٩).

#### ٤-٧-٢ - مدة الحضانة

تتباين مدة الحضانة اللازمة لنمو الفطريات باختلاف انواعها والوسط الغذائي ودرجة الحرارة المستخدمة في النمو. اذ تحضن الفطريات الجلدية مدة لا تقل عن ١٥ يوماً عند عزلها , وتتلف الأوساط الزراعية التي لا يظهر فيها نمواً بعد مدة حضانة أربعة أسابيع (Kwon-Chung and Bennett, ١٩٩٣; Marchisio et al., ١٩٩٦; Muhsin et al., ١٩٩٧).

تؤثر مكونات الاوساط الغذائية و مدة الحضانة في انتاج الكونيدات من الفطريات الجلدية اذ لوحظ ان الفطر *M. canis* ينتج عدداً كبيراً من الكونيدات في وسط Heinz oatmeal cereal agar بعد مدة حضانة ٤ ايام إلا انه لا ينتج الكونيدات في وسط Potato dextrose agar ووسط Mycoseal agar الا بعد مدة حضانة ٧ ايام وبعدها قليلاً من الكونيدات نسبياً (Jessup et al., ٢٠٠٠). ويختلف معدل نمو الفطريات الخيطية الامثل باختلاف الاوساط الغذائية وانواع الفطريات (Meletiadiis et al., ٢٠٠١).

#### ٨-٢ - بعض العوامل المؤثرة في انتاج انزيمات البروتيز

يؤثر العديد من العوامل في نمو الاحياء المجهرية وإنتاج انزيمات البروتيز مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني للوسط الزراعي ومكونات الوسط الزراعي التي تشمل (مصادر الكربون والنتروجين والاملاح) ومدة الحضانة فضلاً عن التهوية وطريقة التخمر المتبعة سواء كانت تخمراً سطحياً ام غاطساً (Aunstrup et al., ١٩٧٩).

#### ١-٨-٢ - الرقم الهيدروجيني

يختلف إنتاج البروتيز من الاحياء المجهرية باختلاف الرقم الهيدروجيني لوسط النمو الخاص بكل كائن، لذلك فان هناك انزيمات بروتيز حامضية وقاعدية ومتعادلة

(Rao et al., 1998). كما يختلف الرقم الهيدروجيني الأمثل للنمو عن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم وفعاليتها، ففي بكتريا *Ferviodobacterium pennavorans* يكون الرقم الهيدروجيني الأمثل لنموها هو 6.5 في حين أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم البروتينز (الكيراتينز) هو 10 (Friedrich and Antranikian, 1996).

إن إنتاج أنزيمات البروتينز من الأعفان يكون في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني يتراوح بين 4-11 (Rao et al., 1998) فمثلاً ينتج فطر *M. canis* أنزيم البروتينز (الكيراتينز) في وسط ذي رقم هيدروجيني 7.8 وأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها هو 8 (Lee et al., 1987) كما أن الرقم الهيدروجيني لوسط إنتاج البروتينز (الكيراتينز) من فطر *T. mentagrophytes* هو 7.8 وأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها هو 5.5 (Muhsin and Aubaid, 2000). إن البروتينز الحامضي المنتج من الفطر *Enomothecium ashyii* ينتج في رقم هيدروجيني 4 و 7 على حد سواء بعد مدة حضانة 48 ساعة (Koltun et al., 1983).

قد يمتلك أنزيم البروتينز فعالية أنزيمية عالية عند قيمتين من الرقم الهيدروجيني كما في فطر *Trichoderma harzianum* إذ يكون الرقمين الهيدروجيين 7.5 و 10 هما الأمثل لفعاليتها (De Marco and Felix, 2002).

#### ٢-٨-٢- درجة الحرارة

يتأثر نمو الفطريات الخيطية وإنتاجها للبروتينز بدرجة الحرارة. فقد وجد أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج البروتينز من الفطر *Scedosporium apiospermum* هي 37م واستخدمت درجة الحرارة 35م لإنتاج أنزيمات البروتينز من الفطر *Aspergillus oryzae* والفطر *penicillium expansum* والفطر *Dahot, T. mentagrophytes*; (Larcher et al., 1996; Aubaid and Muhsin, 1998; 1996). في حين استخدمت درجة الحرارة 27م لإنتاج البروتينز من الفطر *M. canis* (Brouta et al., 2001; Mignon et al., 1998). كما استخدمت درجة الحرارة 25م لإنتاج البروتينز من الفطر *P. chrysogenum* (Benito et al., 2002).

#### ٣-٨-٢- مكونات الوسط الزراعي

يزود الوسط الزراعي المستعمل لإنتاج البروتينز بمصدر للطاقة والكاربون والنتروجين ومواد داعمة ومحفزة للإنتاج. وتؤكد معظم الدراسات أن المصدر الكربوني يحفز النمو ويتباين تأثيره على إنتاج أنزيم البروتينز فقد يكون محفزاً (Activator) أو كابحاً (Repressor) للإنتاج حسب متطلبات الكائن المجهرية ونوع المصدر الكربوني المستعمل، فمعظم السكريات خاصة الكلوكوز له تأثير كابح على إنتاج أنزيم البروتينز إذا ازدادت نسبته عن 0.1-0.5% في معظم الأحياء المجهرية ويعزى ذلك إلى أن تنظيم بناء أنزيم البروتينز يخضع إلى آلية كظم المقيضة (Catabolic repression).

(Egorov et al., 1983). في حين وجد أن الكلوكوز والمالتوز والسكروروز أفضل المصادر الكربونية لإنتاج البروتينز من العفن *A. oryzae* (Ustyuzhanina et al., 1984).

كما يزود الوسط الزراعي بالمصدر النتروجيني كاملاح النتروجين غير العضوية أو المصادر العضوية كالأحماض الأمينية والبروتينات وبصورة عامة يتباين تأثير مصدر النتروجين في إنتاج البروتينز من الأحياء المجهرية (Keen and Williams, 1967).

قد يستخدم مصدر واحد للكاربون والنتروجين معاً، مثلاً استعمال بروتين الكولاجين مصدراً رئيساً للكاربون والنتروجين لإنتاج البروتينز من الفطر *Aspergillus fumigatus* (Monod et al., 1991). كما استعمل الكيراتين (الريش) مصدراً وحيداً للكاربون والنتروجين لإنتاج البروتينز (الكيراتينيز) من بكتريا *Xanthomonas*

٢-٨-٤- التهوية والمزج (De Toni et al., ٢٠٠٢). واستعمل البروتين الليفي والجزء الغشائي من الطبقة المتقرنة لجلد الانسان لانتاج البروتينز (الكيراتينيز) من فطر (*M. canis* Takuichi) (et al., ١٩٨٤).

#### ٢-٨-٤- التهوية والمزج

التهوية والمزج للاوساط الزرعية ذو أهمية في إنتاج الانزيمات من الاحياء المجهرية والحاجة الى التهوية لنمو الاحياء المجهرية وإنتاجها للانزيمات تختلف باختلاف كل من الكائن المجهرى والانزيم، اما أهمية التهوية والمزج فنكمن في حاجة الاحياء المجهرية للاوكسجين الذائب وتوزيع المادة الركيزة في وسط التنمية (الدليمي، ٢٠٠٢). ولتوفير الاوكسجين للكائن المجهرى تحضن الاوساط الزراعية في الحاضنة الهزازة وبسرعة معينة. فمثلاً يتطلب انتاج انزيم الكيراتينيز من فطر *M. canis* تهوية بمقدار سرعة مزج ١٥٠ دورة/دقيقة (Lee et al., ١٩٨٧). في حين يتطلب انتاج الكيراتينيز من البكتريا الخيطية *Streptomyces falbidoflavus* تهوية شديدة مقدارها ٥٠٠ دورة/دقيقة (Bressollier et al., ١٩٩٩). ولانتاج انزيم البروتينز القاعدي من بكتريا *Bacillus spp* فانها تحتاج الى تهوية مقدارها ٤٠٠ دورة/دقيقة (Fujiwara et al., ١٩٩٣).

#### ٢-٨-٥- مدة الحضانة

لا توجد علاقة ثابتة بين مدة الحضانة ونمو الاحياء المجهرية و انتاج الانزيمات الخارجية إذ تتباين تلك العلاقة تبعاً الى نوع الكائن المجهرى والانزيم وعوامل النمو المختلفة، وبصورة عامة يكون انتاج الانزيمات الخارجية مع النمو وان اعلى انتاجية للانزيمات تكون في طور الثبات بشرط استمرار توفر المحثات (Inducers) الضرورية لانتاج الانزيمات وقد تنتج بعض انزيمات البروتينز في اثناء مرحلة النمو اللوغارتمي (الدليمي، ٢٠٠٢). تختلف المدة اللازمة لانتاج انزيم البروتينز باختلاف الاحياء المجهرية المنتجة لها حتى في النوع الواحد فمثلاً ينتج فطر *M. canis* انزيم البروتينز (الكيراتينيز) خلال مدة حضانة ١٠ أيام ويعطي اعلى فعالية للانزيم في اليوم العاشر (Lee et al., ١٩٨٧).

ولاحظ Mignon وجماعته (١٩٩٨) أن أعلى فعالية لانزيم البروتينز (الكيراتينيز) تكون في اليوم الثاني عشر من الحضانة. وفي دراسة اخرى وجد ان فعالية انزيم البروتينز المحلل للكيراتين والكولاجين تكون في اقصاها في اليوم الثامن من الحضانة (Monod et al., ٢٠٠١).

أما بالنسبة للفطريات الاخرى فانها تنتج انزيمات البروتينز خلال مدة اقل أو اكثر من ذلك، فمثلاً ينتج *Trichoderma harzianum* انزيم البروتينز خلال مدة حضانة ٧٢ ساعة (DeMarco and Felix, ٢٠٠٢). وينتج *T. mentagrophytes* انزيم البروتينز (الكيراتينيز) خلال مدة حضن ٢١ يوماً، في حين ينتج انزيم البروتينز غير المحلل للكيراتين بعد مدة ٣٠ يوماً (Muhsin and Aubaid, ٢٠٠٠).

#### ٢-٩- انواع إنزيمات البروتينز وخصائصها

توجد ثلاثة معايير رئيسة في تقسيم انزيمات البروتينز وهي نوع التفاعل المحفز والطبيعة الكيمياوية للموضع الفعال والعلاقة التطورية بين الانزيمات (Barett, ١٩٩٤). وبشكل عام تقسم انزيمات البروتينز الى مجموعتين رئيسيتين على أساس موقع عملها هي انزيمات الببتيديز الخارجية (Exopeptidase) التي تعمل على الأصرة الببتيدية الطرفية وانزيمات الببتيديز

الداخلية (Endopeptidase) التي تعمل على الاواصر الببتيدية الداخلية البعيدة عن مجموعة الامين والكاربوكسيل الطرفية (Moriyara, ١٩٧٤).

كما تقسم انزيمات البروتياز الى ثلاث مجموعات حسب الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل وهي انزيمات البروتياز الحامضية (٢-٥) والمتعادلة (٧-٨) والقاعدية (٩-١١) (Borriss, ١٩٨٧). واعتماداً على المجموعة الوظيفية في الموضع الفعال تقسم انزيمات البروتياز الى اربع مجموعات هي بروتياز السيرين (Serine protease) وبروتياز الاسبارتك (Aspartic protease) وبروتياز الثايول أو السيستايين (Thiol or cystein protease) والبروتياز المعدني (Metaloprotease) (Rao *et al.*, ١٩٩٨; Ward, ١٩٨٣). تحتوي انزيمات بروتياز السيرين حامض السيرين والهستيدين في موضعها الفعال وتضم الانزيمات المنتجة من الاعفان مثل *M. canis* و *T. mentagrophytes* (Aubaid and Muhsin., ١٩٩٨; Mignon *et al.*, ١٩٩٨). وتحتوي انزيمات بروتياز الاسبارتك حامض الاسبارتك والكلوتاميك في موضعها الفعال وتضم انزيمات البروتياز الحامضية المنتجة من الخميرة *Candida spp.* (Hube, ١٩٩٦). المجموعة الثالثة من البروتياز الثايول التي تحتوي على الحامضين السيستايين والهستيدين في موضعها الفعال وتضم انزيمات البروتياز المنتجة من فطر *M. canis* وبكتريا *Streptococcus spp.* وبكتريا *Closteridium histolyticum* (Simpanya and Baxter, ١٩٩٦; Rao *et al.*, ١٩٩٨). أما انزيمات البروتياز المعدنية فانها تحتوي ذرة فلز ثنائي التكافؤ وعادة ما يكون الزنك  $Zn^{2+}$  في موضعها الفعال وتحفز بايون الكالسيوم وتكون حساسة للمواد الخلابية Chelating agents) وتضم انزيمات البروتياز المنتجة من الفطر *A. oryzae* و الفطر *M. canis* (Ward, ١٩٨٣; Brouta *et al.*, ٢٠٠١).

## ١٠-٢ - الاحياء المجهرية المنتجة لانزيم البروتياز (الكيراتينيز)

انزيم الكيراتينيز من انزيمات البروتياز الخارجية له القابلية على تحطيم الكيراتين الطبيعي والبروتينات غير الذائبة الاخرى (Bockle *et al.*, ١٩٩٥). وتعود ثباتية الكيراتين ومقاومته للتحطيم من قبل الأحياء المجهرية إلى التراص القوي لسلاسل البروتين في تراكيب  $\alpha$ -Keratin أو  $\beta$ -Keratin وارتباط هذه التراكيب بجسور سيستايين (Parry and North, ١٩٩٨). وينتج انزيم الكيراتينيز من العديد من الاحياء المجهرية مثل البكتريا والفطريات والبكتريا الخيطية والخمائر. اذ تم فصل وتنقية انزيم الببتيداز الداخلي القاعدي المحلل للكيراتين من بكتريا *Xanthomonas maltophilia* من خلال تنميتها على مصدر كيراتيني، ووجد أن له وزناً جزيئياً ٣٦ كيلو دالتون (De Toni *et al.*, ٢٠٠٢). وفصل إنزيم بروتياز السيرين المحلل للكيراتين من البكتريا المحبة للحرارة *Fervidobacterium pennavorans* عند تنميتها على الريش الطبيعي (Friedrich and Antranikian, ١٩٩٦). لقد فصل انزيم البروتياز (الكيراتينيز) من انواع مختلفة من الفطريات الجلدية مثل *M. gypseum* و *Trichophyton rubrum* و *T. mentagrophytes* (Takuichi and Higuchi, ١٩٧٧; Asahi *et al.*, ١٩٨٥; Tsubio *et al.*, ١٩٨٩; Muhsin *et al.*, ١٩٩٧).

اما بالنسبة للنوع *M. canis* فانه ينتج انزيم البروتياز وزنه الجزيئي ٤٥ كيلو دالتون من نوع بروتياز السيرين (Takuichi *et al.*, ١٩٨٢). كما وجد انه ينتج ثلاثة انواع من البروتيازات ذات اوزان جزيئية ٣١.٥ كيلو دالتون، و ٣٤ كيلو دالتون، و ٤٨ كيلو دالتون (Hamaguchi *et al.*, ٢٠٠٠). كذلك فصل Brouta وجماعته (٢٠٠١) انزيم الكيراتينيز من نوع البروتياز المعدني وزنه الجزيئي ٤٣.٥ كيلو دالتون. وهناك فطريات رمية محبة للكيراتين منتجة للكيراتينيز مثل الجنس *Chrysosporium spp.* (Giuseppina *et al.*, ٢٠٠٣).

وينتج انزيم بروتيز السيرين المحلل للكيراتين من البكتريا الخيطية مثل *Streptomyces albidoflavus* ، ووجد أن وزنه الجزيئي ١٨ كيلو دالتون (Bressollier et al., ١٩٩٩). وتم إجراء دراسة مسحية للتحري عن الخمائر المنتجة لانزيمات البروتيز وأظهرت النتائج بان الخمائر مثل *Geotricum* و *Malassezia furfur* و *Candida spp* منتجة لإنزيم الكيراتينيز (Muhsin et al., ١٩٩٧).

## ١١-٢- دور انزيمات البروتيز في الإلراضية

تنتج الفطريات الممرضة للإنسان العديد من إنزيمات البروتيز الخارجية في أثناء الإصابة وان لهذه الانزيمات دوراً مهماً في زيادة ضراوتها فضلاً عن تزويدها بالمغذيات، فإن هذه الفطريات تنمو على الطبقة المتقرنة من الجلد والشعر والاطافر كمصدراً رئيساً للكربون والنروجين. وتلعب إنزيمات البروتيز دوراً في عملية الالتصاق واختراق الأنسجة ( ; ٢٠٠٢ Monod et al., Tsubio et al., ١٩٨٩). أظهرت نتائج الإصابة التجريبية لخنازير غينيا بسلاسل من فطر *M.canis* ذات الفعالية العالية لأنزيم الكيراتينيز الخارجي بأنها تحدث إصابة حادة (Acute) مقارنةً مع السلالات ذات الفعالية الواطئة لأنزيم واستنتج من ذلك أن هناك علاقة وثيقة بين فعالية الإنزيم وظهور الأعراض السريرية (Viani et al., ٢٠٠١). أما قابلية الإنزيم على تحطيم الشعر فوجد ان فطر *Microsporum gypseum* يمتلك فعالية عالية لإنزيم الكيراتينيز تمكنه من تحطيم الشعر عند تنميته عليه (Okafor and Ada, ٢٠٠٠).

إن لانزيم البروتيز الخارجي المنتج من الفطر *M. canis* له القدرة على تحطيم سايتوبلازم الخلايا القرنية (Horny cells) ودخول الخلايا القرنية (Squamous cells) (Higuichi et al., ١٩٨١). ويشترك كل من انزيم البروتيز والقوة الميكانيكية للغزل الفطري المتطفل في عملية غزو الأنسجة المتقرنة للمضيف (Samdani and Al-Bitar, ٢٠٠٣). ووجد ان كمية انزيم الكيراتينيز المنتجة من الغزل الفطري للنوع *M. canis* داخل الشعرة اعلى من الابواغ المحيطة بالشعره مما يدل على دوره في غزو التراكيب الكيراتينية واشترাকে في الامراضية . وبالرغم من ذلك الا انه ليس العامل الوحيد المسؤول مباشرة عن الاشكال السريرية الملاحظة في القلط المصابة (Mignon et al., ١٩٩٨a,b). إذ تساهم انواع عديدة من أنزيمات البروتيز وانزيمات اللايبيز والفوسفولايبيز وانزيم DNase وغيرها في الامراضية (Papini and Mancianti, ١٩٩٥- ١٩٩٦ ; Simpanya and Baxter, ١٩٩٦; Muhsine et al., ١٩٩٧; Viani et al., ٢٠٠٠).

إن إنزيمات البروتيز المنتجة من الفطريات الجلدية لا تقتصر أهميتها في عملية اختراق أنسجة المضيف بل انها تشترك في تفاعلات فرط الحساسية المتأخرة التي ترتبط بالإصابات الجلدية كاستجابة مناعية خلوية ، كذلك افراز الكلوبولينات المناعية كاستجابة مناعية خلوية للمضيف (Descamps et al., ٢٠٠٣ ; Vermout et al., ٢٠٠٤). وبعض إنزيمات البروتيز لها دور في اختزال حساسية الأحياء المجهرية للمضادات الحيوية (Ulvatne et al., ٢٠٠٢).

## ١٢-٢- تنقية انزيمات البروتيز

ان تنقية الإنزيمات هي سلسلة متتابعة من طرق التجزئة (Fractionation) الغرض منها فصل بروتين الإنزيم عن بقية بروتينات المستخلص الانزيمي الخام وتعتمد طرق الفصل اما على الوزن الجزيئي متمثلة بطرق الترشيح المستند (Ultrafiltration) والفرز الغشائي (Dialysis)، او يتم على اساس الحجم والوزن الجزيئي للانزيمات كما في طريقة الترشيح الهلامي (Gel filtration) او انها تعتمد على الرقم الهيدروجيني والقوة الايونية للمحلول الناضح في طريقة تبادل ايوني (Ion exchange). يعتمد الفصل بطريقة الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) على الشحنة الكهربائية ومن طرق الفصل الأخرى هي الترسيب بالأملاح

والمذيبات العضوية مثل كبريتات الأمونيوم والأسيتون و الايثانول والميثانول وطريقة التجفيد (Lyophization) (Garfin, 1990 and Suelter, 1985).  
 لقد قام العديد من الباحثين بتنقية إنزيمات البروتينيز من الأحياء المجهرية المنتجة لها.  
 فقد قام Lee وجماعته (1987) بتنقية إنزيم بروتيز السيرين من فطر *M. canis* بعدة خطوات متعاقبة هي التبادل الأيوني خلال عمود DEAE-sephadex وعمود CM-Sephadex- C50 والترشيح الهلامي خلال عمود Sephadex- G-75 وكان الإنزيم المنقى ذا فعالية نوعية تعادل 133 مرة أكثر من الإنزيم الخام ونسبة الاسترداد للفعالية الإنزيمية 30%. ونقى أنزيم البروتيز من الفطر *T. mentagrophytes* بسلسلة من الخطوات المتعاقبة أولها الترشيح المستدق باستعمال المرشح Amicon- YM-5 والفرز الغشائي ثم التجزئة خلال عمود التبادل الأيوني DEAE-Sepharose Cl-6B والتجزئة بعمود Sepharcyl- S-200 فكان الإنزيم المتجانس ذا فعالية نوعية 17 مرة أكثر من الإنزيم الخام ونسبة استرداد 1.6% (Tsubio et al., 1989).

قام Reichard وجماعته (1990) بتنقية إنزيم بروتيز السيرين من الفطر *A. fumigatus* بنسبة استرداد 41% وذلك باستعمال كروماتوغرافيا اللفة (Affinity chromatography) خلال عمود Agarose -amino-caproyl-D-- Epsilon tryptophan methylester وتمكن Dahot (1994) من تنقية إنزيم البروتيز القاعدي من فطر *Penicillium expansum* بعملية الترسيب بالأسيتون المبرد بنسبة 1:2 والفرز الغشائي والتجزئة بالترشيح الهلامي باستعمال عمود Sephadex G-100 والتجزئة التبادل بالشوارد خلال عمود DEAE-sephadex A-50 وكان الإنزيم المتجانس المنقى (وزنه الجزيئي 20500 دالتون) ذا فعالية نوعية 61.6 وحدة/ملغم بروتين ونسبة استرداد 48%. وأجرى Brouta وجماعته (2001) خطوات متسلسلة لفصل أنزيم الكيراتينيز من فطر *M. canis* وهي الترشيح المستدق والتجزئة خلال عمود Bacitracin agarose والفرز الغشائي, ثم التجزئة خلال عمود Agarose-Octyl. ومنها تم الحصول على إنزيم منقى وزنه الجزيئي 14350 كيلو دالتون وفعاليته النوعية 75 مرة أكثر من الإنزيم الخام ونسبة استرداد 42% للفعالية الإنزيمية. إن إنزيم البروتيز القاعدي المنقى من بكتريا *Alcaligenes faecalis* بعملية الترسيب بالأسيتون المبرد بنسبة تشبع 80% والتجزئة خلال عمود DEAE- Cellulose, ثم التجزئة بعمود Sephadex G-100. بلغت فعاليته النوعية 19.9 مرة أكثر من الإنزيم الخام وبنسبة استرداد 7.4% للفعالية الإنزيمية (Thangam and Rajkumar, 2002).  
 استعمل Adinarayana وجماعته (2003) خطوتين متعاقبتين في تنقية إنزيم بروتيز السيرين القاعدي المقاوم للحرارة من بكتريا *Bacillus subtilis PE-II* هي التجزئة بكبريتات الأمونيوم بنسبة تشبع 50-70% وكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال عمود Sephadex G-200, ووجد أن الإنزيم المنقى كان ذا فعالية نوعية 21 مرة أكثر من الإنزيم الخام وبنسبة استرداد 75% للفعالية الإنزيمية.

## ١٣-٢ - دراسة بعض حركات إنزيم البروتيز

### ١٣-٢-١ - تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم البروتيز وثباته

تؤثر درجة الحرارة في حالة تأين المجموع الفعالة لكل من الإنزيم والمادة الركيزة (Substrate) وينعكس ذلك على سرعة التفاعل الإنزيمي. ويعتمد تأثير الحرارة في فعالية الإنزيمات على طبيعة بروتين الإنزيم وثباته وتركيز الركيزة وثباتها واللفة الإنزيم للارتباط مع الركيزة والرقم الهيدروجيني للمحلول ووجود المنشطات والمثبطات والقوة الأيونية وتركيز البروتينات في مستخلص الإنزيم ووقت التعريض للحرارة (Fullbrook, 1983).

فقد وجد أن درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم بروتيز السيتلسين الشبيه بالسيرين (Subtilisin like serine protease) المنتج من الفطر *M. canis* هي حوالي 50 م° ودرجة

حرارة ثبات الإنزيم بين ٢٥ و ٣٧ م (Brouta *et al.*, ٢٠٠١). في حين ان درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم البروتيز المعدني (Metalloprotease) المنتج من الفطر نفسه هي ٥٥ م (Mignon *et al.*, ١٩٩٨ b). إن إنزيمات البروتيز (الكيراتينيز) المختلفة ذات الأوزان الجزيئية ٤٨, ٣٤, ٣١.٥ كيلو دالتون المنقاة من الفطر *M. canis* تكون ثابتة وبقوة عند درجة حرارة ٥٥ م وبوجود كلوريد الكالسيوم  $CaCl_2$  بتركيز ٥٠ ملي مولار إذ تحتفظ بـ ٥٠% من الفعالية الابتدائية مقارنة مع فقدان الفعالية الأنزيمية بغياب كلوريد الكالسيوم Hamaguchi *et al.*, ٢٠٠٠).

أما بالنسبة لأنزيم الكيراتينيز الحامضي المنتج من الفطر الجلدي *T. mentagrophytes* فان درجة الحرارة المثلى لفعاليته الأنزيمية هي ٥٠ م ويكون الأنزيم ذا ثباتية عالية بعد تعريضه لدرجة حرارة ٥٠ م لمدة ٣٠ دقيقة (Muhsin and Aubaid, ٢٠٠٠).

ان إنزيمات البروتيز (الكراتينيز) المنتجة من البكتريا لاسيما الأنواع المحبة للحرارة تكون اكثر ثباتاً تجاه الحرارة من انزيمات الفطريات، كما في إنزيم البروتيز القاعدي المنتج من بكتريا *Ferridobacterium pennavorans* الذي يمتلك أقصى فعالية عند درجة حرارة ٨٠ م (Friedrich and Antranikian, ١٩٩٦).

## ٢-١٣-٢- تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية انزيم البروتيز وثباته

يؤثر الرقم الهيدروجيني في الحالة الايونية للأحماض الأمينية المكونة للأنزيم والمسؤولة عن التركيب البنائي له. وبذلك فان الرقم الهيدروجيني يؤثر في سرعة التفاعل نتيجة لتأثيره في ألفة الركيزة وتميم العامل (Cofactor) للارتباط بالموقع الفعال للإنزيم وعند خزن الإنزيم في قيم متعددة من الرقم الهيدروجيني تؤثر في الثبات الإنزيمي من خلال تأثيرها غير الرجعي لمسوخ البروتين (Denaturation) التي تسبب فقدان النشاط الإنزيمي (Fullbrook, ١٩٨٣). تقسم إنزيمات البروتيز إلى ثلاث مجاميع اعتماداً على الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها وهي الإنزيمات الحامضية والمتعادلة والقاعدية، ويتراوح الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها بين ٢-٥، ٧-٨، و ٩-١١ على التوالي، والرقم الهيدروجيني الأمثل لثباتها يتراوح بين ٢-٦، ٧-٩، و ٥-١٠ على التوالي (Borriss, ١٩٨٧). إن الأرقام الهيدروجينية المثلى لفعالية إنزيمات البروتيز القاعدية المنتجة من الأعفان غالباً ما تكون أعلى من ٨، فالرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية البروتيز القاعدي المنتج من *Fusarium spp.* و *A. sojae* هو ١١ وللأنزيم المنتج من الفطر *A. tenuissima* يتراوح بين ٨-١٠ (Emtseva and Konovalov, ١٩٧٩).

وجد ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية البروتيز القاعدي المنتج من إحدى سلالات الفطر *A. oryzae* هو ٥-٧ والرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم هو ٩ (حسن, ١٩٩٦). أما الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية البروتيز المنتج من *P. expansum* فكان ١٠.٥ (Dahot, ١٩٩٤). إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية البروتيز المنتج من الفطر *M. canis* هو ٩ ويبقى الإنزيم محتفظاً بـ ٦٠-٨٠% من فعاليته في رقم هيدروجيني يتراوح بين ٦-١٠، إلا أنه يفقد فعاليته عند الرقم الهيدروجيني ١١ (Mignon *et al.*, ١٩٩٨b). وجد أن إنزيم البروتيز المفلز المنتج من نفس الفطر يعطي فعالية قصوى عند رقم هيدروجيني ٨ ويحتفظ بأكثر من ٨٠% من فعاليته عند رقم هيدروجيني بين ٦-٩ ويفقد أكثر من ٦٠% من فعاليته عند رقم هيدروجيني ١١ لمدة ساعة واحدة (Brouta *et al.*, ٢٠٠١).

## CHAPTER THREE الفصل الثالث

### ٣-المواد وطرائق العمل Materials and Methods

#### ٣-١- المواد الكيميائية

أ- المواد الكيميائية آتية من شركة BDH

Acetic acid ,Aceton,Acryl amide, Agar-agar, Ammonium sulphate, Ammonium per sulphate,  $\alpha$ -amylase, Bis acryl amide,Bovine serum albumin, Bromo phenol blue, Butanol ,Calcium chloride, Casein (fat free), Coomasie brilliant blue R-٢٥٠ ,Ethanol, Glycine, Hydro Chloric acid, Methanol, Potassium dihydrogen orthophosphate, Potassium hydroxide, Sodium azide Sodium chloride,Sodium dihydrogen orthophosphate, Sodium hydroxide, Sucrose, Trichloro acetic acid, Tris hydroxy methyl amino methane.

ب- المواد الكيميائية آتية من شركة Difco

Glycerin,Lactic acid, Phenol.

ج- المواد الكيميائية آتية من شركة Whatman

DEAD-cellulose ,CM-cellulose.

د- المواد الكيميائية آتية من شركة Fluka

٢-Mercaptoethanol, Sodium dodecyl sulphate.

هـ- المواد الكيميائية آتية من شركة Sigma

Creatine kinase ,Inositol, Pyridoxine, Thiamine.

#### ٣-٢ الاوساط الزرعية والمحاليل

#### ٣-٢-١ الاوساط الزرعية

أ- وسط سابرويد كلوكوز اكار (SGA) Sabourauds glucose agar

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة (Oxoid) ويتكون من ٢٠ غم/لتر كلوكوز و ١٠ غم/لتر بيتون و ٢٠ غم/لتر اكار وتم إضافة ٠.٥ ملغم/مل من الكلورامفينكول (Chloramphenicol) لمنع نمو البكتريا و ٠.٥ ملغم/مل من السايكلوهكسامايد (Cycloheximide) لتثبيط نمو الفطريات الرمية السريعة النمو (Koneman *et al.*, ١٩٧٨, ١٩٩٢); Kwon-.Chung and Benett, ١٩٩٢).

ب- وسط مايكوبايوتك اكار (MBA) Mycobiotic agar

حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة (Oxoid) ويتكون من ١٠ غم/لتر كلوكوز و ١٠ غم/لتر بيتون و ٢٠ غم/لتر اكار.

ج- وسط اكار البطاطا والكلوكوز (PGA) Potato glucose agar

حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة (Difco) ويتكون من ٢٠٠ غم/لتر بطاطا و ١٠ غم/لتر كلوكوز و ٢٠ غم/لتر اكار.

د- وسط إنتاج الإنزيم

حضر الوسط وفق طريقة Lee وجماعته (١٩٨٧) ويتكون الوسط من ٠.٥ غم/لتر كلوكوز و ٠.٦ غم/لتر كبريتات المغنسيوم  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  و ٠.٢ مولار اورثوفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  و ٠.٢ مولار اورثوفوسفات البوتاسيوم الاحادية الهيدروجين  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  و ٠.٠١ غم/لتر ثايمين (Thiamin) و ٠.٠١ غم/لتر بايريدوكسين (Pyridoxine) و ٠.٥ غم/لتر انوسيتول (Inositol) وتم استعمال مصادر نتروجينية مختلفة هي الببتون بتركيزين (٠.٢٦% و ٠.٥٢%) ونخالة الحنطة بتركيزين (٠.٢٦% و ٠.٥٢%) والكازين بتركيزين (١% و ٢%) وشعر الإنسان بتركيزين (٠.٦٢% و ٠.٥٢%). في نفس الوسط وبتراكيز مختلفة للكشف عن إنتاج إنزيم البروتيز وافضل تركيز للإنتاج. علماً أنه قد تم استخدام شعر الإنسان بخمسة تراكيز هي (٠.٢٦% و ٠.٥٢% و ٠.٧٨% و ١% و ١.٣%) بتجربة أولية لمعرفة أفضل تركيز لإنتاج الإنزيم لاستخدامه في التجارب اللاحقة.

تم تعقيم جميع الأوساط بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١ بار لمدة ١٥ دقيقة عدا الوسط الذي يحتوي الكازئين , فقد تم تعقيم محلول الكازين لمدة ٥ دقائق ثم أضيف الى بقية مكونات الوسط المعقم في الظروف السابقة نفسها . وقد تم إضافة الثايمين والانوسيتول والبايريدوكسين إلى الوسط بعد تعقيمها بالترشيح الدقيق خلال ورق ترشيح Milipore ٠.٢٢ مايكرومتر.

### ٢-٢-٣ المحاليل

- ٢٠-١- محلول صبغة اللاكتوفينول ويتكون من ٢٠ غرام حامض اللاكتك و ٢٠ غرام كليسرول و ٢٠ غرام فينول و ٠.٥٥ غرام ازرق القطن و ٢٠ مللتر ماء مقطر .
  - ب-محلول دارىء الفوسفات بتركيز ٠.٢ مولر وارقام هيدروجينية ٦ و٧ و٨.
  - ج-محلول دارىء الفوسفات والسترات بتركيز ٠.١ مولر وارقام هيدروجينية ٣ و ٤ و ٥.
  - د- محلول دارىء الكلاسين وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز ٠.٢ مولر وارقام هيدروجينية ٩-١٢.
  - هـ-محلول دارىء الترس وحامض الهيدروكلوريك بتركيز ٠.٥٥ مولر ورقم هيدروجيني ٨.
- حضرت المحاليل الدارئة الأنفة الذكر حسب المصدر (Gomori, ١٩٥٥).
- و-محلول ٠.٥ مولار من هيدروكسيد الصوديوم.
  - ز- محلول ٠.٢٥ حامض الهيدروكلوريك.
  - ح- محلول ٥% ثلاثي كلورو حامض الخليك.

ط- محلول ٠.٥% كازئين بارقام هيدروجينية مختلفة (٦-١٢).  
ذوب ٠.٥ غم من الكازئين في كمية من المحلول الدارئ برقم هيدروجيني معين مع التسخين بدرجة حرارة ٧٠-٨٠ م والتحرك المستمر باستعمال المحرك المغناطيسي المسخن Hote plate magnetic stirrer ثم أكمل الحجم الى ١٠٠ مللتر بالمحلول الدارئ نفسه (حسن، ١٩٩٦).

ي- محلول الاكريل امايد بزاكريل امايد الخزين (٥٠%)  
(Acryl amide- bis acrylamide stock solution)  
ذوب ٤٨.٧٥ غم من الاكريل امايد و ١.٢٥ غم من البزاكريل امايد في ٧٠ مللتر من الماء المقطر وامل الحجم الى ١٠٠ مللتر بالماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة.

ك-المحلول الدارئ المستخدم لهلام الفصل (٨.٨ pH Tris-HCl, ١.٥ M Resolving gel buffer,  
ذوب ١٢.٨ غم من الترس (Tris base) في ٨٠ مللتر من الماء المقطر وتم تعديل الرقم الهيدروجيني الى ٨.٨ باضافة محلول ١ مولار حامض الهيدروكلوريك وامل الحجم الى ١٠٠ مللتر بالماء المقطر.

ل-محلول ١٠% كبريتات دود يسيل الصوديوم (SDS) مذاب في الماء المقطر.  
م-المحلول الدارئ الخزين المستعمل للنموذج Stock sample buffer.  
مزج ١.٢ مللتر من محلول هلام الفصل و ٢ مللتر من محلول ١٠% SDS و ٢ غم من  
السكروز و ٠.٢ مل من محلول ٠.٥% البرومو فينول الازرق و ٤.٨ مللتر ماء مقطر.

ن- المحلول الدارئ المستعمل للقطب Electrode buffer  
ذوب ٣ غم من الترس (Tris base) و ١٤.٤ غم من الكلاسين و ١٠ مللتر من محلول  
SDS في كمية من الماء المقطر وتم تعديل الرقم الهيدروجيني الى ٨.٣ باضافة محلول ١ مولار  
من حامض الهيدروكلوريك ثم اكمل الحجم الى لتر.

س-محلول صبغة الكوماسي الزرقاء Coomassie brilliant blue R-٢٥٠  
يتكون المحلول من ٠.١% صبغة الكوماسي و ٤٠% كحول مثيلي و ١٠% حامض  
الخليك ذوبت المواد ورشح المحلول وحفظ الراشح في قنينة معتمة.

ف- محلول التثبيت Fixation solution  
يتكون من ٤٠% كحول مثيلي و ١٠% ثلاثي كلورو حامض الخليك.  
وزنة الجزيئي

ص-محلول ازالة الصبغة Destaining solution  
يتكون من ٤٠% ميثانول و ١٠% حامض الخليك.

ق- محلول تمد (TEMED)(N, N, N, N, -Tetramethyl diamine)

غ-محلول برسلفات الامونيوم ١٠% Ammonium persulphate  
حضر قبل الاستعمال مباشرة.  
حضرت المحاليل الأنفة الذكر حسب طريقة Laemmli (١٩٧٠).

ع-محلول البروتينات القياسية  
حضر بإذابة البروتينات الاتية: ألبومين المصل البقري Bovine serum  
albumin (وزنة الجزيئي = ٦٧ كيلودالتون)، وإنزيم الفا-امليز  $\alpha$ -amylase (وزنة  
الجزيئي = ٥٨ كيلودالتون)، وإنزيم كرياتين كاييني Creatin kinase (وزنة الجزيئي =  
٤١ كيلودالتون) في محلول النموذج الدارئ الخزين وبتركيز ٥ ملغم/مل .

### ٣-٣ طرائق العمل

#### ١-٣-٣ جمع العينات السريرية

عزل فطر *M. canis* من شخص مصاب بالسعفة الحلقية Tinea corporis في  
الذراع من وحدة الأمراض الجلدية في مستشفى مرجان التعليمي في مدينة الحلة.

#### ٢-٣-٣ عزل الفطر والفحص المباشر

اخذت العينات السريرية بمعاملة منطقة الاصابة بكحول ايثيلي تركيزه ٧٠% ثم اخذت  
حراشف صغيرة من حافة التقرحات الجلدية باستعمال شفرة جراحة معقمة. أما الشعر فجمع

بازالتة باستعمال ملقط معقم (Kwon- Chung and Benett, ١٩٩٢). فحصت عينات الشعر والجلد بوضعها في قطرة من هيدروكسيد البوتاسيوم ١٠% على شريحة زجاجية نظيفة وتهرس عينة الجلد جيداً باستعمال إبرة معقمة. ثم سخنت الشريحة بعد وضع غطاء الشريحة بامرارها قليلاً على لهب مصباح بنزين بعدها تركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة ثم فحصت مجهرياً لملاحظة الغزل الفطري والتركييب الفطرية الاخرى (Konemam *et al.*, ١٩٧٨).

### ٣-٣-٣ نمو الفطر

تم زراعة العينات على وسط سابرويد كلوكوز اكار مع الكلورامفينكول (٠.٠٥ ملغم/مل) و السايكلو هكسميد (٠.٥ ملغم/مل) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ٢٥-٢٨ م لمدة (٧-١٤) يوماً

### ٣-٣-٤ تنقية الفطر وحفظه

نقيت عزلة الفطر السريرية في طريقة التخطيط على وسط سابرويد كلوكوز اكار وحفظت العزلة المنتقاة بدرجة حرارة ٤ م بعد زرعها على مائل وسط سابرويد كلوكوز اكار تم تجدييد العزلة كل ١٤-٣٠ يوماً

### ٣-٣-٥ تشخيص الفطر

٣-٣-٥-أ- الخصائص المظهرية وتشمل شكل المستعمرة وحجمها ولونها وقوامها. (Koneman *et al.*, ١٩٧٨ ; Kwon-.Chung and Benett, ١٩٩٢).

٣-٣-٥-ب- الخصائص المجهرية وتشمل وجود الكونيدات الكبيرة والصغيرة وشكلها وابعادها وعدد خلاياها.

تم نقل جزء صغير من المستعمرة الفطرية باستعمال ابرة معقمة الى قطرة من صبغة اللاكتو فينول على شريحة زجاجية نظيفة ثم وضع غطاء الشريحة وثبتت بامرارها على لهب مصباح بنزن قليلاً ثم فحصت بالمجهر لملاحظة الصفات المجهرية للغزل الفطري.

### ٣-٣-٦ تأثير بعض العوامل البيئية في نمو فطر *M. canis*

#### ٣-٣-٦-١ الوسط الغذائي

تم تقدير نمو الفطر على ثلاثة اوساط هي سابرويد كلوكوز اكار ومايكوبايتوك اكار و وسط اكار البطاطا والكلوكوز. وذلك باخذ قرص بقطر ١٠ ملتر من حافة المستعمرة الفطرية بعمر ٧-١٠ ايام ووضع في مركز الطبق الذي يحوي الوسط الغذائي. وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ٢٥ م وقدر النمو بقياس قطرين متعامدين للمستعمرة الفطرية وحساب معدل النمو لثلاثة مكررات بعد مدة حضانة ١٤ يوماً (Aubaid, ١٩٩٧).

#### ٣-٣-٦-٢ درجة الحرارة

تم تقدير نمو الفطر في درجات حرارة مختلفة (٢٠ و ٢٥ و ٣٠ و ٣٧) م وذلك باخذ قرص بقطر ١٠ ملتر من حافة المستعمرة الفطرية بعمر ٧-١٠ ايام ووضع في مركز الطبق الذي يحوي الوسط SGA لمدة ١٤ يوماً وباستعمال نفس الطريقة في تقدير معدل النمو لثلاثة مكررات.

#### ٣-٣-٦-٣ مدة الحضن

تم تقدير نمو الفطر بعد مدد حضانة مختلفة وذلك بنقل قرص بقطر ١٠ ملليمتر من حافة المستعمرة الفطرية بعمر ٧-١٠ ايام الى مركز طبق بتري حاو على وسط SGA و حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٢٥°م. قدر معدل النمو لثلاثة مكررات بنفس الطريقة السابقة بعد مدد حضانة (٧ و ١٤ و ١٥) يوماً.

### ٣-٧ تقدير فعالية انزيم البروتيز

اتبعت الطريقة المعتمدة من قبل Kunitz (١٩٤٧) والمحورة من قبل (Sabramania and Kalnitsk, ١٩٦٤) في تقدير فعالية البروتيز وتتلخص باضافة ٠.١ مللتر من الراشح الانزيمي الى ١.٩ مللتر من محلول الكازئين %٠.٥ برقم هيدروجيني ٨. وحضن المزيج في درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٠ دقيقة ثم اضيف ٣ مل من محلول ثلاثي كلوروحامض الخليك %٥ لاييقاف التفاعل.

حضر محلول الكفئ (Blank) بالطريقة نفسها عدا اضافة محلول ثلاثي حامض الخليك الى محلول التفاعل قبل اضافة الانزيم. ثم نبذت المحاليل بسرعة ٥٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق وفي درجة حرارة ٤°م. وتم قياس امتصاص الضوء للمحلول الرائق (supernatant) بطول موجي ٢٨٠ نانومتر باستعمال المطياف الضوئي ٢١ spectronic و قدرت وحدات الفعالية الإنزيمية.

**تعريف وحدة الفعالية:-** كمية الانزيم التي تسبب زيادة في امتصاص الضوء على الطول الموجي ٢٨٠ نانومتر مقدارها ٠.٠٠١ في الدقيقة تحت ظروف القياس (Kunitz, ١٩٤٧).

### ٣-٨ تقدير تركيز البروتين

تم تقدير تركيز البروتين بالطريقة المعتمدة من قبل Whitaker and (١٩٨٠) Granum, ١٩٨٠. وذلك بترسيب البروتين من المستخلص الخام باضافة ٣ مللتر من محلول ثلاثي كلوروحامض الخليك %٥ لكل ٢ مللتر من المستخلص ثم نبذ المحلول بسرعة ٥٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة في درجة حرارة ٤°م سكب المحلول الرائق وذوب الراسب في ٢ مل من محلول ٠.٠٥ مولر هيدروكسيد الصوديوم وتم قياس امتصاص الضوء للمحلول بطول موجي ٢٨٠ نانومتر و طول موجي ٢٣٥ نانومتر، واستعمل المحلول القاعدي نفسه محلولاً كفوئاً وتم حساب تركيز البروتين من المعادلة الاتية:-  
تركيز البروتين ملغم / مل =

امتصاص الضوء بطول موجي ٢٣٥ نانومتر - امتصاص الضوء بطول موجي ٢٨٠ نانومتر  
٢.٥١

وحسبت الفعالية النوعية (specific activity) كما ياتي:

الفعالية النوعية وحدة / ملغم بروتين = فعالية الإنزيم (وحدة / مل)  
تركيز البروتين (ملغم / مل)

### ٣-٩ تأثير بعض العوامل في إنتاج إنزيم البروتيز

أجريت دراسة تأثير بعض العوامل وهي الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة و المصدر النتروجيني ومدة الحضن والتهوية في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* وذلك بتثبيت جميع العوامل الأنفة الذكر باستثناء العامل المدروس ، و قدر الإنتاج بدلالة فعالية إنزيم البروتيز

وحدة /مل. وحدد التركيز ٠.٥٢% من شعر الإنسان بتجربة أولية كأفضل تركيز لاستخدامه في التجارب اللاحقة .

### ٣-٩-١ الرقم الهيدروجيني

حضر وسط الإنتاج الحاوي ٠.٥٢% من شعر الإنسان في أرقام هيدروجينية مختلفة (٣-١٠) باستعمال المحاليل الدارئة المناسبة. لقع الوسط بالفطر وحضنت المزارع بدرجة حرارة ٢٧ م لمدة ١٠ أيام (٥ أيام بدون مزج و٥ أيام مع المزج في الحاضنة الهزازة بسرعة ١٥٠ دورة /دقيقة). ثم استخلص الأنزيم وقدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين وباستعمال ثلاثة مكررات ..

### ٣-٩-٢ درجة الحرارة

حضر الوسط الخاص بالإنتاج والحوي ٠.٥٢% من شعر الإنسان كمصدر وحيد للنتروجين وبرقم هيدروجيني ٩ . لقع الوسط بالفطر وحضن الوسط في درجات حرارة مختلفة (٢٥ و٣٠ و٣٥ و٤٠) م لمدة ١٠ أيام وبدون تحريك. ثم قدرت فعالية الإنزيم وتركيز البروتين في المستخلصات المختلفة وباستعمال ثلاث مكررات.

### ٣-٩-٣ المصدر النتروجيني

استعملت المصادر النتروجينية المذكورة سابقاً لغرض إنتاج الإنزيم إذ وزعت الأوساط في دوارق حجمية سعة ٢٥٠ مل وبواقع ٥٠ مل لكل دورق من كل وسط باختلاف المصدر النتروجيني و بثلاث مكررات. لقت الأوساط الزرعية وذلك بإضافة قرص بقطر ١٠ ملليمتر من حافة المستعمرة الفطرية بعمر ٧-١٠ أيام وضبط الرقم الهيدروجيني لمحلول الفوسفات الدارئي المستعمل في الوسط على الرقم الهيدروجيني ٩ قبل التلقيح. حضنت الأوساط في درجة حرارة ٣٥ م و لمدة ١٠ أيام مجزأة (٥ أيام بدون مزج و٥ أيام مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة) باستعمال الحاضنة الهزازة فصل الغزل الفطري وبقياس الشعر والمواد غير المتحللة باستعمال النبذ المركزي في درجة حرارة ٤ م وبسرعة ٥٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق ثم مرر الرائق خلال ورق ترشيح من نوع Millipore (٠.٤٥ مايكرومتر) واستعمل الرائق مستخلصاً خاماً للخطوات اللاحقة.

### ٣-٩-٤ مدة الحضانة

حضر وسط الإنتاج الحاوي ٠.٥٢% من شعر الانسان برقم هيدروجيني ٩ ولقع الوسط بالفطر وحضنت المزارع لمدد زمنية مختلفة (٥-١٠) ايام في درجة حرارة ٣٥ م بدون مزج. استخلص الأنزيم في نهاية كل مدة وقدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين وباستعمال ثلاث مكررات.

### ٣-٩-٥ التهوية

استخدم وسط الإنتاج الحاوي شعر الإنسان بتركيز ٠.٥٢% لدراسة تأثير التهوية في إنتاج الإنزيم وذلك باستعمال ثلاثة ظروف مختلفة هي وسط ساكن بدون تحريك لمدة ١٠ أيام و وسط نصف ساكن أي ٥ أيام بدون مزج و٥ أيام أخرى مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة و وسط متحرك لمدة ١٠ أيام وبسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وضبط الرقم الهيدروجيني لجميع الأوساط على ٩ . حضنت المزارع بدرجة حرارة ٣٥ م ثم قدرت فعالية الأنزيم وتركيز البروتين في المستخلصات في نهاية مدة الحضانة وفي ثلاث مكررات.

### ٣-٣-١٠ مراحل التنقية الجزيئية لإنزيم البروتيز

#### ٣-٣-١٠-١ الترسيب بكبريتات الأمونيوم

أضيف ٢٢.٦ غم و ١٢ غم و ١٦.١ غم من كبريتات الأمونيوم تدريجياً إلى المستخلص الخام مع التحريك المستمر باستعمال المحرك المغناطيسي Magnetic stirrer وفي درجة حرارة ٤ م° للحصول على نسب إشباع ٤٠% و ٦٠% و ٨٠% على التوالي. نبذ المحلول بعد كل إضافة بسرعة ٧٠٠٠ دورة/دقيقة في درجة ٤ م° لمدة ساعة واحدة. فصل المحلول الرائق و أضيف إليه الوزن الآخر من كبريتات الأمونيوم للحصول على نسبة الإشباع التالية، قدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين في الرواسب لكل خطوة بعد إذابتها في ٢ مل من محلول الكلاسين وهيدروكسيد الصوديوم الدارئي برقم هيدروجيني ٩ (Benito et al., ٢٠٠٢).

#### ٣-٣-١٠-٢ الفرز الغشائي Dialysis

أجريت عملية الديليزة لراسب كبريتات الأمونيوم باستعمال أنبوب السليلوز (M.w.cut off.No. ١٢-١٤Kd, spectrum Medical Industries) في الماء المقطر لمدة ٤٨ ساعة مع إضافة كلوريد الكالسيوم بتركيز ٠.٠٠٢ مولار إلى الماء المقطر وتبديل الماء المقطر كل ٣ ساعات. تمت العملية بوضع أنبوب الديليزة الحاوي على المستخلص المركز في وعاء سعته ٥٠٠ مل مملوء بالماء المقطر الحاوي على كلوريد الكالسيوم بتركيز ٠.٠٠٢ مولار. ووضع الوعاء بدرجة حرارة ٤ م° مع التحريك المستمر والبطيء باستعمال magnetic stirrer لمدة ٤٨ ساعة. نبذ المحلول بسرعة ٧٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ساعة وفي درجة حرارة ٤ م° أذيب الراسب في ١٠ مل من محلول الكلاسين وهيدروكسيد الصوديوم الدارئي برقم هيدروجيني ٩ (Muhsin and Aubaid, ٢٠٠٢).

#### ٣-٣-١٠-٣ كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

##### ٣-٣-١٠-٣-١ تحضير المبادل الأيوني

##### ٣-٣-١٠-٣-١-أ المبادل الأيوني كاربوكسي مثيل سليلوز (CM-cellulose):

حضر المبادل بالطريقة الموصوفة من قبل Whitaker (١٩٧٢) إذ أضيف لتر من الماء المقطر الى ٢٠ غراماً من المبادل في اسطوانة مدرجة وترك ليبرد، ثم سكب السائل العلوي وغسل المبادل عدة مرات بالماء المقطر إلى أن أصبح السائل العلوي رائقاً ورشح على قمع بخنر تحت التفريغ، ثم علق الراسب في محلول ٠.٥ مولار كلوريد الصوديوم و ٠.٥ مولار هيدروكسيد الصوديوم ورشح وغسل عدة مرات بالماء المقطر ثم بمحلول داريء الفوسفات برقم هيدروجيني ٦.

##### ٣-٣-١٠-٣-١-ب المبادل ثنائي أثيل أمينو أثيل سليلوز (DEAE-cellulose)

حضر المبادل بالطريقة الموصوفة من قبل Mercer (١٩٧٤) إذ غسل المبادل بمحلول ٠.٥ مولار هيدروكسيد الصوديوم ثم غسل بالماء المقطر ثم بمحلول ٠.٥ مولار هيدروكسيد الصوديوم ثم بالماء المقطر مع استمرار غسل المبادل بالماء المقطر في كل خطوة عدة مرات حتى أصبح السائل العلوي متعادلاً ثم رشح الرائق في قمع بخنر تحت التفريغ ثم علق الراسب بمحلول الترس وحامض الهيدروكلوريك

(٥٠ مولار ورقم هيدروجيني ٧.٤) وغسل المبادل عدة مرات بهذا الدارئ. حضر عمود من المبادل DEAE-cellulose بأبعاد ٧x ٠.٥ سم وتمت موازنته بمحلول الترس وحامض الهيدروكلوريك برقم هيدروجيني ٧.٤ وحسبت سرعة الجريان.

### ٣-٣-١٠-٢ عملية التنقية باستعمال المبادل الايوني

لغرض معرفة الطريقة الأمثل لتنقية الإنزيم في خطوة التبادل الأيوني تم إجراء كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بأسلوب الوجبة Batch wise للمبادلين CM-cellulose و DEAE-cellulose وذلك بمزج محلول الإنزيم الخام مع وزن رطب من المبادل بنسبة ٣:١ (وزن:حجم) وبعد الترشيح غسل المبادل بمحلول الفوسفات الدارئ برقم هيدروجيني ٦ واسترد الإنزيم بإضافة محلول الفوسفات الدارئ برقم هيدروجيني ٨ و ٠.١ مولار كلوريد الصوديوم وقدرت الفعالية وتركيز البروتين في أجزاء الغسل والاسترداد. وبعد ملاحظة ارتباط الإنزيم بالمبادل DEAE-cellulose وعدم ارتباطه بالمبادل CM-cellulose تم إجراء كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بطريقة العمود باستعمال المبادل DEAE-cellulose.

مرر الراسب الحاوي على الإنزيم بعد عملية الفرز الغشائي على عمود المبادل الأيوني DEAE.cellulose ذو الأبعاد ٧x ٠.٥ سم و تم موازنته بمحلول الترس وحامض الهيدروكلوريك برقم هيدروجيني ٨ جمعت أجزاء الغسل واسترد الإنزيم من العمود بمحلول الترس وحامض الهيدروكلوريك برقم هيدروجيني ٨ وبتراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم (٠.٥-٠) مولار وجمعت أجزاء الاسترداد وبواقع ١ مللتر لكل جزء وبسرعة جريان ٦ مل /ساعة وقدرت فعالية الإنزيم وتركيز البروتين بقياس امتصاص الضوء بطول موجي ٢٨٠ نانومتر في أجزاء الغسل والاسترداد (Robyt and White, ١٩٨٧; Thangam and Rajkumar, ٢٠٠٢).

### ٣-٣-١٠-٤ التركيز بالأسيتون

رسب الإنزيم المنقى بالأسيتون المبرد الى -٥ م وبنسبة حجم واحد من الرائق الى حجمين من الأسيتون بتركيز ٩٩ % ، وذلك بإضافة الأسيتون تدريجيا مع التحريك المستمر البطيء باستعمال Magnetic stirrer ولمدة ساعة واحدة في درجة حرارة ٤ م. نبذ المحلول بسرعة ٧٠٠٠ دورة/دقيقة في درجة ٤ م لمدة ساعة واحدة . أذيب الراسب في حجم صغير من المحلول الدارئ الخزين المستعمل للنموذج للحصول على تركيز ١ ملغم /مل .

### ٣-٣-١١ توصيف الإنزيم

#### ٣-٣-١١-١ الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل اميد بوجود SDS (SDS.PAGE)

اتبعت طريقة Laemmli (١٩٧٠) في إعداد الهلام والترحيل الكهربائي مع إجراء بعض التحويرات عليها.

#### ٣-٣-١١-١-١ تحضير هلام الفصل (١٠%)

مزج ١٥ مللتر من محلول هلام الفصل ٨ و ١ مللتر من محلول الاكريل اميد -بزاكريل اميد الخزين و ٠.٤ مللتر من محلول SDS و ١٥.٧ مللتر من الماء المقطر، وبعد ازالة الهواء من المحلول اضيف ٠.٩ مللتر من محلول برسلفات الامونيوم و ٥ مايكرو لتر من التمد TEMED مزجت ونقل المحلول إلى الصفيحة الخاصة بالعملية وترك ليتصلب بعد وضع قليل من البيوتانول على سطحه.

#### ٣-٣-١١-٢ تحضير محلول الإنزيم

ذوب ١ ملغم من راسب الإنزيم في ١ مللتر من محلول النموذج الخزين واضيف له ٥٠ مايكرو لتر من ٢- مركبوتو ايثانول وسخن بدرجة حرارة ٩٠-١٠٠ م لمدة ٥ دقائق ثم ترك ليبرد.

### ٣-١-١١-٣-٣ تحضير محلول البروتينات القياسية

بالطريقة نفسها المتبعة في تحضير الأنزيم وذلك بإذابة ١ ملغم من كل من البروتينات القياسي (ألبومين المصل البقري وأنزيم الفا-امليز وإنزيم كرياتين كاينيز) في ١ مللتر من محلول النموذج الخزين اضيف له ٥٠ مايكرو لتر من ٢- مركبوتو ايثانول وسخن بدرجة حرارة ١٠٠- ٩٠ م لمدة ٥ دقائق ثم ترك ليبرد.

### ٣-١-١١-٤-٣-٣ الترحيل الكهربائي

اضيف ٥٠ مايكرو لتر من محلول الإنزيم إلى كل هلام بعد وضع محلول المستودع بحيث يغطي سطح الصفيحة وتم امرار تيار كهربائي بقوة ٥٠ فولت في مرحلة الفصل لمدة ٥ ساعات تقريباً، ثم استخرج الهلام من الصفيحة وغمر الهلام في محلول التثبيت لمدة ساعتين ثم في محلول صبغة الكوماسي R-٢٥٠ وترك أربع ساعات ثم أزيلت الصبغة بغمر الهلام في محلول إزالة الصبغة مع تبديله عدة مرات لحين ظهور الحزم الزرقاء بوضوح ثم حفظ الهلام في محلول ٧ % حامض الخليك.

### ٣-١١-٢-٣-٣ دراسة بعض الخصائص الحركية لإنزيم البروتيز المنقى جزئياً

#### ٣-١١-٢-١-٣-٣ تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم وثباته

قدرت فعالية الإنزيم في قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني لركيزة الكازئين ٠.٥ % فقد استعملت الأرقام الهيدروجينية ٦-١٢ وقدرت فعالية الإنزيم حسب الطريقة السابقة (Kunitz, ١٩٤٧). ولدراسة تأثير الرقم الهيدروجيني على ثباتية الإنزيم تم خزن محلول الإنزيم في المحاليل الدارئة ذات الأرقام الهيدروجينية المختلفة تراوحت بين ٣-١٢. وذلك بأخذ ٠.١ مللتر من الإنزيم وإضافته إلى ٠.٩ مللتر من المحلول الدارئ وحضن المزيج في درجة حرارة ٢٥ م لمدة ٣٠ دقيقة ثم وضعت الأنابيب في حمام ثلجي وقدرت فعالية الإنزيم المتبقية (Aubaid, ١٩٩٧).

#### ٣-١١-٢-٢-٣-٣ تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم وثباته

قدرت فعالية الإنزيم في درجات حرارة مختلفة تراوحت بين ٢٠-٨٠ م باستعمال ركيزة الكازئين ٠.٥ % وفي الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم وهو ١١ وقد استعملت نفس الطريقة السابقة في تقدير فعالية الإنزيم ولدراسة تأثير درجة الحرارة في ثبات الإنزيم فقد تم حضن الإنزيم في درجات حرارة مختلفة تراوحت بين ٠-٧٠ م وعند قيمة الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم وهو ٩ وذلك بأخذ ٠.١ مللتر من الإنزيم وإضافته إلى ٠.٩ مللتر من المحلول الدارئ الكلاسين وهيدروكسيد الصوديوم برقم هيدروجيني ٩ وحضن المزيج بدرجات حرارة مختلفة لمدة ٣٠ دقيقة ثم قدرت الفعالية الإنزيمية المتبقية بعد تبريد الأنابيب في حمام ثلجي (Aubaid, ١٩٩٧).

## Chapter Four الفصل الرابع

### ٤- النتائج Results:

#### ٤-١ عزل و تشخيص الفطر:

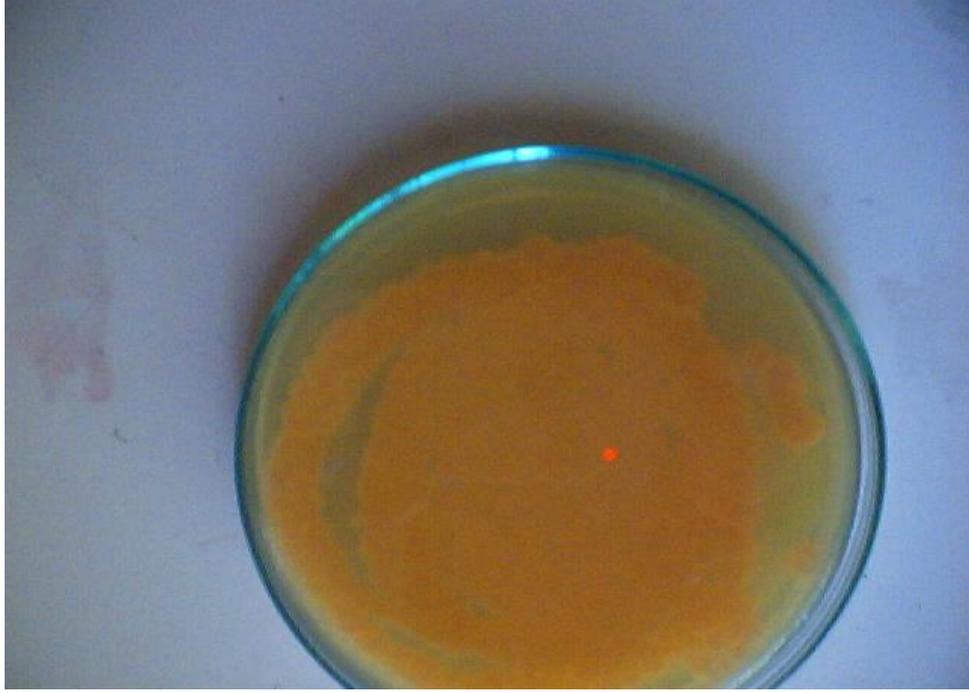
اظهرت نتائج الفحص المجهرى المباشرة لعينة الجلد المصاب وجود التراكيب الفطرية المتمثلة بسلاسل من الابواغ الحرشفية *Arthroconidia* التي تعتبر أحد علامات وجود الفطر *M. canis* المسؤؤل عن الإصابة.

بعد ان زرعت عينة الجلد المصاب على وسط سابر ويد كلوكوز أكار الحاوي الكلور امفينكول والسايكلوهكساميد بتركيز ٠.٠٥ ملغم / مل و ٠.٥ ملغم / مل على التوالي ،ظهرت مستعمرات الفطرية مرتفعة وذات أخايد و لونها ابيض مصفرا أو بيجيا وذات غزلا فطريا صوفيا كثيفا أما لون المستعمرة من الجهة الخلفية للطبق فكان اصفر إلى بني مصفر (شكل ٤-١-أ و ٤-٢-ب).

شكل (٤-١-أ) مستعمرة الفطر *M. canis* على وسط سابرويد كلوكوز اكار بعد ١٤ يوما

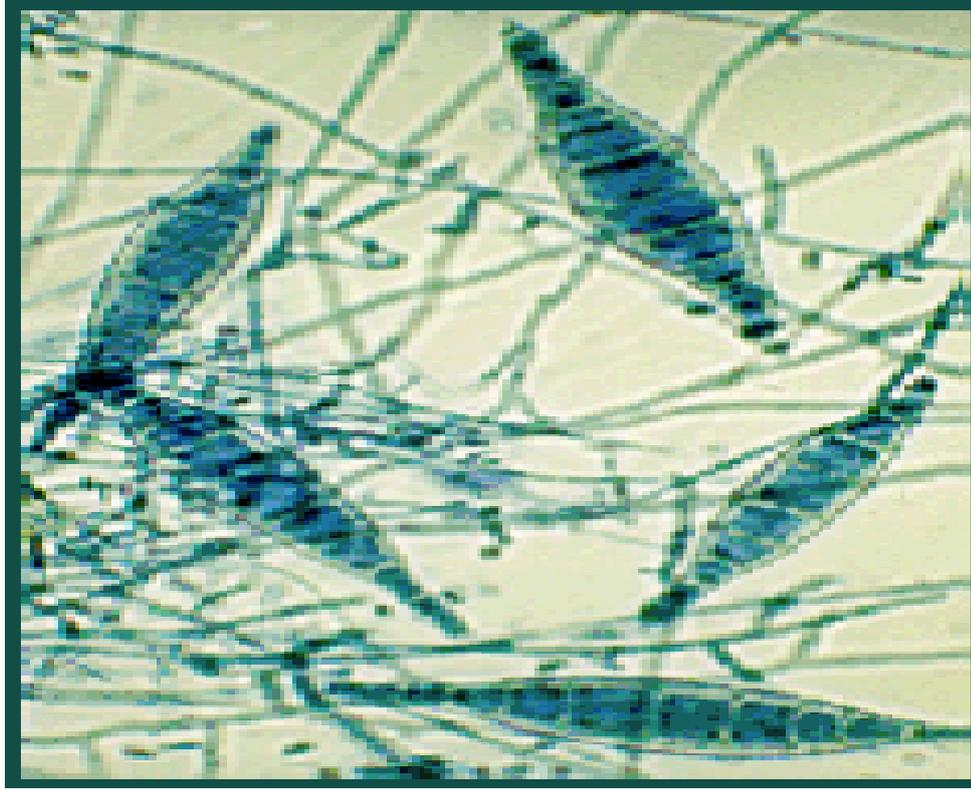


من الحضن وبدرجة حرارة ٢٥ م.



شكل (٤-١-ب) مستعمرة الفطر *Microsporium canis* من الجهة الخلفية على وسط سابرويد كلوكوز اكار اكار بعد ١٤ يوماً من الحضانة وبدرجة حرارة ٢٥°م.

وتميز الغزل الفطري الذي فحص مجهرياً على قوة (٤٠٠X) بوجود كونيدات كبيرة Macroconidia مغزلية الشكل أبعادها تتراوح بين ١٥-١٨ × ٦٠-٨٠ مايكرومتر وذات جدران خشنة وسميكة (شكل ٤-٣)، و تحتوي كذلك على عقد Knob في نهايتها البعيدة، أما الكونيدات الصغيرة Microconidia فهي معدومة او غير واضحة.

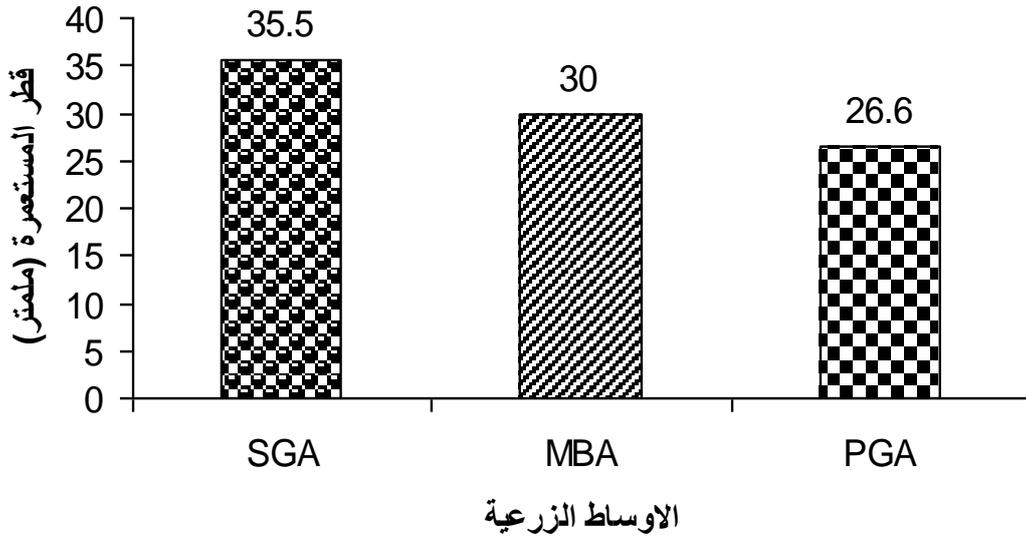


شكل (٤-١-ج) الغزل الفطري و الكونيدة الكبيرة (Macroconidia) لفطر *M. canis* على الوسط الغذائي سابرويد كلوكوز اكار بعد مدة حضانة ١٤ يوماً وفي درجة حرارة ٢٥°م (٤٠٠ X ٢٥=μm).

#### ٤-٢ تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر *M. canis*

##### ٤-٢-١ الوسط الغذائي

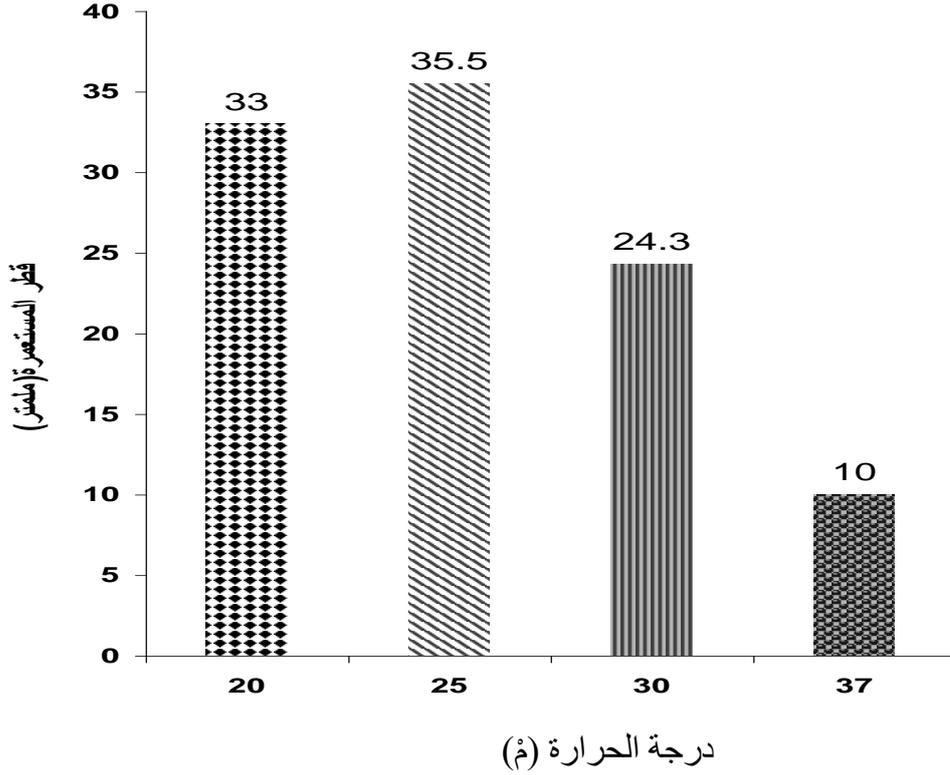
تم استعمال ثلاث أوساط غذائية هي سابرويد كلوكوز اكار (SGA) و مايكوبايوتك أكار M (BA) وأكار البطاطا والكلوكوز (PGA). درس تأثير هذه الأوساط الغذائية في نمو الفطر في درجة حرارة ٢٥°م ولمدة ١٤ يوماً وقد بينت نتائج التجربة وجود فروقات في معدل نمو الفطر (قطر المستعمرة) على وسط سابرويد كلوكوز اكار (SGA ٣٥.٥ ملليمتر) و مايكوبايوتك اكار (MBA ٣٠ ملليمتر) ووسط اكار البطاطا والكلوكوز (PGA ٢٦.٦ ملليمتر) (شكل ٤-٢).



شكل (٢-٤) تأثير نوع الوسيط الغذائي الصلب على معدل نمو الفطر *M. canis* بدرجة حرارة ٢٥ م ولمدة ١٤ يوماً من الحضن وقطر القرص المستخدم لقاهاً ١٠ ملمتر.

#### ٢-٢-٤ درجة الحرارة

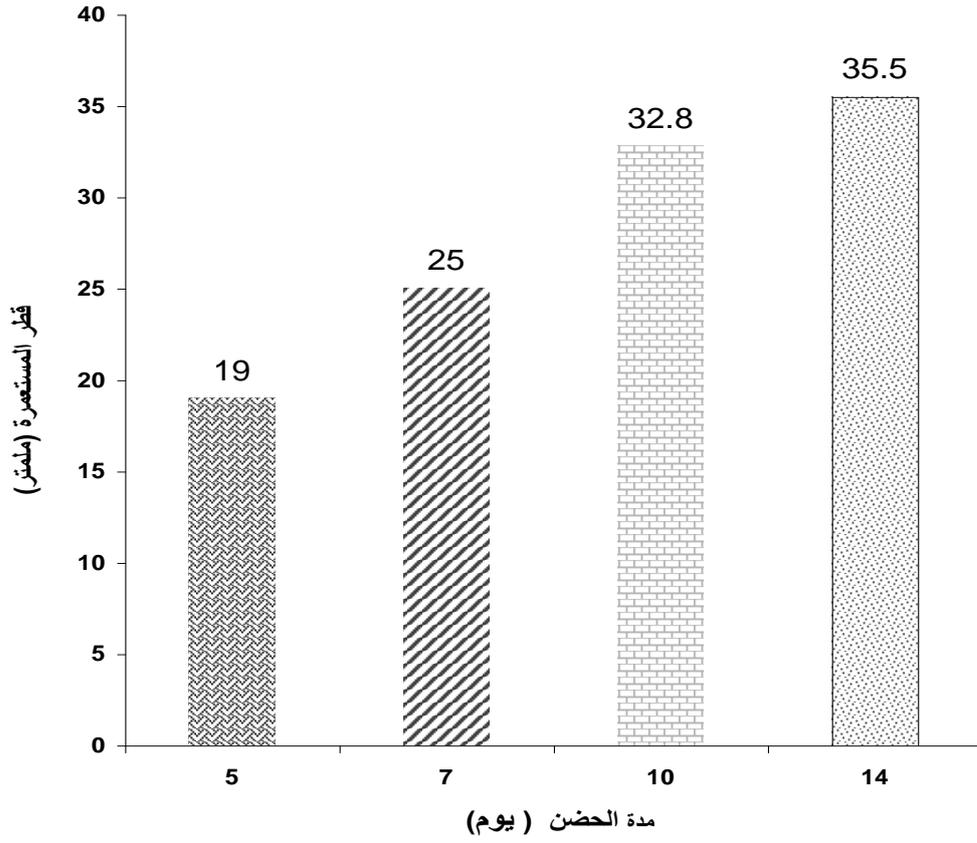
تم دراسة تأثير درجة الحرارة في نمو الفطر *M. canis* باختبار أربع درجات حرارة هي ٢٠ و ٢٥ و ٣٠ و ٣٧ م، وبعد مدة حضانة ١٤ يوماً أظهرت النتائج أن الدرجة الحرارية ٢٥ م هي المثلى لنمو الفطر إذ بلغ معدل قطر مستعمرة الفطر عندها ٣٥.٥ ملمتر في حين كان معدل النمو عند درجة حرارة ٢٠ و ٣٠ م هو ٣٣ ملمتر و ٢٤.٣ ملمتر على التوالي، ولم يطرأ تغيير في معدل نمو الفطر عند درجة حرارة ٣٧ م (شكل ٣-٤).



شكل ( ٣-٤ ) تأثير درجة الحرارة في نمو الفطر *M. canis* على وسط SGA ولمدة حضانة ١٤ يوماً وقطر القرص المستخدم لثقاباً ١٠ ملمتر.

#### ٣-٢-٤ مدة الحضن

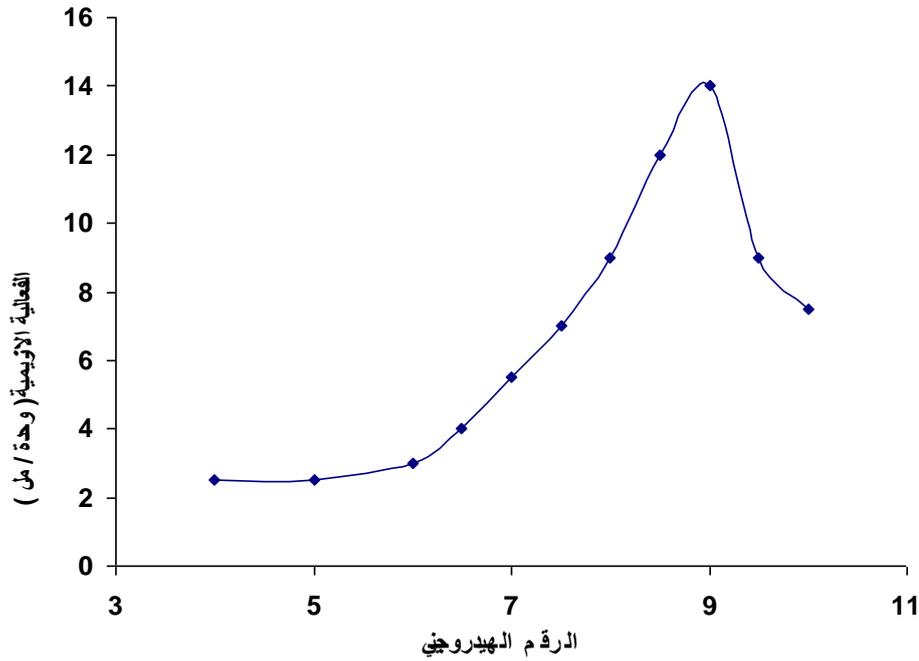
أجريت دراسة تأثير مدة الحضن على نمو فطر *M. canis* باستعمال وسط ساير ويد كلوكوز أكار وبدرجة حرارة ٢٥ م°. أظهرت النتائج أن معدل نمو الفطر الذي تناسب تناسباً طردياً مع مدة الحضن ذ بلغ أعلى معدل لنمو الفطر في اليوم ١٤ ( ٣٥.٥ مليمتر)، في حين كان معدل نمو الفطر في الأيام ٥، و٧، و١٠، و١٩ و٢٥ و٣٢.٨ ملمتر على التوالي (شكل ٤-٤).



شكل ( ٤-٤ ) تأثير مدة الحضانة في نمو الفطر *M. canis* على وسط SGA بدرجة حرارة ٢٥م وقطر القرص المستخدم لفاحاً ١٠ ملمتر.

٣-٤ تأثير بعض العوامل في إنتاج إنزيم البروتيز  
١-٣-٤ الرقم الهيدروجيني

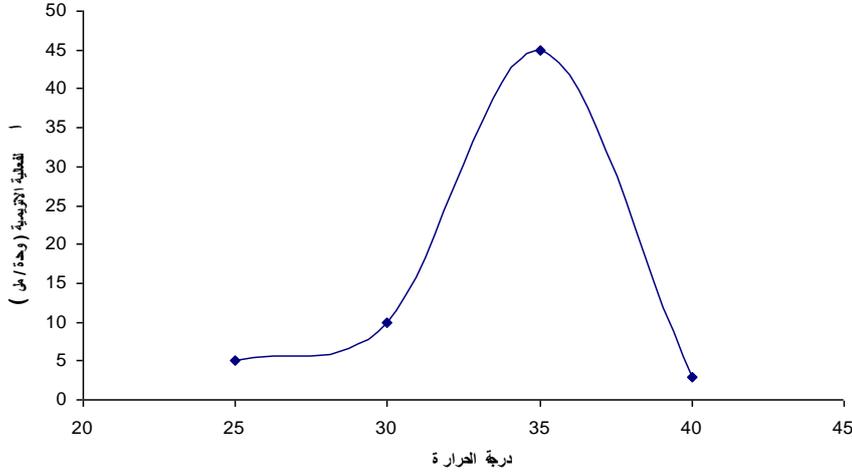
عند استخدام شعر الإنسان بتركيز ٠.٥٢% وفي درجة حرارة ٢٧م ظهر أن أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* هو ٩ (شكل ٤-٥)، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده ١٢ وحدة/مل، كما لوحظ أن إنتاج الإنزيم يكون في أقصاه بين الرقم الهيدروجيني ٨ و ١٠ مقارنة مع الرقم الهيدروجيني المتعادل والحامضي الذي تكون عنده الفعالية الإنزيمية أقل ما يمكن.



شكل (٤-٥) تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستخدام وسط Lee وجماعة (١٩٨٧) باستخدام شعر الانسان مصدر وحيد للنتروجين بتركيز ٠.٥٢% بدرجة ٢٧ م بعد ١٠ أيام من النمو (٥ أيام ساكنة و٥ أيام متحركة).

#### ٤-٣-٢ درجة الحرارة

تم دراسة تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستعمال شعر الانسان تركيز ٠.٥٢% و برقم هيدروجيني ٩ و باستخدام وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) ولمدة ١٠ أيام (ساكنة) ويظهر من الشكل ٤-٦ أن أفضل درجة حرارة لإنتاج إنزيم البروتيز هي ٣٥م، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية ٤٥ وحدة/مل، في حين انخفضت الفعالية الإنزيمية إلى ٥ وحدة / مل في درجة الحرارة ٢٥ م وإلى ٣ وحدة/مل في درجة حرارة ٤٠ م.

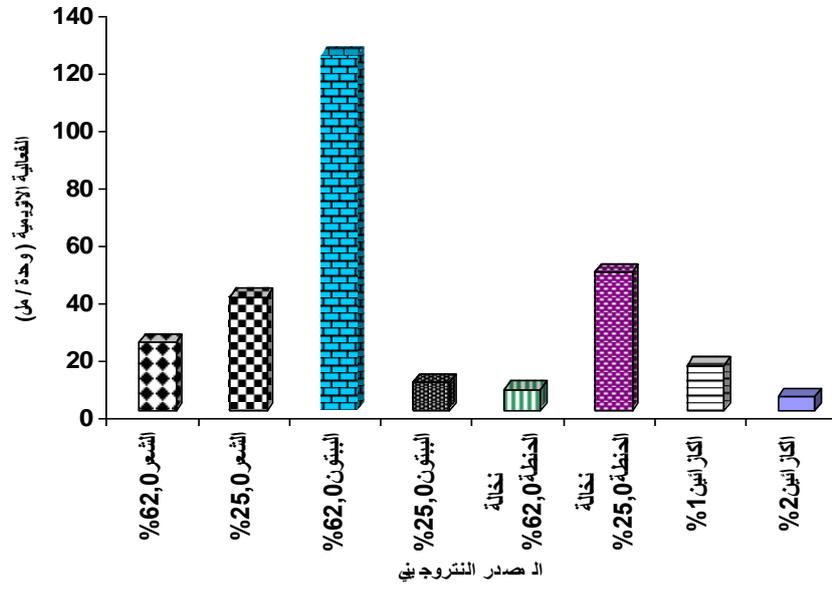


شكل ( ٤-٦ ) تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* وباستخدام شعر الإنسان بتركيز ٠.٥٢ % برقم هيدروجيني ٩ بعد ١٠ ايام من النمو(ساكنة).

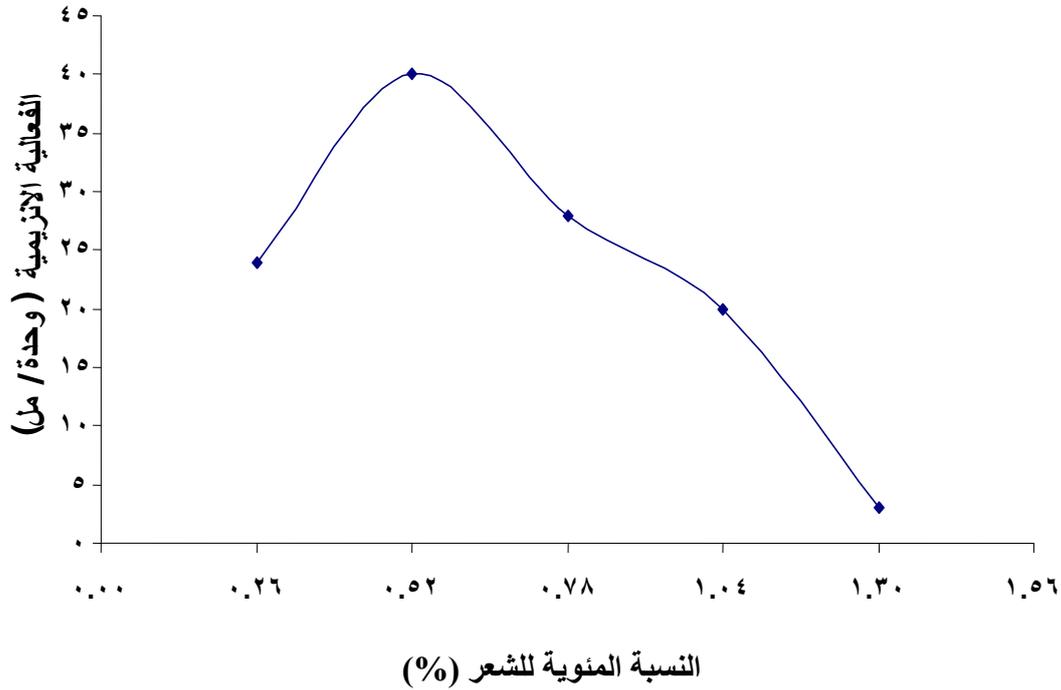
#### ٤-٣-٣ المصدر النتروجيني

اعتماداً على بعض التجارب الأولية التي تم إجراؤها تم اختيار أربعة أنواع من المصادر النتروجينية لدراسة قابلية الفطر *M. canis* على إنتاج إنزيم البروتيز و هي الشعر (٠.٢٦% و ٠.٥٢%) والبيتون (٠.٢٦% و ٠.٥٢%) ونخالة الحنطة (٠.٢٦% و ٠.٥٢%) والكازئين (١% و ٢%). أظهرت الفحوصات أن الفطر *M. canis* له القابلية على إنتاج إنزيم البروتيز باستخدام كل من المصادر النتروجينية الأربعة. أي أن الفطر ينتج أنواعاً مختلفة من البروتيز على الرغم من اختلاف الفعالية التي كانت ١٢٤ وحدة / مل عند استخدام البيتون ٠.٢٦% في حين كانت الفعالية الإنزيمية لكل من الشعر ٠.٢٦% ونخالة الحنطة ٠.٥٢% هي ٢٠ و ٤٨.٥ وحدة/مل على التوالي. اما فعالية انزيم البروتيز باستخدام الكازئين بتركيز ١% فكانت ١٦ وحدة/مل. شكل(٤-٧).

وتم دراسة تأثير تركيز المصدر النتروجيني (الشعر) في إنتاج إنزيم البروتيز حيث يلاحظ من الشكل (٤-٨) ان التركيز ٠.٥٢% كان افضل تركيز لانتاج انزيم البروتيز اذ بلغت الفعالية الانزيمية عند هذا التركيز ٤٠ وحدة/مل. وعندما كان التركيز ١.٣% انخفضت الفعالية الانزيمية الى ٣ وحدة/مل .



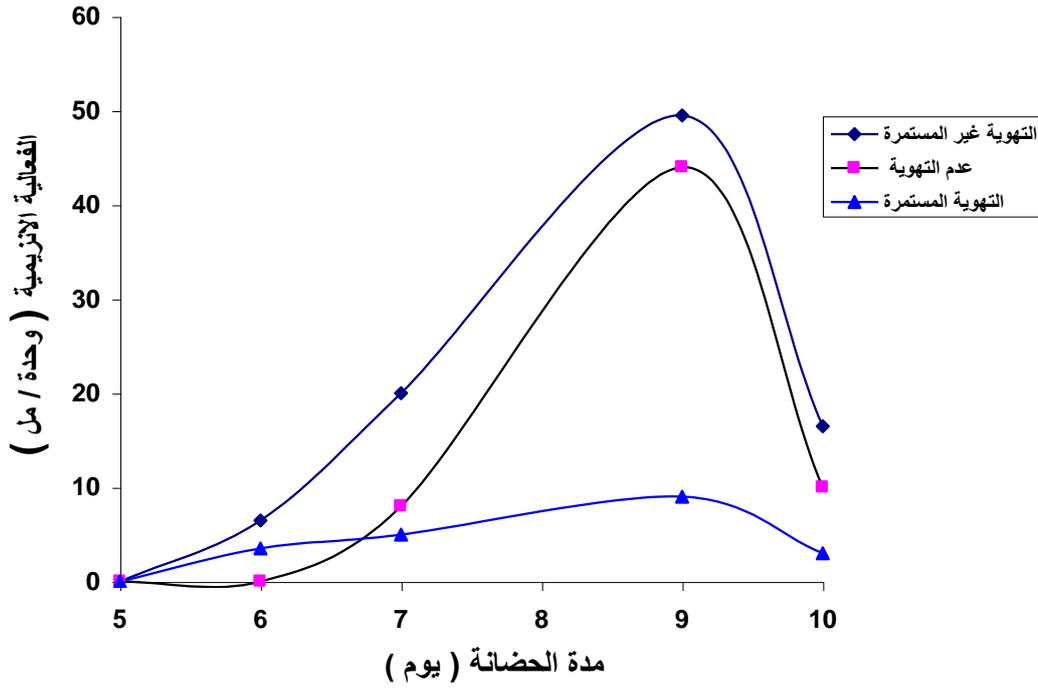
شكل (٧-٤) تأثير المصدر النتروجيني في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستخدام وسط Lee وجماعة (١٩٨٧) بدرجة ٣٥ م ورقم هيدروجيني ٩ بعد ١٠ أيام من النمو (٥ أيام ساكنة و٥ أيام متحركة)



شكل (٤-٨) تأثير النسبة المئوية للشعر في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستخدام وسط Lee وجماعة (١٩٨٧) بدرجة ٣٥ م ورقم هيدروجيني ٩ بعد ١٠ أيام من النمو (٥ أيام ساكنة و ٥ أيام متحركة).

#### ٤-٣-٤ التهوية والمزج ومدة الحضان

تم دراسة تأثير عوامل التهوية والمزج في إنتاج البروتيز من الفطر *M. canis* وظهرت النتائج ان التهوية غير المستمرة (أي الحضان لمدة ٥ أيام بدون مزج) و ثم الحضان مع المزج لمدة ٥ أيام اخرى كانت الفضلى في إنتاج إنزيم البروتيز مقارنة مع ظروف التهوية المستمرة وعدم التهوية. إذ بلغت الفعالية الإنزيمية باستخدام التهوية غير المستمرة ٤٩.٥ وحدة/مل في اليوم ٩ من الحضان في حين كانت الفعالية الإنزيمية باستخدام التهوية المستمرة وعدم التهوية هي ٩ و ٤٤ على التوالي في اليوم التاسع من الحضان (شكل ٤-٩). كذلك أظهرت النتائج ان اليوم ٩ من الحضان هو الأفضل في إنتاج الإنزيم.



شكل ( ٩-٤ ) تأثير مدة الحضن في إنتاج الأنزيم البروتيز من الفطر *M. canis*. باستخدام وسط Lee وجماعة Lee (١٩٨٧) بدرجة ٣٥ م ورقم هيدروجيني ٩ بعد ١٠ أيام من النمو (٥ أيام ساكنة و ٥ أيام متحركة).

#### ٤-٤ التنقية الجزئية لأنزيم البروتيز

##### ٤-٤-١ الترسيب بكبريتات الأمونيوم

لمعرفة الطريقة الفضلى لتركيز أنزيم البروتيز المنتج في هذه الدراسة استخدمت كبريتات الأمونيوم بنسبة اشباع متدرجة تراوحت بين ٤٠% و ٦٠% و ٨٠% لترسيب راسح الأنزيم الخام ولوحظ من التجربة الاولى أن نسبة الاشباع ٨٠% تعطي افضل فعالية نوعية. إذ بلغت الفعالية النوعية للراسب المتكون ٨٣٦ وحدة/ ملغم مقارنة مع الفعالية النوعية لراسح الأنزيم الخام والبالغة ٥٧ وحدة/ ملغم. وبلغت درجة النقاوة ١٤.٦ مرة ونسبة استرداد الفعالية الانزيمية ٨١.٦% (جدول ٤-١).

جدول (٤-١): مراحل التنقية الجزئية لأنزيم البروتيز المنتج من الفطر *M. canis*

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة /مل)	الفعالية الكلية (وحدة)	تركيز البروتين (ملغم /مل)	البروتين الكلي (ملغم)	الفعالية النوعية (وحدة /ملغم)	درجة النقاوة (مرة)	النسبة المئوية (%) لاسترداد الفعالية الإنزيمية

١٠٠	١	٥٧	٢٦.٢	٠.٢٦٢	١٥٠٠	١٥	١٠٠	راشح الإنزيم الخام
٨١.٦	١٤.٦	٨٣٦	١.٤٧	٠.١٢٢	١٢٢٤	١٠٢	١٢	كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع ٨٠%
٦٢.١	٣٥.٨	٢٠٤٣	٠.٤٥٦	٠.١١٤	٩٣٢	٢٣٣	٤	DEAE- cellulose chromatography

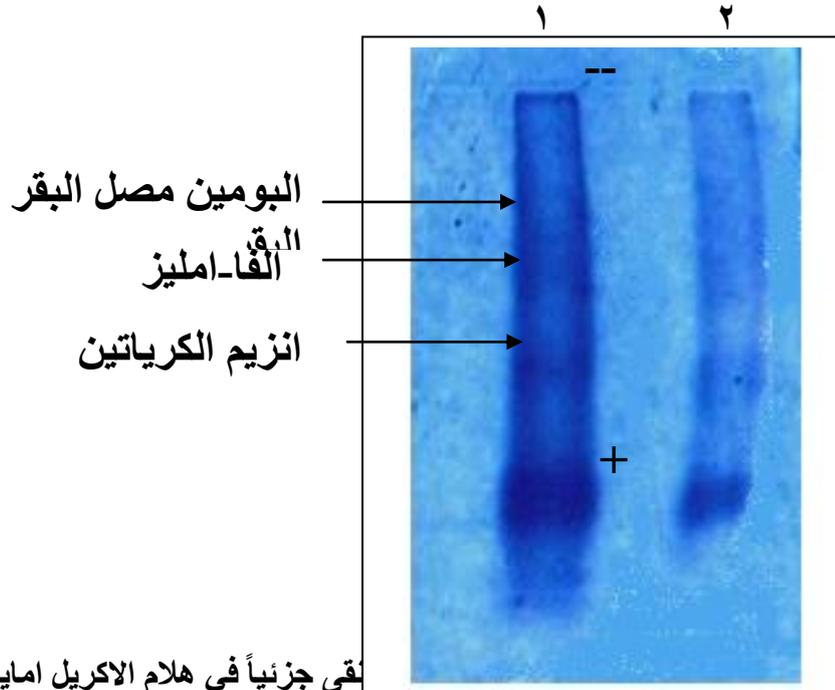
#### ٢-٤-٤ كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

أجريت تجربة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بأسلوب الوجة Step wise للمستخلص الخام خلال المبادلين CM-C و DEAE-C. أظهرت النتائج إن الإنزيم لا يرتبط بالمبادل CM-C وانه يرتبط بالمبادل DEAE-C لذلك تم استخدام عمود DEAE-C في عملية التنقية. وتم إمرار الراسب من عملية الفرز الغشائي خلال عمود DEAE-C وجمعت أجزاء الغسل والاسترداد كلاً على حدة وقدرت الفعالية الإنزيمية في كل منها ثم مزجت الأجزاء الحاوية على أعلى فعالية إنزيمية فكانت الفعالية النوعية منها ٢٠٤٣ وحدة/ ملغم بروتين، وبلغت عدد مرات التنقية ٣٥.٨ مرة مقارنة مع راشح الإنزيم الخام الذي يمتلك فعالية نوعية مقدارها ٥٧ وحدة/ ملغم بروتين. (جدول ٤-١).

#### ٥-٤ توصيف الإنزيم :

#### ١-٥-٤ الترحيل الكهربائي:

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي (شكل ٤-١٠) للمستخلص الإنزيمي المنقى جزئياً بعد مرحلة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بان المستخلص يحتوي على عدة بروتينات تختلف في الوزن الجزيئي وأحدها بروتين الإنزيم. كذلك تم ترحيل المستخلص كهربائياً بدون SDS وأعطى نفس النسق بالترحيل مما يشير إلى أن مرحلة التبادل الأيوني بالمبادل DEAE-cellulose قد ارتبطت به عدة بروتينات ذات شحنة سالبة .



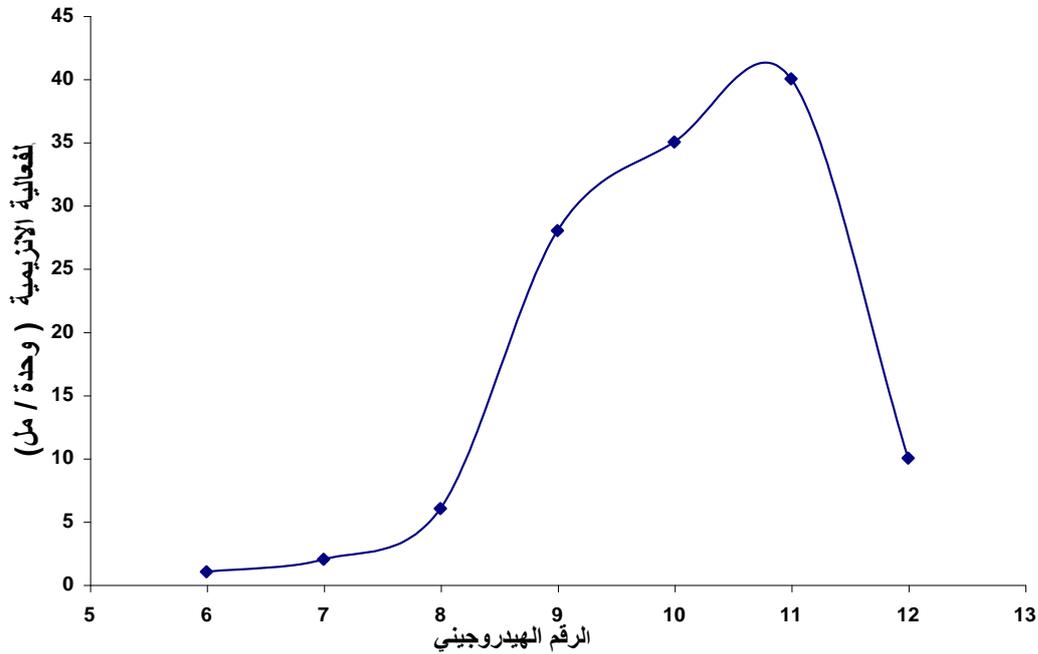
شكل (٤-٠) بوجود SDS (SDS-PAGE) بعد مرحله كروماتوغرافيا التبادل الايوني (تركيز هلام اكريل أميد = ١٠%، الزمن = ٥ ساعات، الفولتية = ٥٠ فولت)

- ١- يمثل مسار البروتينات القياسية (إنزيم الكرياتين كاينيز، الوزن الجزيئي = ٤١ كيلودالتون، وإنزيم ألفا-أمليز، الوزن الجزيئي = ٥٨ كيلودالتون، وألبومين مصّل البقر، الوزن الجزيئي = ٦٧ كيلودالتون).
٢. يمثل مسار الانزيم المنقى جزئياً.

٤-٥-٢ دراسة بعض الخصائص الحركية لإنزيم البروتيز المنقى جزئياً

٤-٥-٢-١ تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم وثباته

أشارت النتائج أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتيز المنقى جزئياً من الفطر *M. canis* هو ١١ باستخدام ركيزة الكازئين بدرجة حرارة ٣٧ م° ومدة تفاعل ٢٠ دقيقة إذ بلغت أقصى فعالية إنزيمية له (٤٠ وحدة/مل). كما أظهرت النتائج أن

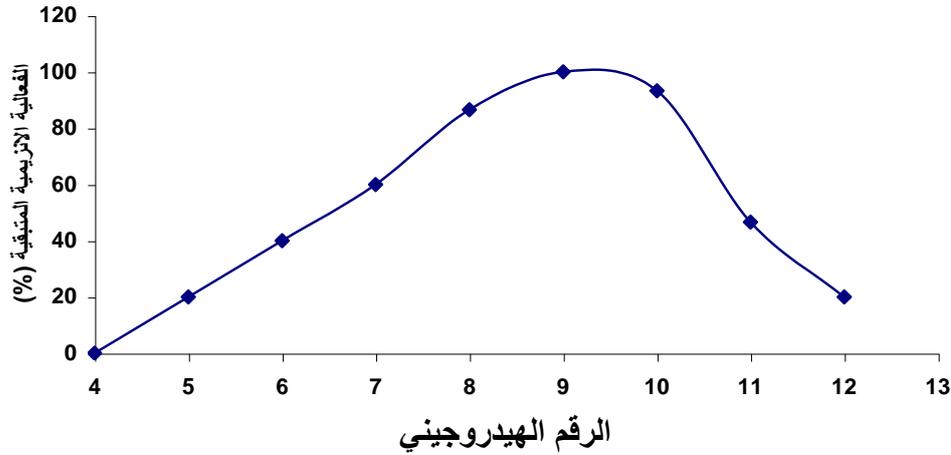


افضل نشاط للإنزيم يقع ضمن المدى القاعدي ٩ - ١٢ (الشكل ٤-١١).

الرقم الهيدروجيني

شكل (٤-١١) تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *M. canis* في وسط Lee (١٩٨٧) والمنقى جزئياً بدرجة حرارة ٣٧ م° ومدة تفاعل ٢٠ دقيقة .

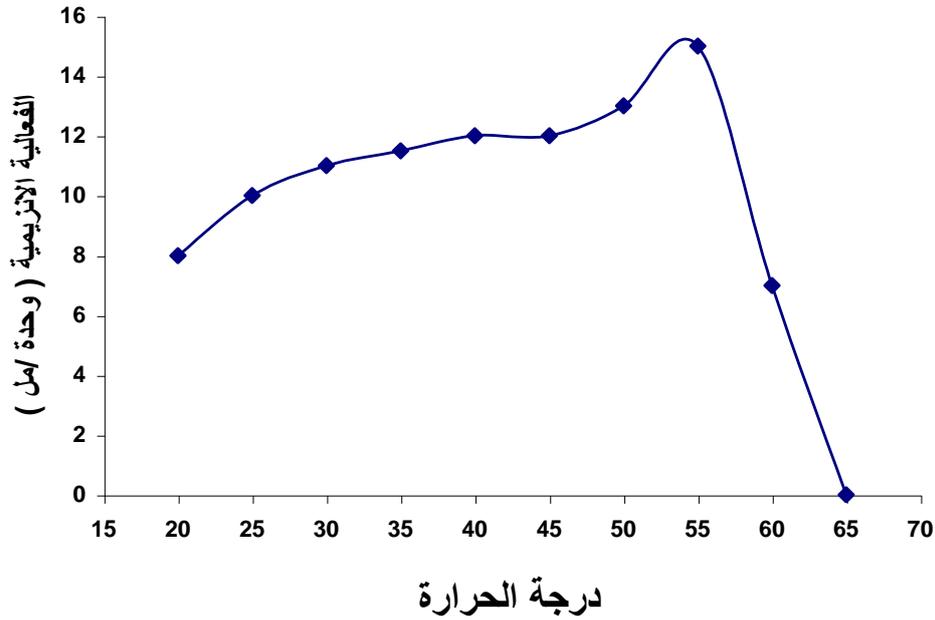
٨ (شكل ٤-١٢). أما ثبات الإنزيم فكان أعلى ثبات له عند الرقم الهيدروجيني ٩ و ١٠، إذ بلغت ١٠٠ % و ٩٣.٣ % من الفعالية الإنزيمية الاصلية، ويحتفظ بمعظم فعاليته عند الرقم الهيدروجيني



شكل (٤-١٢) تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات إنزيم البروتيز المنقى جزئياً من الفطر *M. canis*

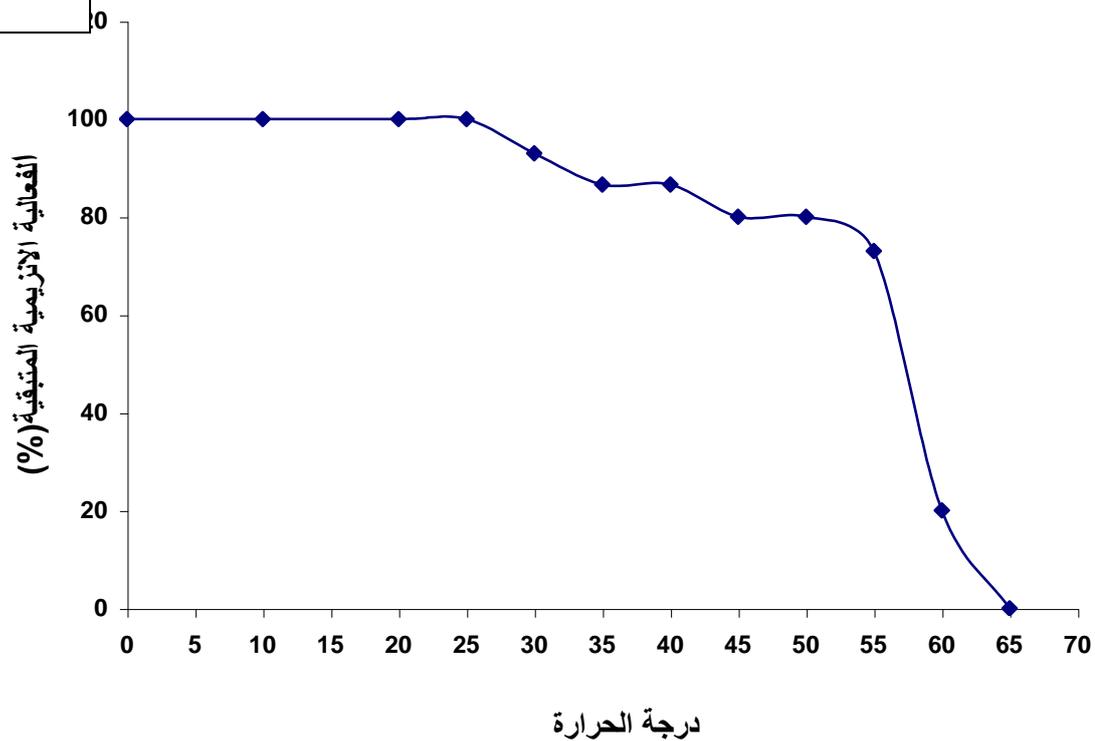
#### ٤-٢-٥-٤ تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم البروتيز وثباته

أظهرت النتائج أن الدرجة الحرارية المثلى لفعالية إنزيم البروتيز برقم هيدروجيني ١١ ومدة تفاعل ٢٠ دقيقة هي ٥٥° م وكانت الفعالية الإنزيمية ضمن المدى الحراري ٣٠-٥٥ م هي ١١-١٥ وحدة / مل على التوالي ثم هبطت الفعالية الإنزيمية بعد درجة حرارة ٥٥° م وبلغت صفراً عند درجة حرارة ٦٥° م (شكل ٤-١٣).



شكل ( ٤-١٣ ) تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *M. canis* في وسط Lee (١٩٨٧) والمنقى جزئياً برقم هيدروجيني ١١ ومدة تفاعل ٢٠ دقيقة.

آما تأثير درجة الحرارة على ثبات الإنزيم فقد أظهرت النتائج (شكل ٤-١٤) ثبات الإنزيم ١٠٠% عند درجات الحرارة ٠ - ٢٥ °م، واحتفاظ الإنزيم بنسبة عالية من فعاليته عند درجات الحرارة ٣٠-٥٥ °م ، في حين فقد الإنزيم فعاليته تماماً عند درجة حرارة ٦٥° م ومدة حضانة ٣٠ دقيقة.



شكل ( ٤-١٤ ) تأثير درجة الحرارة في ثبات إنزيم البروتيز المنقى جزئياً من الفطر *M canis*

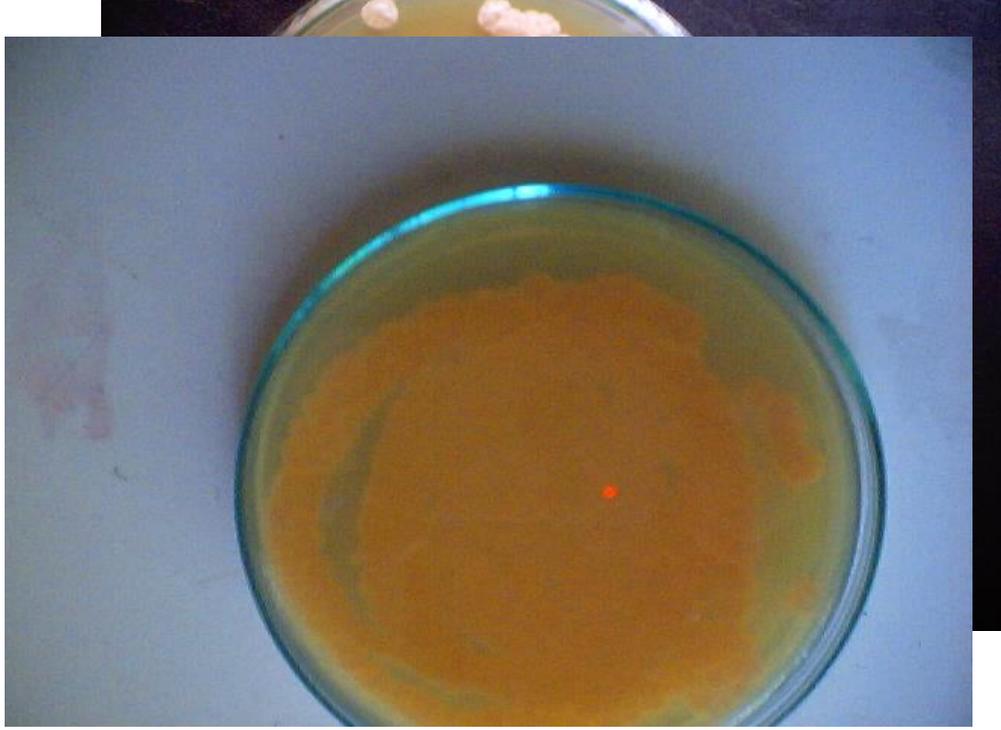
## Chapter Four الفصل الرابع

### ٤- النتائج Results

#### ٤-١ عزل و تشخيص الفطر

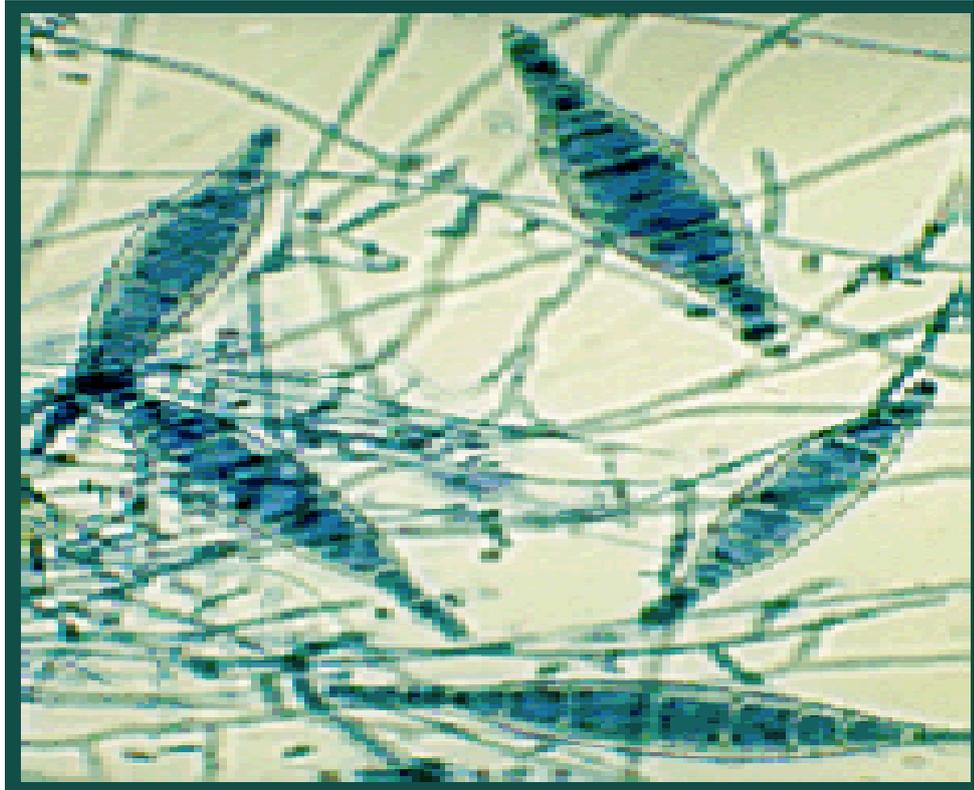
اظهرت نتائج الفحص المجهرى المباشرة لعينة الجلد المصاب وجود التراكيب الفطرية المتمثلة بسلاسل من الابواغ الحرشفية *Arthroconidia* التي تعتبر أحد علامات وجود الفطر *M. canis* المسؤؤل عن الإصابة.  
بعد ان زرعت عينة الجلد المصاب على وسط ساير ويد كلوكوز أكار الحاوي المضادات الحيوية الكلور امفينكول (٠.٠٥ ملغم/مل) والسايكلوهكسمايد (٠.٥ ملغم/مل)، ظهرت مستعمرات الفطر مرتفعة وذات أخاديد و لونها ابيض مصفراً أو بيجياً وذات غزلاً فطرياً صوفياً كثيفاً أما لون المستعمرة من الجهة الخلفية للطبق فكان اصفر إلى بني مصفر (شكل ٤-١-أ و ٤-٢-ب).

شكل (٤-١-أ) مستعمرة الفطر *M. canis* على وسط سايرويد كلوكوز اكار بعد ١٤ يوماً من الحضان وبدرجة حرارة ٢٥°م.



شكل (٤-١-ب) مستعمرة الفطر *M. canis* من الجهة الخلفية على وسط سايرويد كلوكوز اكار بعد ١٤ يوماً من الحضان وبدرجة حرارة ٢٥°م.

وتميز الغزل الفطري الذي فحص مجهرياً على قوة (٤٠٠X) بوجود كونيدات كبيرة *Macroconidia* مغزلية الشكل أبعادها تتراوح بين ١٥-١٨ × ٦٠-٨٠ مايكرومتر وذات جدران خشنة وسميكة (شكل ٤-٣)، و تحتوي كذلك على عقد *Knob* في نهايتها البعيدة، أما الكونيدات الصغيرة *Microconidia* فهي معدومة او غير واضحة.

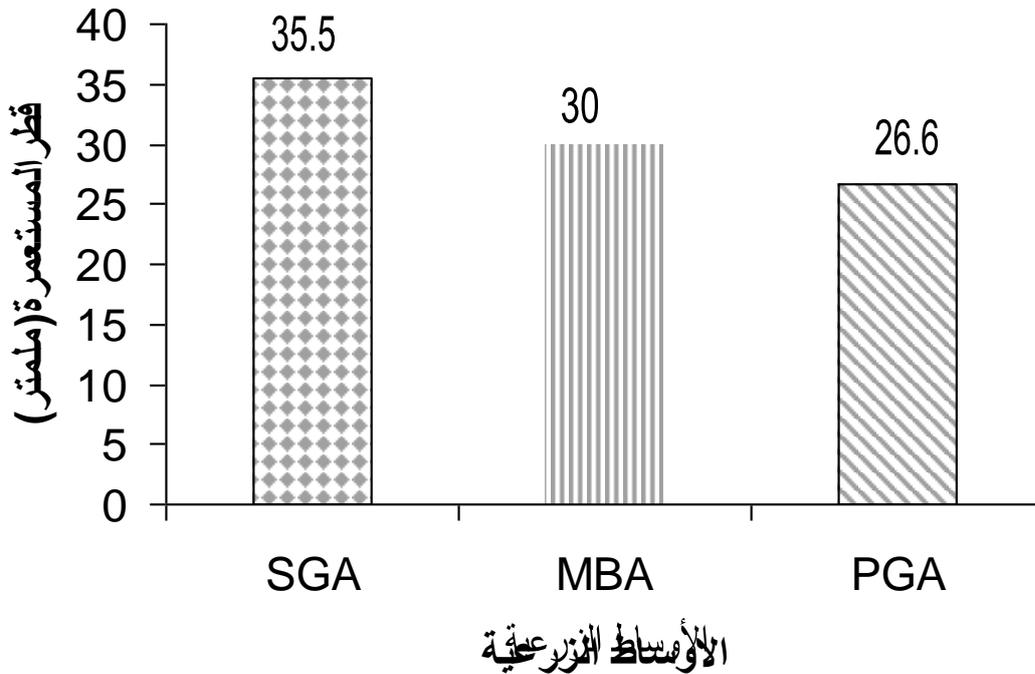


شكل (٤-١-ج) الغزل الفطري و الكونيدة الكبيرة (Macroconidia) لفطر *M. canis* على الوسط الغذائي سابرويد كلوكوز اكار بعد مدة حضانة ١٤ يوماً و بدرجة حرارة ٢٥م (٢٥µm X ٤٠٠).

٤-٢ تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر *M. canis*

#### ٤-٢-١ الوسط الغذائي

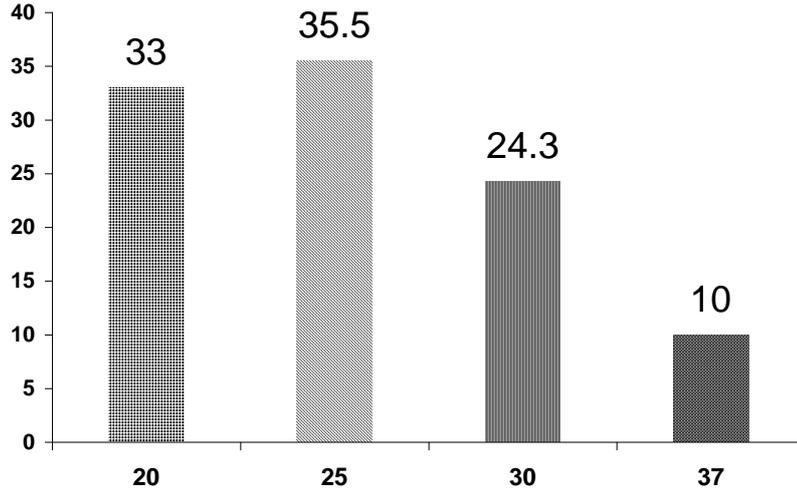
بينت نتائج التجربة وجود فروقات في معدل نمو الفطر (قطر المستعمرة) على وسط سابرويد كلوكوز اكار (SGA ٣٥.٥ ملليمتر) ومايكوبايتوك اكار (MBA ٣٠ ملليمتر) ووسط اكار الكلوكوز والبطاطا (PGA ٢٦.٦ ملليمتر) (شكل ٤-٢).



شكل (٤-٢) تأثير نوع الوسط الغذائي الصلب على معدل نمو الفطر *M. canis* في درجة حرارة ٢٥ م ولمدة ١٤ يوماً من الحضن وقطر القرص المستخدم لقاحاً ١٠ ملليمتر.

#### ٤-٢-٢ درجة الحرارة

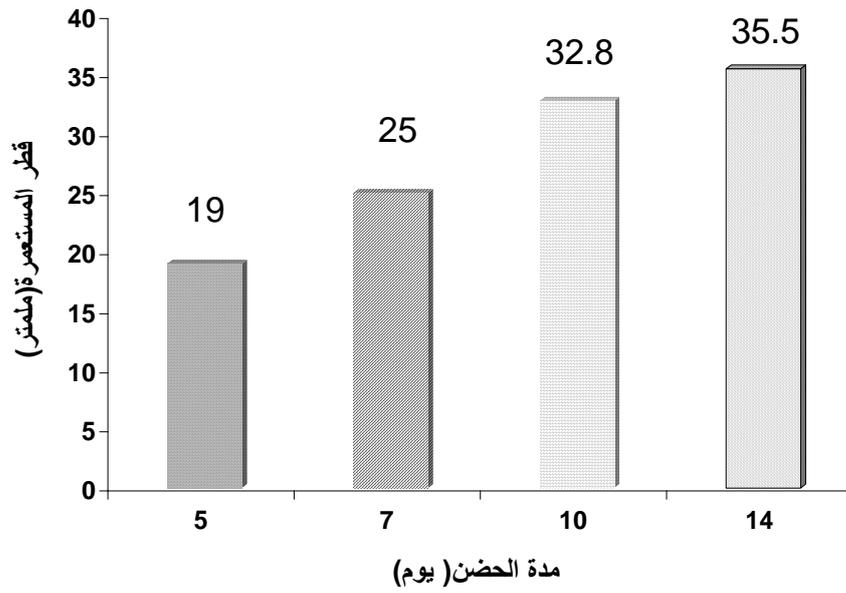
أظهرت النتائج أن الدرجة الحرارية ٢٥ م هي المثلى لنمو الفطر إذ بلغ معدل قطر مستعمرة الفطر عندها ٣٥.٥ ملليمتر في حين كان قطر المستعمرة عند درجة حرارة ٢٠ و ٣٠ م هو ٣٣ ملليمتر و ٢٤.٣ ملليمتر على التوالي، ولم يطرأ تغيير في نمو الفطر عند درجة حرارة ٣٧ م ضمن القرص المستخدم لقاحاً (١٠ ملليمتر) (شكل ٤-٣).



شكل ( ٤-٣ ) تأثير درجة الحرارة في نمو الفطر *M. canis* على وسط SGA ولمدة حضانة ١٤ يوماً و قطر القرص المستخدم لقاحا ١٠ ملمتر.

#### ٤-٢-٣ مدة الحضن

أجريت دراسة تأثير مدة الحضن على نمو فطر *M. canis* باستعمال وسط سابر ويد كلوكوز أكار ودرجة حرارة ٢٥ م. أظهرت النتائج أن معدل نمو الفطر الذي تناسب تناسباً طردياً مع مدة الحضن، إذ بلغ أعلى معدل لنمو الفطر في اليوم ١٤ هو ٣٥.٥ ملليمتر، في حين كان معدل نمو الفطر في الأيام ٥ و ٧ و ١٠ و ١٩ و ٢٥ و ٣٢.٨ مللمتر على التوالي (شكل ٤-٤).

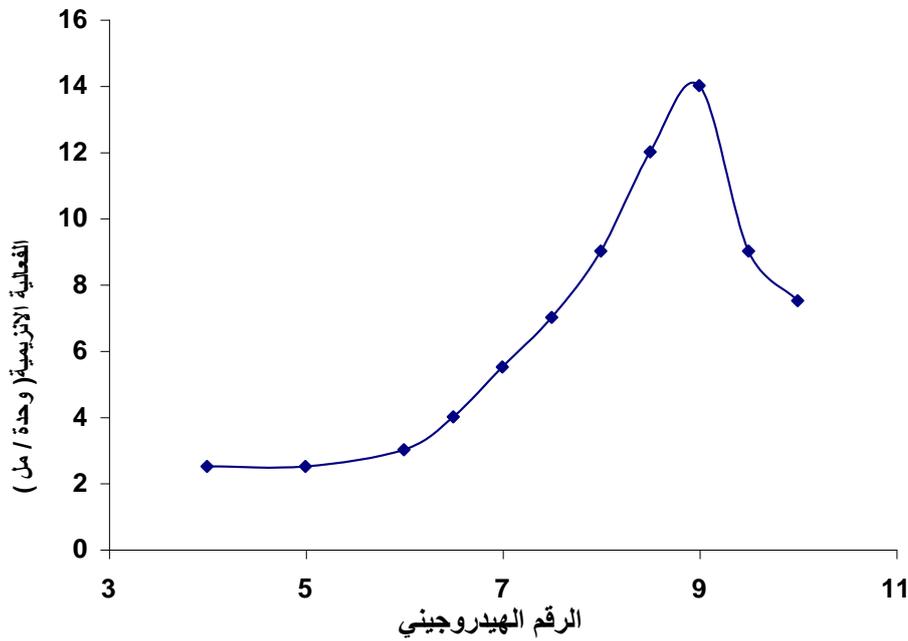


شكل ( ٤-٤ ) تأثير مدة الحضانة في نمو الفطر *M. canis* على وسط SGA وفي درجة حرارة ٢٥°م وقطر القرص المستخدم لقاحا ١٠ ملمتر .

#### ٣-٤ تأثير بعض العوامل في إنتاج إنزيم البروتيز

##### ١-٣-٤ الرقم الهيدروجيني

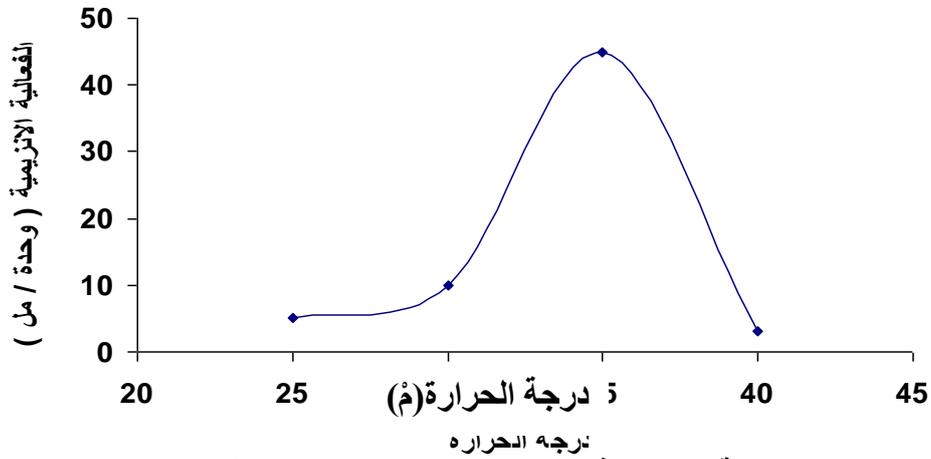
عند استخدام شعر الإنسان بتركيز ٠.٥٢% وفي درجة حرارة ٢٧م° ظهر أن أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* هو ٩ (شكل ٤-٥)، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده ١٢ وحدة/مل، كما لوحظ أن إنتاج الإنزيم يكون في أقصاه بين الرقم الهيدروجيني ٨ و ١٠ مقارنة مع الرقم الهيدروجيني المتعادل والحامضي الذي تكون عنده الفعالية الإنزيمية أقل ما يمكن.



شكل (٤-٥) تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستخدام وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) باستخدام شعر الإنسان مصدرا وحيد للنتروجين بتركيز ٠.٥٢% عند درجة حرارة ٢٧م° بعد ١٠ أيام من النمو (٥ أيام ساكنة و٥ أيام متحركة).

##### ٢-٣-٤ درجة الحرارة

تم دراسة تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستخدام شعر الإنسان تركيز ٠.٥٢% و برقم هيدروجيني ٩ ويظهر من الشكل ٤-٦ أن أفضل درجة حرارة لإنتاج إنزيم البروتيز هي ٣٥م°، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية ٤٥ وحدة/مل، في حين انخفضت الفعالية الإنزيمية إلى ٥ وحدة/مل في درجة الحرارة ٢٥م° وإلى ٣ وحدة/مل في درجة حرارة ٤٠م°.



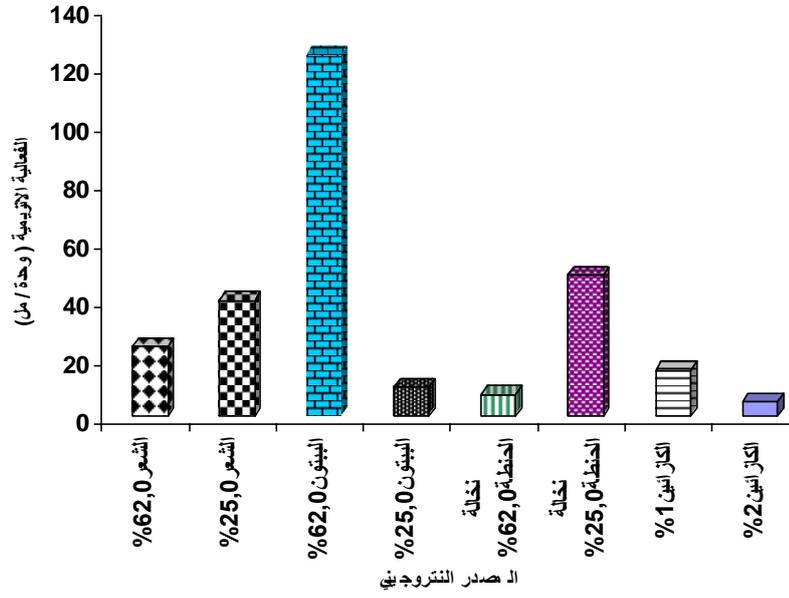
شكل ( ٦-٤ ) تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستخدام وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) وباستخدام شعر الإنسان بتركيز ٠.٥٢ % برقم هيدروجيني ٩ ولمدة ١٠ أيام (Lee et al., 1987).

#### ٣-٤-٤ المصدر النتروجيني

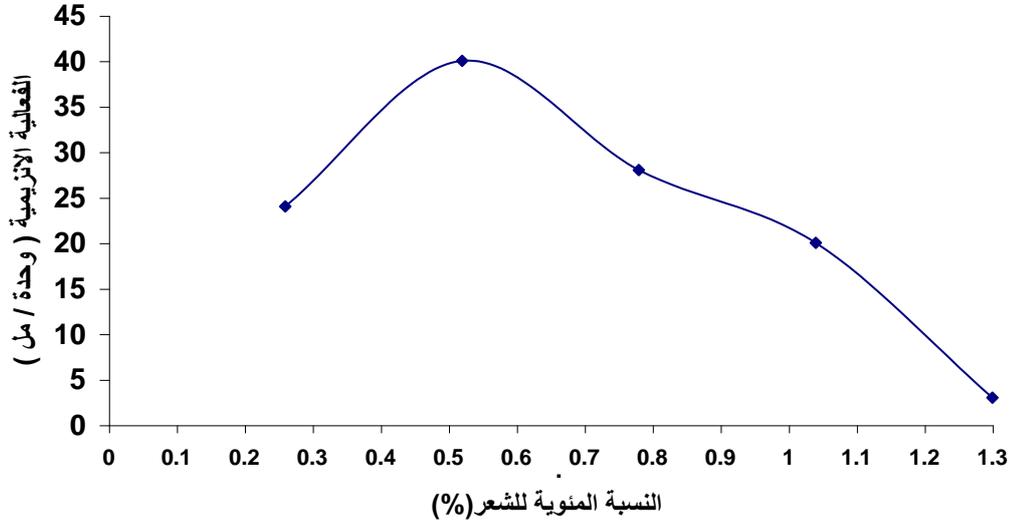
اعتماداً على بعض التجارب الأولية التي تم إجراؤها تم اختيار أربعة أنواع من المصادر النتروجينية لدراسة قابلية الفطر *M. canis* على إنتاج البروتيز و هي الشعر (٠.٢٦% و ٠.٥٢%) والبيتون (٠.٢٦% و ٠.٥٢%) ونخالة الحنطة (٠.٢٦% و ٠.٥٢%) والكازئين (١% و ٢%). أظهرت الفحوصات أن الفطر *M. canis* له القابلية على إنتاج إنزيم البروتيز باستخدام كل من المصادر النتروجينية الأربعة. أي أن الفطر ينتج أنواعاً مختلفة من البروتيز على الرغم من اختلاف الفعالية التي كانت ١٢٤ وحدة / مل عند استخدام البيتون ٠.٢٦% في حين كانت الفعالية الإنزيمية لكل من الشعر ٠.٢٦% ونخالة الحنطة ٠.٥٢% هي ٢٠ و ٤٨.٥ وحدة/مل على التوالي. أما فعالية إنزيم البروتيز باستخدام الكازئين بتركيز ١% فكانت ١٦ وحدة/مل شكل (٧-٤).

وتم دراسة تأثير تركيز المصدر النتروجيني (الشعر) في إنتاج إنزيم البروتيز حيث يلاحظ من الشكل (٨-٤) أن التركيز ٠.٥٢% كان أفضل تركيز لإنتاج إنزيم البروتيز إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عند هذا التركيز ٤٠ وحدة/مل، وعندما كان التركيز ١.٣% إنخفضت الفعالية الإنزيمية إلى ٣ وحدة/مل.

شكل ( ٧-٤ ) تأثير المصدر النتروجيني في إنتاج انزيم البروتيز من الفطر *M. cains*



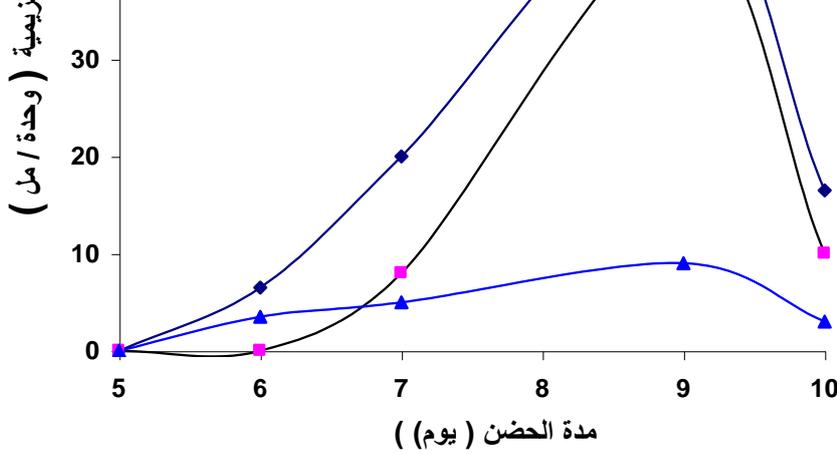
باستخدام وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) في درجة حرارة ٣٥°م ورقم هيدروجيني ٩ ومدة حضانة ١٠ ايام (٥ ايام ساكنة و ٥ ايام متحركة).



شكل (٤-٨) تأثير النسبة المئوية للشعر في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستخدام وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) في درجة حرارة ٣٥ م ورقم هيدروجيني ٩ ومدة حضن ١٠ أيام (٥ أيام ساكنة و٥ أيام متحركة).

#### ٤-٣-٤ التهوية والمزج ومدة الحضن

تم دراسة تأثير عوامل التهوية والمزج في إنتاج البروتيز من الفطر *M. canis* وظهرت النتائج ان التهوية غير المستمرة (أي الحضن لمدة ٥ أيام بدون مزج) وثم الحضن مع المزج لمدة ٥ أيام اخرى كانت الفضلى في إنتاج إنزيم البروتيز مقارنة مع ظروف التهوية المستمرة وعدم التهوية. إذ بلغت الفعالية الإنزيمية باستخدام التهوية غير المستمرة ٤٩.٥ وحدة/مل في اليوم ٩ من الحضن في حين كانت الفعالية الإنزيمية باستخدام التهوية المستمرة وعدم التهوية هي ٩ و ٤٤ على التوالي في اليوم التاسع من الحضن (شكل ٤-٩). كذلك أظهرت النتائج ان اليوم ٩ من الحضن هو الأفضل في إنتاج الإنزيم.



شكل ( ٩-٤ ) تأثير مدة الحضانة في إنتاج أنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* في وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) وبرقم هيدروجيني ٩ وفي درجة حرارة ٣٥ م باستخدام شعر الانسان بتركيز ٠.٥٢ % وفي ظروف التهوية المختلفة.

#### ٤-٤ التنقية الجزئية لأنزيم البروتيز

##### ٤-٤-٤ الترسيب بكبريتات الأمونيوم

لمعرفة الطريقة الفضلى لتركيز أنزيم البروتيز المنتج في هذه الدراسة استخدمت كبريتات الأمونيوم بنسبة اشباع متدرجة تراوحت بين ٤٠-٨٠% لترسيب راشح الأنزيم الخام ولوحظ من التجربة الاولى أن نسبة الاشباع ٨٠% تعطي افضل فعالية نوعية. إذ بلغت الفعالية النوعية للراسب المتكون ٨٣٦ وحدة/ ملغم مقارنة مع الفعالية النوعية لراشح الأنزيم الخام والبالغة ٥٧ وحدة/ ملغم. وبلغت درجة النقاوة ١٤.٦ مرة ونسبة استرداد الفعالية الانزيمية ٨١.٦ % (جدول ٤-١).

جدول (٤-١): مراحل التنقية الجزئية لأنزيم البروتيز المنتج من الفطر *M. canis*.

خطوات التنقية	الحجم / (مل)	الفعالية (وحدة / مل)	الفعالية الكلية (وحدة)	تركيز البروتين (ملغم / مل)	البروتين الكلي (ملغم)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم)	درجة النقاوة (مرة)	النسبة المئوية لاسترداد الفعالية الإنزيمية (%)
راشح الأنزيم الخام	١٠٠	١٥	١٥٠٠	٠.٢٦٢	٢٦.٢	٥٧	١	١٠٠
كبريتات الأمونيوم بنسبة اشباع ٨٠%	١٢	١٠٢	١٢٢٤	٠.١٢٢	١.٤٧	٨٣٦	١٤.٦	٨١.٦

72.1	30.8	20.43	0.406	0.114	932	233	ε	DEAE- cellulose chromatography
------	------	-------	-------	-------	-----	-----	---	--------------------------------

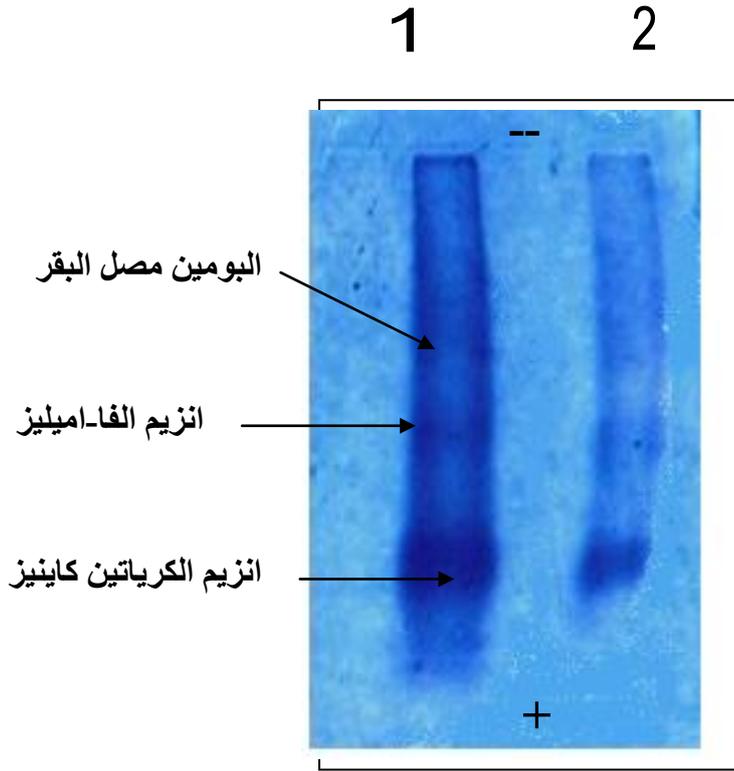
#### ٤-٤-٢ كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

أجريت تجربة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بأسلوب الوجبة Batch wise للمستخلص الخام خلال المبادلين CM-c و DEAE-c. أظهرت النتائج إن الإنزيم لا يرتبط بالمبادل CM- C وانه يرتبط بالمبادل DEAE-c لذلك تم استخدام عمود DEAE-c في عملية التنقية. وتم إمرار الراسب من عملية الفرز الغشائي خلال عمود DEAE-c وجمعت أجزاء الغسل والاسترداد كلاً على حدة وقدرت الفعالية الإنزيمية في كل منها ثم مزجت الأجزاء الحاوية على أعلى فعالية إنزيمية فكانت الفعالية النوعية منها ٢٠٤٣ وحدة/ ملغم بروتين، وبلغت عدد مرات التنقية ٣٥.٨ مرة مقارنة مع راسح الإنزيم الخام الذي يمتلك فعالية نوعية مقدارها ٥٧ وحدة/ ملغم بروتين. (جدول ٤-١).

#### ٤-٥ توصيف الإنزيم

##### ٤-٥-١ الترحيل الكهربائي

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي (شكل ٤-١٠) للمستخلص الإنزيمي المنقى جزئياً بعد مرحلة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بان المستخلص يحتوي على عدة بروتينات تختلف في الوزن الجزيئي واحدها بروتين الانزيم. كذلك تم ترحيل المستخلص كهربائياً بدون SDS واعطى نفس النسق بالترحيل مما يشير إلى أن مرحلة التبادل الأيوني بالمبادل DEAE-cellulose قد ارتبط به عدة بروتينات ذات شحنة سالبة.



شكل ( ٤-١٠ ) الترحيل الكهربائي لإنزيم البروتيز المنقى جزئياً في هلام اكريل أميد بوجود SDS-PAGE بعد مرحلة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (تركيز هلام اكريل أميد=١٠%، الزمن=٥ ساعات، الفولتية=٥٠ فولت ).

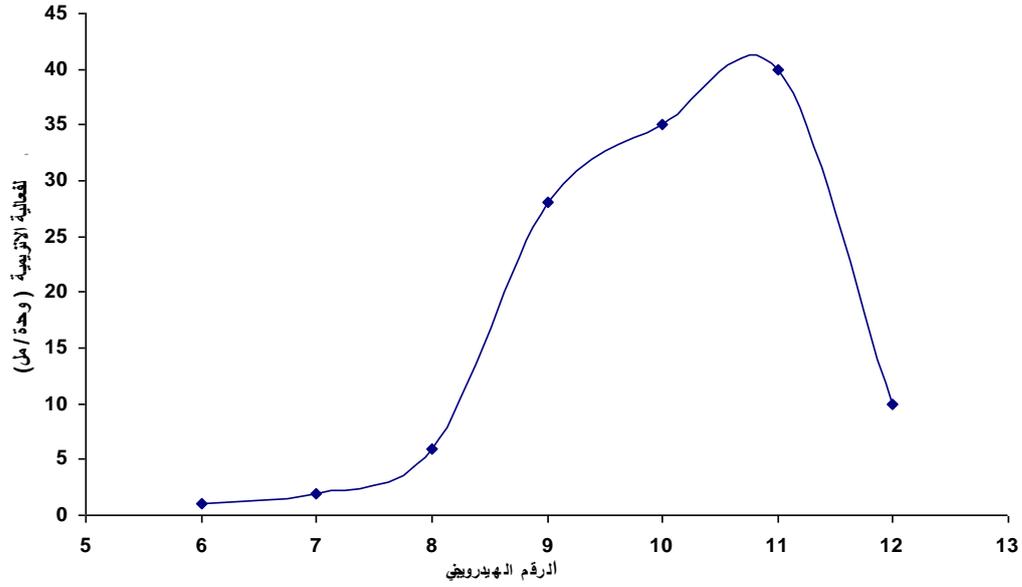
١- يمثل مسار البروتينات القياسية (انزيم الكرياتين كائينز، الوزن الجزيئي=٤١ كيلودالتون، والبومين مصّل البقر، الوزن الجزيئي=٦٧ كيلودالتون، وإنزيم ألفا- أمليز، الوزن الجزيئي=٥٨ كيلودالتون).

٢ - يمثل مسار الانزيم المنقى جزئياً.

#### ٤-٦-٢ دراسة بعض الخصائص الحركية لإنزيم البروتيز المنقى جزئياً

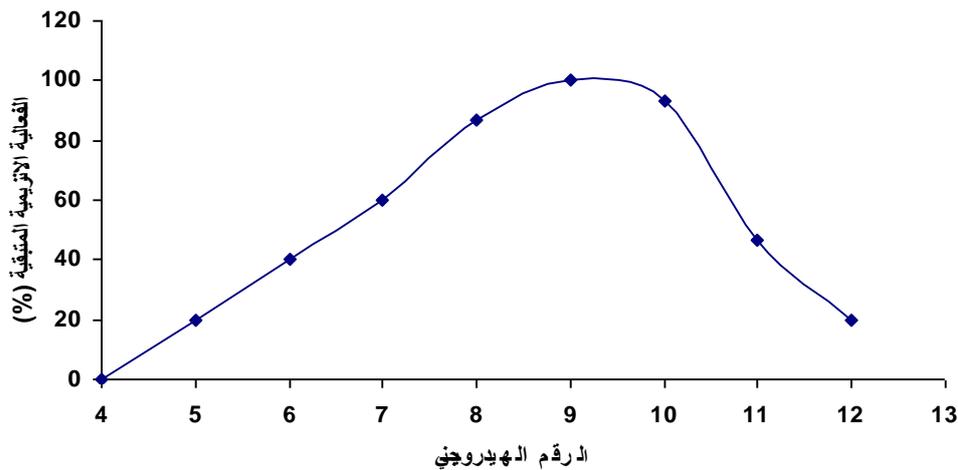
##### ٤-٦-٢-١ تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم وثباته

أشارت النتائج أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتيز المنقى جزئياً من الفطر *M. canis* هو ١١ باستخدام ركيزة الكازئين ، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده ٤٠ وحدة/مل. كما أظهرت النتائج أن أفضل نشاط للإنزيم يقع ضمن المدى القاعدي ٩-١٢ (شكل ٤-١١).



شكل ( ١١-٤ ) تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *M. canis* على وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) والمنقى جزئياً عند درجة حرارة ٣٧ م ومدة تفاعل ٢٠ دقيقة .

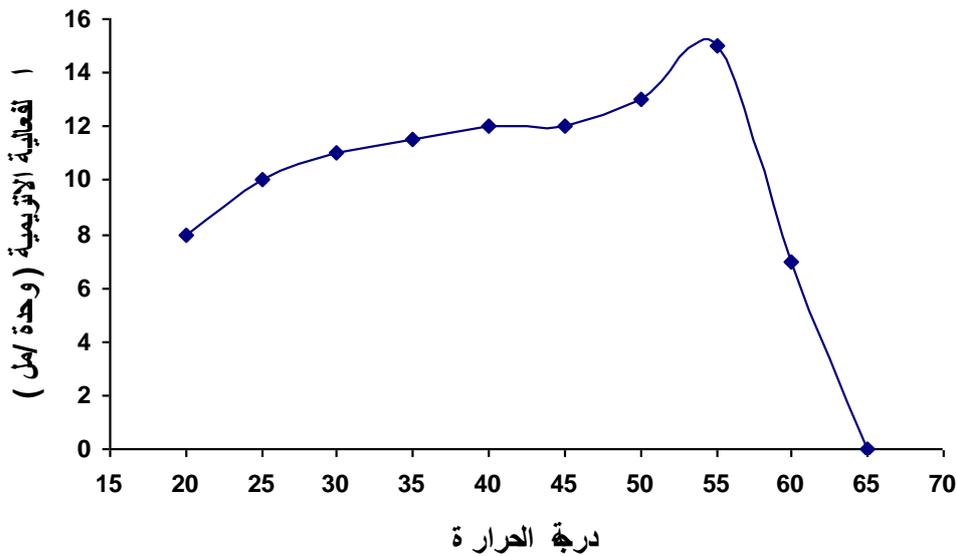
أما ثبات الإنزيم فكان أعلى ثبات له عند الرقم الهيدروجيني ٩ و ١٠ إذ بلغت ١٠٠ % و ٩٣.٣ % على التوالي من الفعالية الإنزيمية الاصلية، واحتفظ بمعظم فعاليته عند الرقم الهيدروجيني ٨ (شكل ٤-١٢).



شكل (٤-١٢) تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات إنزيم البروتيز المنقى جزئياً من الفطر *M. canis*

#### ٤-٥-٢-٢ تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم البروتيز وثباته

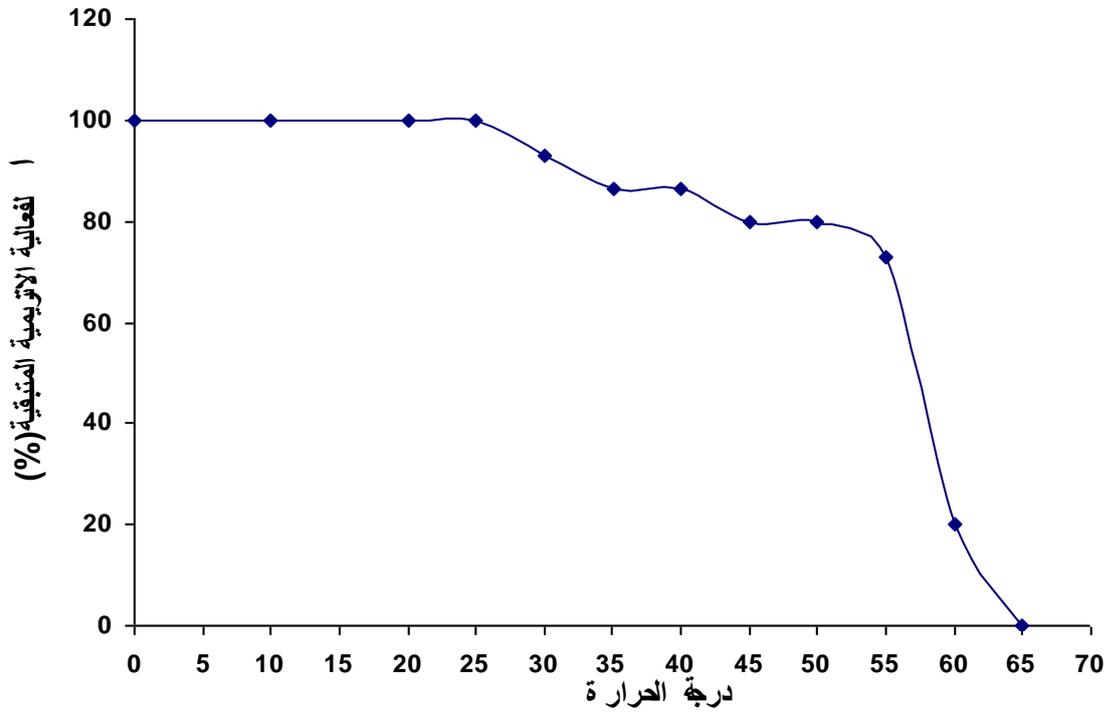
أظهرت النتائج أن الدرجة الحرارية المثلى لفعالية إنزيم البروتيز هي ٥٥° م وكانت الفعالية الإنزيمية ضمن المدى الحراري ٣٠-٥٥° م هي ١١-١٥ وحدة / مل على التوالي ثم هبطت الفعالية الإنزيمية بعد درجة حرارة ٥٥° م وبلغت صفراً عند درجة الحرارة ٦٥° م (شكل ٤-١٣).



شكل (٤-١٣) تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم البروتيز المنقى من الفطر *M.*

*canis* على وسط Lee وجماعته (١٩٨٧) والمنقى جزئياً برقم هيدروجيني ١١  
ومدة تفاعل ٢٠ دقيقة.

أما تأثير درجة الحرارة على ثبات الإنزيم فقد أظهرت النتائج (شكل ٤-١٤) ثبات الإنزيم  
١٠٠% عند درجات الحرارة ٠ - ٢٥ م، واحتفاظ الإنزيم بنسبة عالية من فعاليته عند درجات  
الحرارة ٣٠-٥٥ م، في حين فقد الإنزيم فعاليته تماماً عند درجة حرارة ٦٥ م ومدة حضانة ٣٠  
دقيقة.



شكل ( ٤-١٤ ) تأثير درجة الحرارة في ثبات إنزيم البروتيز المنقى جزئياً من الفطر  
*M. canis*

## الفصل الخامس CHAPTER FIVE

### ٥- المناقشة Discussion

#### ٥-١- عزل وتشخيص الفطر *M. canis*

أظهرت نتائج الدراسة المظهرية للفطر المسبب للسعفة الحلقية تكوينه لمستعمرات ذات لون ابيض مصفر أو بيجي من الجهة الأمامية و اصفر الى بني مصفر من الجهة الخلفية للطبق الزراعي ووجود غزل فطري صوفي كثيف (شكل ٤-١، ٤-١ب) اما الصفات المجهرية التي ميزت الفطر فهي وجود الكونيدات الكبيرة المغزلية الشكل التي تمتاز بتثنج جدرانها واحتوائها على عقد في نهايتها الطرفية وكانت أبعادها تتراوح بين ١٥-١٨ × ٦٠-٨٠ مايكرومتر وهذه الخصائص تدل على الفطر من النوع *M. canis*, وهذا التوصيف يتفق مع نتائج العديد من الباحثين; Marchisio et al, ١٩٩٦; (Velho et al., ٢٠٠٠). مع اختلافات في حجم الكونيدة الكبيرة بين هذه الدراسة ونتائج بعض الباحثين الذين أشاروا الى ان حجم الكونيدات الكبيرة يتراوح بين ١٥-٢٠ × ٦٠-١٢٥ مايكرومتر وعزوا السبب الى تأثير الظروف البيئية; Fry et al., ١٩٧٩; Koneman et al., ١٩٧٨) (Kwon-Chung and Bennett, ١٩٩٢).

#### ٥-٢- تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر *M. canis*

##### ٥-٢-١- الوسط الغذائي

إن نمو الفطر *M. canis* على الوسط الغذائي SGA قد تفوق ٣٥.٥ مليمتر بالمقارنة مع نمو الفطر على الوسط MBA في حين ان معدل نمو الفطر على وسط PGA قد انخفض عن معدلات النمو في الوسطين السابقين، اذ بلغ معدل النمو ٣٥.٥ مليمتر و ٣٠ مليمتر و ٢٦ مليمتر على التوالي (شكل ٤-٢). ان الزيادة الحاصلة في نمو الفطر *M. canis* على وسط SGA ربما تكون ناتجة عن تحفيز إنبات الابواغ (Meletiadiis et al., ٢٠٠١). كما قد يرجع سبب الزيادة في معدلات النمو إلى نسبة الكلوكوز في الوسط الغذائي التي كانت ٢% في SGA و ١% في MBA إضافة إلى ذلك وجود ١% من الببتون في SGA و MBA الذي يخلو منه وسط PGA خاصة ان الببتون يحتوي نسبة ١٣% من النتروجين تصل إلى ١٣% (Kurbanoglu and Algur, ٢٠٠٢) وفي دراسة سابقة لوحظ ان وسط SGA هو افضل من الوسط MBA في نسبة عزل الفطريات الجلدية (Merz et al., ١٩٧٦).

كما لوحظ في دراسة اخرى من قبل Takasuka (٢٠٠٠) ان وسط مرق السابرويدي ديكستروز يحفز النمو الجيد للفطرين *T. rubrum* و *T. mentagrophytes* مقارنة مع النمو الضعيف على وسط Yeast nitrogen base. وجد ان مرق السابرويدي هو افضل من وسط RPMI و Yeast nitrogen base في تحفيزه إنبات الابواغ والكونيدات ويعطي نموا غزيرا لكل من الفطر *R. microsporus* و الفطر *A. fumigatus* وبمعدل ثلاث إلى أربع مرات مقارنة مع النمو على وسط (Meletiadiis et al., ٢٠٠١). أشار Jessup وجماعته (٢٠٠١) ان الوسط Heinz oatmeal cereal agar هو افضل وسط لانتاج الكونيدات من الفطريات الجلدية ومنها الفطر *M. canis*. و يليه الوسط اكار البطاطا والديكستروز ثم الوسط Mycosel الحاوي على خلاصة الخميرة بنسبة ١%.

إن الفطريات الجلدية يمكنها استغلال السكريات البسيطة مثل الكلوكوز مصدرا للكربون في حين لا يمكنها تحليل السكريات المتعددة كالنشأ والسليولوز الطبيعي ومشتقاته الموجودة في البطاطا (Philpot, ١٩٧٧). إن وجود الكلوكوز في الوسط الغذائي يؤدي إلى زيادة معدل النمو وزيادة الوزن الجاف أيضا، كذلك يؤدي إلى إنتاج الأحماض التي تسبب انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي وجعله ملائما لنمو الفطريات (Kunert, ٢٠٠٠). لذا يعتقد أن أهم عامل محدد للنمو بالنسبة للوسطين MBA و SGA هو الكلوكوز الذي يختلف تركيزه في الوسطين. إن معدل نمو الأحياء المجهرية يتأثر بمصدر الكربون (الكلوكوز) ويتناسب طردياً مع تركيزه في الوسط الغذائي ضمن حدود معينة (السعد، ١٩٩٠). اما بالنسبة للوسط PGA فانه علاوة على تركيز الكلوكوز في الوسط فانه يحتوي العديد من المواد المعقدة كالنشأ

والسليولوز والمواد البكتينية والأحماض مثل حامض الكلوروجينيك (Chlorogenic) والكافائيك (Caffeic) التي قد لا يستطيع الفطر استغلالها . وهذا ينعكس سلبياً على نمو الفطر في وسط PGA مقارنة مع وسط MBA الذي يحوي على نفس تركيز الكلوكوز. ويكون نمو الفطريات الجلدية أفضل عند توفر المصادر النتروجينية مع السكريات مقارنة مع وجودها منفردة و يحفز النمو بشكل أفضل عند استخدام مزيج من الأحماض الأمينية مما لو استخدمت بصورة مفردة (Kunert, ٢٠٠٠). تتميز الفطريات الجلدية باستغلال الأحماض الأمينية المكونة للبيتون والكازئين كمصدر للنتروجين والكاربون على الرغم من وجود الكلوكوز وهذا يؤدي بدوره إلى ارتفاع الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي و الذي يصبح غير ملائم لنمو الفطريات (Drori et al., ٢٠٠٣; Kunert, ٢٠٠٠).

#### ٥-٢-٢- درجة الحرارة

أظهرت النتائج ان معدل نمو الفطر *M. canis* يزداد تدريجياً مع ارتفاع درجات الحرارة لغاية ٣٧م (شكل ٤-٣)، إذ بلغ معدل نمو الفطر عند درجة حرارة ٢٠م حوالي ٣٣ مليمتر، ثم ارتفع إلى ٣٥.٥ مليمتر عند درجة حرارة ٢٥م وهي درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر. وانخفض مع ارتفاع درجة الحرارة إذ وصل إلى ٢٤.٣ مليمتر عند درجة حرارة ٣٠م، ثم حصل تثبيط كامل لنمو الفطر عند درجة حرارة ٣٧م إن توقف نمو الفطر بارتفاع درجات الحرارة ربما يعود إلى فقدان الغشاء الخلوي لوظيفته الحيوية أو تحطيم المكونات الساييتوبلازمية وتحلل الخلايا (De Maranon et al., ١٩٩٩). إن هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكرته بعض الدراسات بخصوص درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر *M. canis*، والتي تتراوح بين ٢٥-٢٧م (Sharquie and Al- Zubaidi., ١٩٨٥; Marchisio et al., ١٩٩٦; Muhsin et al., ١٩٩٧; Mignon et al., ١٩٩٨) ووجد ان الفطر *T. mentagrophytes* لا يمكنه تكوين الابواغ الحرشفية في وسط السابرويد وفي درجة حرارة ٣٠م (Emyanitoff and Hashimoto, ١٩٧٩). ان درجة الحرارة المثلى لنمو الفطريات الجلدية تتراوح بين ٢٥-٣٥م ولا تنمو بدرجة حرارة ٤٠م، فقد وجد ان الفطر *M. persicolor* ذو الأصل الحيواني لا ينمو بدرجة حرارة ٣٧م (Weitzman and Summerbell, ١٩٩٥). أشار Norris وجماعته (١٩٩٩) إلى عدم وجود اختلافات في تأثير كل من درجة الحرارة ٣٠ و ٣٥م في معدل نمو الفطريات الجلدية العائدة إلى الجنس *Trichophyton spp.* إن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطريات تختلف باختلاف الأنواع العائدة لنفس الجنس، حتى بين سلالات النوع الواحد (Kwon-Chung and Benett, ١٩٩٢).

#### ٥-٢-٣- مدة الحضانة

يبين الشكل ٤-٤ أن معدل نمو الفطر *M. canis* يزداد تدريجياً مع ازدياد مدة الحضانة، إذ وصل معدل النمو إلى ٣٥,٥ مليمتر بعد مدة حضانة ١٤ يوماً على وسط سابرويد كلوكوز اكار. تختلف سرعة نمو الفطريات باختلاف أنواعها وباختلاف الأوساط الغذائية، إذ يصل الفطر *R. microsporus* إلى طور الثبات عند تنميته في وسط مرق السابرويد كلوكوز بعد مدة حضانة ٣٤.٥ ساعة، في حين ان الفطر *A. fumigatus* وصل إلى طور الثبات وفي نفس الوسط بعد مدة حضانة ٩٢ ساعة، أما الفطر *Sclerosporium prolificans* فانه وصل إلى طور الثبات بعد مدة حضانة ٧٥ ساعة في نفس الوسط السابق (Meletiadis et al., ٢٠٠١). يعتمد معدل النمو للغزل الفطري على حجم اللقاح ففي اللقاح المحتوي عدداً كبيراً من الخلايا يكون معدل النمو أسرع من تلك المحتوية عدداً اقل من الخلايا (Cuenca- Estrella et al., ٢٠٠١). وتستمر الزيادة في معدل النمو مع ازدياد مدة الحضانة عند توفر المواد الغذائية في وسط النمو حتى تستنفد المواد الغذائية الضرورية لنمو الفطر او يقل تركيز أحد العناصر المحددة للنمو. وفي دراسة سابقة وجد ان مدة الحضانة ونوع الوسط الغذائي لهما تأثير كبير في تجرثم الفطريات الجلدية، إذ لوحظ ان الفطر *M. canis* ينتج الكونيدات بغزارة بعد مدة حضانة ٤ أيام على وسط Heinz oatmeal cereal agar في حين ان الفطر نفسه لا ينتج الكونيدات على وسطي Mycosel agar و Potato dextrose agar إلا بعد مدة حضانة ٧ أيام (Jessup et al., ٢٠٠٠).

### ٣-٥- تأثير بعض العوامل في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis*

#### ١-٣-٥- الرقم الهيدروجيني

يتركز تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم البروتيز من خلال التأثير في صفات الوسط الغذائي كإذابة المواد الغذائية وانتقالها وتأينها وتركيز البيكاربونات الناتجة من ذوبان ثاني أكسيد الكربون الذي يؤثر في السعة الدائرية للوسط الغذائي (Bull and Bushnell, 1976). مما تنعكس هذه على نمو الفطر وإنتاجه للإنزيمات ومن ناحية أخرى يؤثر الرقم الهيدروجيني في ثبات الإنزيمات المنتجة وليس بالضرورة ان يتطابق الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنتاج مع الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم (Volesky and Luong, 1985). كما يؤثر الرقم الهيدروجيني على عملية الترجمة واستنساخ وتصنيع البروتين (Leger et al., 1998).

بينت النتائج أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج البروتيز هو ٩ وكانت إنتاجية الإنزيم عالية ضمن الحدود القاعدية ٨-١٠ مقارنة مع الظروف الحامضية والمتعادلة (شكل ٤-٥). فقد بلغت الفعالية الإنزيمية ١٤ وحدة/مل عند الرقم الهيدروجيني ٩ وانخفضت بارتفاع الرقم الهيدروجيني في شكل تدريجي. ان هذه النتيجة تتفق مع دراسة سابقة قام بها حسن (١٩٩٦) الذي حصل على الإنتاج الأمثل لإنزيم البروتيز باستخدام الرقم الهيدروجيني ٩ من الفطر *A. oryzae*. وفي دراسات سابقة عن إنزيمات البروتيز في الفطر *M. canis* استخدم الرقم الهيدروجيني ٨. ٧ لإنتاج البروتيز ولم تشر تلك الدراسة إلى الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنتاج (Lee et al., 1987; Mignon et al., 1998 a,b; Brouta et al., 2001). بينما أشار Thangam وجماعته (٢٠٠٢) إلى أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج البروتيز من البكتريا *Alcaligenes faecalis* هو ٨. كما استخدم الرقم الهيدروجيني الحامضي لإنتاج بعض إنزيمات البروتيز، فقد كان الرقم الهيدروجيني لإنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *T. mentagrophytes* هو ٤.٥ (Aubaid, 1997). واستخدم الرقم الهيدروجيني ٤.٥ لإنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *P. chrysogenum* (Benito et al., 2002). إن إنتاج كل نوع من أنواع إنزيمات البروتيز يتبع طريقة تعبير جيني مختلفة استجابةً للرقم الهيدروجيني الخارجي أو المحيطي فالإنزيمات تنتج عند الرقم الهيدروجيني الذي تكون عنده فعالة أو مؤثرة فقط، وبمعنى آخر أن الرقم الهيدروجيني يلعب دور مهم في التعبير الجيني للبروتينات المفروزة (Leger et al., 1998).

#### ٥-٣-٢- درجة الحرارة

ازدادت الفعالية لإنزيم البروتيز في الراشح الزراعي مع ارتفاع درجات الحرارة فبعد أن كان إنزيم البروتيز المنتج في درجة حرارة ٢٠م° ذا فعالية إنزيمية ٥ وحدة/مل ارتفعت الفعالية للراشح الزراعي في درجة حرارة ٣٥م° لتصل إلى ٤٥ وحدة/مل، ثم انخفضت الفعالية الإنزيمية للراشح الزراعي عند درجة حرارة ٤٠م° إلى ٣ وحدة / مل (شكل ٤-٦).

إن ارتفاع درجة حرارة الوسط الغذائي إلى ٣٥م° أدى إلى زيادة في إنتاج إنزيم البروتيز مقارنة بدرجات الحرارة الواطئة ٢٥-٣٠م° إذ أن الاختلاف في درجات الحرارة المثلى لنمو الفطر وإنتاج الإنزيم قد يعود إلى وجود بعض العوامل المنظمة لإنتاج إنزيمات البروتيز التي تنتج في أثناء نمو الفطر ويتوقف إنتاجها بارتفاع درجات الحرارة نتيجة لتوقف نمو الفطر وبذلك تسمح بالإنتاج الأوفر لإنزيمات البروتيز (Kunert, 2000). إن نتائج هذه الدراسة تتفق مع نتائج دراسة Dahot (1994) الذي وجد أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز القاعدي من الفطر *P. expansum* هي ٣٥م°. كما استخدمت درجة حرارة مماثلة لإنتاج هذا الإنزيم (الونداوي، ١٩٩١). كذلك استخدمت درجة الحرارة ٣٥م° لإنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *T. mentagrophytes* (Aubaid and Muhsin, 1998). في حين وجد Ghahfarokhi وجماعته (٢٠٠٣) أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز

من الفطر *T. mentagrophytes* هي ٣٢م . ووجد أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز القاعدي المقاوم للحرارة من البكتريا (*Bacillus subtilis* PE- ١١ هي ٣٧م (Adinarayana et al ٢٠٠٣) .. أما درجة الحرارة المثلى لإنتاج البروتيز من البكتريا *Vibrio sp.* هي ٣٠م (Sangali and Brandelli, ٢٠٠٠). وتم استعمال درجة الحرارة ٢٧م لإنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* (Lee et al., ١٩٨٧; Mignon et al., ١٩٩٨; Brouta et al., ٢٠٠١).

### ٥-٣-٣- الوسط الغذائي (المصدر النتروجيني)

يبين الشكل (٤-٧) إن الفطر يستطيع استغلال المصادر النتروجينية المختلفة لإنتاج إنزيمات البروتيز إذ أن تركيز المصدر النتروجيني له تأثير كبير في الإنتاج. بلغت الفعالية ١٢٤ وحدة/مل عند استعمال البيبتون بتركيز ٠.٢٦%، في حين انخفضت الفعالية إلى ١٠ وحدة/مل عند زيادة التركيز إلى ٠.٥٢%. وعند استخدام نخالة الحنطة كمصدر نتروجيني بتركيز ٠.٢٦% بلغت الفعالية لإنزيم البروتيز ٤٨.٥ وحدة/مل إلا أنها انخفضت إلى ٧.٥ وحدة/مل عند زيادة تركيز النخالة إلى ٠.٥٢%. أما الكازين الذي كان أقل تأثيراً في الإنتاج نجد أن التركيز ١% كان أفضل لإنتاج الإنزيم فقد بلغت الفعالية الانزيمية عنده ١٦ وحدة/مل وانخفضت إلى ٥ وحدة/مل عند التركيز ٢%. وكانت الفعالية الانزيمية عند استخدام شعر الإنسان بتركيز ٠.٥٢% هي ٤٠ وحدة/مل ثم بدأت الفعالية الانزيمية بالانخفاض التدريجي بزيادة التركيز لتصل إلى ٣ وحدة/مل عند التركيز ١,٣% (شكل ٤-٨). أشارت الدراسات السابقة إلى استخدام الشعر أو مادة الكراتين بتركيز ٠.٥٢% لإنتاج إنزيم البروتيز ذي فعالية محللة للكيراتين من الفطر *M. canis* (Mignon et al., ١٩٩٨ a,b; Brouta et al., ٢٠٠١).

إن التباين الذي يحصل في إنتاج إنزيم البروتيز باختلاف المصادر النتروجينية ربما يعزى إلى عدة أسباب منها اختلاف أنواع ونسب المواد العضوية الموجودة في المصدر النتروجيني العضوي وخاصة البروتينات، إذ يحتوي البيبتون على نتروجين بنسبة ١٣,٨% ويحتوي الكازين نتروجين بنسبة ١٠% (Kurnbanoglu and Algur, ٢٠٠٠)، في حين تحتوي نخالة الحنطة بروتين بنسبة ١٥% (حسن، ١٩٩٦). كما يحتوي الشعر نتروجين بنسبة ١٥% وكاربون بنسبة ٤٥% ودهوناً بنسبة ٥% (Franbourg et al., ٢٠٠٣). أو احتمال إنتاج الفطر *M. canis* عدة أنواع من إنزيمات البروتيز التي يمكن أن يحثها المصدر النتروجيني في وسط النمو، فقد أشارت الدراسات السابقة إلى فصل وتنقية إنزيم بروتيز السيرين وزنه جزيئي ٤٥ كيلو دالتون من راشح المزرعة للفطر *M. canis* (Takuichi et al., ١٩٨٢). كما وجد أنه ينتج ثلاثة أنواع من البروتيازات ذات أوزان جزيئية مختلفة هي ٣١.٥، و ٣٤، و ٤٨ كيلو دالتون (Hamaguchi et al., ٢٠٠٠).

والسبب الآخر هو اختلاف الطبيعة الفيزيائية والكيميائية للمصدر النتروجيني وهو من العوامل المؤثرة في نمو الأحياء المجهرية وإنتاجها للإنزيمات خاصة الأوساط ذات الطبيعة غير المتجانسة مثل نخالة الحنطة والشعر، ومن أهم العوامل الفيزيائية هي المساحة السطحية التي تتعرض لفعال الأحياء المجهرية و المسامية وحجم الدقائق (Nigam and Singh, ١٩٩٤). أما العوامل الكيميائية المؤثرة في إنتاج البروتيز هي طبيعة تركيب المواد المكونة للمصدر النتروجيني سواء كانت مواد بسيطة أم معقدة أم احتوائها مواد نشوية وسليولوزية والتي تعد أكثر أهمية في إنتاج الإنزيمات المحللة من المصادر الغنية بالمواد اللكتينية (Pandey et al., ١٩٩١).

أما سبب انخفاض الفعالية الانزيمية نتيجة لزيادة تركيز المصدر النتروجيني فقد يفسر إلى أن الجينات المشفرة للإنزيمات المطلوبة لاستهلاك النتروجين تنظم عادة باليات استحثاث أو تحفيز متخصصة تخضع إلى آلية سيطرة رئيسية تعرف بألية كبح أيض النتروجين (Nitrogen metabolic repression) وتبعاً لهذه الآلية فالجينات تعبر بمستويات عالية عند ظروف تحديد النتروجين فقط، أما عند النمو بوجود مصادر نتروجينية جاهزة ومفضلة فإنه يؤدي إلى إعطاء إشارة لإيقاف التعبير الجيني للإنزيمات المحللة (Marzluf, ١٩٩٧). وهذا ما أشار إليه Larcher وجماعته (١٩٩٦) إذ لاحظوا أن أعلى إنتاج لإنزيم البروتيز من الفطر *Sclerosporium apiospermum* يكون عند تركيز البيبتون

١٠,١% في حين ان زيادة التركيز في الوسط إلى ١% أدى إلى زيادة في معدل نمو الفطر وانخفاض كبير جداً في إنتاج الإنزيم. كما لوحظ ان كلاً من البيبتون والكازين يحفز تراكم إنزيم البروتيز في الوسط الزراعي لفطر *A. terreus* وبالتالي انخفاض الفعالية الانزيمية وذلك لان هذه المصادر النتروجينية البسيطة تكون حاوية عددا كبيرا من الأحماض الأمينية والبيبتيدات الصغيرة وبذلك تؤدي إلى إيقاف إنتاج الإنزيم بالية تعرف بالية كبح الايض الهدمية (Ashur et (Catabolite repression) (1996). ان المصادر النتروجينية العضوية المعقدة تكون مصدراً لتراكيز متباينة من الأحماض الأمينية الحرة والبيبتيدات التي يكون لها تأثير مهم في تنظيم إنتاج إنزيمات البروتيز حسب الآلية المذكورة سابقاً فقد تكون الأحماض الأمينية بتراكيز قليلة غير كافية لحث إنتاج الإنزيم او بتراكيز مثلى لحث الإنتاج فتسبب أعلى إنتاج للإنزيم او أنها قد تكون بتراكيز عالية فتسبب تثبيط إنتاج إنزيمات البروتيز (Egorov et al., 1983).

### ٥-٣-٤- مدة الحضانة

ازدادت الفعالية الإنزيمية للبروتيز المنتج مع تقدم مدة الحضانة وبلغت أقصاها في اليوم التاسع من الحضانة على اختلاف ظروف التهوية (شكل ٤-٩) ففي ظروف التهوية غير المستمرة التي تفوقت على بقية المعاملات ازدادت فيها الفعالية الإنزيمية في اليوم التاسع بحوالي ٨ أضعاف تقريبا مقارنة باليوم السادس ثم انخفضت الفعالية الإنزيمية بعد اليوم التاسع ولجميع المعاملات.

إن الانخفاض الذي يحصل في إنتاج الإنزيم بعد مدة الحضانة المثلى يعود إلى سببين: الأول هو أن ثبات الإنزيم الذي يقل مع زيادة مدة الحضانة والسبب الآخر هو أن عملية إنتاج البروتيز تحدث خلال عملية إنبات الكونيدات ويرافقه تحرر الفوسفات غير العضوي من الجدار الخلوي للكونيدة الذي يزداد بازدياد مدة الحضانة وهذا يؤدي إلى تثبيط إنزيمات البروتيز (Page and Stock, 1971). أو انه يعود إلى وجود اختلاف في العائلة الجينية (Gene family) المشفرة لإنزيمات البروتيز Yamada et al., 2004).

تختلف مدة الحضانة لإنتاج إنزيمات البروتيز باختلاف نوع الإنزيم، والكائن المجهرى، ووسط النمو، كذلك باختلاف سلالات النوع الواحد. فقد وجد أن مدة الحضانة لإنتاج إنزيم البروتيز المحلل لبروتينات اللحم من الفطر *P. chrysogenum* هي ٤ أيام (Benito et al., 2002). في حين يستغرق إنتاج البروتيز من البكتريا *B. subtilis PE-11* مدة حضانة مثلى ٤٨ ساعة (Adinarayana et al., 2003). وفي دراسة قام بها Lee وجماعته (1987) لوحظ ان أعلى فعالية لإنزيم البروتيز المنتج من الفطر *M. canis* تكون في اليوم العاشر من الحضانة. في حين وجد Mignon وجماعته (1998a) ان أعلى فعالية لإنزيم البروتيز المنتج من الفطر *M. canis* تكون في حدود اليوم الثاني عشر. بينما لاحظ Brouta وجماعته (2001) ان فعالية هذا الإنزيم تكون في أقصاها في اليوم الثامن من الحضانة بدرجة حرارة ٢٧م. إن هذه النتائج هي قريبة من نتائج الدراسة الحالية.

### ٥-٣-٥- التهوية والمزج

أظهرت النتائج أن ظروف التهوية غير المستمرة (٥ أيام بدون مزج و٥ أيام مع المزج) هي الفضلى في إنتاج إنزيم البروتيز، إذ بلغت الفعالية الانزيمية تحت هذه الظروف ٤٩.٥ وحدة/مل في حين كانت الفعالية الانزيمية ٩ وحدة/مل و ٤٤ وحدة/مل تحت ظروف التهوية المستمرة وعدم التهوية على التوالي (شكل ٤-٩). إن السبب في كون ظروف التهوية غير المستمرة هي الفضلى في إنتاج إنزيم البروتيز قد يعود إلى أن عملية التصاق الكونيدات الفطرية التي تحتاج إلى الوقت الكافي لتتمكن من الالتصاق والإنبات والبدء بعملية النمو وإنتاج الإنزيم. إذ إن عملية التصاق الكونيدات الصغيرة والكونيدات الحرشفية لبعض الفطريات الجلدية على الخلايا المولدة للكيراتين (Keratinocytes) في جلد الإنسان تحتاج إلى مدة زمنية تتراوح بين ٣-٤ ساعات (Zurita and Hay, 1987) لذلك فإن التهوية والمزج المستمر يمنع أو يؤخر عملية التصاق الكونيدات الفطرية أو يقلل من عدد الكونيدات الملتصقة وهذا يؤدي إلى انخفاض إنتاج إنزيم البروتيز. وبما أن آلية تحطيم الكيراتين تبدأ بعملية إزالة الأمين

(Deamination) التي تحدث بواسطة إنزيم L-amino acid oxidase الذي يقوم بتحويل الأحماض الأمينية إلى أحماض كيتو (إضافة ذرة أو كسجين إليها) وامينيا، لذلك فإن استهلاك الأوكسجين في عملية إزالة الامين تجعل آلية تحطيم الكيراتين تحتاج إلى التهوية (Kunert, 2000).

تختلف الدراسات السابقة في ظروف التهوية المستخدمة لإنتاج إنزيمات البروتيز. بعضها استخدم ظروف تهوية غير مستمرة لإنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis Mignon et al.*, 1998a,b, و القسم الآخر استخدم تهوية مستمرة كما في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *(Lee et al., 1987)*. و *P. chrysogenum* (Benito et al., 2002) و إنتاج البروتيز من البكتيريا *B. subtilis PE-1* (Adinarayana et al., 2003). وتستخدم ظروف التهوية المستمرة في إنتاج العديد من الإنزيمات مثل البروتيز و اللابيباز من الفطر *P. auratigriseum* (Lima et al., 2003). وإنزيم Pectatylases من الفطر *Colletotrichum gloeosporioides* (Drori et al., 2003). كما أن هناك بعض الدراسات لم تستخدم ظروف التهوية في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر (Muhsin and Aubaid, 2000) *T. mentagrophytes* وإنتاج البروتيز من الفطر *A. oryzae* (حسن، 1996). و الفطر *S. apiospermum* (Larcher et al., 1996).

#### ٤-٥- مراحل التنقية الجزئية لإنزيم البروتيز

#### ٤-٥-١- الترسيب بكبريتات الأمونيوم

يجرى عادة تركيز الإنزيمات في خطوات التنقية الأولى للتخلص من نسبة كبيرة من الماء وللحصول على درجة من النقاوة، وتستخدم الأملاح عموماً لهذا الغرض كألاح الأمونيوم والصدويوم في شكل كبريتات أو كلوريدات في الغالب، أو المذيبات العضوية كالكحول الإيثيلي والأسيتون ويحدث الترسيب بالأملاح بسبب معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بفعل الملح والاختلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين ويؤدي ذلك إلى انخفاض ذاتية البروتين وترسبه وتسمى هذه العملية التلميح الخارجي (Salting out) (White et al., 1973). أما المذيبات العضوية فتقوم بخفض الثابت الكهربائي الثنائي للوسط (Dielectric constant) مؤدية بذلك إلى زيادة قوة التجاذب بين الجزيئات فتتكثف وتترسب (Whitaker, 1972) ولمعرفة التركيز الأفضل لترسيب إنزيم البروتيز تم إجراء تجربة أولية استخدمت فيها كبريتات الأمونيوم بنسب إشباع مختلفة تراوحت بين 40-80% وأظهرت النتائج أن التركيز الأمثل لترسيب بروتين الإنزيم هو 80% إشباع وتم إذابة الإنزيم المترسب في حجم معين من داري الكلاسين وهيدروكسيد الصوديوم برقم هيدروجيني 9، وقد بلغت الفعالية النوعية للإنزيم 836 وحدة/ملغم بروتين مقارنة براشح الإنزيم الخام الذي كانت فعاليته النوعية 57 وحدة/ملغم بروتين وبلغ عدد مرات التنقية 14,6 مرة بحصيلة إنزيمية 81,6% (جدول 4-1) وقد توصل بعض الباحثين إلى نتائج مشابهة، إذ أعطى الترسيب بكبريتات الأمونيوم نسب إشباع 50-60% في الخطوة الأولى من تنقية إنزيمات البروتيز الخارجية المنتجة من إحدى سلالات *A. oryzae* هي 16.8 مرة وبحصيلة إنزيمية 84,2% (Kundu and Manna, 1975). وبلغ عدد مرات تنقية إنزيم البروتيز المنتج من سلالة الفطر *A. oryzae* 2.3 مرة وبحصيلة إنزيمية 85% (حسن، 1996). وقد بلغت عدد مرات تنقية إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *S. apiospermum* عند ترسيبه بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 80% حوالي 8.6 مرة وبحصيلة إنزيمية 38% (Larcher et al., 1996).

في حين كان عدد مرات تنقية إنزيم البروتيز القاعدي المقاوم للحرارة المنتج من سلالة جديدة للبكتيريا *B. subtilis PE-1* 1.2 مرة وبحصيلة إنزيمية بلغت 72% (Adinarayana et al., 2003).

استخدمت كبريتات الأمونيوم في ترسيب إنزيمات البروتيز بتركييزات مختلفة باستخدام نسبة إشباع 60% لترسيب إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *(De Marco Trichoderma harzianum et al., 2002)*. في حين اجري تطبيق نسبة إشباع 80% لترسيب إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *P. chrysogenum* (Benito et al., 2002). إن شيوع استخدام كبريتات الأمونيوم في ترسيب البروتينات يعود إلى ميزات المرغوبة كذائبيتها العالية وتوفرها وقلة كلفتها نسبياً وعدم أضرارها

بالإنزيمات (الدليمي، ٢٠٠٢). يعتمد تركيز الملح الذي يؤدي إلى ترسيب البروتين على عدد وتوزيع شحنات البروتين والمجامع الكارهة للماء (Hydrophobic residue)، كما يؤثر حجم البروتين وشكله ووجود مركبات أخرى معه في ذائبته (White et al., ١٩٧٣).

#### ٥-٤-٢ - تنقية إنزيم البروتيز باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

أجريت تجربة أولية للتبادل الأيوني بأسلوب الوجبة باستخدام المبادلين كاربوكسي مثيل سليلوز (CM-c) وثنائي اثيل امينو اثيل سليلوز (DEAE-cellulose) أظهرت النتائج ان الإنزيم يرتبط كلياً تقريباً بالمبادل (DEAE-c) مقارنة بالارتباط الضعيف جداً بالمبادل CM-c. لذلك تم استخدام المبادل DEAE-c في عملية التنقية في خطوة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني خلال عمود ابعاده  $٧ \times ٠.٥$  سم. إذ تم امرار المستخلص الانزيمي الناتج من خطوة الترسيب بمح كبريتات الامونيوم بعد عملية الفرز الغشائي (الديزة) على المبادل وجمعت الاجزاء المحتوية على الفعالية الانزيمية. وقد بلغت الفعالية النوعية للإنزيم ٢٠٤٣ وحدة/ملغم بروتين وبنقاوة ٣٥.٨ مرة وبحصيلة إنزيمية ٦٢.١ % (جدول ٤-١). ومن مميزات المبادل الأيوني DEAE-c هو استيعابه الواسع وفصله العالي للمواد وسهولة تحضيره وامكانية استخدامه بأسلوب الوجبة والعمود وامكانية إعادة تنشيطه واستعماله مرات عديدة فضلاً عن إمكانية استخدامه في التطبيقات الواسعة (Brummer and Gunzer, ١٩٨٧).

استخدم التبادل الأيوني باستخدام المبادلات الايونية الموجبة مثل DEAE-sephacel في خطوات تنقية إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* وبلغت عدد مرات التنقية ٤.٨ مرة وبحصيلة إنزيمية ٧٤.٩% واستخدم المبادل الأيوني السالب C M-Sephadex في الخطوة اللاحقة فكانت عدد مرات التنقية ١٥.٩ مرة وبحصيلة إنزيمية ٦٥.٨ % (Lee et al., ١٩٨٧). كما استخدم المبادل الأيوني السالب CM-Cellulose في تنقية إنزيم البروتيز من سلالة من البكتريا *B. licheniformis* (Lin et al., ١٩٩٢) واستخدم المبادل DEAE-sephedex A-٥٠ في تنقية إنزيم البروتيز من الفطر *P. expansum* فكانت الحصيلة الانزيمية ٤٨% (Dahot, ١٩٩٤). واستخدم حسن (١٩٩٦) المبادلين DEAE-c و CM-c في تنقية إنزيم البروتيز من احدى سلالات الفطر *A. oryzae* بصورة منفصلة ولاحظ ان عدد مرات التنقية بالنسبة لمبادل CM-c هي ٥.٨ مره والحصيلة الإنزيمية ٥١.٨% في حين ان عدد مرات التنقية باستخدام DEAE-c كانت ٢.٦ مرة وبحصيلة إنزيمية ٨٧.٢% واستخدام المبادل الأيوني الموجب DEAE-c في تنقية إنزيم البروتيز القاعدي من البكتريا *Alcaligenes faecalis* وبلغت نقاوة الإنزيم ١٤.٣ مرة وبحصيلة إنزيمية ٣٠.٦ % (Thangam et al., ٢٠٠٢).

#### ٥-٥ توصيف الإنزيم

##### ١-٥-٥ الترحيل الكهربائي

أظهر الترحيل الكهربائي في هلام متعدد اكريل امايد بوجود SDS وجود اكثر من حزمة بروتينية واحدة مما يشير الى وجود بروتينات اخرى اضافية مع بروتين الإنزيم الذي ارتبط بالمبادل الايوني الموجب DEAE-cellulose وقد تراوحت الاوزان الجزيئية للحزم الظاهرة بين ٦٧-٤١ كيلودالتون (شكل ٤-١٠). أن الإنزيم يحمل شحنة سالبة فانجذب نحو القطب الموجب وهذا ما يتوقع إذ تعتمد حركة البروتين في الهلام على الشحنة التي يحملها البروتين بالدرجة الرئيسة وعلى شكله وحجمه بالدرجة الثانية ويتحرك البروتين هنا في رقم هيدروجيني ثابت (٨.٣) ضمن مجال كهربائي بين القطب الموجب والسالب اعتمادا على العوامل المذكورة (Westmermeier et al., ١٩٨٤ ; Blackshear, ١٩٩٧). فقد وجد Takuichi وجماعته (١٩٨٢) أن الوزن الجزيئي لإنزيم البروتيز المنقى من الفطر *M. canis* هو ٤٥ كيلودالتون. في حين تمكن Hamaguchi وجماعته (٢٠٠٠) من تنقية ثلاثة أنواع من إنزيمات البروتيز من الفطر المذكور وذات أوزان جزيئية مختلفة هي ٣١.٥، ٣٤، و ٤٨ كيلودالتون. كما فصل إنزيم البروتيز بوزن جزيئي ٤٣.٥ كيلودالتون من الفطر *M. canis* (Brouta et al., ٢٠٠١).

إن هذه النتيجة مقاربة لما توصلنا إليه بدراستنا الحالية. غير إن الاختلاف الموجود في الأوزان الجزيئية لإنزيمات البروتيز المفصولة من الفطر *M. canis* قد يعود إلى اختلاف العزلات المدروسة التي تختلف فيها العوائل الجينية المشفرة لإنزيمات البروتيز، إذ أن إنزيم البروتيز المعدني مثلاً يشفر بثلاث جينات مختلفة هي  $MEP^1$ ,  $MEP^2$ ,  $MEP^3$  (Yamada et al., ٢٠٠٤).

#### ٥-٥-٢- بعض الخصائص الحركية لانزيم البروتيز المنقى جزئياً

##### ٥-٥-٢-١- تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتيز وثباته

يبين الشكل ٤-١١ أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتيز تجاه ركيزة الكازين والتي يتراوح بين ٩-١١، ونلاحظ أن الفعالية الإنزيمية ارتفعت تدريجياً بارتفاع الرقم الهيدروجيني حتى وصلت أقصاها عند الرقم الهيدروجيني ١١. إن هذه النتيجة مقاربة لما جاء به Dahot (١٩٩٤) إذ لاحظ أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *P. expansum* تجاه ركيزة الكازين هو ١٠.٥ وأشار Fujiwara وجماعته (١٩٩٣) أن الفعالية الإنزيمية لإنزيم البروتيز القاعدي المقاوم للحرارة من بكتريا *Bacillus spp.* تجاه الكازين تكون في أقصاها عند الرقم الهيدروجيني ١٢-١٣. كما لوحظ في دراسة أخرى أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية البروتيز المنتج من البكتريا *subtilis* *B.* تجاه الكازين هو ١٠ (Adinarayana et al., ٢٠٠٣).

وبالنسبة لإنزيمات البروتيز المنتجة من الفطر *M. canis* فإن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها تجاه الكيراتين تراوح بين ٨-٩ (Lee et al., ١٩٩٨a,b; Mignon et al., ٢٠٠١; Brouta et al., ١٩٨٧). يختلف الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيمات البروتيز باختلاف الإنزيم والمادة الركيزة. فقد وجد أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتيز القاعدي المحلل للكيراتين من سلالة بكتريا *B. licheniformis* تجاه ركيزة الكازين هو ١١.٥ في حين كان ٨.٥ تجاه مسحوق الكيراتين (Horikoshi, ١٩٩٩). إن الفعالية الإنزيمية لانزيم البروتيز في دراستنا الحالية تبدأ بالهبوط بعد الرقم الهيدروجيني ١١، كما أنها منخفضة في الحدود الحامضية. ويأتي هذا الانخفاض في الفعالية الإنزيمية نتيجة تأثير الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في مجاميع قابلة للتأين (Prototropic groups) توجد في الإنزيم وفي الركيزة وفي معقد الإنزيم - الركيزة - معقد الإنزيم- الناتج (Whitaker, ١٩٧٢). بالنسبة لتأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الإنزيم فنلاحظ من (الشكل ٤-١٢) أن الرقم الهيدروجيني لثبات الإنزيم يتراوح بين ٨-١٠. وكان الرقم الهيدروجيني الأمثل الذي تكون عنده الفعالية الإنزيمية ثابتة ١٠٠% هو ٩. بدأت الفعالية الإنزيمية بالهبوط بعد الرقم الهيدروجيني ١٠، وكذلك انخفضت فعالية الإنزيم في الأرقام الهيدروجينية الحامضية والمتعادلة. إن هذه النتيجة متقاربة مع نتيجة دراسة Larcher وجماعته (١٩٩٦) الذين أوضحوا أن إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *S. apiospermum* يبقى محتفظاً بفعاليتها عند الرقم الهيدروجيني ٧-١١. ولأحظ Lee وجماعته (١٩٨٧) أن إنزيم البروتيز المنتج من سلالة الفطر *M. canis* يكون ثابتاً في الأرقام الهيدروجينية القاعدية كذلك وجد أن إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *M. canis* يبقى محتفظاً بـ ٨٠% من فعاليته الإنزيمية بعد تعرضه إلى الأرقام الهيدروجينية ٦-٩ (Brouta et al., ٢٠٠١) في حين كان إنزيم البروتيز القاعدي المنتج من بكتريا *Alcaligenes faecalis* يكون ثابتاً عند رقم هيدروجيني يتراوح بين ٧-١١ (Thangam et al., ٢٠٠٢). وفي دراسة لوحظ أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات البروتيز المنتج من البكتريا *B. subtilis* PE-١١ يتراوح بين ٨-١٠ (Adinarayana et al., ٢٠٠٣). إن السبب في انخفاض ثبات إنزيمات البروتيز القاعدية في الأرقام الهيدروجينية الحامضية والقاعدية العالية يعود إلى تأثير الرقم الهيدروجيني في تركيب جزيئة الإنزيم من خلال تغييره التركيب الثانوي والثلاثي للبروتين، وقد يحدث مسخ لاعكسي للبروتين (Irreversible denaturation) في المحاليل الحامضية والقاعدية القوية (Fersht, ١٩٨٤). قد يعود انخفاض ثبات الإنزيم في الأرقام الهيدروجينية الحامضية ٤-٦ إلى تأثير حموضة الوسط في تركيب جزيئة الإنزيم وتؤدي إلى تأين المجاميع الموجودة في الموقع الفعال (Segel, ١٩٧٦).

أما السبب في اختلاف ثبات إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *M. canis* قد يعود إلى اختلاف إنزيمات البروتيز المنتجة من نفس الفطر إذ أن الفطر ينتج أنواعاً مختلفة من الإنزيمات فقد وجد أن العائلة الجينية

MEP تشفر الى العديد من إنزيمات البروتيز المعدنية في الفطر *M. canis* وان هذه الانزيمات تعد من عوامل الضراوة التي تساهم في التغلب على وسائل دفاع المضيف التي قد يكون لكل منها رقم هيدروجين امثل للثبات والفعالية (Simpanya and Baxter, 1996; Yamada et al., 2004).

#### ٥-٥-٢-٢ - تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم البروتيز وثباته

يتضح من (الشكل ٤-١٣) ان الفعالية الانزيمية لانزيم البروتيز ازدادت مع ارتفاع درجة الحرارة بصورة تدريجية حتى تصل الفعالية الانزيمية أقصاها عند درجة حرارة ٥٥م، ثم تبدأ بالهبوط السريع جداً وتصل إلى الصفر عند ٦٥م. ان هذه النتيجة متوافقة مع دراسة Mignon وجماعته (1998a,b) إذ وجد ان درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم البروتيز هي حوالي ٥٥م. ووجد أيضا ان درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم البروتيز المنتج من بكتريا *A. faecalis* هي ٥٥م (Thangam et al., 2002). فقد لوحظ ان درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *A. oryzae* تتراوح بين ٤٥-٥٠م (حسن، ١٩٩٦).

ذكر Muhsin وAubaid (2000) و Brouta وجماعته (2001) ان درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم البروتيز من الفطر *T. mentagrophytes* و الفطر *M. canis* هي ٥٠م. وفي دراسة أخرى وجد ان درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم البروتيز المنتج من بكتريا *B. subtilis PE-II* هي ٦٠م (Adinarayana et al., 2003).

أما بالنسبة لتأثير درجة الحرارة على ثبات الإنزيم فيبين الشكل ٤-١٤ ان الإنزيم يحتفظ بـ ١٠٠% من فعاليته عند درجة الحرارة صفر- ٢٥م، كما يحتفظ بنسبة عالية من فعاليته عند درجة حرارة ٥٥م ويلاحظ ان الفعالية الانزيمية تكون عالية جداً عند درجة حرارة ٢٠-٣٠م، ثم تبدأ بالهبوط مع ارتفاع درجة الحرارة حتى تصل عند درجة الحرارة ٦٥م إلى الصفر. ان هذه النتيجة متوافقة مع ما جاء به Aubaid (1997) إذ لاحظ ان درجة حرارة ثبات إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *T. mentagrophytes* هي ٥٥م. ووجد ان إنزيم البروتيز المنتج من الفطر *M. canis* يفقد أكثر من ٨٠% من فعاليته عند تعرضه لدرجة حرارة ٥٠م ولمدة ساعة واحدة (Brouta et al., 2001).

أما إنزيم البروتيز المنتج من البكتريا *A. faecalis* فان فعاليته الانزيمية تكون ثابتة عند درجة حرارة ٥٠م (Thangam et al., 2002)، في حين لاحظ Adinarayana وجماعته (2003) ان إنزيم البروتيز المنتج من البكتريا *B. subtilis PE-II* يكون ثابتاً عند درجة الحرارة ٦٠م بنسبة ١٠٠% من فعاليته الانزيمية. ان زيادة سرعة التفاعلات الانزيمية مع ازدياد درجة الحرارة ناتج عن زيادة التصادمات (Collisions) بين جزيئات الإنزيم و الركيزة نتيجة زيادة درجات الحرارة ومع ارتفاع درجة الحرارة يحدث مسخ للإنزيم نتيجة تأثير درجة الحرارة على التركيب الثلاثي للبروتين وتغيير تركيب الموقع الفعال للإنزيم مما يؤدي إلى فقدان فعاليته (Segel, 1976). ان الاختلاف في مقاومة الإنزيمات للحرارة وثباتها قد يعود إلى زيادة الأواصر ثنائية الكبريت بين الأحماض الأمينية المكونة لجريئة الإنزيم الذي يؤدي إلى زيادة الثبات الحراري للإنزيم أو أنها تحتوي على مجموعة من الأحماض الأمينية الكارهة للماء (Hydrophobic) التي تؤدي أيضا إلى زيادة الثبات الحراري للإنزيمات (Rao et al., 1998).

## المصادر :References

### المصادر باللغة العربية

الجيلاوي، رباب عمران راضي(١٩٩٤) إنتاج إنزيم البروتيز من بكتريا *Bacillus subtilis* وامكانية استخدامه في دباغة الجلود. رسالة ماجستير -كلية العلوم- جامعة بغداد.

الدليمي، خلف صوفي (٢٠٠٢) الإنزيمات المايكروبية والتقانات الحيوية. جامعة فيلادلفيا، الأردن.

السعد، مها رؤوف (١٩٩٠) فسلجة الأحياء المجهرية . الطبعة الثانية. جامعة بغداد، بغداد.

الونداوي، شادات عباس (١٩٩١) دراسة أولية عن إنزيمات البروتيز المنتجة من الفطر *Aspergillus terreus*. رسالة ماجستير- كلية العلوم- جامعة بغداد.

حسن، شذى سلمان(١٩٩٦) إنتاج وتنقية وتوصيف البروتيز القاعدي من العفن *Aspergillus oryzae* بطريقة تخمر المواد الصلبة. رسالة دكتوراه- كلية العلوم- جامعة بغداد.

### المصادر باللغة الانكليزية

Adinarayana,K.; Ellaiah, P. and Prasad, D. S. (٢٠٠٣) Purification and partial characterization of thermostable serine alkaine protease from anewly isolated *Bacillus subtilis* PE-١١. AAPS Pharm. Sci. Tech.; ٤(٤): article ٥٦.

- Ajello, L.; Kaplan, W. and Chandle, F.W. (1980) Dermatophyte mycetomas: fact or fiction? the fifth International conference on the mycoses, Scientific publication No. 396, Pan American Health Organization. P : 130-131.
- Ali, T.M. (1990). A study of tinea capitis in Baghdad .M.Sc. Thesis. College of Medicine .University of Baghdad.
- Asahi, M. ; Lindquist, R. ; Fukuyama, K. ; Apodaca, G. ; Epstein, W.L. and McKerrow, J.H. (1980) Purification and characterization of major extracellular proteases from *Trichophyton rubrum*. Biochem. J. ; 232 : 139-144.
- Ashur, S.A. ; EL-Shura, H.M. ; Metwally, M. and Habib, S.A. (1996) Fungal fermentation of whey incorporated with certain supplements for the production of proteases. Microbios. ; 86(346) : 69-79.
- Attapatu, M.C. (1989) A study of tinea capitis in Serilanka. J. Med. Vet. Mycol. ; 27(1) : 27-32.
- Aubaid, A.H. and Muhsin, T.M. (1990). Partial purification and kinetic studies of exocellular Protease from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacea*. Mycoses; 41: 163-168.
- Aubaid, A. H. (1997) Enzymatic activity, purification of keratinase and proteinase and their roles in the pathogenicity and Immunogenicity of clinical isolates of dermatophytes and yeasts. Ph. D. thesis, collage of education, Basrah University.
- Aunstrup, K.; Andersen, O.; Falch, E.A. and Nielsen, T.K. (1979) Production of microbial enzymes, In Microbial Technology, A. H. Rose, ed. Academic Press, Inc. New York.
- Barett, A.J. (1994) Proteolytic enzymes: serine and cystine peptidases. Methods enzymology; 244: 1-10.
- Barson, W.J. (1980) Granuloma and pseudogranuloma of the skin due to *Microsporum canis*. Arch. Dermatol.; 111: 890- 897.
- Benito, M.J.; Rodriguez, M. Núñez, F.; Asensio, M.A.; Bermúdez, M.E. and Córdoba, J.J. (2002) Purification and characterization of an extracellular protease from *penicillium chrysogenum* P 222 active against meat proteins. Applied Environ. Microbiol.; 68(7): 2532-2536.

- Blackshear, P.J. (1984) Systems for polyacrylamide gel electrophoresis. In: Methods in enzymology. (ed. W.B. Jakoby). 1, 4: 237-206. Academic press-New York.
- Böckle, B.; Galunsky, B. and Muller, R. (1990). Characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM 45031. Applied and Environ, Microbiol.; 61: 3700-3711.
- Borriss, R. (1987) Biology of enzymes . In :Biotechnology (ed. J. H. Rehm and G. Reed). Vol-79: 30-36 VCH Deerfield Beach.
- Boyer, R.F. (1986). Modern experimental biochemistry . p 46-276. Adeson Welsey publishing company, Massachusetts.
- Bressollier, P.; Letourneau, F.; Urdaci, M. and Verneuil, B. (1999) Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus* . Applied and Environ. Microbiol.; 65(6): 2070-2076.
- Brouta, F.; Descamps, F.; Fett, T.; Losson, B.; Gerday, Ch. and Mignon, B. (2001) Purification and characterization of a 43.0Kda keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. Med. Mycology; 39: 269-270.
- Brummer, W. and Gunzer, G. (1987): Laboratory techniques of enzyme recovery. In: Biotechnology (eds: J. H. Rehm and G. Reed) . VCH Deer field Beach. vol. 79: 213-278..
- Bull, A. T. and Bushnell, M. E. (1976) Environmental control of fungal growth. In the filamentous fungi. (eds. J. E. Smith and D. R. Berry). Edward Arnold. London. vol. 2: 1-26..
- Cuenca-Estrella, M.; Diaz-Guerra, T. M.; Mellado, E. and Rodriguez- Tudela, J. L. (2001) Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. J. of clin. Microbiol.; 39(2): 520-532.
- Dahot, M. U. (1994). Purification and some properties of alkaline protease from *Penicillium expansum*. J. of Islamic Acad. of sci.; 4(2): 1-5
- Danew, P. and Klossek, P. (1989) The dependence of the physiological properties of *Trichophyton mentagrophytes* on the pH value of the culture medium . Mycoses; 32(6): 303-308.

- De Maranon, I. M.; Chandanson, N.; Joly, N. and Gervais, P. (1999). Slow Heat Rate Increases Yeast Thermotolerance by Maintaining Plasma Membrane Integrity. *Biotechnol. Bioeng.*; 65: 176-181.
- De Marco, J. L. and Felix, C. R. (2002) Characterization of protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. *BMC Biochem.*; 3(1):3 (article).
- De Moraes, M. S.; Gompertz, P.; Amorim, C. Travares; H. S., Alchorne, M. M. A. and Fischman, O. (2000). Epidemiology of tinea capitis (Sao Paulo, Brazil). *Rev. Iberoam Micol.*; 17: 140.
- Descamps, F. F.; Brouta, F., Vermout, S. M., Wiliame, C., Losson, B. J. and Mignon, B. R. (2003). Arecombinant 31.0 Kda keratinase and crude exoantigen from *Microsporum canis* fail to protect against homologous experimental infection in guinea Pigs. *Veterinary Dermatology*; 14: 300-312.
- De Toni, C. H.; Richter, M. F.; Chagas, J. R.; Henriques, J. A. P. and Termignoni, C. (2002) Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from feather degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. *Can. J. Microbiol.*; 48(4): 342- 348.
- Di-Silverio, A.; Mosca, M.; Grattia, M. and Brandozzi, G. (1999) Superficial mycosis observed at the department of dermatology of University of Pavia A 13- Year survey. *Mycopathology*; 105: 11-17.
- Drori, N.; Kramer- Haimovich, H.; Rollins, J.; Dinoor, A.; Okam, Y.; Pines, O. and Prusky, D.(2003) External pH and nitrogen source affect secretion of pectate lyase by *Colletrichum gloeosporioides*. *App. Environ. Microbiol.*, 69(6): 3208-3212.
- Egorov, N. S. Loriya, Z. K. and Yudina, T. G. (1983) Effect of proteins on exoprotease synthesis in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. (USSR)*; 22(4): 443-446.
- Egorov, N.S. Yudina, T.G.; Loriya, Z.K. and Zeteneva, R.N. (1981) A medium for the synthesis of exoprotease by *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. (USSR)*; 20(1): 51-55.
- El-Benhawi, M.; Fathy, S.; Moubsher, A. H. and Alem, N. S. (1991) Mycologic study of tinea capitis in Qatar. *Int. J. Dermatol.*; 30(3): 204- 205.

- Ellis, D.H. (1994) Clinical mycology: The human opportunistic mycoses- Gillingham Printers Pty Ltd- Australia. P. 166.
- Emtseva, T.V. and Konovalov, S. A. (1979) Alkaline proteinases of microbiological origin (Survey). Appl. Biochem. Microbiol.; 14(5): 511-523.
- Emyanitoff, R. G. and Hashimoto, T. (1979). The effect of temperature, incubation atmosphere and medium composition on arthrospore formation in the fungus *Trichophyton mentagrophytes*. Cand. J. Microbiol.; 25(3): 362-366.
- Fersht, A. (1984) Enzyme structure and mechanism .W.H. Freeman and Company-New York.
- Franbourg, A.; Hallegot, P.; Baltenneck, F.; Toutain, C. and Leroy, F. (2003). Current research on ethnic hair. J. of Amer. Acad. Derm.; 48: 115-119.
- Friedrich, A. B. and Antranikian, G. (1996) Keratin degradation by *Fervidobacterium Pennavorans*, a novel thermophilic aerobic species of the order Thermotogales. Appl. and environ. Microbiol.; 62(8): 2875-2882.
- Fry, D. T.; Oldfield, R. J. and Bridger, R. C. (1979) A colour atlas of pathogenic fungi, Wolfe Medical Publication Ltd. London. U.K.
- Fujiwara, N.; Masui, A. and Imanaka, T. (1993) Purification and Properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* spp. J. Biotechnol.; 30: 245-256.
- Fullbrook, P. D. (1983) Practical limits and prospects. In: Industrial enzymology .(eds. T. Godfrey and J. Reichelt). Nature Press. PP: 41-110.
- Garfin, D. E. (1990) Purification Procedures: Electrophoretic methods, In: Methods in enzymology (eds. E. d. Murray and P. Deutscher). 182: 425-441.
- Ghahfarokhi, M. S.; Razafsha, M.; Allameh, A. and Abyaneh, M. R. (2003). Inhibitory effects of Aqueous onion and garlic extract on growth and keratinase activity in *Trichophyton mentagrophytes*. Iran Biochem. J.; 4(3): 113-118.

- Giuseppina, M.; Franklin, E.; Rodolfo, S.; Eymar, G. and Anselmo, L. (2003) Morphological characterization of invitro human hair keratinolysis, produced by identified wild strains of *Chrysosporum* species. Mycopath.; 156(3): 163-169.
- Gomori, G. (1900) Preparation of buffer for use in enzyme studies, Vol. 1, In "Methods in Enzymol., S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds" Academic Press. New York.
- Hamaguchi, T.; Morishita, N.; Usui, R. and Takuichi, I. (2000) Characterization of an extracellular Keratinase from *Microsporium canis*. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi; 41(4): 207-212.
- Heieken, F. G. and O' Connor, R. J. (1972) Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and  $\alpha$ - amylase by *Bacillus subtilis* NRRL- B3041. J. Gen. Microbiol., 73: 30-44.
- Higuchi, D.; Takuichi, I. and Negi, M. (1981) The effect of keratinase on human epidermis, especially on stratum corneum. Jap. J. Dermat.: 119-120.
- Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. Microbiology and Molecular biology reviews; 63(4): 730-700.
- Hube, B. (1996) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. Curr. Top. Med. Mycol.; 7: 00-79.
- Jessup, C. J.; Warner, J. ; Isham, N.; Hasan, I. and Ghannoum, M. A. (2000) Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes: Establishing a Medium for Inducing Conidial Growth and Evaluation of Susceptibility of Clinical Isolates. J. Clin. Microbiol.; 38(1): 341-344.
- Juffs, H. S. (1976) Effect of temperature and nutrients on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens* and *Ps. aeruginosa* in broth and milk. J. Appl. Bacteriol.; 40: 23-23.
- Keen, N. T. and Williams, P. H. (1967) Effect of nutritional factors on extracellular protease production by *Pseudomonas lachrymans*. Can. J. Microbiol.; 13: 863-871.
- King, D.; Cheever, L. W.; Hood, A.; Horn, T. D.; Rinaldi, M. G.; and Merz, W. G. (1999) Primary invasive cutaneous *Microsporium canis* infections in immunocompromised patients. J. of clin. Microbiol.; 37(2): 460-462.

- Koltun, L. V.; Tstrelkov, V. T. and Shavovskii, G. M. (1983) Proteinases of the flavinogenic fungus *Ermothecium ashyii* and some characteristics of their synthesis. *Microbiol. (USSR)*; 22(1): 90-95.
- Koneman, E. W.; Roberts, G. D. and Wright, S. E. (1978) Practical laboratory mycology, 2<sup>nd</sup>.ed, Williams and Wilkins Company, Baltimor, U.S. A.
- Kunert, J. (1977). Physiology of keratinophilic fungi. *Revista Iberoamericana de Micologia*; 1: 77-80.
- Kunert, J. (1988) Utilization of cystine by dermatophytes on glucose- peptone media. *Folia Microbiol*; 33: 188-197.
- Kundu ,A.K. and Manna,S.(1975) Purification and characterization of extracellular protease of *Aspergillus oryzae* .*Appl.Microbiol.*; 30(4): 507-513.
- Kunitz, M. (1947) *J. Gen. Physiol.* 30: 291-296 (Cited in Subramanian and Kalnitsky, (1974).
- Kurbanoglu, E. B. and Algur, Ö. F. (1972) Use of Ram Horn Hydrolyste as a peptone for bacterial growth. *Turk. J. Biol.*; 26: 110-123.
- Kwon-Chung, K. S. and Bennett, J. E. (1992) *Medical Mycology*. Williams and Wilkins, 2<sup>nd</sup>.ed. U. S. A.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*; 227: 680-685.
- Larcher, G.; Cimon, B.; Symoens, F.; Trongchin, G.; Chabase, D. and Bouchara, J. (1996) A 33 Kda serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochem. J.*; 310: 119-126.
- Lee, K. H. ; Park, K. K.; Park, H. S. and Lee, J. B. (1987) Isolation, Purification and characterization of keratinolytic proteinase from *Microsporium cains*. *Yonsei Med. J.*; 28(2): 131-138.
- Leger, R. J. St.; Joshi, L. and Roberts, D. (1998) Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle- degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *APPL. Environ. Microbiol.*; 64(2): 709-713.

- Lima, V. M. G.; Krieger, N.; Sarquis, M. I. M.; Mitchell, D. A.; Ramos, L. P. and Fontana, J. D. (2003) Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantioigriseum*. Food Technol. Biotechnol.; 41(2): 100-110.
- Lin, X.; Lee, C.; Casale, E. S. and Shih, J. C. H. (1992) Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. Appl. Environ. Microbiol.; 58(10): 3271-3275.
- Lunder, M. (1992). Is *Microsporum canis* infection about to become a serious dermatological problem? Dermatol ; 184: 87-89.
- Marchisio, V. F.; Preve, L. and Tullio, V. (1996) Fungi responsible for skin mycoses in Turin (Italy). Mycoses; 39 : 141-150.
- Marzluf, G. (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. Microbiol and molec. boil. rev.; 61(1): 17-32.
- Matsumoto, T. (1996) Fungal disease in dermatology. In: Principle and practice of clinical mycology, Kibbler, C. C.; Mackenzie, D. W. and Odds, F. C. (eds). J. Wiley and Sons Ltd., USA. PP: 103-129.
- Meletiadis, J.; Meis, J. F. G. M.; Mouton, J. W. and Verweij, P. E. (2001) Analysis of Growth characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. J. Clin. Microbi; 39(2): 478-484.
- Mercer, D. W. (1974) Separation of tissue and serum creatine Kinase isoenzyme by ion-exchange Column Chromatography. Clin. Chem.; 20, 37.
- Merz, W.G.; Sandford, G. and Evans, G.L. (1976) Clinical evaluation of the addition of gentamicin to commercially prepared mycological media. J. Clin. Microbiol.; 3: 496-500.
- Mignon, B. R.; Nikkels, A. F.; Pierard, G. E. and Losson, B. J. (1998) The invitro and invivo Production of a 31.0 Kda Keratinolytic Subtilase from *Microsporum canis* and the clinical Status in naturally infected Cats. Dermatol. ; 196(4): 438-441.
- Mignon, B. R.; Leclipteux, T.; Focant, C.; Nikkels, A. J.; Pierard, G. E. and Losson, B. J. (1999) Humoral and cellular immune response to crude exoantigen and Purified Keratinase of *Microsporum canis* in experimental infected guinea Pigs. Med. Mycol.; 37(2): 123-129.

- Mignon, B.R.; Swinnen, M.; Bouchara, J. P.; Hofinger, M.; Nikkels, A.; Pierard, G.; Gerday, C.H. and Losson, B. (1998) Purification and characterization of a 31.0 kDa Keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. *Med. Mycology*; 36: 390-404.
- Moloney, A. P.; O'Rourke, A.; Considine, P. J. and Coughlan, M. P. (1988) Enzymatic saccharification of sugar beet pulp. *Biotech. Bioeng.*; 26: 718-728.
- Monod, M.; Capoccia, S.; Lechenne, B.; Zaugg, C.; Holdom, M and Jousson, C. (2002) Secreted Proteases. From pathogenic fungi- *Int. J. Med. Microbiol.*; 292(5-6): 405-419
- Morihara, K. (1978) Comparative specificity of microbial proteinase. *Adv. Enzymol.*; 41: 179-233.
- Muhsin, T. M. and Salih, T. H. (2001) Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in southern Iraq. *Mycopath.*; 150(2): 49-52.
- Muhsin, T. M. and Aubaid, A.H. (2000) Purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. *Mycopath.*; 150: 121-125.
- Muhsin, T. M.; Aubaid, A.H. and Al-Duboon, A. H. (1997) Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolated on solid media. *Mycoses*; 40: 400-469.
- Muller, G.H.; Kirk, R.W. and Scott, D.W. (1989) Fungal diseases. In: Dyson J, ed. *Small Animal Dermatology*, 8<sup>th</sup> edn. Philadelphia: WB Saunders: 290-346.
- Myrvik, Q.N. and Weiser, R.S. (1988) *Fundamentals of Medical Mycology and Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> edn., Lea and Febiger Philadelphia. p: 534-542.
- Nigam, P. and Singh, D. (1994) Solid-state (substrate) fermentation system and their applications in biotechnology. *J. Basic Microbiol.*; 34(6): 405-423.
- Norris, H. A., Elewski, B. E. and Ghannoun, M. A. (1999) Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of microdilution method. *J. Am. Acad. Dermatol.*; 40(6 Pt 2): 9-13.

- Okafor, J. I. and Ada, N. (2000) Keratinolytic activity of five human isolates of the dermatophytes. J. Commun. Dis .; 32(4): 300-305.
- Page, W. J. and Stock, J. J. (1971) Regulation and self inhibition of *Microsporum gypseum* Macroconidia germination. J. Bacteriol.; 108(1): 276-281.
- Palecek, S. P.; Parikh, A. S. and Kron, S. J. (2002) Sensing, Signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. Microbiol, 148: 893-907.
- Pandey, A. (1991) Effect of particale size of substrates on enzyme production in SSF. Biores. Technol.; 37: 169-172.
- Papini, R. and Mancianti, F. (1990-1996) Extracellular enzymatic activity of *Microsporum canis* isolates. Mycopathol; 132(3): 129-132.
- Parry, D. A. D. and North, A. C. T. (1998) Hard  $\alpha$ - keratin intermediate filament chains: substructure of the N- and C- terminal domains and the predicted structure and function of the C- terminal domains of type I and type II chains. J. of stru. Biology; 122: 67-70.
- Philpot, C. M. (1977) The use of Nutritional tests for the differentiation of dermatophytes. Sabouraudia; 15: 141-150.
- Porro, A. M.; Yoshioka, M. C. N.; Kaminski, S. K.;Palmeira, M. C. A.;Fischman, O. and Alchorne, M. M. A. (1997) Desseminated dermatophytosis caused by *Microsporum gypseum* in two patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Mycopath.; 137(1): 9-12.
- Ramon, A. M.; Porta, A. and Fonzi, W. A. (1999) Effect of Environmental pH on Morphological Development of *Candida albicans* Is Mediated Via The Pac C-Related Transcription Factor Encoded by *PRR 2*. J. of Bacteriol.; 181(24): 7024-7030.
- Rao, M. B; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. and Molec. Biol. Rev.; 62(3): 097- 130.
- Reham, H. S. and Reed, G. (1987) Biotechnology, vol. 9. Verlag Chemei. Wein heim. Deerfield Beach.
- Reichard, U. ; Buttner, S.; Eiffert, H., Staib, F. and Ruchel, R. (1990) Purification and characterisation of an extracellular Serine proteinase from

- Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue .J. Med. Microbiol.; 33(ξ): 243-201.
- Robyte, J. F. and White, B. J. (1987) Biochemical techniques. second.ed.Wadsworth,Belmont,California, U. S. A: P: 9-81.
- Sangali, S and Brandelli, A. (2000) Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain Kr7. J. of Appl. Microbiol.; 89(0): 730-740.
- Samdani, A. J. and Al-Bitar, Y. (2003) The effect of proteinases (keratinases) in the pathogenesis of dermatophytes infection using electron microscope. Pakistan J. Med. Sci.; 19(ξ): 264-267.
- Segel, I. H. (1976) Biochemical calculations.first.ed. Jhon Wiley and Sons. Sharquie,E.and Al-zubaidi,K.,A.(1980) *Microsporum canis* in Iraq .Saudi med.j.; 6(3): 248-200.
- Simpanya, M. F. and Baxter, M. (1996) Partial characterization of a proteolytic enzymes of *Microsporum canis* and *Microsporum cookei*. Mycoses ; 39(7-8): 279-282.
- Sinski, J. T.; Kelley, L. M.; Flynt, P. M. and Miegel, J. (1977) Dermatophyte isolation Media: Quantitative Appraisal using skin scales infected with *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*, J. clinical Microbiol.; 0(1): 34- 38.
- Subramanian,A.R. and Kalnitsky,G.(1964) The major alkaline protease of *Aspergillus oryzae* ,Aspergillopeptidase B.I.Isolation in homogeneous form.Biochemistry; 3(12): 1861-1867.
- Suelter, C. H. (1980) A practical guidel to enzymology.first. A widely interscience publication. New York.
- Takasuka, T. (2000) Amino acid- or protein dependent growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. FEMS Immnuol. and Med. Microbiol.; 29(ξ): 241-240.
- Takuichi .I. and Higuchi, D. (1977) Isolation, Purification and biochemical Properties of Keratinase elaborated from *Microsporum gypseum*. Jap. J. Dermatol. ; 87: 300-309.
- Takuichi, I.; Higuchi, D.; Sei, Y. and Koga, M. (1982) Isolation of an extracellular proteinase (keratuase) from *Microsporum canis*. Sabouraudia ; 20(ξ): 281-288.

- Takuichi, I.; Sei, Y.; Takagi, H. and Negi, M. (1984) Partial characterization of the extracellular keratinase from *Microsporum canis*. Sabouraudia; 22(3): 219-224.
- Thangam, E. B. and Rajkumar, G. S. (2002) Purification and characterization of alkaline Protease from *Alcaligenes faecalis*. Biotechnol. Appl. Biochem. ; 35: 149-154.
- Tsuboi, R.; Ko, IK.; Takamori, K. and Ogawa, H. (1989) Isolation of keratinolytic proteinase form *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. Inf. and Imm.; 17(11): 3479-3483.
- Ulvatne, H.; Haukland, H. H.; Samuelsen, O.; Krämer, M. and Vorland, L. H. (2002) Protease in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B. J. of Anti. Chemoth.; 50: 461-467.
- Ustyuzhanina, S. V.; Yaroveuko, V. L. and Voinarskii, I. N. (1984) Synthesis of protease and  $\alpha$ -amylase by the fungus *Aspergillus oryzae* 201-90. Appl. Biochem. Microbiol.; 20(3): 616-621.
- Velho, G.; Lopess, V.; Amorim, M. L.; Cardoso, L.; Massa, A. and Amorin, J. M. (2000) Dermatophytes isolated at H. G. Santo Antonio, Portugal. Rev. Iberoam. Micol.; 17: 139.
- Vermout, S. M.; Brouta, F. D.; Descamps, F. F.; Losson, B. J. and Mignon, B. R. (2004) Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a *Microsporum canis* metalloprotease subunit vaccine in guinea Pigs. FEMS Immunol. and Med. Microbiol.; 40: 70-80.
- Viani, F. C.; Dossantos, J. I.; Paula, C. R.; Larson, C. E. and Gambale, W. (2001). Production of extracellular enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulence. Med. Mycol.; 39(5): 463-468.
- Volesky, B. and Luong, I. (1980) Microbiol enzymes Production, Purification and isolation. CRC (Critical Reviews in Biotechnology); 2: 119-146.
- Wagner, D. K. and Sohnle, P. G. (1990) Cutaneous defense against dermatophytes and yeasts. Clin. Microbiol. Rev.; 3(3): 317-330.

- Ward, O. P. (١٩٨٣) Proteinases, In "Microbial Enzymes and Biotechnology .W. M. Fogarty ed" App. Sci. Publisher. England.
- Weitzman, I. (١٩٨٦). The genus *Arthroderma* and its later synonym *Nannizzia*. Mycotoxin; ٢٥:٥٠٥-٥١٨.
- Weitzman, I. and Summerbell, R. C. (١٩٩٥) The dermatophytes. Clin. Microbiol. Rev.; ٨(٢): ٢٤٠-٢٥٨.
- Westermeier, R. ; Fichman. J.; Gronon, S.; Schickle, H.; Beling, G. and Weisner, P. (١٩٩٧) Electrophoresis in practice ,A guide to methods and applications of DNA and protein separation. ٢<sup>nd</sup>.ed., VCH. Germany.
- Whitaker, G. R. and Granum, P. E. (١٩٨٠) An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at ٢٣٥ and ٢٥٠ nm, Anal. Biochem.; ١٠٩: ١٥٦-١٥٩.
- Whitaker, J. R. (١٩٧٢) Principles of enzymology for the food science. first.ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- White, A., Handler, P. and Smith, E. (١٩٧٣) Principles of biochemistry. second.ed. Mc Grow- Hill Book Company Ablakiston Publication, New York.
- Yamada, T.; Makimura, K.; Hirai, A.; Kano, R.; Hasegawa, A.; Uchida, K. and Yamaguchi, H. (٢٠٠٤) Isolation of a promoter region of a secreted Metalloprotease gene from *Microsporium canis*. Jap. J. infect. Dis.; ٥٧ : ٢٥-٢٨.
- Yehia, M. M. (١٩٨٠) Studies on dermatophytes in Mosul and Vincinity. M. Sc. Thesis, College of Medicine, Mosul University. Iraq.
- Zurita, J.; and Hay ,R.J. (١٩٨٧) Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes invitro. J. of Invest. Dermatol.; ٨٩(٥): ٥٢٩-٥٣٤.



## الإستنتاجات

١. تم الحصول على عزله محليه من الفطر الجلدي *M. canis* من أصابه بالسعفة الحلقية.
٢. كانت للظروف البيئية خاصة نوع الوسط الغذائي الصلب ودرجه الحرارة ومدته الحضانه أهميه كبيره في نمو الفطر *M. canis* .
٣. حددت الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز مثل الرقم الهيدروجيني ( ٩ ) ودرجه الحرارة (٣٥م) والمصدر النتروجيني وتركيزه (الببتون ٠.٢٦%) والتهويه(المزج أو التهويه غير المستمره) ومدته الحضان (٩ أيام) ولوحظ إن درجه الحرارة المثلى لنمو الفطر (٢٥ م) تختلف عن درجه الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم (٣٥م).
٤. تم تنقيه الإنزيم جزئيا بخطوتين متعاقبتين هما الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع ٨٠% والتبادل الأيوني خلال عمود من المبادل الأيوني DEAE-cellulose.
٥. حدد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم (١١) وثباته (٩) و درجه الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم (٥٥م) وثباته (صفر -٢٥م).

## التوصيات

١. إجراء دراسات حول توصيف إنزيم البروتيز المنتج من العزلة المحلية من الفطر *M. canis* وتقدير الوزن الجزيئي للإنزيم.
٢. إجراء دراسات بخصوص آليه تأثير بعض المضادات الحيوية في تثبيط إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* إذ انه من العوامل المهمة جدا في ضراوة الفطر التي يجب أن تعمل عليها المضادات الحيوية مباشرة وأجراء مقارنه مع مستخلصات بعض النباتات الشائعة في القطر لهذا الغرض.
٣. إجراء دراسات فسلجية و مناعية على الإنزيم في محاولة لإيجاد طريقه تلقيح ناجحة تمنع أو تخفف من حدة الاصابه.