انتاج البروتيز المحلل للخثرة الدموية من عزلات فطرية متنوعة
1. تقييم عزلات الفطريات والاوساط الزرعية

منى حمودي الجبوري* عبد الله عبد الكريم حسن** سعود رشيد العاني**

تاريخ قبول النشر ٢٠٠٦/٦/١٢

الخلاصة

من بين 21 عزلة فطرية سجلت 15 فطر منها إنتاج البروتيز المحلل للخثرة الدموية المصنعة من بلازما دم الإنسان. أظهرت الفطريات الموجبة لاختبار تحلل الخثرة الدموية تباينا في أوقات التحلل حيث سجلت الفطريات *Aspergillus niger* (AB-11) و *Pleuorotus ostreatus* (white variety) و *Pleurotus ostreatus* (gray variety) و *Aspergillus oryzae* (AB – 21) و *Pleurotus sajor-caju* و *Trichoderma harzianum* و *Coprinus cinerus* و *Agaricus bitotquis* افضل تحلل للخثرة الدموية بتفوق معنوي (حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى 0.01) ، حيث بلغت أوقات التحلل 40 و 41 و 44 و 45 و 46 و 46 و 54 و 64 دقيقة ، على التوالي، وذلك عند تنمية هذه الفطريات في الوسط السائل (1) المؤلف أساسا من السكروز ومسحوقي فول الصويا والخميرة ، وفي ظروف المزرعة المتحركة. استخدمت الفطريات أعلاه في غربلة عدد من الأوساط الزرعية السائلة والصلبة ، وقد سجلت أقصى إنتاج للبروتيز المحلل للخثرة الدموية من الفطريات *A. niger* (AB-11) و *A. oryzae* (AB-21) و *Trichoderma harzianum* في الوسط السائل (6) المؤلف اساسا من الغليسيرين وكبريتات المغنيسيوم وكبريتات الأمونيوم و فوسفات البوتاسيوم ، وذلك بأقل وقت لتحلل الخثرة الدموية بلغت 38 و 43 و 44 دقيقة على التوالي، في حين كان إنتاج هذا الانزيم أقصاها في وسط الغربلة (وسط 1) من قبل الفطريات *P. ostreatus* بضربيه الابيض والرمادي والفطر *P. sajor-caju*.

أظهرت النتائج إن نمو جميع الفطريات قيد البحث في الوسط الصلب المؤلف أساسا من مخلفات السوس (مخلفات ناتجة بعد استخلاص المادة الطبية من نبات عرق السوس) سجل أعلى إنتاج لهذا الانزيم مقارنة بالأوساط الصلبة الأخرى ، وكانت كل من الفطريات *P. ostreatus* بضربيه الابيض والرمادي والفطر *T. harzianum* الأفضل في إنتاج الانزيم بأوقات تحلل قدرها 37 و 39و 39 دقيقة ، على التوالي.

المقدمة

ان الخثرة (الجلطة) الدموية هي كتلة من كريات الدم الحمر والصفيحات الدموية والياف من بروتين الليفين fibrin . ان تخثر الدم عملية مهمة لحياة الانسان اذا ما حدثت طبيعيا كما في حالات الجروح وتضرر الانسجة ، وقد تكون هذه العملية مهددة لحياة الانسان اذا ما حدثت داخل جهاز الدوران محدثة حالات مرضية مختلفة (17،4) .

هناك ثلاث آليات تستخدم لعلاج الاصابة بمرض الجلطة الدموية ، تتضمن الآلية الاولى منع تلازن الصفيحات الدموية Antiplatelet aggregation والثانية هي منع تخثر الدم Anticoagulation وان العلاج بكلا الآليتين هو وقتي وذلك لتجنب حدوث او تكرار حدوث امراض الجلطة الدموية، في حين تكون الآلية الثالثة وهي الية علاجية تطبق حال الاصابة بامراض الجلطة الدموية وهي تحلل الليفين Fibrinolysis باستخدام عدد من انزيمات البروتيز من مصادر شتى (32,26)

تعد الفطريات من المصادر التي تنتج مديات واسعة من انزيمات البروتيز ، وسجلت البحوث انتاج انزيمات البروتيز المحللة للخثرة الدموية من عدد من الانواع الفطرية ، وخلال الستينات من القرن المنصرم تمت دراسة خصائص بروتيز منتج من الفطر *Aspergillus oryzae* حيث كان هذا الانزيم فعال اتجاه عدد من الركائز من ضمنها ركيزة خثرة الليفين (5) . وفي عام 1970 اثبت كل من كيسلنك وسيفنسون (20) ان الانزيم بروتيز I (Protease I) المنقى بشكل تام من الفطر *A. oryzae* ليس له فعالية اتجاه خثرة الليفين فقط ، وانما شملت فعاليته اتجاه عدد من العوامل الخاصة بتخثر الدم مما اعطى

* قسم علوم الحياة – كلية العلوم / جامعة بغداد
** وزارة العلوم والتكنلوجيا / دائرة البحوث الزراعية – مركز تكنلوجيا الغذاء.ص.ب 765 بغداد – العراق

اهمية لهذا الانزيم في تحلل الخثرة الدموية من جهه ، والمساهمة في الحد من تكونها من جهة اخرى، في دراسة اخرى قام بها كل من كيردنتسيفا و ايكاروف (7) على عدد من سلالات الفطريات الناقصة العائدة للأجناس *Aspergillus* sp. (13 نوع) و *Acremonium* sp. (3 انواع) و *Verticillium* sp. (3 انواع) حيث اختبرت ثمانية اوساط زرعية سائلة بأسلوب المزرعة المتحركة ، وسجلت الدراسة اختلاف فعالية انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية باختلاف السلالة الفطرية من جهه، وبأختلاف الوسط الزرعي من جهه اخرى ، وقد بلغت اعلى فعالية (118.1 وحدة / مليغرام كتلة حيوية) للسلالة 108 العائدة للنوع *Aspergillus flavus* المنمى في وسط يتألف اساسا من 0.19% كلوكوز و 0.36% سكروز و 0.061% نترات البوتاسيوم مع مجموعة من الاملاح المعدنية ، في حين سجلت اعلى فعالية (97.9 وحدة / مليغرام كتلة حيوية) من قبل السلالة 171 للنوع نفسه في وسط زرعي آخر مؤلف اساسا من الغليسرين (0.75%) وكبريتات الامونيوم (0.06%) مع مجموعة من الاملاح المعدنية .

تم عزل وتنقية انزيم بروتيز آخر من الفطر *A. ochraceus* السلالة 513 ولهذا الانزيم فعاليتان مهمتان ، الاولى فعالية محللة لبروتين الليفين من خلال فعاليته المنشطة لمولد البلازمين ، والثانية فعالية مضادة للتخثر anticoagulant activity (3,) .

حصل برودبنت وجماعته (6) على براءة اختراع اثر اكتشافهم انزيم بروتيز محلل لخثرة الليفين من الفطر البازيدي *Armillaria mellea* وذلك عندما نمي هذا الفطر في وسط زرعي مؤلف من رقائق الذرة الصفراء المطبوخة مع المالت وسجلت فعالية انزيم البروتيز الذي سمي AM protease من المستخلص المائي للغزل الفطري mycelium مقدرة بتحلل خثرة الليفين خلال 90 ثانية فقط. من الجدير بالذكر ان جميع البروتيزات المنتجة من انواع الفطريات سابقة الذكر هي انزيمات خارج خلوية Extracellular proteases ، في حين انتجت انزيمات بروتيز محللة لخثرة الليفين من الاجسام الثمرية لفطريات اخرى وخاصة العراهينMushrooms العائدة لصنف الفطريات البازيدية ، حيث تقي بروتيز محلل لخثرة الليفين داخل خلوي (من الاجسام الثمرية) للفطر الغذائي *Pleurotus ostreatus* (9) ومن الفطر *Ganoderma lucidium* (8)

تهدف الدراسة الحالية الى غربلة 21 عزلة فطرية عائدة للفطريات اللاقحية والناقصة والبازيدية وكذلك غربلة عدد من الاوساط الزرعية السائلة والصلبة لانتخاب اكفأ فطر منتج لأعلى فعالية من انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية.

المواد وطرائق العمل

الفطريات المستخدمة

استخدمت21 عزلة من الفطريات و المدرجة في الجدول (1) والمستحصلة من دائرة البحوث الزراعية وتكنلوجيا الغذاء في وزارة العلوم والتكنلوجيا ، الفطر *C. cinereus* و العزلات المحلية من(AB 11 – AB 39) المذكرة مصادر عزلها في الجدول المذكور عزلت وشخصت حسب دراسات سابقة (1,2,23) .

تحضير لقاح الفطريات

نشطت الفطريات موضوع البحث عن طريق زراعتها في وسط البطاطا دكستروز اكار (Potato Dextrose Agar)PDA المائل وحضنت بدرجة 27 م لمدة 1-2 اسبوع (حسب نوع الفطر) ثم استخدمت في تحضير اللقاح الخاص بالاوساط السائلة والصلبة .

تحضير لقاح الاوساط السائلة

حضر لقاح الفطريات الناقصة واللاقحية بأضافة 1 ميليلتر من الماء المقطر المعقم على سطح نمو هذه الفطريات في وسط PDA المائل ثم قشط سطح الوسط بأستخدام ابرة معقمة needle ونقل العالق الى انابيب اختبار معقمة مع الرج لمنع تكتل الكونيدات في العالق ثم ضبط عدد السبورات الى 10^6 سبور لكل ميليلتربأستخدام شريحة العد Petroff-Hausser counting champer (24) .

استخدم هذا اللقاح في تلقيح الاوساط السائلة بنسبة 1% ، اما لقاح الفطريات البازيدية (لاتكون سبورات في وسط PDA المائل) فقد نقل جزء من المستعمرة الفطرية المكونة من الغزل الفطري فقط ولقح الوسط السائل مباشرة بهذا اللقاح .

اختبار قابلية الفطريات لأنتاج انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية

استخدم الوسط الزرعي السائل (1) المذكورة مكوناته ادناه ، صب هذا الوسط في دوارق حجمية سعة250 ميليلتربواقع 100 ميليلتر وسط زرعي لكل دورق ، وعقمت بالموصدة بدرجة 121 م لمدة 20 دقيقة ، برد الوسط الى درجة حرارة الغرفة ولقح بلقاح الاوساط السائلة

ثم حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة بواقع 120 دورة بالدقيقة وبدرجة تحضين 27 م لمدة 7 ايام للفطريات الناقصة واللاقحية و14 يوما للفطريات البازيدية ، بعد انتهاء مدة التحضين رشح المزروع الفطري خلال اوراق ترشيح (Whatman No.1) ثم نبذ الراشح بمنبذة مبردة بسرعة 4000 دورة بالدقيقة لمدة 15 دقيقة وجمع الطافي في قنان معقمة لتقدير الفعالية الانزيمية بطريقة تحلل الخثرة الدموية لبلازما الانسان .

تقدير فعالية انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية

استخدمت طريقة تحلل الخثرة الدموية المكونة من بلازما الانسان حيث اضيف الى انبوبة اختبار 0.5 ميليلترمن مستخلص الانزيم الخام الى خثرة البلازما المكونة من مزج 0.2 ميليلتر بلازما الانسان و 0.8 ميليلتر من المحلول الملحي الفسيولوجي و 0.25 ميليلترمن كلوريد الكالسيوم (0.25%) ، وفي انبوبة اختبار اخرى (انبوبة السيطرة) اضيف 0.5 ميليلتر من المحلول الملحي الفسيولوجي (بدلا من مستخلص الانزيم) الى خثرة البلازما ورجت الانابيب وحضنت بدرجة 37 م ثم سجلت اوقات تحلل الخثرة الدموية (21).

تأثير الاوساط الزرعية في انتاج الانزيم

تأثير الاوساط الزرعية السائلة

لقحت الاوساط الزرعية السائلة التالية بالفطريات الأكثر كفاءة في تحلل الخثرة الدموية :

الوسط(1) وسط كاواي وموكاي (18) ، ويتكون من المواد التالية (غرام / لتر) :

سكروز 30 ، مسحوق فول الصويا 30 ، مستخلص الخميرة 3 ، فوسفات البوتاسيوم 5 ، كبريتات المغنيسيوم 0.2.

الوسط(2) وسط سونك و جو(29) ، يتكون من المواد التالية (غرام / لتر) :

مستخلص المالت 15 ، كلوكوز 8 ، ببتون 10 ، مستخلص الخميرة 5.

الوسط (3) وسط كرنتسيف و ايكاروف(7) ، يتألف من المواد التالية (غرام / لتر) :

سكروز 10 ، غليسيرين 15 ، كبريتات المغنيسيوم 1.2 ، فوسفات البوتاسيوم 14 ، نترات البوتاسيوم 2.

الوسط (4) وسط كريكان و روز(19) ، يتألف من المواد التالية (غرام / لتر) :

مرق البطاطا(200 غرام بطاطا / لتر) Potato broth 24 ميليلتر، دكستروز 10 ، مستخلص الخميرة 2 ، كبريتات المغنيسيوم 0.25 ، فوسفات البوتاسيوم 0.46 .

الوسط (5) وسط سونك وجو(29) ، يتألف من المواد التالية (غرام / لتر) :

سكروز 30 ، كازائين 10 ، نترات الصوديوم 2 ، فوسفات البوتاسيوم 1 ، كبريتات المغنيسيوم 5 ، كلوريد البوتاسيوم 0.5 ، كبريتات الحديديك 0.1.

الوسط (6) وسط كرد نتسيفا و ايكاروف(7) ، يتألف من المواد التالية (غرام / لتر) :

غليسيرين 7.5 ، كبريتات المغنيسيوم 0.5 ، فوسفات البوتاسيوم 1 ، كلوريد الكالسيوم 0.1 ، كبريتات الحديديك 0.01 ، كبريتات الامونيوم 0.6 .

الوسط (7) وسط شايمزانو و تومودا (28) ، يتألف من المواد التالية (غرام / لتر) :

دكستران 50 ، مولاس 20 ، فوسفات البوتاسيوم 1.5 ، كبريتات المغنيسيوم 0.5 ، ثايمين 2×10^{-3} .

الوسط (8) وسط ديماكرو وفلايكس(10) ، يتألف من المواد التالية (غرام / لتر) :

كلوكوز 1 ، ببتون 1 ، كازائين 5 ، فوسفات البوتاسيوم 2 ، كبريتات المغنيسيوم 0.3 ، كلوريد الكالسيوم 0.3 ، يوريا 0.3 ، كبريتات الامونيوم 1.4 .

اتبعت ظروف الزرع والاستخلاص وتقدير الفعالية الانزيمية نفسها المذكورة في اعلاه .

2-4-2-2 تأثير الأوساط الزرعية الصلبة

لقحت الاوساط الزرعية الصلبة بلقاح الفطريات الأكثر كفاءة في تحلل الخثرة الدموية ، استخدمت الاوساط الزرعية الصلبة التي هي عبارة عن مخلفات زراعية وصناعية شملت تبن الحنطة و كوالح الذرة الصفراء واوراق وسيقان زهرة الشمس وقشور الرز ومخلفات عرق السوس ووسط السماد العضوي المتخمر Compost ، غطست جميع هذه الاوساط بالماء لمدة 12 ساعة ونشفت من الماء الفائض وعبئت في قنان زجاجية سعة 1 لتر بواقع 250 غراما وسطا لكل قنينة وعقمت بالموصدة بدرجة 121 م لمدة 1.5 ساعة ثم بردت القناني الى درجة حرارة الغرفة لتصبح جاهزة لعملية التلقيح . اما وسط السماد العضوي فقد حضر حسب الطريقة المذكورة من قبل فيدر (31) ، حيث استخدم تبن الحنطة المادة الاساس في الوسط مع اضافة 60% مخلفات الدواجن و 2.5% نخالة الحنطة و6% كبريتات الكالسيوم ، تم خلط اللقاح الخاص بالاوساط الصلبة بنسبة 3% ثم حضنت بدرجة 27 م لغاية اكتمال النمو في جميع اجزاء الوسط .

استخلاص البروتيز المحلل للخثرة الدموية من الاوساط الصلبة

استخلص الانزيم بأضافة داري، الفوسفات ذو الرقم الهيدروجيني 6 الى الوسط الصلب المشبع بالنمو الفطري (بعد تجزئة الوسط) بنسبة 1:3 (وزن : وزن) وخلط جيدا مع الرج ثم رشح خلال قماش شاش (4 طبقات) للتخلص من الاجزاء الصلبة كبيرة الحجم ، نبذ الراشح بالمنبذة المبردة بسرعة 4000 دورة بالدقيقة لمدة 15 دقيقة ثم قدرت الفعالية الانزيمية للطافي بطريقة تحلل الخثرة الدموية لبلازما الانسان .

تقدير نسبة البروتين في الاوساط الصلبة

قدرت نسبة البروتين (N×6.25) حسب طريقة مايكروكلدال Microkjeldahl (16) باستخدام جهاز Buchi-322 automatic nitrogen analyzer .

اجريت التحاليل الاحصائية لنتائج البحث حسب اختباردنكن المتعدد الحدود Duncan Multiple Range Test واختبار الفرق المعنوي الاصغر Least Significant Difference(LSD) (30).

النتائج والمناقشة

اختبار قابلية الفطريات لأنتاج انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية

يبين الجد ول (2) ان هناك 15 فطرا موجبا لأختبار تحلل الخثرة الدموية، في حين كانت سائر الفطريات سالبة لهذا الاختبار (لغاية 180 دقيقة) . اظهرت الفطريات الموجبة لأختبار تحلل الخثرة الدموية تباينا في اوقات التحلل حيث سجلت الفطريات *A. niger* AB-11 و *P. ostreatus* (w.v) و *P. ostreatus* (g.v) و *A. oryzae* AB - 21 و *P. sajor -caju* و *T. harzianum* و *C. cinereus* و *A. bitorquis* أفضل تحلل للخثرة الدموية بتفوق معنوي (حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى 0.01) وكانت اوقات التحلل 40 و41 و 44 و45 و46 و 46 و54 و64 دقيقة ، على التوالي ، وذلك عند تنمية هذه الفطريات في الوسط السائل(1) وفي ظروف المزرعة المتحركة . انتخبت الفطريات المذكورة في اعلاه في اجراء دراسات تأثير الاوساط الزرعية في فعالية الانزيم .

ان اهم اسباب استخدام طريقة تحلل الخثرة الدموية المكونة من بلازما الانسان لغربلة الفطريات وكذلك غربلة اوساطها الزرعية هي كون هذه الطريقة سريعة وغير مكلفة . قد يعزى تباين اوقات تحلل الخثرة الدموية الى التباين الحاصل في انتاج انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية الذي يختلف باختلاف العزلات الفطريات نفسها ،وكما ان الفطريات التي لم تنتج انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية (الجدول – 2) لا يعني انها لاتنتج انزيمات بروتيز اخرى، الا ان انزيماتها المحللة للبروتين قد تكون غير نوعية لتحليل ركيزة الليفين ، الاساس في الخثرة الدموية. ان اختلاف انتاج البروتيز المحلل للخثرة الدموية مع تحديد عمله اتجاه ركيزة الليفين باختلاف الفطريات المنتجة له يتفق مع ما اشارت اليه دراسات سابقة (25,10 ,7)

تأثيرالاوساط الزرعية السائلة في انتاج أنزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية

يظهر الجدول (3) تباينا في فعالية الانزيم باختلاف الوسط الزرعي السائل والفطر المنمى فيه ، كما وانتجت كلا من الفطريات *T.harzianum* و *A. niger* AB-11 و *A. oryzae* AB-21 الانزيم باقصى فعالية في الوسط (6) . اذ سجلت اقل زمن لتحلل الخثرة الدموية بلغ 44 و 38 و 43 دقيقة ، على التوالي ، في حين كان الوسط (1) – وسط الغربلة – افضل وسط سجلت فيه الفطريات *P. ostreatus* (w.v) و *P. ostreatus* (g.v) و *P. sajor -caju* افضل فعالية انزيمية حيث تم تحليل الخثرة الدموية بزمن قدره 41 و 44 و46 دقيقة ، على التوالي . وعلى الرغم من تسجيل الفطرين *C. cinereus* و *A. bitorquis* اوقات تحلل الخثرة الدموية اكثر من الفطريات الاخرى ، وفي جميع الاوساط ، الا انهما سجلا افضل فعالية انزيمية عند نموهما في الوسط (8) بوقت تحلل قدره 51 و58 دقيقة ، على التوالي (الجدول– 3).

ان اختلاف فعالية البروتيز المحلل للخثرة الدموية للعزلات الفطرية المنتخبة قد يعزى الى اختلاف في نوع البروتين باختلاف الوسط السائل ، ونظرا لكون هذا البروتيز من الانزيمات المحثة (28,25,15) فأن وجود بروتين معين في الوسط الغذائي يحفز الفعالية الانزيمية اتجاه ركيزة اكثر من غيرها . ان هذه النتائج تتفق مع ما جاءت به دراسات مماثلة سجلت فيها اختلاف فعالية انزيم البروتيز المحلل لخثرة الليفين باختلاف كل من الانواع الفطرية من جهة والوسط الزرعي السائل من جهة اخرى (22,11,7) .

الجدول (1) العزلات الفطرية المستخدمة ومصادرها.

الفطر	الرقم / الرمز	المصدر
Aspergillus niger	11414	ATCC
Trichoderma harzianum	-	ATCC
Agaricus bisporus	B-62	مزرعة الحميدية لأنتاج الفطر الابيض
Pleurotus ostreatus(w.v)	-	ITCC
Pleurotus eryngi	-	ITCC
Pleurotus sajor – caju	-	ITCC
Pleurotus ostreatus (g.v)	-	ITCC
Coprinus comatus	-	(14)
Agaricus bitorquis	-	(13)
Coprinus cinereus	-	عزلت من السماد العضوي / التوبثة
Aspergillus niger	AB-11	عزلت من السماد العضوي / التوبثة
Aspergillus niger	AB-12	عزلت من عليقة دواجن / ديالـــى
Aspergillus niger	AB-13	
Aspergillus oryzae	AB-20	عزلت من التربة / منطقة الجادرية
Aspergillus oryzae	AB-21	عزلت من السماد العضوي/التوبثة
Rhizopus stolonifer	AB-35	عزلت من عليقة دواجن/ ديالـــى عزلت من عليقة دواجن/ ديالـــى
Rhizopus stolonifer	AB-36	عزلت من السماد العضوي / التوبثة
Trichoderma viride	AB-38	عزلت من السماد العضوي / التوبثة
Penicillium notatum	AB-39	عزلت من السماد العضوي / التوبثة
Penicillium notatum	P-11	(12)
Penicillium notatum	P-12	(12)

ATCC = American Type Culture Collection .
I TCC = Indian Type Culture Collection .

الجدول(2) اوقات تحلل الخثرة الدموية بوساطة عزلات فطرية متنوعة.

الانواع / العزلات الفطرية	الرقم / الرمز	وقت تحلل الخثرة الدموية(دقيقة)
Aspergillus niger	11414	ج 88
Trichoderma harzianum	-	أ 46
Agaricus bisporus	B-62	- •
Pleurotus ostreatus(w.v)	-	أ 41
Pleurotus eryngi	-	د 101
Pleurotus sajor – caju	-	أ 46
Pleurotus ostreatus (g.v)	-	أ 44
Coprinus comatus	-	-
Agaricus bitorquis	-	ب 64
Coprinus cinereus	-	أ ب 54
Aspergillus niger	AB-11	أ 40
Aspergillus niger	AB-12	-
Aspergillus niger	AB-13	د 108
Aspergillus oryzae	AB-20	-
Aspergillus oryzae	AB-21	أ 45
Rhizopus stolonifer	AB-35	هـ 156
Rhizopus stolonifer	AB-36	هـ 162
Trichoderma viride	AB-38	ج د 94
Penicillium notatum	AB-39	-
Penicillium notatum	P-11	-
Penicillium notatum	P-12	هـ 123

تشير الحروف الانجليزية المتشابهه في عمود وجود فروق معنوية وتشير الحروف المختلفة الى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكر متعدد الحدود تحت مستوى 0.01 .
• الاشارة (-) تعني عدم تحلل الخثرة الدموية لغاية 180 دقيقة .

الجدول (3) تأثير الاوساط الزرعية السائلة في فعالية انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية بوساطة عزلات فطرية منتخبة*.

L.S.D (P< 0.01)	الوسط (8)	الوسط (7)	الوسط (6)	الوسط (5)	الوسط (4)	الوسط (3)	الوسط (2)	الوسط (1)	اوقات تحلل الخثرة الدموية(دقيقة) / الانواع / العزلات الفطرية
8.8	63	62	44	55	63	47	51	46	*T. harzianum*
9.0	76	71	38	60	55	11	46	40	*A. niger* AB-11
10.3	60	67	43	58	55	45	56	45	*A. oryzae* AB-21
12.0	73	70	54	63	72	52	63	44	*P. ostreatus* (g.v) *P. ostreatus*
12.2	73	70	59	63	64	52	60	41	*P. sajor -caju* (w.v)
11.7	71	68	67	61	66	57	57	46	*A. C. cinereus*
14.4	51	84	66	72	57	60	59	54	*bitorquis*
12.8	58	90	68	77	60	66	67	64	L.S.D (P<0.01) :
	9.5	10.3	6.9	7.7	9.0	9.3	11.7	5.6	الانواع / العزلات
	17.4	19.8	16.3	16.3	18.2	16.6	14.1	12.6	الانواع / العزلات × الاوساط

الفعالية الانزيمية مقدرة بوقت تحلل الخثرة الدموية (دقيقة)

الجدول (4) تأثير الاوساط الزرعية الصلبة في فعالية انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية بوساطة عزلات فطرية منتخبة*.

الاوساط الزرعية الصلبة							اوقات تحلل الخثرة الدموية (دقيقة) / الانواع/ العزلات الفطرية
L.S.D (P<0.01)	مخلفات السوس	كوالح الذرة الصفراء	قش زهرة الشمس	قشور الرز	تبن الحنطة	السماد العضوي	
10.2	39	51	46	72	53	57	*T. harzianum*
12.0	42	55	48	78	63	68	*A. niger* AB-11
12.6	40	53	50	66	61	58	*A. oryzae* AB-21
10.7	39	46	53	65	52	-	*P. ostreatus* (g.v) *P.ostreatus* (w.v)
12.3	37	44	56	68	48	-	*P.sajor-caju*
13.1	42	48	61	68	48	-	*C.cinereus*
13.4	51	73	86	-	76	48	*A. bitorquis*
13.3	56	83	-	-	78	53	L.S.D (P<0.01):
	6.4	15.0	15.3	7.6	9.5	6.7	الانواع / العزلات الفطرية
	9.2	21.2	19.0	14.3	16.2	9.4	الانواع / العزلات × الوسط

الشكل (1) المحتوى البروتيني في الاوساط الزرعية الصلبة المستخدمة في غربلة الفطريات لانتاج البروتيز المحلل للخثرة الدموية.

تأثيرالاوساط الزرعية الصلبة في انتاج أنزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية

يبين الجدول (4) ان افضل كفاءة في تحلل الخثرة الدموية سجلت في وسط مخلفات السوس عند زراعته بالفطريات المختبرة كافة ، وبلغ اقصى تحلل للخثرة الدموية بوساطة الفطر *P. ostreatus* بضربيه الابيض والرمادي والفطر *T. harzianum* باوقات تحلل بلغت 37 و 39 و39 دقيقة ، على التوالي.

يبين الجدول نفسه ان وسط السماد العضوي يعد افضل وسط سجل فيه الفطر *C. cinerus* والفطر *A. bitorquis* اقل وقت لتحلل الخثرة الدموية التي بلغت 48 و53 دقيقة ، على التوالي ، في حين كان هذا الوسط (السماد العضوي) غير ملائم لنمو انواع الفطر *Pleurotus* وبالتالي لم تسجل اي فعالية لتحلل الخثرة الدموية ، كما تباينت فعالية انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية للفطريات الاخرى بتباين الاوساط الزرعية الصلبة (الجدول 4).

يلاحظ من النتائج ان حالات النمو المثلى في الاوساط الزرعية تعكس فعالية انزيمية اكفأ من حالات النمو الضعيف ، فنمو انواع الفطر *Pleurotus* كان ضعيف جدا في وسط السماد العضوي . وعلى هذا فلم يمكن الحصول على الانزيم في هذا الوسط في حين سجلت فطريات اخرى (*C. cinereus* و *A. bitorquis*) نموا تاما في هذا الوسط مما اعطى فعالية انزيمية عالية وهذا ما يؤكد ان مكونات الوسط الزرعي وطريقة تحضيره دورا مهما في تنمية عدد من الفطريات واعاقة اخرى ، وهذا يتفق مع ما اشار اليه عدد من الدراسات في هذا المجال (34.27) .

استخدم وسط مخلفات السوس لاول مرة في هذه الدراسة لاستزراع الفطريات موضوعة البحث وتميزت هذه الفطريات وخاصة الفطريات المكونة للاجسام الثمرية مثل الفطر *A. bitorquis* والفطر *C. cinereus* وكفاءة انواع الفطر *Pleurotus* قيد البحث بالنمو الكامل في هذا الوسط ، كما وكانت فعالية انزيم البروتييز المحلل للخثرة الدموية من قبل معظم الفطريات المستزرعة بهذا الوسط اعلى مما هو عليه في الاوساط الزرعية الاخرى ، وهذا ربما يعزى الى تحفيز انتاج اعلى للانزيم ناتج من تفوق المحتوى البروتيني لهذا الوسط مقارنة بالاوساط الاخرى (الشكل 1) ، او قد تعزى قابلية تلك الفطريات على الاستفادة من طائفة من مكونات الوسط خصوصا وان نبات السوس ذو خصائص طبية معروفة وهذه ربما تتفق بشكل غير مباشر مع دراسة واينذر وجماعته Winther *et al.* (33) الذي عمل مركبا مكونا من عدد من الاعشاب الطبية من ضمنها عرق السوس واطلق عليه اسم PADM A-28 وصنع على شكل اقراص (340 ملغ) ، وقد اختبر على 36 مريضا مصابا بالجلطة الدموية (عمر 67 سنة) واتضح ان هناك فعالية محللة لليفين من خلال اختزال وقت تحلل خثرة اليوغلوبيولين(ECLT) بحوالي 40% واختزال نشاط مثبط منشط مولد البلازمين(PAI-1) من 14.6 الى 10.1 وحدة / ميليلتر .

على الصعيد الاقتصادي لانتاج الانزيم فيعد وسط مخلفات السوس (كما في معظم الاوساط الصلبة الاخرى قيد الدراسة) من المخلفات الصناعية الرخيصة الثمن والتي يمكن استغلالها لانتاج هذا الانزيم.

References

1. Alexopoulous ,C. J., Mims ,C.W.& Blackwell , M. 1996.Intro- dutory Mycology. John Wiley & Sons, INC . New York ,
Chichester , Brisbane , Toronto & Singapore . 4th ed. P.869.

2. Barnett , H. L. & Barry , B. H. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi . Buress Publishing Company .

3. Batomunkueva , B. P. & Egorov , N. S. 2001. Isolation , puri- fication , and resolution of the extracellular proteinase of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities . Microbiol. 70(5):519-523.

4. Becker ,W. M., Kleinsmith, L.J. & Hardin , J.2000. The world of the cell. The Benjamin / Cummings publishing company P. 878

5. Bergkvist ,R. & Svard , P.O. 1964. Studies on the thrombo- lytic effect of a protease from *Aspergillus oryzae* . Acta. Physiolog. Scandanavia . 60:363-370.

6. Broadbent , D., Turner , R. W. & Walton , P. L.1974. Proteo- lytic enzymes : Production by *Armillaria mellea* . In "Microbial Enzyme Production" (S.J. Gutcho , ed.). Noyes data corporation , New Jersey , P.204.

7. Cherdyntseva , T. A. & Egorov , N. S.1989. Formation by fungi of the *Aspergillus* , *Acremonium* and *Verticilium* genera of extracellular proteases which coagulate blood plasma and lyse blood clots.Microbiol. 57(4):463-467.

8. Choi ,H. S. & Sa ,Y. S.2000. Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum*. Mycologia 92:545-552. 9.Choi ,H. S. & Shin , H. H. 1998. Purification and partial characterization of a fibrinolytic protease in *Pleurotus ostreatus* . Mycologia 90:674-679.

10.Demacro , J. L. & Felix , C.R. 2002. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches ' broom disease. Biochem.3:3-7.

11.Egorov , N.S.,Landan, N.S. & Kotova , I.B. 1988. Combined immobillized cultures producing fibrinolytic proteinases Microbiol. 57(6):753-759.

12.Hassan , A. A., AL - Temimi , S.K., Jasim , S.H. & Mahmoud, A.R.2001. Population level of mycoflora in feed and beds of poultry and the influnce of some factors on it. Alfath. J. 8:193-206.

13.Hassan , A. A., & Mahmoud, A. R. 2003. Outdoor cultiva- tion of two white edible mushrooms *Agaricus bisporus* and *Agaricus bitorquis* . Iraqi J. Agric. 8(2):59-66.

14.Hassan , A. A., Natheer , A. M., Mahmoud, A. R. & Alani A.H.2000.Cultivation trials of an edible mushroom *Coprinus comatus* Fr. In Iraq. Diala J. 1(9): 70-79

15.Hassan , A. A. 2005. Production of fibrinolytic protease from Pleurotus ostreatus by solid state fermentation.Ph.D.Thesis. College of Science,University of Baghdad , Iraq.

16.Hesse, P. R. 1971. A textbook of soil chemical analysis.John Murray. Pp520

17.Jackson , C. M., Jespersen , J., Esnoouf , M.P., Rosing,J.,White, G., Barrowcliffe ,T.,Kluft ,C. & Lenahan , J.1999. Standard- ization of coagulation tests:definig the problem- a report from the committee of standadization of coagulation tests. A Joint committee of the IFCC and ISTH. Clin. Chem. Lab. Med. 37:1437-1511.

18.Kawai ,M., & Mukai ,N.1974.Proteolytic enzymes: production by organisms in the class Basidiomycetes.In"Microbial enzy- mes production." (S.J. Gutcho, ed.) , Noyes data corporation, New Jersey.P. 201.

19.Kerrigan ,R. W. & Ross . I. K. 1989. Allozymes of a wild *Agaricus bisporus* population : new alleles, new genotypes. Mycologia 81(3):433-443.

20.Kiessling , H. & Svensson , R. 1970. Influence of an enzyme from *Aspergillus oryzae* , protease I , on some components of fibrinolytic system. Acta. Chemie. Scandanavia 24:569- 579.

21. Kline , D.L.1962. Enzymes in blood clotting . In "Methods in enzymology." (S.P. Colowick and N. O. Kaplan, eds). Acad- Mic press , New York and London.P.187

22.Larcher , G. Bouchara , J.P., Annaix ,V. Symoens , F. Chabasse, D. & Tronchin , G. 1992. Purification and characterization of a fibrinolytic serine protease from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate . FEBS. 308:65-69.

23. Largent , D. L. & Barone , T. J. 1988. How to identify

mushrooms to genus VI : Modren genera . Mad River press , Ine.. Eureka , California. 24.Madigan . M. T. , Martinko , J. M. & Parker, J. 2000. Brock biology of microorganisms.Prentice Hall, New Jersey. P.991 25.Palmieri , G., Bianco ,C., Cennamo , G., Giardina , P., Marino , G.,Mont ,M & Sannia,G.2001.Purification and characteriza- tion and functional role of novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 67(6):2754- 2759. 26.Quriel ,K., Welch ,E.L., Sortell ,C. K., Ceary ,K., Fiore ,W.M.& Cimino , C. 1995. Comparsion of streptokinase, urokinase and recombinant tissue plasminogen activator in an in vitro model of venous thrombolysis . Thromb. Haemost. 22(5): 593-597.

27.Rajarathnam ,S.& Bano ,Z.1988.*Pleurotus* mushrooms.Part IB pathology,in vitro and in vivo growth requirements,and world status.Crit. Rev. Food Sci. Nutri.26(3):243-311.

28.Shimazono , H. & Tomoda , K. 1974. Proteolytic enzymes : production by fungi of the family polyporaceae.In"Microbial enzyme production." (S. J. Gutcho, ed.).Noyes data corpora- tion . New Jersey.P.194.

29.Song , C. H. & Cho , K. Y.1987. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. Mycologia 79(6):866-876.

30.Steel , P. G. D. & Torrie , J. H. 1980. Procedures of Statistics , A biometrical Approach , 2nd Ed. MacGraw Hill Book Co.Kagahusha , Tokyo , Japan.

31.Vedder , P. J. C.1978.Modren mushroom growing. Educaboek, Culemberg

32.Weitz ,J. I., Stewart ,R. J. & Fredenburph , J. C.1999. Mechan- ism of action of plasminogen activators. Thromb. Haemost. 82:974-982.

33.Winther , K. Kharazmi , A. Himmelstrup , H., Drabaek , H. & Mehlsen , J. 1994. PADMA - 28 , A botanical compound , decrease the oxidative burst response of monocytes and improves fibrinolysis in patients with stable intermittent claudication . Fibrinol.8(2):47-49.

34.Wood , D. A. & Fermor , T. R. 1985. Nutrition of *Agaricus bisporus* . In "The biology and technology of the cultivated mushroom."(P.B. Flegg , D. M. Spencer & D. A. Wood, eds.) John Wiley & Sons Ltd.

Production of fibrinolytic protease from various fungal isolates 1. Evaluation of fungal isolates and media

***AL-Jaboury, M. H. **Hassan, A. A ** Alani, S. R.**

* Department of Biology, College of Science, Baghdad University
** Food Technology Center, Ministry of Science and Technology P.O.Box 765 , Baghdad , Iraq.

Abstract

Among twenty one species and isolates of fungi, the production of fibrinolytic protease in fifteen of them was recorded. The maximum lysis times of human plasma clot were 40,41,44,45,46,46,54 and 64 min recorded by *Aspergillus niger* (AB-11),*Pleurotus ostreatus* (white variety),*Pleurotus ostreatus* (gray variety), *Aspergillus oryzae* (AB – 21),*Pleurotus sajor-caju*,*Trichoderma harzianum*,*Coprinus cinerus* and *Agaricus bitorquis* , respectively, when these fungi grown on the liquid medium No.1 composed essentially of sucrose,soya bean powder and yeast extract powder in a shacked culture conditions. The positive fungi for human plasma clot lysis test were evaluated for their fibrinolytic activity in various types of liquid and solid media. The maximum human plasma clot lysis time were 38, 43 and 44 min recorded by *Aspergillus niger* (AB-11), *Aspergillus oryzae* (AB – 21) and *Trichoderma harzianum*, respectively, when these fungi grown on the liquid medium No.6 composed essentially of glycerin , Mg SO4, KH2PO4, CaCl2 and (NH4)2SO4.The results showed that all tested fungi produced a fibrinolytic protease when grown on a solid medium composed of Sus wastes (produced from extracted medicinal plant , *Glycyrrhiza glabra*) and the maximum human plasma clot lysis time were 37, 39 and 39 min recorded by white and gray variety of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum* respectively.