

مقایسه فعالیت آنزیمی قارچ‌های کراتینولیتیک جدا شده از خاک مناطق مختلف

دکتر حسین معلابی^۱، دکتر فریده زینی^۲، دکتر ژرالد لارچر^۳، دکتر محمود محمودی^۴، دکتر سید مهدی زرگریان^۵

^۱ استادیار قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

^۲ استاد قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۳ دانشیار بیوشیمی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آنجرس فرانسه

^۴ استاد آمارحیاتی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۵ عضو هیأت علمی علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

نشانی نویسنده مسؤول: سبزوار، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دکتر حسین معلابی

E-mail: moallaei43@yahoo.com

وصول: ۸۷/۱/۲۷، اصلاح: ۸۷/۳/۴، پذیرش: ۸۷/۸/۶

چکیده

زمینه و هدف: قارچ‌های کراتینولیتیک از جمله قارچ‌های موجود در خاک هستند که فعالیت آنزیمی آنها باعث تجزیه مواد کراتینیزه در خاک شده و یکی از عوامل مهم بیماری‌زا محسوب می‌گردد و به منظور تعیین فعالیت آنزیمی در قارچ‌های کراتینولیتیک و بررسی اثرات شرایط اقلیمی در فعالیت آنزیمی این مطالعه صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: این تحقیق از نوع توصیفی مقطعی بوده و در سال ۲۰۰۴ میلادی بر روی ۹۰ قارچ کراتینولیتیکی که به صورت تصادفی از ایران و سایر کشورها انتخاب شده بودند، انجام گرفت. نمونه‌ها در محیط ژاپکس تغییر یافته مایع کشت داده شد. سپس فعالیت آنزیمی عصاره میسلیمی آنها با استفاده از سوبستراهای Azocasein، سوبسترای کروموزنیک سنتتیک و کراتین آزور تعیین گردید. داده‌ها با استفاده از جداول دو بعدی توصیف گردید و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس بدون تکرار یک طرفه و توکی تحت نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد که مریودنتیوم کراتینوفیلوم با $94/6 \mu\text{g/ml}$ و میکروسپوروم کوکئی با $81/6 \mu\text{g/ml}$ دارای بالاترین فعالیت آزوکازینولیتیک بوده و سوبستراهای کروموزنیک N-Suc-Ala-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA، N-Suc-Phe-Val-Arg-pNA و N-Suc-Ala-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA را به ترتیب هیدرولیز نمودند. بین روش‌های بررسی فعالیت آنزیمی اختلاف معناداری وجود دارد ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که آنزیم‌های مترشحه در این قارچ‌ها ماهیت پروتئینازی داشته و به آنزیم‌های گروه سرین پروتئینازهای سوبتیلیزین - کیموتریسین مانند تعلق دارد. (مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۵/ شماره ۳/ صص ۱۶۹-۱۷۵).

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های کراتینولیتیک؛ سرین پروتئیناز؛ آزوکازینولیتیک؛ پروتئینولیتیک.

مقدمه

مقادیر غیر قابل تصویری از ترکیبات آلی به‌ویژه ماکرومولکول‌های مقاوم کیتین و کراتین در محیط در اثر از بین رفتن موجودات در محیط به وجود می‌آیند و قارچ‌های کراتینولیتیک به علت داشتن آنزیم‌های با ماهیت کراتینولیتیک در وارد نمودن کربن، نیتروژن و گوگرد موجود در کراتین به چرخه طبیعت نقش دارند. از طرف دیگر، فعالیت آنزیمی قارچ‌های کراتینولیتیک موجب تغییرات فیزیکی و شیمیایی بافت‌های بدن و تجزیه پروتئین‌های میزبان شده و از آن‌ها به عنوان منبع غذایی استفاده می‌نمایند و محیط مناسبی را برای رشد و بقا خود به وجود می‌آورند. بنابراین، پتانسیل بیماری‌زایی قارچ‌های پاتوژن به توانایی ترشح این آنزیم‌ها بستگی دارد و در واقع، اختلاف در ویرولانسی قارچ‌ها به دلیل اختلاف در توانایی ترشح این آنزیم‌ها می‌باشد (۱). قارچ‌های کراتینولیتیک آنزیم‌های مختلفی ترشح می‌نمایند که بعضی قادر به تجزیه پروتئین‌های مانند کلاژن، الاستین و کراتین هستند و لذا می‌توانند به عنوان فاکتور ویرولانسی مطرح گردند (۲). در مطالعات گذشته فعالیت آنزیمی آنزیم تخلیص شده از درماتوفیت‌های بیماری‌زا با استفاده از پره‌های مرغ و موی خوکچه هندی به عنوان القاء کننده تراش آنزیم کراتیناز انجام شده است (۳، ۴). این تحقیق، به منظور تعیین فعالیت آنزیمی قارچ‌های کراتینولیتیکی خاکزی و درماتوفیت‌های بیماری‌زا صورت گرفت تا نقش این آنزیم‌ها در برگشت مواد معدنی به چرخه مواد در طبیعت، در تولید پروتئین از مواد کراتینیزه موجود در طبیعت و استفاده آن برای تغذیه دام‌ها، بازیافت پس ماند‌های صنعتی و نیز اهمیت آن در بیماری‌زایی و تهیه واکسن به منظور پیشگیری از بروز بیماری درماتوفیتوزیس مشخص گردید.

از آن جایی که ماهیت کراتینولیتیکی تنها محدود به درماتوفیت‌ها به‌عنوان قارچ‌های پاتوژن نمی‌شوند، لذا مطالعه فعالیت آنزیمی گونه‌های خاکزی قارچ‌های

کراتینولیتیک به منظور تعیین پتانسیل بیماری‌زا بودن آن‌ها ضروری است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق از نوع توصیفی مقطعی بوده و در سال ۲۰۰۴ میلادی بر روی ۹۰ قارچ کراتینولیتیکی که به صورت تصادفی از ایران و سایر کشورها انتخاب شده بودند، انجام گرفت. در این تحقیق که از خاک نواحی مناطق زراعی، جنگلی و مناطق زراعی دیمی ایران (۵، ۶) و نیز از نمونه‌های بالینی در آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران جدا شده بود و فعالیت آنزیمی قارچ‌های کراتینولیتیکی کلکسیون قارچ‌های آزمایشگاه انگل‌شناسی - قارچ‌شناسی بیمارستان دانشگاه آنجرس فرانسه که از خاک و نیز از نمونه‌های بالینی در مناطق مختلف دنیا جدا شده بود، مورد بررسی قرار گرفت تا قارچ‌های با فعالیت کراتینولیتیکی بالا شناسایی شده و بتوانیم از آن‌ها در بازیافت مواد از پسماندها استفاده نماییم. ابتدا قارچ‌ها در پلیت‌های حاوی Yeast Extract Pepton Dextrose Agar (YPDA) کشت داده شدند و در درجه حرارت 27°C به مدت دو هفته نگهداری شدند (برای هرگونه قارچ دو پلیت). سپس سوسپانسیون از میسلیم‌ها و اسپورهای قارچ تهیه شد و در دور 1000 g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل به فلاسک‌های 100 ml Modified Czapek-Dox liquid محیط 50 ml Medium (MCDLM) تلقیح گردید و در دمای 25°C به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. سپس به وسیله کاغذ صافی میلی‌پور با منافذی به قطر $0.45\mu\text{m}$ صاف شدند و فعالیت آنزیمی محلول صاف شده مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی فعالیت آنزیمی: توانایی آزوکازینولیتیکی

به روش محسن و همکاران (۷) تعیین گردید و از محلول ۲ درصد Azocasein (w/v) در بافر mM Tris-HCl

یافته‌ها

در این تحقیق، توزیع قارچ کراتینولیتیک به صورت زیر است: تعداد ۶۴ گونه خاکزی جدا شده از مناطق زراعی، جنگلی و مناطق زراعی دیمی ایران، ۶ گونه از نمونه‌های بالینی از افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۲۰ گونه قارچ‌های کراتینولیتیک کلکسیون قارچ‌های آزمایشگاه انگل‌شناسی - قارچ شناسی بیمارستان دانشگاهی آنجرس فرانسه که از خاک و نیز از نمونه‌های بالینی در مناطق مختلف دنیا جدا شده بود (جدول ۱) که در بین آن‌ها ترایکوفیتون و انبروزگه‌میا (۳۴ سوش)، میکروسپوروم ژپسئوم (۱۱ سوش) و آنکسیوپسیس استرکوراریا (۷ سوش) دارای بالاترین تعداد بودند. آزمون آنالیز واریانس یک طرفه بدون تکرار نشان داد که اختلاف معناداری در بین روش‌های بررسی فعالیت آنزیمی وجود دارد. همچنین آزمون توکی نشان داد که این اختلاف معنی‌دار تنها در روش ارزیابی فعالیت آنزیمی با استفاده از سوبسترای کروموژنیک N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA وجود دارد.

بررسی فعالیت آنزیمی قارچ‌های کراتینولیتیک مورد بررسی در این مطالعه نشان داد که مریودنتیوم کراتینوفیلوم با $94/7u/ml$ و میکروسپوروم کوکئی با $81/7u/ml$ دارای بالاترین فعالیت آزوکازینولیتیک بوده و سدوسپوریوم اپیسپوروم با $58u/ml$ ، ترایکوفیتون متاگروفایتس با $56/8u/ml$ ، کرایوسپوریوم کراتینوفیلوم با $37/9u/ml$ ، میکروسپوروم فولوم با $37/1u/ml$ ، آرترودرما کونیکولی با $23/95u/ml$ دارای فعالیت نسبی آزوکازینولیتیک و ترایکوفیتون و انبروزگه‌میا با $18/7u/ml$ و مالبرانشه آورانسیاسه با $14/4u/ml$ دارای فعالیت کم آزوکازینولیتیک بود و سایر قارچ‌های کراتینولیتیک در این تحقیق فعالیت آزوکازینولیتیک چندانی نداشتند.

در این مطالعه، میکروسپوروم کوکئی با $25u/ml$ و ترایکوفیتون و انبروزگه‌میا با $87u/ml$ دارای بالاترین

20به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید و هیدرولیز آن موجب تغییر رنگ محیط گردید و رنگ آزاد شده در طول موج $450nm$ به‌وسیله Titer Multiscan Spectrophotometer اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی به‌صورت u/ml بیان شد که $1u/ml$ معادل $0/01$ افزایش جذب نور می‌باشد.

ماهیت سرین پروتئینازی با استفاده از روش کریست جانسون (۸) مورد ارزیابی قرار گرفت و از سوبسترهای کروموژنیک اختصاصی N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA، N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA و N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA (pNA) استفاده شد و مقدار آزاد شده به‌صورت جذب رنگ به وسیله Titer Multiscan spectrophotometer در طول موج $405nm$ اندازه گرفته شد و فعالیت آنزیمی به‌صورت $nKat/ml$ بیان شد که $1nKat/ml$ از فعالیت آنزیم معادل رها شدن $1mol$ pNA می‌باشد و توانایی کراتینولیتیک آنزیم‌های فوق با استفاده از $5mg$ کراتین آزور به همراه $1ml$ بافر $Tris-HCl$ pH 7.5 انجام شد که رنگ آزاد شده در طول موج $595nm$ به وسیله Titer Multiscan Spectrophotometer اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیمی به‌صورت افزایش $0/01$ واحد در اثر واکنش آنزیم با کراتین آزور تعریف شده است (۴).

اثر مهارکننده phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) بر روی فعالیت آنزیمی: ابتدا محلول عصاره خام کشت را با $10ml$ از محلول $100mM$ PMSF و نیز حلال آن متانل به مدت 30 دقیقه در درجه حرارت $37^{\circ}C$ مجاور گردید و سپس توانایی آزوکازینولیتیک عصاره خام کشت به‌دست آمد.

آنالیز آماری فعالیت آنزیمی در قارچ‌ها: برای بررسی داده‌های به دست آمده از روش‌های مختلف، در بررسی فعالیت آنزیمی در قارچ‌های مختلف از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه بدون تکرار و توکی تحت نرم افزار SPSS استفاده گردید. لازم به ذکر است که تمام مواد از کمپانی سیگما خریداری شده بود.

جدول ۱: واریته های محیطی و بالینی قارچ های کراتینولیتیک به همراه منشاء و تعداد آن‌ها

ردیف	نوع قارچ	تعداد	منشاء
۱	آنکسیوپسیس استرکوراریا	۷	IR ¹ -(130, 12, 63, 77, 114), LMA ² -96.1694, LMA-70.0064
۴	آرترودرما کونیکولی	۵	IR-(92, 48, 103), IHEM ³ -4437, 14.603)
۷	آرترودرما توبر کولاتوم	۲	IHEM-(3456, 3457)
۸	کرایزوسپوریوم اولسنوتی	۲	IR-(27, 121)
۹	کرایزوسپوریوم کارمیجالی	۱	IR-27a
۱۰	کرایزوسپوریوم کراتینوفیلوم	۶	IR-(54, 52, 16, 88, 35), LMA-9470
۱۲	کرایزوسپوریوم تروپیکوم	۳	Ir-131, IHEM-(15.406, 2026)
۱۴	مالبرانشه آ اورانتیاسه	۱	IR-28
۱۵	میکروسپوروم کانیس	۱	IR-1466
۱۶	میکروسپوروم کوکتی	۱	LMA-94548
۱۷	میکروسپوروم فولوم	۲	LMA-(94736, 94737)
۱۹	میکروسپوروم نسیسوم	۱۱	IR-(7625, 154, 86, 124, 105, 171, 191, 175, 361), LMA-(5040.1101, 1380)
۲۳	مایسلیوفتورا ولرا	۱	IR-81
۲۴	مریودنتیوم کراتینوفیلوم	۳	IR-217, LMA-(96215, 9470)
۲۶	سدوسپوریوم ایسیپوروموم	۱	IR-49
۲۷	رینوسپورا فلاویسما	۱	IR-192
۲۸	ترایکوفیتون منتاگروفایتس	۲	IR-(04, 05)
۲۹	ترایکوفیتون روبروم	۲	IR-7331
۳۰	ترایکوفیتون ترستر	۲	LMA-(92.121, 9450)
۳۱	ترایکوفیتون وانبروزگهمیا	۳۴	IR-(84, 89, 142, 150, 117, 119, 45, 61, 78, 11, 94, 02, 21, 42, 17, 33, 252, 215, 115, 164, 19, 23, 149, 137, 133, 225, 189, 164, 174, 162, 245, 227, 257, 256)
۳۲	ترایکوفیتون آیلویی	۲	LMA-9459,
	جمع	۹۰	

Iran ,2- laboratory of medical Mycology Angers- France , 3- Institue of Health , Epidemiology and Mycology Brussels, Belgium

جدول ۲: فعالیت های آنزیمی قارچ های کراتینولیتیک

ردیف	گونه	تعداد سوش	سوبسترا کروموزنیک nKat/ml			کراتینولیتیک u/ml	آزوکازینولیتیک u/ml
			Arg-pNA	Leu-pNA	Phe-pNA		
۱	آنکسیوپسیس استرکوراریا	۷	۳/۳۷	۲/۷	۳/۲۸	۱	۳/۳۷
۲	آرترودرما کونیکولی	۵	۲۳/۹۵	۳/۶	۳۴/۲	۲/۶	۲۳/۹۵
۳	آرترودرما توبر کولاتوم	۲	۰	۱۱/۵	۱۵/۵	۰	۰
۴	کرایزوسپوریوم کارمیجالی	۱	۸/۶	۱	۴	۰	۸/۶
۵	کرایزوسپوریوم اولسنوتی	۲	۷/۶	۱	۱۶/۵	۲	۷/۶
۶	کرایزوسپوریوم کراتینوفیلوم	۶	۳۷/۹	۴/۵	۴/۶	۴/۸	۳۷/۹
۷	کرایزوسپوریوم تروپیکوم	۳	۴۱	۸/۳	۸/۶	۲/۶	۴۱
۸	مالبرانشه آ اورانتیاسه	۱	۱۴/۴	۳۹	۵۹	۳	۱۴/۴
۹	میکروسپوروم کانیس	۱	۰	۱۱	۸	۰	۰
۱۰	میکروسپوروم کوکتی	۱	۸۱/۶	۱۴۲	۳۳۸	۱۲۵	۸۱/۶
۱۱	میکروسپوروم فولوم	۲	۳۷/۱	۱۴	۷۴/۵	۱۰/۵	۳۷/۱
۱۲	میکروسپوروم نسیسوم	۱۱	۹/۱۸	۱۷	۴۴/۶	۱	۹/۱۸
۱۳	مایسلیوفتورا ولرا	۱	۴۰	۱۲	۴۶	۴	۴۰
۱۴	مریودنتیوم کراتینوفیلوم	۳	۹۴/۶	۵۴/۳	۱۷۲/۶	۲۰	۹۴/۶
۱۵	سدوسپوریوم ایسیپوروموم	۱	۵۸	۱۷	۷۳	۶	۵۸
۱۶	رینوسپورا فلاویسما	۱	۱۴	۱۴	۷	۲	۱۴
۱۷	ترایکوفیتون منتاگروفایتس	۲	۵۶/۸	۵/۵	۵۵	۰	۵۶/۸
۱۸	ترایکوفیتون روبروم	۲	۰	۲	۰	۰	۰
۱۹	ترایکوفیتون ترستر	۲	۱/۴	۱۷/۵	۱۲/۵	۱	۱/۴
۲۰	ترایکوفیتون وانبروزگهمیا	۳۴	۱۸/۶	۶۵	۳۴/۷۹	۸۶	۱۸/۶
۲۱	ترایکوفیتون آیلویی	۲	۱۲/۴	۵	۸	۲	۱۲/۴

کوکتی با ۳۳۸nKat/ml و مریودنتیوم کراتینوفیلوم ترایکوفیتون وانبروزگهمیا با ۷۲/۶nKat/m ،

فعالیت آنزیمی کراتینولیتیک هستند. در ارزیابی فعالیت آنزیمی با استفاده از سوبسترای کروموزنیک میکروسپوروم

جدول ۳: تأثیر PMSF بر روی فعالیت آزوکازینولیتیک آنزیم‌های مترشحه توسط قارچ‌های کراتینولیتیک

ردیف	گونه	فعالیت آزوکازینولیتیک	
		قبل از اثر PMSF U/ML	بعد از اثر PMSF U/ML
۱	آنکسیوپسیس استرکوراریا	۲۴/۴	۸/۸
۲	آرترودرما کونیکولی	۵۵/۶	۲۰/۸
۳	آرترودرما توپرکولاتوم	۵۷/۶	۲۰
۴	کرایزوسپوریوم کارمیچالی	۹/۲	۴/۱
۵	کرایزوسپوریوم اولسنوئی	۸۷/۶	۲۶/۴
۶	کرایزوسپوریوم کراتینوفیلوم	۳۶	۵/۶
۷	کرایزوسپوریوم تروپیکوم	۵	۴
۸	مالیرانشه آورانتیاسه	۶۸/۴	۹/۸
۹	میکروسپوروم کانیس	۲/۱	۰/۴
۱۰	میکروسپوروم کوکئی	۱۵/۶	۱/۲
۱۱	میکروسپوروم فولوم	۲۶/۶	۹/۶
۱۲	میکروسپوروم ژیسئوم	۴۹/۲	۱۸
۱۳	مایسلیوفتورا ولرا	۶۳/۲	۲۱/۶
۱۴	مریودنتیوم کراتینوفیلوم	۲۶۵/۶	۳۰/۴
۱۵	سدوسپوریوم ایسپوروموم	۶۶	۲۳/۲
۱۶	رینوسپورا فلاویسا	۲۷/۶	۱۰/۴
۱۷	ترایکوفیتون متاگروفایتس	۲۲	۱۶
۱۸	ترایکوفیتون روبروم	۱	۰/۴
۱۹	ترایکوفیتون ترستر	۱/۲	۰/۳
۲۰	ترایکوفیتون وانبروزگه‌میا	۶۷/۴	۵۳/۲
۲۱	ترایکوفیتون آیلویی	۱۵/۱	۳

با $17/5 \text{ nKat/ml}$ N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA را بیش از سایر سوبستراهای کروموزنیک هیدرولیز می‌نماید (جدول ۲). در خصوص تأثیر PMSF بر روی فعالیت آنزیمی آزوکازینولیتیک قارچ‌های کراتینولیتیک این مطالعه نشان داد که PMSF باعث مهار فعالیت آزوکازینولیتیک در تمام آن‌ها می‌گردد (جدول ۳).

بحث

این مطالعه نشان داد که آنزیم‌های مترشحه توسط قارچ‌های کراتینولیتیک دارای ماهیت پروتئینازی هستند و نیز N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA را که سوبسترای اختصاصی کراتیناز است، بیش از سایر سوبستراها هیدرولیز می‌نمایند که نشان‌دهنده این است که آنزیم غالب در قارچ‌های کراتینولیتیک مورد مطالعه در این مطالعه از نوع کراتیناز است. ایبوا تاکی یوشی و همکاران

میکروسپوروم فولوم با $74/5 \text{ nKat/ml}$ ، سدوسپوریوم ایسپوروموم با 73 nKat/ml ، ترایکوفیتون متاگروفایتس با 55 nKat/ml ، میکروسپوروم ژیسئوم با $44/6 \text{ nKat/ml}$ ، ترایکوفیتون وانبروزگه‌میا با $34/79 \text{ nKat/m}$ ، آرترودرما توپرکولاتوم با $15/5 \text{ nKat/ml}$ و ترایکوفیتون ترستر با $12/5 \text{ nKat/ml}$ N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA را بیش از سایر سوبستراها هیدرولیز می‌نمایند، در حالی که در آرترودرما کونیکولی با 48 u/ml ، کرایزوسپوریوم کراتینوفیلوم با $20/8 \text{ nKat/ml}$ ، ترایکوفیتون روبروم، کرایزوسپوریوم اولسنوئی و آنکسیوپسیس استرکوراریا با 7 nKat/ml ، میکروسپوروم کانیس با 6 nKat/ml ، کرایزوسپوریوم تروپیکوم با $13/6 \text{ nKat/ml}$ و کرایزوسپوریوم کارمیچالی با 13 nKat/ml N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA را بیشتر از سایر سوبستراهای کروموزنیک هیدرولیز می‌نمایند و تنها ترایکوفیتون ترستر

کراتیناز) و تا حدودی سوبسترای کروموزینیک N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA (سوبسترای اختصاصی تریپسین) و به مقدار خیلی کمتر سوبسترای کروموزینیک N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA (سوبسترای اختصاصی الاستاز) را هیدرولیز نمایند.

همچنین در این مطالعه، آرترودرما کونیکولی، کرایزوسپوریوم کراتینوفیلوم، ترایکوفیتون روبروم، کرایزوسپوریوم اولسنوئی، آنکسیوپسیس استرکوراریا، میکروسپوریوم کانیس، کرایزوسپوریوم تروپیکوم و کرایزوسپوریوم کارمیچالی N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA را بیش از سایر سوبستراهای کروموزینیک هیدرولیز می‌نمایند که شاید نشان‌دهنده غالب بودن آنزیم پروتیناز تریپسین مانند در آن‌ها است.

سرین پروتینازها دارای یک واحد آمینواسیدی سرین فعال در جایگاه کاتالیتیک خود هستند که توسط PMSF مهار می‌شود و با یافته‌های این مطالعه نیز همخوانی دارد لذا بر اساس الگوی مهارت آنزیمی و اثر سوبستراهای اختصاصی، آنزیم‌های مترشحه توسط این قارچ‌ها به گروه سرین پروتینازهای سوبتیلیزین-کیموتریپسین مانند تعلق دارند.

این تحقیق اولین تحقیق در مورد فعالیت آنزیمی قارچ‌هایی کراتینولیتیک در ایران است و چنین تحقیقی تنها در شهر تورینو در کشور ایتالیا بر روی فعالیت آنزیمی قارچ‌های کراتینولیتیک جدا شده از هوا انجام شد (۱۲) و نشان داده شده بود که گونه‌های مختلف یک گونه دارای توانایی مختلف در فعالیت آنزیمی هستند. در تحقیق حاضر هم نشان داده شد که گونه‌های مختلف قارچ‌های کراتینولیتیک مانند ترایکوفیتون وانبروزگه‌ما دارای توانایی مختلف در فعالیت آنزیمی هستند ولی شرایط جغرافیایی و اکولوژیک تأثیری بر روی ماهیت آنزیم‌های ترشح شده ندارد.

(۹) نشان دادند که برای تولید آنزیم کراتیناز باید به محیط کشت قارچ کراتین اضافه نمود که باعث القاء تولید آنزیم در قارچ گردد. همچنین بروتا و همکاران (۱۰) نیز در پروسه تخلیص آنزیم متالوپروتیناز کراتینولیتیک از میکروسپوریوم کانیس دریافتند که وقتی قارچ را در محیط کشت حاوی پپتون ولی فاقد کراتین کشت دهند، آنزیم جدا شده از آن هیچ‌گونه فعالیت کراتینولیتیکی از خود بروز نخواهد داد ولی وقتی در محیط کشت حاوی کراتین کشت داده شود، فعالیت کراتینولیتیکی بالایی در آنزیم جدا شده از آن مشاهده خواهد شد. در این مطالعه، در ارزیابی فعالیت کراتینولیتیک با استفاده از سوبسترای کراتین، آنزیم مترشحه در این قارچ‌ها با وجود ماهیت پروتینازی فعالیت کراتینولیتیک مشخصی نداشتند که دلیل آن محیطی می‌باشد که قارچ‌ها در آن‌ها رشد داده شده و فاقد کراتین بوده است. همچنین در تحقیق دیگری (۱۱) محققین دریافتند که اگر قارچ‌ها در محیطی حاوی ^{45}Cl و MgSO_4 رشد داده شود، ترشح کراتیناز خارج سلولی در آن‌ها مهار می‌گردد. بنابراین، دلیل دیگری که برای پایین بودن میزان فعالیت کراتینولیتیکی در این قارچ‌ها می‌توان ذکر نمود وجود مواد معدنی در محیط کشتی است که قارچ‌ها در آن کشت داده شده‌اند.

در این مطالعه، رابطه مثبتی بین بالا بودن توانایی هیدرولیز آزوکازین و بالا بودن توانایی هیدرولیز سوبستراهای کروموزینیک N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA و N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA و نیز رابطه منفی بین بالا بودن توانایی هیدرولیز آزوکازین و پایین بودن توانایی هیدرولیز سوبسترای کروموزینیک N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA مشاهده شد که دلیل آن این است که تمام سرین پروتینازها دارای قدرت هیدرولیز سوبسترا آزوکازین بوده و می‌توانند سوبسترای کروموزینیک N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (سوبسترای اختصاصی

References

1. Noval JJ, Nickerson WJ. Decomposition of native keratin by streptomyces fradiae. J Bacteriol. 1959; 77(3):

- 251-263.
2. Kunnert J. Physiology of Keratinophilic fungi. In: Kushawaha RKS., Guarro J, editors. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micologia Apdo. 2000.
 3. Anbup, Gopinath A, Hilda T, Lakshmi P, Annadurai G. Purification of keratinase from poultry isolate- *Scopularis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. Enzyme and microbial technology 2005; 36: 639-47.
 4. Gradisar H, Kern S, Friedrich J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. Appl Microbiol Biotechnol. 2000; 53(2): 196-200.
- ۵- معلائی حسین، زینی فریده، محمودی محمود، هاشمی جمال و پیت مارک. بررسی و شناسایی قارچ های کراتینوفیلیک در خاک زراعی-دیمی استان های خراسان رضوی و جنوبی. مجله دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، تابستان ۸۵، سال سیزدهم، شماره ۲ (پیاپی ۴۰)، صفحات ۶۴ تا ۷۳.
6. Moallaei H, Zaini F, Pihet M, Mahmoudi M, Hashemi J. Isolation of keratinophilic fungi from soil samples of forests and farm yards. Iranian J Publ Health. 2006; 35(4): 62-9.
 7. Muhsin TM, Aubaid AH. Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. Mycopathologia. 2001; 150(3): 121-5.
 8. Kristjansson MM. Activity Measurements of Proteinases Using Synthetic Substrates In: Wrolstad RE, Eric A, Decker Michael H, Penner David S, Reid Terry E, Acree Steven J, et al. (eds). Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc.2003.
 9. Takiuchi I, Higuchi D, Sei Y, Koga M. Isolation an extracellular oroteinase (keratinase) from *Microsporum canis*. Sabouraudia. 1982; 20(4): 281-8.
 10. Brouta F, Descamps F, Fett Losson B, Gerday C, Mignon B. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. Med Mycol. 2001; 39(3): 269-75.
 11. el-Naghy MA, el-Ktatny MS, Fadl-Allah EM, Nazeer WW. Degradation of chicken featherv by *Chrysosporium georgiae*. Mycopathologia. 1998; 143(2): 77-84.
 12. Filipello MV, Preve L, Tullio V. Fungi responsible for skin mycoses in Turin (Italy). Mycoses. 1996; 39(3-4): 141-50.