

خالص سازی آنزیم لاکتوپراکسیداز از شیر شتر و بررسی اثرات آن بر علیه باکتری های سودوموناس آئروجینوزا و کلستریدیوم سبتیکوم

سعید زیبایی^{۱*}، مهین بلوری مقدم^۲، حسین نوروزی مقدم^۳

۱- استادیار بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد، ایران

۲- کارشناس ارشد گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور خراسان رضوی، مشهد، ایران

۳- استادیار بخش تولید واکنس های بی هوازی، موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۲ خرداد ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۵ دی ۱۳۹۲

چکیده

لاکتوپراکسیداز آنزیمی است از خانواده اکسیدوردوکتاز که خاصیت ضد میکروبی قوی دارد. بنابراین بعنوان نگهدارنده طبیعی مواد غذایی و آرایشی بهداشتی بکار می رود. در این تحقیق آنزیم لاکتوپراکسیداز شیر شتر با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با ستون سفادکس جی ۱۰۰ و کروماتوگرافی تعویض یونی با ستون کربوکسی متیل سفادکس C-50 استخراج و خالص سازی شد. فعالیت آنزیم با استفاده از تترامتیل بنزدین و خلوص آنزیم با استفاده از روش SD-SPAG مورد بررسی قرار گرفت. از روش کشت سطحی بر روی آگار خوندار برای بدست آوردن تعداد باکتری در میلی لیتر و از رقت 10^{-6} برای انجام آزمایش استفاده گردید. بر اساس روش های آماری از ۳ گروه آزمایش و یک گروه شاهد با چهار تکرار برای هر نمونه برای هر یک از باکتری ها استفاده شد. گروه های شامل سه گروه مورد آزمایش دو گروه حاوی تیوسیانات و پراکسید هیدروژن و یک گروه واجد سیستم کامل (تیوسیانات، پراکسید هیدروژن و لاکتوپراکسیداز) و یک گروه شاهد می باشند. پس از انجام آزمایش، تعداد باکتری ها در زمان های صفر، ۶۰ و ۳۶۰ دقیقه با استفاده از از روش کشت سطحی بر روی آگار خوندار شمارش شدند. با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه نشان داده شد که بین گروه های مورد آزمایش اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0.0001$). نتایج حاکی از ۴۶ درصد کاهش رشد پس از ۳۶۰ دقیقه برای باکتری کلستریدیوم سبتیکوم می باشد. برای اساس نتایج بدست آمده لاکتوپراکسیداز استخراج شده از شیر شتر خاصیت آنتی باکتریایی موثری بر دو باکتری سودوموناس آئروجینوزا و کلستریدیوم سبتیکوم دارد.

کلمات کلیدی: لاکتوپراکسیداز، سودوموناس آئروجینوزا، کلستریدیوم سبتیکوم

*نویسنده مسئول: سعید زیبایی

آدرس: استادیار بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد، ایران. تلفن: ۰۵۱۱۸۴۱۱۰۰۹

پست الکترونیک: s.zibae@mrzi.ac.ir

مقدمه

که یک باسیل گرم منفی، هوازی و متحرک است. این باکتری فرصت طلب بوده و قادر است در برخی از شرایط بیماری مقاوم به درمان در انسان ایجاد نماید (۱۰). همچنین از باکتری کلستریدیوم سبتیکوم نیز استفاده گردید که از باکتری های گرم مثبت هاگدار و بی هوازی بوده و این باکتری علاوه بر روده حیوانات، در روده انسان و لوله تناسلی جنس ماده نیز یافت می گردد. کلستریدیوم سبتیکوم از عوامل گاز گانگرن آتروماتیک و انتروکولیت نکروتیک است. در اکثر موارد عفونت های کلستریدیوم سبتیکوم با بدخیمی، بویژه سرطان کولون همراه است (۱۱ و ۱۸).

مواد و روش کار

مواد مورد استفاده

شیر شتر از شتر تک کوهانه بوم شناخت ترکمن (استان گلستان)، مواد تترامیتیل بنزیدین (از شرکت AppliChem)، محیط های کشت باکتری، سولفات آمونیوم، پراکسید هیدروژن ۳٪، گلیسرین، دی متیل سولفوکساید، اسید کلریدریک، توئین ۸۰، تریس، گلیسین، آمونیوم پرسولفات، سدیم دودسیل سولفات، نترات نقره، کرینات سدیم، متانول از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. آلومین سرم گاو، سفادکس-سی ۵۰ (CM sephadex C-50)، سفادکس جی ۱۰۰، آکریل آمید، بیس آکریل آمید از شرکت سیگما آلدریج تهیه شدند. باکتری های مورد استفاده نیز از بخش تحقیق و تشخیص بیماری های دام و طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق تهیه گردید.

استخراج و خالص سازی آنزیم لاکتوپراکسیداز

در این تحقیق لاکتوپراکسیداز بر اساس روش تغییر یافته (۲۳) از شیر شتر بوم شناخت ترکمن استخراج

شیر شتر دارای بیواکتیوهای است که هرکدام با ارزش بوده و عملکرد بیولوژیکی خاصی دارند (۹). لاکتوپراکسیداز بیواکتیوی است با کارایی ضد میکروبی که بعنوان نگهدارنده طبیعی کاربرد زیادی دارد. لاکتوپراکسیداز پلی پپتیدی با ۶۱۲ اسید آمینه و وزن ملکولی حدوداً ۷۸ کیلو دالتون بوده که نقطه ایزوالکتریک آن برابر ۹/۶ می باشد. لاکتوپراکسیداز از آنزیم های مقاوم به حرارت است که به عنوان شاخص پاستوریزاسیون محسوب می گردد دارای یک گروه هم (آهن) و حدود ۱۰ درصد کربوهیدرات می باشد (۱۵). لاکتوپراکسیداز، تیوسیانات را در حضور پراکسید هیدروژن اکسید نموده و هیپوتیوسیانات با خاصیت ضد میکروبی قوی تولید می نماید، این ترکیب با گروه سولفیدریل (SH) پروتئین های میکروبی پیوند برقرار کرده و اثر بازدارندگی خود را بر ویروس ها، قارچ ها و باکتری ها اعمال می نماید (۱۵). مقایسه توالی اسیدهای آمینه آنزیم لاکتوپراکسیداز انسان با لاکتوپراکسیداز گاو، گاو میش، گوسفند، بز و شتر نشان داد که تشابهی حدود ۸۵ درصد وجود دارد. این در حالی است که این مقایسه در بین حیوانات به استثنای شتر نشان می دهد که بین ۹۵ تا ۹۸ درصد تشابه وجود دارد بنابراین لاکتوپراکسیداز شتر با سایر حیوانات تفاوت دارد (۲۱). در خصوص شیر شتر بررسی غیرفعال شدن لاکتوپراکسیداز شاخص بهتری برای ارزیابی فرآیند پاستوریزاسیون در مقایسه با فسفاتاز قلیایی است. این آنزیم در برخی کشورها جهت کنترل رسمی پاستوریزاسیون مورد استفاده قرار می گیرد (۴). در تحقیق حاضر به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی لاکتوپراکسیداز خالص شده از شیر شتر ایرانی بر علیه باکتری ها، از سودوموناس آئروجینوزا استفاده گردید

به کمک رسم نمودار لینیوور-برک و با استفاده از شیب و عرض از مبدا این نمودار بدست آمد.

بررسی فعالیت ضدباکتری آنزیم لاکتوپراکسیداز آماده سازی باکتری ها

بدین منظور ابتدا باکتری های سودوموناس آئروجینوزا و کلاستریدیوم سبتیکوم، ۲۴ ساعت قبل از رقت سازی و در محیط کشت (Difco Brain heart infusion broth Laboratories) و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط هوازی برای سودوموناس آئروجینوزا و در شرایط بی هوازی برای کلاستریدیوم سبتیکوم نگهداری شدند. سپس به دنبال تهیه رقت از کشت باکتریایی، به منظور تعیین تعداد باکتری تعداد کلنی های تشکیل شده (colon-forming units) بر روی آگار خوندار (Sheep Blood Agar) کشت داده شد.

بررسی فعالیت ضدباکتریایی

جهت بررسی از رقت ۶-۱۰ باکتری ها استفاده گردید. برای آزمایش لوله های حاوی باکتری به ۴ گروه مورد بررسی و یک گروه شاهد تقسیم شدند که در هر گروه چهار تکرار وجود داشت. اثر باکتری کشی هر یک از واکنش گر ها بطور جداگانه و اثر پراکسید هیدروژن و تیوسیانات باهم و نیز اثر سیستم کامل شامل (۰/۰۳ میلی مولار پراکسید هیدروژن، ۱ میلی مولار تیوسیانات و ۰/۰۲ میکرو گرم بر میلی لیتر آنزیم) با شرایط برابر بررسی گردید. پس از نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در دقایق ۰، ۶۰ و ۳۶۰ از گروه ها نمونه گرفته و جهت شمارش تعداد کلنی بر روی پلیت های حاوی آگار خوندار کشت داده شد.

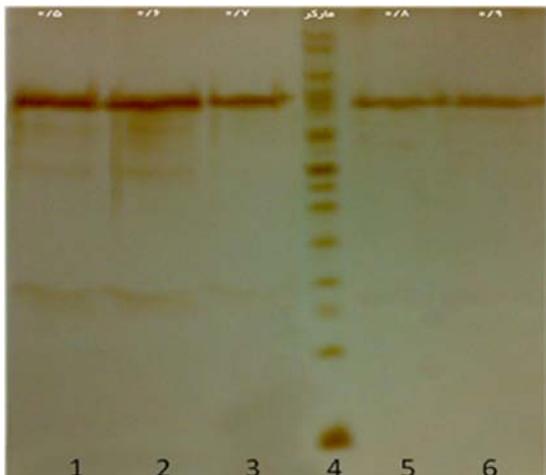
بررسی آماری

از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه برای بررسی نتایج بدست آمده استفاده گردید.

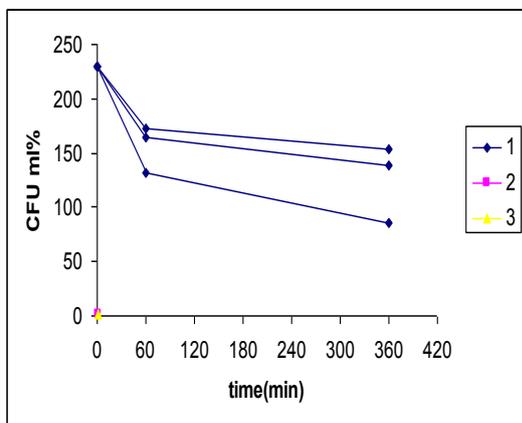
و خالص سازی گردید. بطور خلاصه پس از چربی زدایی و جدا سازی کازئین از آب پنیر و صاف کردن بمنظور کروماتوگرافی تعویض یونی از رزین سفادکس سی ۵۰ و ستونی به ابعاد (۳×۱۰ cm) و برای ژل فیلتراسیون از سفادکس جی ۱۰۰ استفاده گردید. عمل متعادل سازی با بافر فسفات سدیم ۱۰ میلی مولار با (pH=۶/۸) انجام گرفت. در کروماتوگرافی تعویض یونی جمع آوری فراکسیون های حاوی پروتئین های با شستشو توسط بافر فسفات سدیم محتوی مقادیر مختلف کلرید سدیم (۰/۲ تا ۱ مولار) انجام شد. میزان خلوص پروتئین در فراکسیون های جمع آوری شده به روش SDS-PAGE بررسی گردید. از رنگ آمیزی نترات نقره برای دیدن باند حاوی پروتئین در ژل آکریل آمید ۱۲/۵ درصد استفاده گردید. به منظور تایید وجود لاکتوپراکسیداز از در فراکسیون ها، از آزمایش واکنش رنگی لاکتوپراکسیداز با تترامتیل بنزیدین (TMB) استفاده شد.

سنجش فعالیت و بررسی سنتیک آنزیم لاکتوپراکسیداز

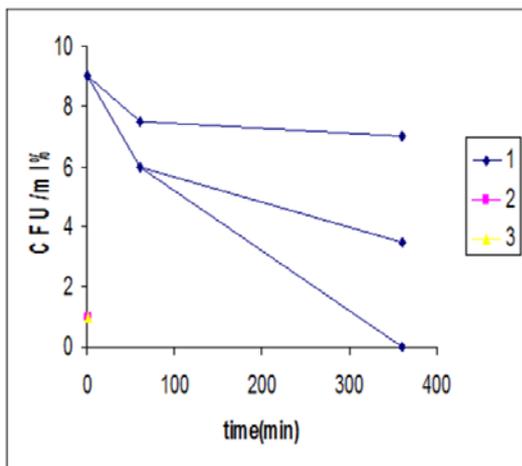
سنجش فعالیت آنزیم بر اساس روش تغییر یافته (۵) انجام گرفت. لاکتوپراکسیداز در حضور پراکسید هیدروژن با TMB واکنش رنگی نشان ایجاد می نماید. یک واحد (1.0 U) فعالیت آنزیم لاکتوپراکسیداز، مقدار آنزیمی است که اکسیداسیون $1 \mu\text{mol/min}$ از سوبسترای تترامتیل بنزیدین را در دمای 25°C و pH ۶ در محصول رنگی ($\epsilon = 59000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) کاتالیز می نماید. بمنظور محاسبه ثابت های سنتیکی آنزیم، فعالیت آنزیم لاکتوپراکسیداز در غلظت های ۰/۰۱-۲ میلی مولار TMB اندازه گیری شد و سرعت واکنش در هر مورد محاسبه گردید. ثابت های سینتیکی آنزیم



شکل ۱ - نتایج حاصل از تایید وجود لاکتوپراکسیداز در فراکسیون ها با استفاده از SDS-PAGE



نمودار ۱. نتایج حاصل از فعالیت ضدباکتری آنزیم لاکتوپراکسیداز روی باکتری سودوموناس آئروجینوزا در طی زمان های ۶۰ و ۳۶۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد



نمودار ۲. نتایج حاصل از فعالیت ضدباکتری آنزیم لاکتوپراکسیداز روی باکتری کلوستریدیوم سیتیکوم در طی زمان های ۶۰ و ۳۶۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد

نتایج

نتایج حاصل از استخراج و خالص سازی آنزیم لاکتوپراکسیداز

نتایج حاصل از SD_SPAGE و نیز واکنش رنگی با TMB، خالص بودن لاکتوپراکسیداز را در فراکسیونهای جمع آوری شده با غلظت نمکی ۰/۸ و ۰/۹ مولار نشان داد. همچنین غلظتی معادل ۰/۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر برای هر یک از فراکسیون ها بدست آمد (شکل ۱).

همچنین مقدار V_{max} و K_m برای آنزیم محلول به ترتیب $0.045 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ و $1-0.57 \text{ mM}$ برای آنزیم بدست آمد. نتایج حاصل از تعیین pH ایتیم فعالیت لاکتوپراکسیداز نشان داد که بیشترین فعالیت آن در حضور بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار pH ۶ می باشد.

نتایج حاصل از فعالیت ضدباکتری آنزیم لاکتوپراکسیداز روی باکتری سودوموناس آئروجینوزا

نتایج نشان داد که اگرچه هر یک از واکنش گرها بمیزان کمی از تعداد باکتری در زمان های متفاوت کم کردند، اما اثر سیستم کامل در کاهش باکتری پس از ۳۶۰ دقیقه معنی دار می باشد. براساس آنالیز واریانس دو طرفه اختلاف معنی داری ($P < 0.0001$) بین اثر سیستم کامل (با ۶۳ درصد کاهش در دقیقه ۳۶۰) با اثر سایر مواد شرکت کننده در واکنش جهت کاهش تعداد باکتری ها دیده شد. بنابر آنزیم لاکتوپراکسیداز استخراج شده از شیر شتر اثر ضدباکتریایی معنی داری روی سودوموناس آئروجینوزا نشان داده است (نمودار ۱).

لاکتوپراکسیداز دارای بار مثبت است، به این رزین متصل شده و در غلظت های مختلف نمکی می توان این اتصال را جدا نمود (۶). از روش تبادل یونی با استفاده از کربوکسی متیل سلولز جهت خالص سازی لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز از شیر شتر استفاده شده است. آنها نیز از گرایان های ۱-۰ مولار کلرید سدیم برای جداسازی لاکتوفرین از اتصال بین لاکتوفرین با بیدها استفاده کردند (۱۶). همچنین از کربوکسی متیل سفادکس برای خالص سازی لاکتوپراکسیداز استفاده نموده و نتایج مناسبی بدست آوردند. نتایج تحقیق حاضر با نتایج این محققین هم خوانی دارد. در این تحقیق با استفاده از سیستم لاکتوپراکسیداز طی ۶ ساعت انکوباسیون میزان تشکیل کلنی بر میلی لیتر (CFU/ml) باکتری *Sordomonas Aurogenizora* به ۳۷ درصد میزان اولیه و تشکیل کلنی بر میلی لیتر باکتری (CFU/ml) *کلاستریدیوم سپتیکوم* به صفر رسید (۲۰). خاصیت ضدباکتریایی سیستم لاکتوپراکسیداز (LPOS) *Lactoperoxidase system* روی باکتری های گرم منفی نظیر *Sordomonas* ها، کلی فرم ها، *سالمونلا* و *شیکلا* نشان داد که علاوه بر اثرات متوقف کننده رشد روی این باکتری ها با در نظر گرفتن درجه حرارت، pH، تعداد باکتری اولیه و نیز مدت زمان تاثیر به درجاتی سبب مرگ باکتری ها نیز شده است. اما برای باکتری های گرم مثبت بدلیل تفاوت در دیواره سلولی تنها توقف رشد را ایجاد می کند (۲، ۳ و ۱۳). در تحقیق حاضر و نیز مطالعه انجام شده (۱) نشان داد که اثر توقف رشد و مرگ باکتری ها هم برای باکتری های گرم مثبت نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلاستریدیوم سپتیکوم* و هم برای باکتری گرم منفی مثل *سودوموناس آئروجنینوزا* پس از ۶ ساعت اثر گذاری شده است که این اثر در مورد باکتری گرم مثبت

نتایج حاصل از فعالیت ضدباکتری آنزیم لاکتوپراکسیداز روی باکتری *کلاستریدیوم سپتیکوم*

بررسی نتایج نشان می دهد که اگر چه هریک از واکنش گرها بمیزان کمی از تعداد باکتری در زمان های متفاوت کم کردند، اما اثر سیستم کامل در کاهش باکتری پس از ۳۶۰ دقیقه معنی دار می باشد. براساس آزمون آنالیز واریانس دو طرفه اختلاف معنی داری ($P < 0/0001$) بین اثر سیستم کامل (با ۱۰۰ درصد کاهش در دقیقه ۳۶۰) با اثر سایر مواد شرکت کننده در واکنش جهت کاهش تعداد باکتری ها دیده شد. بنابراین آنزیم لاکتوپراکسیداز استخراج شده از شیر شتر اثر ضدباکتریایی معنی داری بر روی *کلاستریدیوم سپتیکوم* نشان داده است (نمودار ۲).

بحث و نتیجه گیری

لاکتوپراکسیداز آنزیمی از خانواده اکسیدوردوکتاز است که بعنوان نگهدارنده مواد غذایی و آرایشی-بهداشتی کاربرد دارد. این آنزیم بعنوان یکی از بیواکتیو های مهم شیر محسوب می گردد که خاصیت ضدباکتریایی (بخصوص برای پاتوژن هایی که از راه خوراکی سبب عفونت دستگاه گوارش می شوند) ضدویروسی، ضد قارچی، ضد انگلی و نیز اثرات آنتی-اکسیدانی و خاصیت ترمیمی برای دستگاه گوارش دارد (۱۸ و ۲۱). در این بررسی لاکتوپراکسیداز شیر شتر بوم شناخت ترکمن با روش کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از رزین کربوکسی متیل سفادکس- سی و ۵۰ و نیز کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با ستون سفادکس جی ۱۰۰ خالص گردید. گروه های کربوکسی متیل Carboxy Methyl (CM) دارای بار منفی می باشند که به پروتئین با بار مثبت متصل می شوند. از آنجا که

گزارش مشترکی که بین کارشناسان WHO و FAO که در ۲۸ نوامبر ۲۰۰۵ در رم ایتالیا ارائه شد، استفاده از سیستم LPOS بعنوان نگهدارنده شیر خام توصیه شده است (۷). همچنین استفاده از سیستم LPOS بعنوان ممانعت کننده از رشد و کاهنده پاتوژن های مواد غذایی در استاندارد استرالیا و نیوزلند مورد پذیرش قرار گرفته است (۸). از این سیستم بعنوان یک روش قابل اجراء و اقتصادی برای افزایش ماندگاری شیر در نقاطی که استفاده از سرما بلافاصله پس از شیر دوشی برای نگهداری شیر میسر نمی باشد می توان نام برد. همچنین می توان از این سیستم در ترکیب با سایر روش های ضد میکروبی غیرحرارتی نظیر استفاده از فشار هیدرواستاتیکی بالا و یا میدان الکتریکی پالسی و نیز ترکیب با سایر مواد طبیعی ضد میکروبی نظیر باکتریوسین و یا لاکتوفرین استفاده نمود (۱۷).

لذا پیشنهاد می گردد که از لاکتوپراکسیداز شیر شتر برای سایر کارهای تحقیقاتی بعنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی نظیر گوشت و مواد لبنی و نیز برای کاربرد های صنعتی دیگر (خمیر دندان ها) استفاده گردد.

منابع

۱. بلوری مقدم، م.، بهمن پور، س.، زیبایی، س.، ایزدی، م.، لعل علیزاده، س. (۱۳۹۰). جداسازی آنزیم لاکتوپراکسیداز از شیر شتر و بررسی اثرات آنی باکتریال آن بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*. نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی، دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۲۴-۱۷.

2. Bjorck, L., Rosen, V., Reiter, M. (1975). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against *Pseudomonads* and other gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 30:199-204.

بیهوازی کلستریدیوم سپتیکوم بسیار شدید بوده است. Bjorck و همکاران (۱۹۷۵) با اثر دادن سیستم لاکتوپراکسیداز روی باکتری *Pseudomonas fluorescens*، نشان داد که طی ۴ ساعت انکوباسیون، بیش از ۹۰ درصد باکتری ها از بین می روند (۲). Jacob و همکاران (۱۹۷۲) نشان دادند که ۱۰۰ درصد مایکوپلازما پنومونیه که به مدت ۳۰ دقیقه در معرض سیستم LPOS قرار گرفت، از بین رفتند (۱۴). Ihalin (۱۹۹۸) اثر سیستم LPOS را روی *Acintobacillus actinomycetemcomitans* به مدت یک ساعت در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که بیشترین درصد تشکیل کلنی بر میلی لیتر آن ۷۰ و کمترین آن ۴۰ درصد بوده است (۱۳). نوروزی مقدم و همکاران (۱۳۸۱) در تحقیقی اثر ضدباکتریایی سیستم پراکسیداز را بر دو باکتری *Bacillus subtilis* و *Aeromonas hydrophila* در مدت زمان انکوباسیون (۱۵ دقیقه) بررسی نمودند و نشان دادند که میزان تشکیل کلنی بر میلی لیتر (CFU/ml) باکتری گرم منفی تحت اثر این سیستم ۲۷ درصد و این میزان برای باکتری گرم مثبت، ۱۱ درصد بوده است (۱). Haukioja و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که سیستم LPOS روی *Helicobacter pylori* اثر دارد. بلوری مقدم و همکاران (۱۳۹۰) نشان دادند اثر سیستم لاکتوپراکسیداز بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از ۶ ساعت ۷۰ درصد بوده است یعنی پس از این مدت تنها ۳۰ درصد باکتری ها قادر بودند تشکیل کلنی دهند (۱). با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق و اینکه لاکتوپراکسیداز شتر با لاکتوپراکسیداز سایر دام ها تفاوت دارد (۲۲)، شاید تایید کننده این اعتقاد شتر داران باشد که شیر شتر را مقاوم تر از شیر سایر حیوانات می دانند. براساس

- proteolytically activated by furin. *Infection and Immunity* **65**: 4130-4.
12. Haukioja, A., Ihalin, R., Loimaranta, V., Lenander, M., Tenovuo, J. (2004). Sensitivity of *Helicobacter pylori* to an innate defence mechanism, the lactoperoxidase system, in buffer and in human whole saliva. *Journal of Medical Microbiology* **53**: 855-60.
 13. Ihallin, R., Loimaranta, V., Lumikari, M.L., Tenovuo, J. (1998). The effects of different halide substrates on peroxides mediated killing of *Acintobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontal Research* **33**: 421-7.
 14. Jacobs, A.A., Low, I.E., Paul, B.B., Strauss, R.R., Sbarra, A.J. (1972). Mycoplasmacidal activity of Peroxidase-H₂O₂-Halide systems. *Infection and Immunity* **5**: 127-31.
 15. Jacquot, M., Donato, Ph.De., Barres, O., Pons, M.N., Scher, J. Miclo, A., Poncele, D. (2002). Physicochemical characterization of the lactoperoxidase system powders: comparison of two drying techniques. *Powder Technology* **128**: 205-12.
 16. Kinkade, J.R., Kendarmiller, W. (1976). Isolation and characterization of murine lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure* **446**: 407-18.
 17. Liska, D.J., Lukaczer, N.D. (2001). Gut dysfunction and chronic disease. *Ansr-Applied Nutritional Science Reports* **558** 10/01 Rev. 3/03: 1-8.
 18. Lönnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American journal of clinical nutrition* **77**: 1537.
 19. Mandell, G.L., Douglas, R.G., Bennett, J.E. (2010). *Principles and practice of infectious diseases*. 7th Edition Churchill Livingstone: Philadelphia, PA, USA. 185-208.
 20. Pruitt, K.M., Adamson, M., Arnold, R. (1979). Lactoperoxidase binding to Streptococci. *Infection and Immunity* **25**: 304-9.
 3. Bjorck, L. (1978). Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychotrophic bacteria in milk. *Journal of Dairy Research* **1**: 109-18.
 4. Cabral, J.M.S., Kennedy, J.K. (2005). *Immobilization techniques for altering thermal stability of enzymes, thermostability of enzymes* (In Gupta, M.N., Ed.), Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 163-79.
 5. Chávarri, F., Santisbean, A., Virto, M., de Renobales, M. (1998). Alkaline phosphatase acid phosphates, lactoperoxidase, and lipoprotein lipase activities in industrial ewe's milk and cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 2926-32.
 6. Elagamy, E.I., Ruppenne, R. (1996). Purification and characterization of lactoferrin, actoperoxidase, lysozyme and Immunoglobulins from camel's milk. *International Dairy Journal* **6**: 129-45.
 7. FAO/OMS (2006). Benefits and potential risks of the Lps of raw milk preservation. Inform of the technical meeting FAO/OMS. (Monograph Series FAO, 56 pages, and on the Internet). Available from: <http://www.fao.org/ag/dairy.html>.
 8. Food Standards Australia and New Zealand (2002). Final assessment report. *Application 404*. Available at http://www.catallix.com/image/z_fsanx.pdf.
 9. Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.G. (2007). Bioactive peptides in dairy products. *Handbook of Food Products Manufacturing*. Y.H. Hui (ed). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ. 489-517.
 10. Gellatly, S.L., Hancock, R.E.W. (2013). *Pseudomonas eruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease* **67**: 159-73.
 11. Gordon, V.M., Benz, R., Fujii, K., Leppla, S.H., Tweten, R.K. (1997). *Clostridium septicum* alphatoxin is

21. Seifu, E., Buys, E.M., Donkin, E. (2005). Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology* **16**: 137.
22. Sharma, S., Kumar Singh, A., Kaushik, S., Sinha, M., Prabha Singh, R., Sharma, P., Sirohi, H., Kaur, P.P., Singh, T. (2013). Lactoperoxidase: structural insights into the function, ligand binding and inhibition. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **4**: 108-28.
23. Tenovuo, J. (2002). Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Disease* **8**: 23-9.
24. Uguz, M.T., Ozdemir, H. (2005). Purification of bovin milk lactoperoxidase and investigation of antibacterial properties at different thiocyanate mediated. *Applied Biochemistry and Microbiology* **41**: 397-41.

Archive

Purification of Lactoperoxidase Enzyme from Camel's Milk and Survey Its Antibacterial Effects against *Pseudomonas aeruginosa* and *Clostridium septicum*

Zibae, S.^{1*}, Bolori Moghaddam, M.², Nurozi Moghaddam, H.³

1- Assistant Professor, Department of Veterinary Research and Biothecnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, North East Branch, Mashhad, Iran

2- M.Sc., Department of Biochemistry, Payam-e-Noor University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Anaerobic Vaccine Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, North East Branch, Mashhad, Iran

Received date: 5 January 2014

Acceptance date: 2 June 2014

Abstract: Lactoperoxidase is an enzyme of the oxidoreductase family. Lactoperoxidase is an important antimicrobial agent. Applications of lactoperoxidase are being found as a preservative in food and cosmetics. Immobilized LPO provides several significant benefits such as, easily separated from the reaction products, reducing production costs by efficient recycling and control of the process. Camel lactoperoxidase (LPO) was purified using CM sephadex C-50 ion-exchange chromatography, and sephadex G-100 gel filtration from camel milk. The activity of LPO was measured by using TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) as a chromogenic substrate at pH6.0. Purification degree was controlled with SDS-PAGE. The number of bacteria were found by spread plate technique and used 10^{-6} dilution per ml for accomplishment of tests. According to statistical manner 3 test groups and one control group by four replications with equal conditions were formed for each bacterium. Test groups include 2 reagent groups (H_2O_2 , thiocyanate) and one group containing H_2O_2 and thiocyanate together and one complete system { H_2O_2 (0.03Mm), thiocyanate (1Mm), LPO (0.02 μ g/ml)}. The numbers of bacteria were counted at 0, 60 and 360 mints by using spread plate technique. According to two-way variance analysis, significant results were shown between the effects of complete system and other for antibacterial activity ($P < 0.0001$). The results shown 46% reduced of colony form unit for *Pseudomonas aeruginosa* and 100% reduced of colony form unit for *Clostridium septicum* after 360 Minutes. As a result, Lactoperoxidas enzyme was extracted from Camel Milk shown significantly anti-bacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and *Clostridium septicum*.

Keywords: Lactoperoxidase, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium septicum*

*Corresponding author: Zibae, S.

Address: Assistant Professor, Department of Veterinary Research and Biothecnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, North East Branch, Mashhad, Iran. Tel:

Email: s.zibae@mrazi.ac.ir