Archive of SID

تعیین غلظت موثر ضدباکتریایی سیستم لاکتوپراکسیداز بر اشریشیاکلی در شیرUHT

دکتر گیتی کریم[1] دکتر لادن منصوری نژند[2]

هدف: تعیین تأثیر مقادیر طبیعی سیستم لاکتوپراکسید از شیر بر اشریشیاکلی *(E.coli)* در شیرUHT.

طرح: مطالعه تجربی.

روش: غلظتهای مختلف باکتریایی اشریشیاکلی (10^1-10^3-10^5-10^7 cfu/ml) تهیه و به شیرUHT که قبلاً سیستم لاکتوپراکسیداز در آن فعال شده بود تلقیح گردید. برای فعال کردن سیستمLP در شیر استریلیزه از دو غلظت مختلف آنزیم لاکتوپراکسیداز یعنی ۱۰ و ۳۰ ppm که مقادیر طبیعی این آنزیم در شیر گاو است استفاده شد و آنزیم به همراه ۰/۲۵ میلی مول تیوسیانات و ۰/۲۵ میلی مول آب اکسیژنه برای هر یک از غلظتهای باکتریایی فوق الذکر به شیر اضافه گردید. شیرهای تلقیح شده در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و در زمانهای صفر، روز اول، روز دوم، روز هفتم و چهاردهم شمارش باکتری انجام گرفت. به همراه هر یک از آزمونها یک نمونه شاهد (تلقیح شده با میکروارگانیسم و بدون افزودن LPS) در نظر گرفته شد. برای هر آزمون (نمونه وشاهد) دو تکرار انجام گردید.

نتیجه گیری: در پایان باتوجه به مشاهدات و اطلاعات به دست آمده مشخص گردید که به طور کلی سیستم لاکتوپراکسیداز فعال شده در شیر اثر قابل توجهی بر سویه$O_{111}:B_4$ندارد و این سویه از میکروارگانیسم در مقابلLPSمقاوم است.

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۲، ۸۱-۷۷.

واژه های کلیدی: سیستم لاکتوپراکسیداز، اشریشیاکلی، شیرUHT.

Assessment of effective concentration of lacto peroxidase system on *E.coli* in UHT milk

Karim, G.,[1] Mansourinajand, L.[2]

[1]Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. [2]Graduated from The Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

Objective: To assess the effect of natural concentrations of LPS in cow's milk on *E.coli* $O_{111}:B_4$ in UHT milk.

Design: Experimental study.

Procedure: Different concentrations of *E.coli* (10^1-10^3-10^7 cfu/ml) were inoculated into the UHT milk which contained active LPS to study the effect of the system on the microorganism. Two concentrations of LP (10 and 30 ppm) which are the naturally accured of this enzyme in raw milk were prepared and added to the UHT milk together with each of the microorganism concentrations mentioned above with 0.25 mM of thiocy,anate and 0.25 mM of hydrogen peroxide, control was prepared using UHT milk with 10^8 cfu/ml of microorganism. All the samples and control were stored at 4°C and 25°C and tested at 0, 1,2,7 and 14 days intervals. For each sample and control two repetation were considered.

Statistical analysis: Two ways analysis of variance.

Results: The micro organism in the samples showed the same growth trendes as in the controls. The data obtained in this study, shows that the LPS has no considerable antibacterial effect on *E.coli* $O_{111}:B_4$. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 2: 77-81, 2002.***

Key words: Lactoperoxidase system, *E.coli*, UHT milk.

در بسیاری از کشورهای در حال توسعه و از جمله کشور ما به دلایل اقتصادی و کمبود انرژی، نبود تجهیزات کافی و... مشکلات زیادی در زمینه سرد کردن و نگهداری شیرخام پس از دوشیدن و در زمان حمل آن از دامداریهای کوچک به مراکز تولید و کارخانجات لبنیات سازی وجود دارد. بدین ترتیب کیفیت بهداشتی مقادیر قابل ملاحظه ای از شیرهای خام قبل از رسیدن به کارخانه کاهش یافته و حتی گاهی فاسد و غیرقابل مصرف می گردد (۱). امروزه با توجه به توصیه استفاده از سیستم LP در شیر خام توسط فدراسیون بین المللی شیر(IDF) در بسیاری از کشورهای جهان از جمله کنیا و هندوستان از این سیستم به منظور نگهداری بیشتر شیر به طور وسیع استفاده می شود (۲،۱۴،۲۲).

سیستم لاکتوپراکسیداز یک سیستم ضدمیکروبی طبیعی در شیر است که طول مدت نگهداری شیرخام و فرآورده های آن را افزایش می دهد (۲۶). علاوه بر شیر در پنیر (۲۵، ۸، ۶) و مواد غذایی دیگر مانند ماهی سالمون دودی کاربرد فراوان دارد. این سیستم را در شیر اصطلاحاً استریلیزاسیون سرد می نامند (۶،۱۳). آنزیم لاکتوپراکسیداز اکسیداسیون تیوسیانات توسط هیدروژن پراکسید را کاتالیز می کند و ترکیبات اکسیدکننده حد واسط با طول عمر کوتاه مانند OSCN و اکسی اسید تیوسیانات تولید می شود که اثرات ضدمیکروبی دارند (۱،۵،۹،۱۶،۲۱). محصول اصلی اکسید کننده هیپوتیوسیانات است که در pH طبیعی شیر پایدار بوده و فعالیت آنزیمهای مختلف را مهار می کند (۱۷، ۵).

اکسیداسیون گروه تیول در آنزیمها و سایر پروتئینها عامل اصلی در نقش ضدمیکروبی سیستم لاکتوپراکسیداز است و موجب اختلال در ساختمان غشای سلولی میکروارگانیسم شده و بافت نشت یون پتاسیم، اسیدهای آمینه و پلی پپتیدها به خارج سلول گردیده، همچنین جذب گلوکز، پورین ها، پیریمیدین ها و اسیدهای آمینه را مختل و ساخت پروتئینها، DNA و RNA را متوقف می کند (۲۳، ۲۰).

در این مطالعه باتوجه به اثر ضدمیکروبی سیستمLP، باکتری اشریشیاکلی سویه$O_{111}:B_4$ به عنوان میکروارگانیسم موردمطالعه درنظر گرفته شد تا تاثیر غلظت مناسب سیستم بر آن تعیین شود. سویه O_{111} در رده باکتریهای بیماریزای روده ای قرار داشته و در موارد متعدد از شیر و فرآورده های آن جدا شده است (۲۴). در سال ۱۹۹۰ در یوگسلاوی میزان ۳۴/۳ درصد از سویه های بیماریزای روده ای جدا شده از پنیرهای خامه ای سویه O_{111} بوده است (۱۸). در مصر نیز سویه های متعدد بیماریزای روده ای اشریشیاکلی از شیر جدا شده است (۱۹، ۳). در فرانسه یک مورد شیوع مسمومیت غذایی با سویه O_{111} گزارش گردیده است (۷). علاوه بر آن این میکروارگانیسم عامل ایجاد بادکردگی در پنیرهای بسته بندی شده نیز می باشد (۱۶). باتوجه به این که میکروارگانیسم انتخاب شده هم دارای ویژگی بیماریزایی و هم عامل فساد در پنیر می باشد لذا تأثیر سیستمLP بر روی آن مورد مطالعه قرار داده شد.

۱) گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش کار

در این مطالعه از شیر استریلیزه UHT به عنوان محیط کشت طبیعی و عاری از میکروبهای رقیب استفاده شده است. با این فرضیه که سیستم LP می تواند اثر کشندگی و مهارکنندگی روی میکروارگانیسم مورد مطالعه داشته باشد. در شیر استریلیزه سیستم لاکتوپراکسیداز غیرفعال است زیرا آنزیم در دمای فرآیند شیر (۱۵۰-۱۳۰ درجه سانتیگراد) به مدت چند ثانیه از بین می رود پس جهت فعال کردن سیستم باید اجزاء سیستم را به آن اضافه می کردیم.

مواد مورد استفاده: میکروب لیوفیلیزه *E.coli* $O_{111}:B_4$ که از مؤسسه تحقیقاتی رازی تهیه گردید (RITCC 1176). آنزیم لاکتوپراکسیداز Horse Radish Lactoperxidase (EC 1.11.1.17) Sigma. تیوسیانات پتاسیم (Merck شماره ۵۱۲۴)، هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد (Merck شماره ۸۲۲۲۸۷)، محیط کشت Violet Red Bile Dextrose Agar (Merck) (VRBA)، محیط کشت Brain Heart Infusion Broth (Merck) (BHI).

وسایل مورد نیاز: اسپکتروفتومتر، پی پتوراتوماتیک، سمپلرهای اپندورف (Ependorf Samplers)، فیلترهای میلی پور ۰/۴۵ میکرون، سایر وسایل متعارف آزمایشگاه میکروب شناسی.

روش کار: آنزیم لاکتوپراکسیداز در دو رقت (۱۰ ppm) و (۳۰ppm) تهیه گردید. مقدار ۱/۲۱ گرم از تیوسیانات پتاسیم را به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسانیده و ۰/۱ میلی لیتر از آن را به ۱۰ میلی لیتر شیر اضافه نمودیم تا غلظت ۰/۲۵ میلی مول به دست آید. ۱/۴۱ میلی لیتر از آب اکسیژنه را به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسانیده و ۰/۱ میلی لیتر از آن را به ۱۰ میلی لیتر شیر اضافه نمودیم تا غلظت ۰/۲۵ میلی مول آب اکسیژنه به دست آید. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب نور توسط مقدار معین میکروب در محیط مایع و شفاف BHI مشخص گردید. همزمان با اندازه گیری جذب نور پس از تهیه رقتهای متوالی شمارش میکروبی نیز انجام شد. برای مثال زمانی که میزان جذب نور ۱/۹ بوده است تعداد میکروب بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۵ درجه سانتیگراد برابر $۱/۲\times۱۰^{۹}$ CFU/ml بود.

این آزمایش حداقل ۱۰ بار تکرار شد تا میزان جذب نور و برابری آن با تعداد میکروارگانیسم معین به دست آمد و مشخص شد که اگر مقدار یک میلی لیتر از کشت میکروبی ۱۸ ساعته را به محیط BHI منتقل کرده و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۱۸ ساعت نگهداریم در صورتی که پس از این زمان میزان جذب نور ۱/۹ باشد تعداد میکروارگانیسم موجود $۱۰^{۹}$CFU/ml خواهد بود. از محیط کشت مایع BHI حاوی $۱۰^{۹}$CFU/ml، مقدار یک میلی لیتر را به لوله در پیچدار حاوی ۹ میلی لیتر محلول رقیق کننده آب پپتونه نمکدار منتقل کردیم به این ترتیب تعداد $۱۰^{۸}$ میکروارگانیسم به دست آمد. سپس یک میلی لیتر از این رقت را به ۹ میلی لیتر شیر حاوی سیستم لاکتوپرکسیداز فعال شده اضافه نمودیم و رقت $۱۰^{۷}$ به دست آمد و به همین ترتیب رقتهای بعدی تهیه گردید.

به لوله درپیچدار حاوی ۱۰ میلی لیتر شیر مقدار یک میلی لیتر آنزیم لاکتوپراکسیداز را با رقت معین اضافه نمودیم سپس ۰/۱ میلی لیتر از تیوسیانات رقیق شده (۰/۲۵ میلی مول) را اضافه کردیم (تیوسیانات و آنزیم لاکتوپراکسیداز قبل از مصرف توسط فیلترهای میلی پور ۰/۴۵ میکرن استریل می شدند). ۰/۱ میلی لیتر از آب اکسیژنه رقیق شده به محلول فوق اضافه شد (آب اکسیژنه بایستی تازه تهیه شود) که غلظت آن هم ۰/۲۵ میلی مول در ۱۰CC شیر بود. قبل از تلقیح میکروب ۹ میلی لیتر از این محلول را به لوله درپیچدار خالی و استریل منتقل کرده سپس به سرعت یک میلی لیتر از غلظت $۱۰^{۸}$CFU/ml میکروارگانیسم را به ۹ میلی لیتر شیر اضافه کردیم تا غلظت $۱۰^{۷}$CFU/ml به دست آید و به همین ترتیب غلظتهای بعدی تعیین گردید.

در زمان صفر پس از تهیه رقتهای متوالی تا ۸ لوله از نمونه بالا شمارش میکروبی انجام گردید. برای مقایسه عمل سیستم لاکتوپراکسیداز با شاهد لازم بود که شاهد هم تهیه شود. شاهد شامل ۹ میلی لیتر شیر و یک میلی لیتر از رقت $۱۰^{۸}$ میکروارگانیسم بود. از شاهد نیز در زمان صفر پس از تهیه رقت کشت دادیم. از هر لوله رقت در دو پلیت به روش Doublicate plating کشت داده شد. روش کشت، سطحی و محیط کشت VRBA بود. دمای نگهداری پلیت ها در گرمخانه۳۵ درجه سانتیگراد و شمارش در زمانهای صفر، روز اول، روز دوم، روز هفتم و روز چهاردهم انجام گردید. در کل چهار گروه آزمون مورد آزمایش قرار گرفت که هر کدام دارای یک شاهد و یک تکرار بودند.

نتایج

در تصویر ۱ دو گروه یک و دو نشان داده شده است. گروه یک در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و گروه دو در دمای ۴ درجه سانتیگراد با مقدار ۱۰ppm آنزیم می باشد. در تلقیح $۱۰^{۷}$CFU/ml میکروارگانیسم به نمونه (10^{7}FU/ml+PS) و شاهد حاوی $۱۰^{۹}$CFU/ml هر دو هم زمان و تواماً افزایش میکروارگانیسم مشاهده گردید. و این نشان می دهد که سیستم LP هیچ گونه اثری روی *E.coli* نداشته است. در دمای ۴ درجه سانتیگراد نیز نمونه و شاهد با اختلاف کمی افزایش میکروارگانیسم را نشان می دهند که نشان دهنده عدم تأثیر LPS بر این میکروب در این دما نیز می باشد.

تصویر ۲ گروه یک و دو را نشان می دهد، در تلقیح $۱۰^{۵}$CFU/ml و مقدار ۱۰ ppm آنزیم، که در این آزمون نیز میکروارگانیسم در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۲۵ درجه سانتیگراد در نمونه و شاهد همراه با یکدیگر افزایش یافته و در نتیجه بی تأثیربودن سیستم LP را روی *E.coli* نشان می دهد. تصاویر ۳ و ۴ گروه یک و دو را در تلقیح $۱۰^{۳}$CFU/ml و $۱۰^{۱}$ نشان می دهد که منحنی شاهد و نمونه به طور همزمان افزایش داشته اند.

در هر دو دمای مورد مطالعه سیستم لاکتوپراکسیداز (LPS) بر روی *E.coli* بی تأثیر بوده است. تصاویر ۵ و ۶ گروه ۳ و ۴ را نشان می دهد در تلقیح $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۵}$ نتایج مشابه فوق بوده است و تصاویر ۷ و ۸ که گروه ۳ و ۴ را در تلقیح $۱۰^{۳}$ و $۱۰^{۱}$ نشان می دهد نیز بی تاثیر بودن سیستم لاکتوپراکسیداز روی میکروارگانسیم مشاهده می شود. پس به طور کلی نتیجه می گیریم که این سیستم بر روی میکروب بی تاثیر می باشد.

بحث

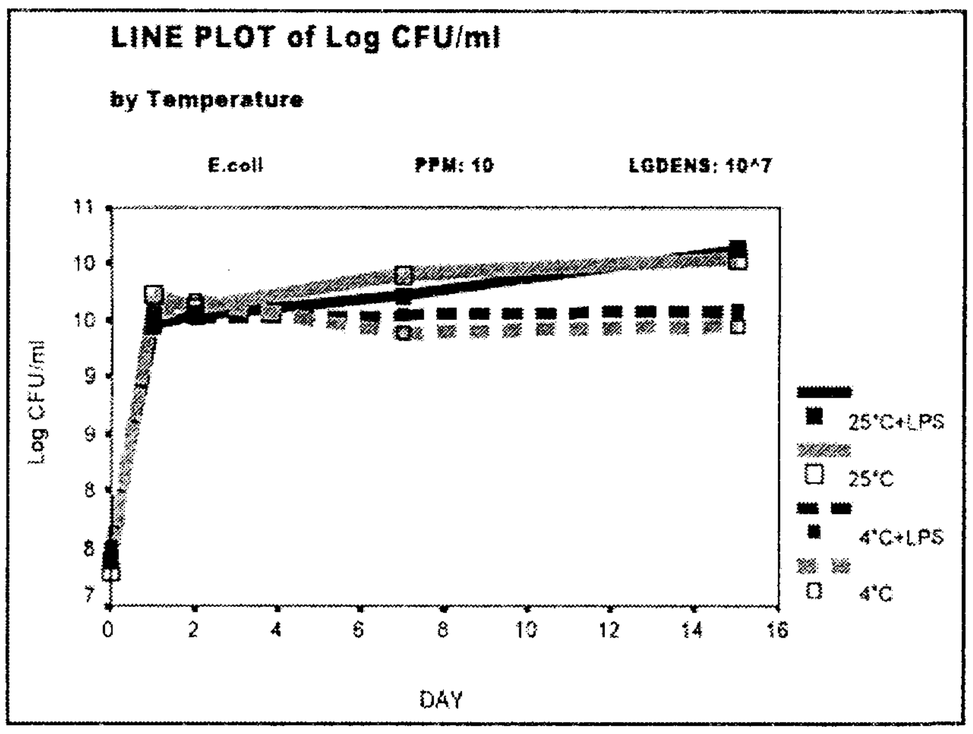
مطالعات اخیر نشان داده است که شیر و فرآورده های آن به دفعات باعث انتقال بیماریزاهایی مانند اشریشیاکلی بیماریزای روده ای و سایر پاتوژنهای روده ای به انسان شده اند (۲). نتایج متغیر و متفاوتی در ارتباط با اثر سیستم لاکتوپراکسیداز روی *E.coli* گزارش شده است.

در یک مطالعه مشاهده گردید که *E.coli* در حضور آنیون هیپوتیوسیانات از بین می رود (سویه مورد آزمایش *E.coli* NCTC 9703) بوده است (۱۷).

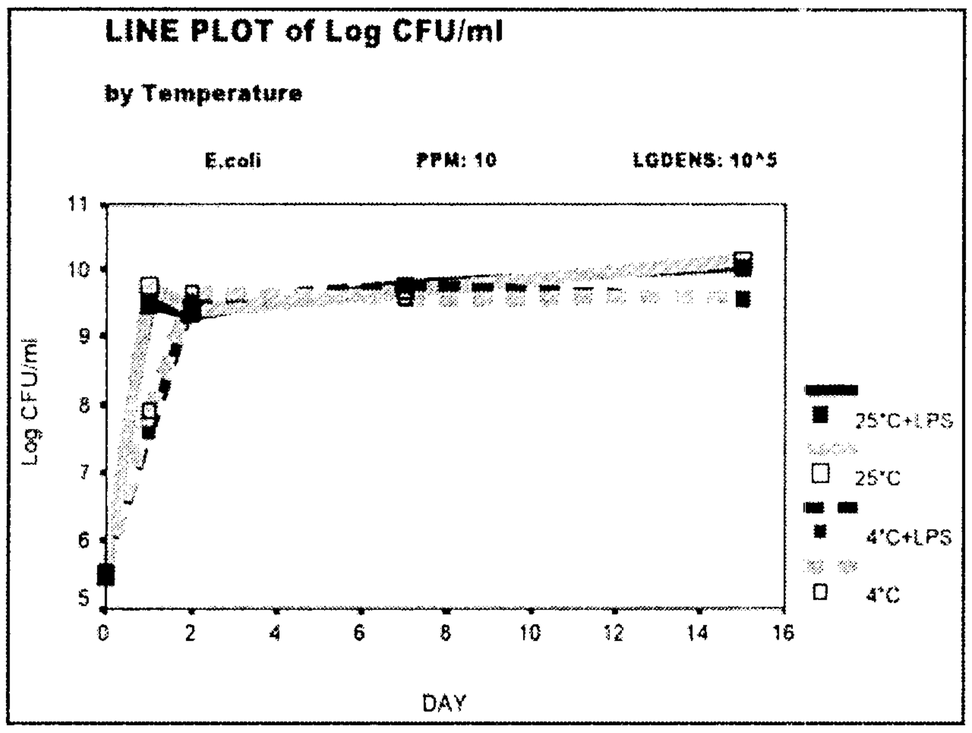
در تحقیقی دیگر افزودن اجزای سیستم لاکتوپراکسیداز و فعال کردن آن در شیر استریلیزه موجب کاهش تعداد *E.coli* 0175: H7 شده است

www.SID.ir

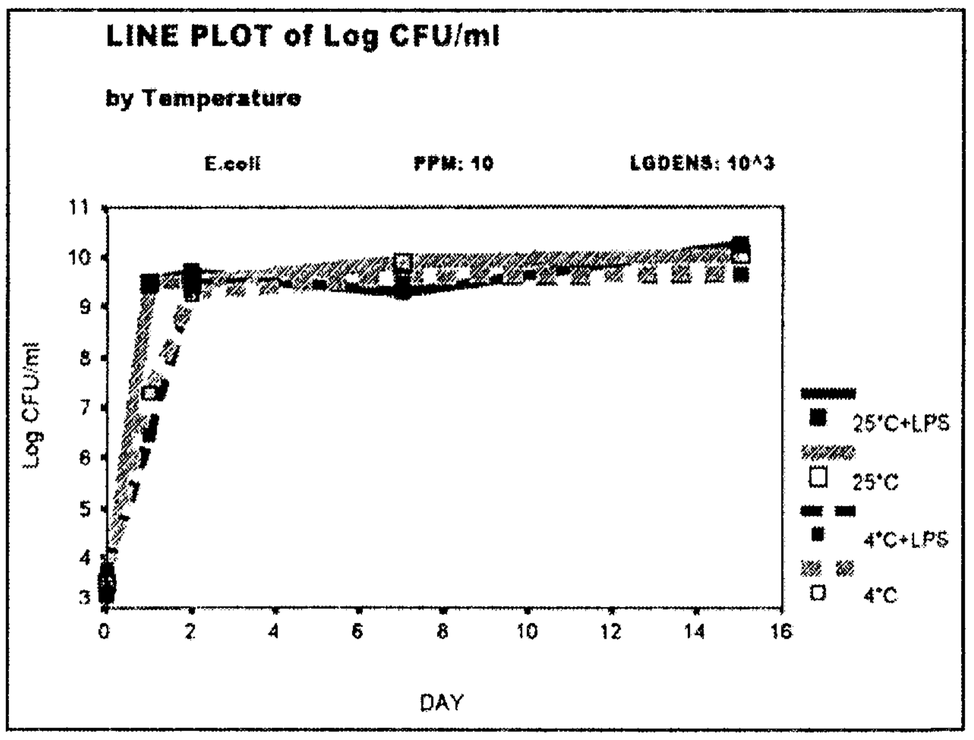
Archive of SID



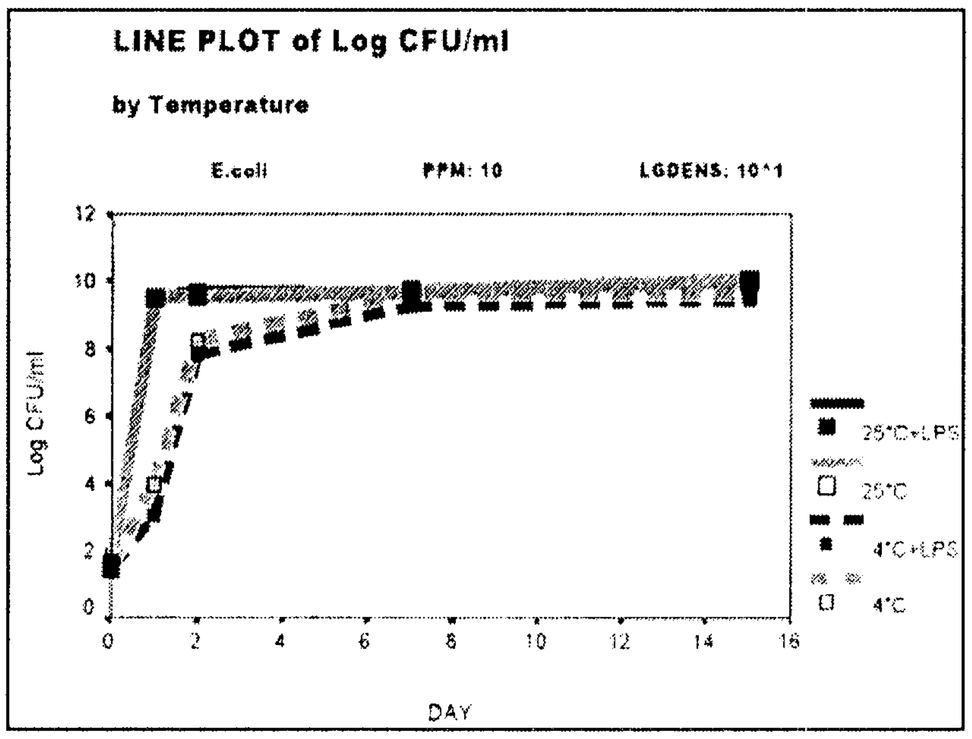
تصویر۱ - تأثیر سیستمLPS(غلظت آنزیم۱۰pmm) بر میکروارگانیسم (10^7cfu/ml) در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتیگراد در نمونه و شاهد.



تصویر۲ - تأثیر سیستمLPS(غلظت آنزیم۱۰pmm) بر میکروارگانیسم (10^5cfu/ml) در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتیگراد در نمونه و شاهد.



تصویر۳ - تأثیر سیستمLPS (غلظت آنزیم۱۰pmm) بر میکروارگانیسم (10^3cfu/ml) در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتیگراد در نمونه و شاهد.



تصویر۴ - تأثیر سیستمLPS (غلظت آنزیم۱۰pmm) بر میکروارگانیسم (10^1cfu/ml) در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتیگراد در نمونه و شاهد.

به طوری که در دمای ۱۵ و ۱۷ درجه سانتیگراد (دمای نگهداری) تعداد میکروارگانیسم به اندازه ۲ واحد لگاریتم کاهش یافته است در حالی که در همین مطالعه بدون فعال کردن سیستم در شیر خام که به طور طبیعی سیستم لاکتوپراکسیداز در آن وجود دارد میکروارگانیسم به خوبی رشد نشان داده است (۵).

Bjorck و همکاران در سال ۱۹۸۰ مشاهده نمودند که سیستم لاکتوپراکسیداز باعث مهار قابل برگشت بر روی بسیاری از باکتریهای گرم مثبت و مهار غیرقابل برگشت یا اثر باکتری کشی روی باکتریهای گرم منفی مثل اشریشیاکلی می شود (۴). در بررسی دیگری فعال کردن سیستم لاکتوپراکسیداز باعث مهار رشد استافیلوکوک و اشریشیاکلی گردید و کاهش به اندازه ۲ واحد لگاریتم روی *E.coli* مشاهده شد (۱۵). در مطالعه ای که توسطFarragو همکاران در سال ۱۹۹۲ انجام شد دیده شد که سیستم لاکتوپراکسیداز روی *E.coli* 0175: H^7 هم اثر کشنده باکتری و هم توقف رشد دارد. زمانی که تعداد میکروارگانیسم 10^4 CFU/ml بود، باکتری کاملا غیرفعال شده و زمانی که تعداد 10^8 CFU/ml بود توقف رشد باکتری ایجاد شده است (۱۱).

سیستم لاکتوپراکسیداز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد (دمای محیط) که شرایط مطلوب تکثیر و تزاید سلولها می باشد خیلی فعالتر از زمانی است که سلولها در حالت استراحت (دمای ۴ درجه سانتیگراد) می باشند (۱۱).

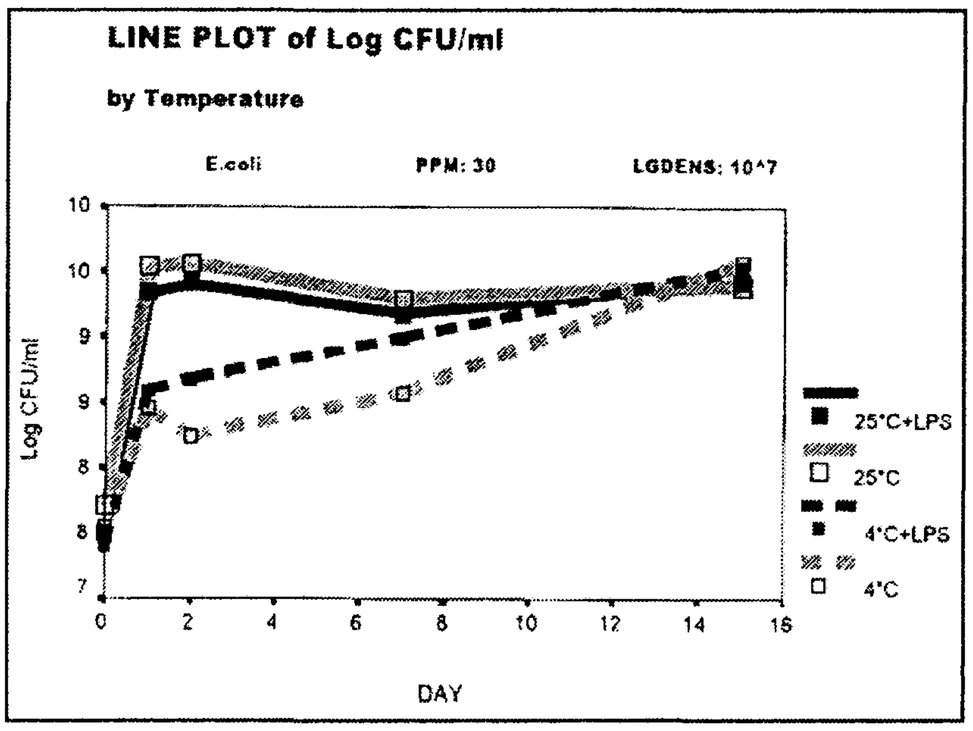
زمانی که pH کم می شود اثر کشندگی سیستم لاکتوپراکسیداز افزایش می یابد و این امر مشخص می کند که چرا اثر سیستم لاکتوپراکسیداز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد سریعتر است (۱۱). اثر باکتری کشی سیستم لاکتوپراکسیداز بر علیه سویه های مختلف *E.coli* قبلاً نیز گزارش شده است (۴،۱۱).سیستم لاکتوپراکسیداز در همه موارد اثر کشندگی برروی اشریشیاکلی *E.coli* سویه CRA646 و سالمونلاتیفی موریوم *(S.typhimurim)* داشته است (۹).

در مطالعه دیگری دیده شده که سیستم لاکتوپراکسیداز شروع مرحله رشد لگاریتمی*E.coli* را در شیر خشک اطفال به تأخیرمی اندازد (۱۰). در یک بررسی *E.coli* در شیر خام و در دمای ۴ درجه سانتیگراد رشد نکرد و اثر سیستم لاکتوپراکسیداز فعال شده در این دما روی شمارش *E.coli* بسیار ناچیز و جزیی بوده است (۲۷). در حالی که در دمای ۸ درجه سانتیگراد شاهد دارای رشد میکروبی ولی بدون یک فاز لگاریتمی مشخص بود ولی در همین دما با سیستم فعال شدهLP بعد از دو روزرشد میکروارگانیسم مشاهد گردید که نشان دهنده بی اثر بودن سیستم بر میکروارگانیسم می باشد (۲۷).

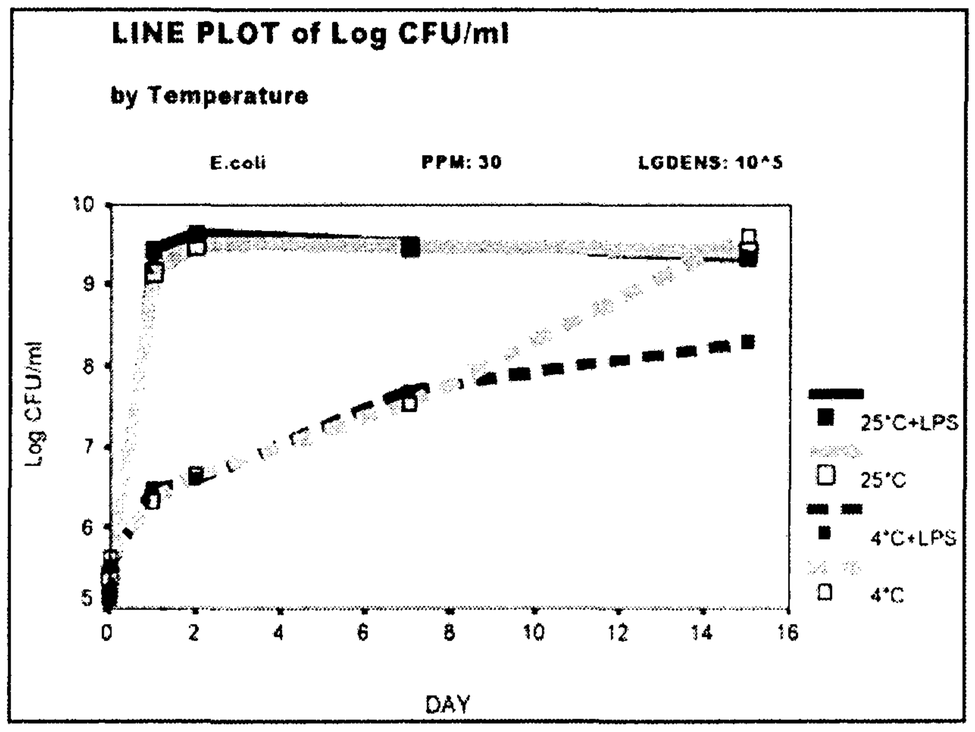
Denis و همکاران در سال ۱۹۹۷ در یک بررسی اثر سیستم لاکتوپراکسیداز بر روی چندین میکروارگانیسم مختلف را مطالعه نموده و به این نتیجه رسیدند که سیستم لاکتوپراکسیداز هیچ اثری روی *E.coli* ندارد (۸). این

www.SID.ir

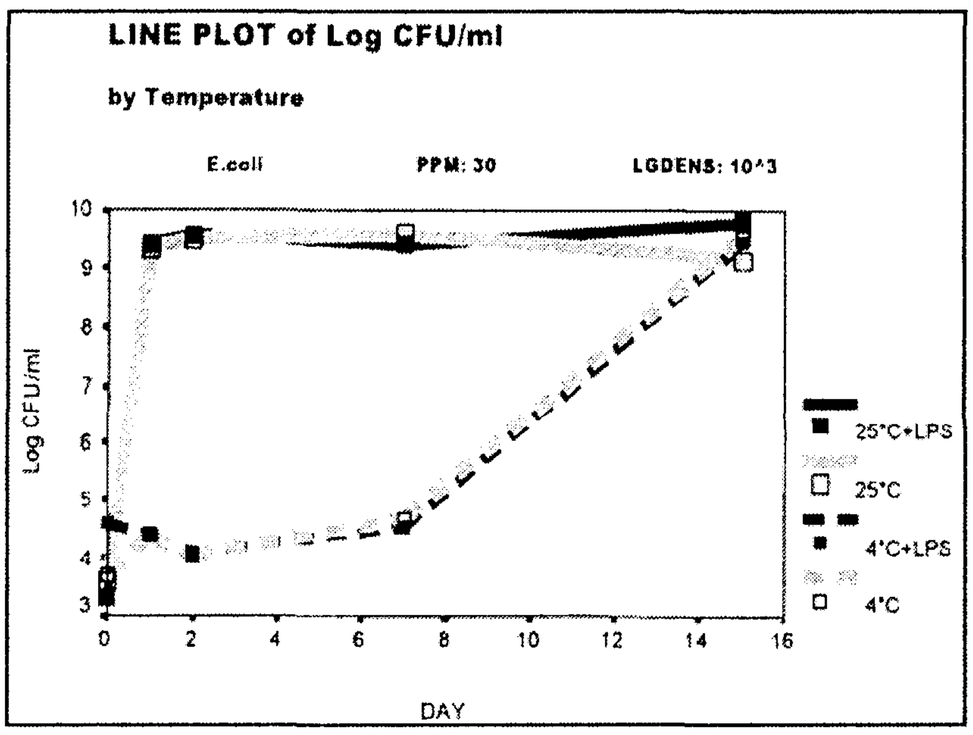
Archive of SID



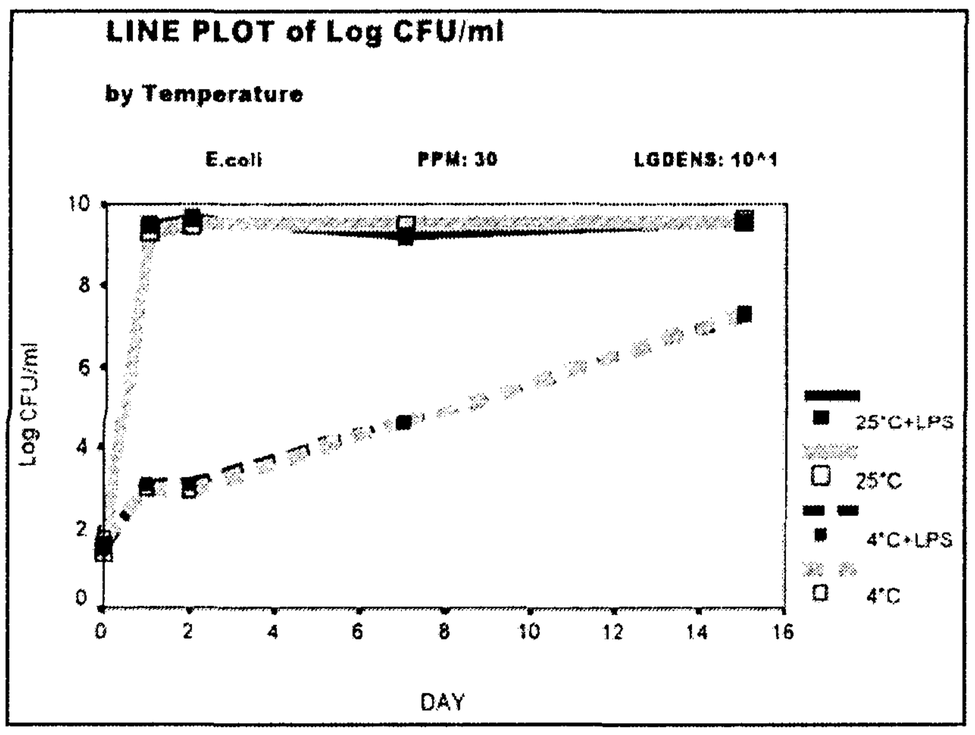
تصویر۵ - تأثیر سیستمLPS(غلظت آنزیم۳۰pmm) بر میکروارگانیسم (۱۰^۷cfu/ml) در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتیگراد در نمونه و شاهد.



تصویر۶ - تأثیر سیستمLPS(غلظت آنزیم۳۰pmm) بر میکروارگانیسم (۱۰^۵cfu/ml) در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتیگراد در نمونه و شاهد.



تصویر۷ - تأثیر سیستمLPS(غلظت آنزیم۳۰pmm) بر میکروارگانیسم (۱۰^۳cfu/ml) در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتیگراد در نمونه و شاهد.



تصویر۸ - تأثیر سیستمLPS(غلظت آنزیم۱۰pmm) بر میکروارگانیسم (۳۰^۱cfu/ml) در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتیگراد در نمونه و شاهد.

سه مطالعه اخیر با نتیجه ای که در این بررسی گرفته شده همخوانی دارد.

اثر ضدمیکروبی سیستم LP برعلیه فلور طبیعی و مخلوط شیر و بویژه باکتریهای گرم مثبت به صورت توقف رشد است. اثر این سیستم با مطالعات انجام شده بر روی باکتریهای گرم منفی مثل پسودوموناس(Pesudomonas) و اشریشیاکلی یک اثر باکتری کشی می باشد (۱۲). باتوجه به این که گزارشی از اثر سیستم LP بر B_4:O_{111} *E.coli* در دست نیست در این پژوهش مشاهده گردید که سیستم LP هیچ گونه اثر قابل توجه ای روی سویه مورد مطالعه ندارد و مطالعه حاضر با سه پژوهش فوق الذکر همخوانی دارد لذا تصور می رود که اثرات ضد میکروبی سیستم LP وابسته به گونه و سویه میکروارگانیسم است.

تشکر و قدردانی

این طرح با پشتیبانی مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام گرفته است. مجری طرح وظیفه خود می داند که از کمکهای حوزه محترم معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده دامپزشکی سپاسگزاری نماید. از راهنماییهای علمی آقای دکتر ودود رضویلر در این مطالعه بهره زیاد بردیم که بدین وسیله تشکر و قدردانی می گردد. همچنین از همکاری صمیمانه آقای نوروزی کارشناس گروه بهداشت مواد غذایی متشکریم.

References

۱. نیکوپور، ه، اعتمادی، ف. و پیشوایزدی، م. (۱۳۷۴): نگهداری شیر خام با روش فعال کردن سیستم لاکتوپراکسیداز، مجله پژوهش و سازندگی، صفحه: ۱۳۹ـ۱۳۸.

2. Abbar, F. M. (1988): Incidence of fecal coliform and serovars of enteropathogenic Escherichlia coli in naturally contaminated cheese. Journal of Food Protection. 51, 5: 384-385.
3. Ahmed, A. H., Ahmed and Moustafa, K. (1987): Occurrence of feceal coliforms and enteropathogenic Escherichia coli (EEC) in Egyptian soft cheese. Journal of Food Protection 51, 6: 442-444.
4. Bjorck, L. and Claesson, O. (1980): Correlation between concentration of hypothicyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against Escherichia coli. Journal of Dairy Science. 63: 919-922.
5. Bleumink, B., Rijkeli, B., Meikete, G. and Enne de, B. (1997): The effect of the lactoperoxidase system on E. coli 0157: H7 in raw milk. Proceeding, world congress on food hygiene, the Hague, the Netherlands.

www.SID.ir

Archive of SID

6. Boussouel, N., A. F., Bastein, A. M., Revol Junelles, J. P., Ramet, I. B. Milliere (1997): Antibacterial activity of the lactoperxidase system (LPS) with different halogens. Proceeding, world congress on food hygiene, the Hague, the Netherlands.

7. Campos, LC., Whittam, TS., Gomes, TAT., Aadrade, TRC. and Trabulsi, IR.(1994): Escherichia coli serogroup O: 111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulrnce properties. Infection and Immunity. 62, 8: 3282-3288.

8. Denis, F. and Paul, R. (1989): Antibacterial activity of the lactoperoxidas system on listeria monosytogen in tryptiase soy broth, UHT milk and French soft cheese. Jouranl of Food Protection 57, 10: 706-711.

9. Earnshaw, R. G., Banks, J. G., Dominque, D. and Franccorte, C. (1989): The perservation of cottage cheese by an activated lactopeoxidase system. Food Microbiology. 6: 285-288.

10. Earnshaw, R., Banks, G., Francotte, C. and Dominique, D. (1990): Inhibition of *Salmoella typhimurium* and Escherichia coli in infant milk formula by an activiated lactoperoxidase system. Journal of Food Protection. 53, 2: 170-172.

11. Farrag, S. A., Gazzar, F.E.E. I. and Marth, F. H. (1992): Use of the lactopeoxidase system to inactive E.coli 0157: H7 in a semi – synthetic medium and in raw milk, Milchwissenschaft 47, 1: 15-17.

12. International Dairy Federation (1988): Code of practice for the preservation of raw milk by use of the lactoperoxidase system. Bulletin of the International Dairy Federation 234: 15p.

13. Jay James, M. (1991): Modern Food Microbiology. 4th ed. Chapman and Hall London, UK.

14. Kishore, K., Bancerjee, P., Marimuthu, P. B. and Malay, C. (1997): Effect of thiocyanate ingestion through milk on thyroid hormone homeostasis in women. British Journal of Nutrition. 78: 676-681.

15. Kangumba, J.G.K., Vewnter, E.H. and Coetzer, J.A.W. (1997): The effect of activation of the loctoperoxidase and souring on certain potential human pathogens in cow's milk. Journal of the South Africa Veterinary Association 68, 4: 130-136.

16. Lara, R. A., Mendoza, I., Lacruz, D. and Garcia, H. S. (1987): Effect of the lactoperoxidase system on yield and characteristics of freish-type cheese. Mlichwissenschaft 42, 12: 773-775.

17. Marshall, B. R. (1980): Comparison of the antibacterial activity of the hypothiocyanate anion towards Streptococcus lactis and Escherichia coli. Journal of General Microbiology 120: 513-516.

18. Otenhajmer, I., Mijacevic, C. and Asanin, R. (1989): Incidence of pathogenic E.coli strains in milk and milk products. Acta Veterinaria (Beugrad) 39, 2-3: 127-135.

19. Padhye Nisha, V. and Michael P, D. (1992): Escherichia coli 0157: H7: Epidemiology, Pathogensis and Methods for detection in foods. Journal of Food Protection, 55, 7: 555-565.

20. Reiter, B. (1978): Review of the progress of dairy science antimicrobiol system in milk. Jouranl Dairy Res. 45: 131-147.

21. Reiter, B. and Goran, H. (1984): Lactoperoxidase antibacterial system (natural occurrence, biological functions and practical applications) Jouranl of Food Protection, 47, 9: 724-732.

22. Ridley, S.C. and Peter, L. S. (1990): Farm application of lactoperoxidase treatment and evaporative cooling for the intermediate preservation of unprocessed milk in Kenya. Journal of Food Protection, 53, 7: 592-597.

23. Sears, Cynthial. and James, B.K. (1996): Enteric bacterial toxins; mechanism of action and linkage to intestinal secretion. Microbiological Reviews: 167-215.

24. Singh, R. S., Batish, V.K., Chander, H. and Tanganathan, B. (1985): Reactivation of heat injured Escherichia coli cells in milk. Milchwissenschaft 40, 7: 398-401.

25. Tolle, V.A., Otten, I. and Suhren, J. (1981): Zur dynamik der produktrpezifischen kamflora und von coliformen keimen / E.coli wahrend des herstellungsprozesses von camembert kase. Milchwissenschaft 36, 1: 5-9.

26. Wolfson, L. M. and Susan, S.S. (1993): Antibacterial activity of the lactoperoxidase system, A review. Journal of Food Proetection, 56, 10: 887-892.

27. Zapico, P., Pilor, G., Manuel, N. and Margarita, M., (1995): Activity of goat's milk lactoperoxidase system on Pseudomonas fluorescens and Escherichia coli at refrigeration temperatures. Journal of Food Protection, 58, 10: 1136-1138.

www.SID.ir