JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره هفدهم، شماره اول، ۱۴۰۰، پیاپی ۴۲: ۸۴-۷۳

مقاله تحقیقی

بررسی اثرهم افزایی لاکتوفرین و لاکتو پر اکسیداز شیر شتر بر روی باکتری *استافیلو کوکوس اورئوس*

سعید زیبائی*[۱]، مرجان شاملو[۲] ، علی محمدی ثانی[۳]

۱-دانشیار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۲-دانش آموخته فوق لیسانس، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

۳-دانشیار صنایع غذایی، واحد قوچان دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۰

چکیده

مطالعه با هدف بررسی اثر ضد باکتریایی ترکیبی وبه تنهایی لاکتوفرین وسیستم لاکتو پراکسیداز استخرج شده از شیر شتر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد. خالص سازی لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز با استفاده از سانتریفوژ و استخراج آنزیم‌ها با روش کروماتوگرافی تعویض یونی با سفادکس CMC-50 انجام گرفت. آنزیم ها با روش SDS.PAGE شناسائی ودر حضورمحلول فسفات سدیم دیالیز (تغلیظ) گردید که با اسپکتوفتومتردرطول موج ۶۰۰ نانومتر عدد ۷۱۴/۲۳ میکروگرم برای لاکتوفرین وعدد ۷۷۴/۴ برای لاکتو پر اکسیداز اندازه گرفته شد. جهت تعیین خاصیت ضد باکتریایی این دو آنزیم ترکیبی وجداگانه با سه رقت وهر رقت سه تکرارهمراه با یک کنترل مثبت ومنفی استفاده گردید. استافیلو کوکوس اورئوس بر روی محیط MHB برده و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گرادگرمخانه گذاری شد. جهت بررسی از سه رقت ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم لاکتوفرین و ۰/۰۱ و ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم لاکتو پراکسیداز به همراه ۰/۰۳ تیوسیانات و و ۱ مول پراکسید هیدروژن به همراه ۶-۱۰ باکتری کشت داده در زمانهای مختلف با اسپکتوفتومتر سنجیده شد. لاکتو فرین در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیترسبب رشد بهتر باکتری ودرغلظت ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر در ساعت ۶ پس از شروع کشت ۳۷٪ کاهش رشد نسبت به کنترل مثبت داشته است، لاکتو پراکسیداز در هر سه غلظت جلوی رشد را گرفته واثر غلظت ۰/۰۲ و ۰/۰۴ اثر مشابه ای داشته است. در کشت ترکیبی آنزیم ها در هر سه غلظت بطور کامل رشد باکتری را جلوگیری کرده ولاکتوفرین اثر لاکتوپراکسیداز را افزایش داده است. می توان نتیجه گرفت که این دو پروتئین اثرهم افزایی برای مقابله با باکتری از خود نشان داده اند.

کلمات کلیدی: لاکتو فرین، لاکتو پر اکسیداز، شیر شتر، استافیلو کوکوس اورئوس، خاصیت ضد باکتریایی

*نویسنده مسئول: سعید زیبائی

آدرس: بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک، موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد، ایران

پست الکترونیک: S.zibaee@rvsri.ac.ir

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت، غیر اسپور زا، غیر متحرک، هوازی بی هوازی اختیاری است (۱). این باکتری بر روی غشاهای مخاطی و پوست پستانداران، مواد غذایی مختلف و محیط اطراف یافت می‌شود وعامل ایجاد ذات الریه، التهاب وریدها، مننژیت، عفونت دستگاه ادراری، التهاب موضعی‌استخوان‌ها، اندوکاردیت، ضایعات سطحی پوست و ورم پستان گاو می باشدو بدلیل داشتن فاکتورهای تهاجم متعدد همچنین به علت مقاومت آنتی بیوتیکی فراوان هنوز یکی از میکروارگانیسم های خطرناک برای انسان و دام محسوب می شود. بدلیل مقاومت روز افزون داروئی نسبت به این باکتری تلاش های زیادی برای ساخت ترکیبات ضد باکتری در حال انجام است (۲ و ۱۶).

شیر غذای کامل و دارای بیواکتیو های ویژه ای نظیر: کازئین و لاکتوفرین که سبب فعالیت بهتر گوارشی شده، لاکتو گلوبولین، هورمون رشد و لاکتو فرین که سبب رشد شده، ایمونوگلوبولین، پرولاکتین و لاکتو فرین که سبب تقویت ایمنی می گردند و بیو اکتیو هایی که نقش ضد میکروبی دارند نظیر: لیزوزیم، لاکتوپراکسیداز و لاکتو فرین، می باشد (۱۸). لاکتوپراکسیداز پلی پپتیدی با وزن ملکولی ۷۸ کیلو دالتون بوده که نقطه ایزوالکتریک آن برابر ۹/۶ است. لاکتو پراکسیداز یک آنزیم اکسیدوردوکتاز با ساختار گلیکوپروتئین ویک پروتئین دفاعی است فعال شدن این آنزیم وترشح آن در غدد برون ریزی مانند شیر، اشک، بزاق، بینی و برونشها وترشحات روده ای رخ می دهد. فاکتور های متعددی بر غلظت آنزیم لاکتو پراکسیداز اثر می گذارند. از جمله سن، مراحل شیر دهی وتغذیه (۲۵،۶ و ۱۳). فعالیت آنزیم اثرات ضد باکتریایی داشته در صنایع غذایی، حصولات آرایش بهداشتی وجوش خوردن زخم ها کاربرد صنعتی دارد (۳۰،۱۵ و ۲).

برای فعال کردن سیستم لاکتو پراکسیداز نیاز به سه ترکیب آنزیم لاکتو پراکسیداز، تیوسیانات و پراکسید هیدروژن می باشد. تیوسیانات بطور طبیعی در شیر وجود دارد. پراکسید هیدروژن بدلیل حضور باکتریهای گرم منفی در شیر و قدرت تولید پراکسید هیدروژن توسط آنها تا حدی در شیر یافت می گردد (۲۴،۳۴ و ۹). باکتری های *اسید لاکتیکی* (*lactic acid bacteria*) موجود در شیر قادر به تولید H2O2 بوده و می توانند لاکتوپراکسیداز شیر را فعال نمایند (۱۴).

لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین باندشونده به آهن و تقریباً دارای ۷۰۰ اسیدآمینه با وزن مولکولی حدود ۸۰ کیلودالتون می باشد که از یک زنجیره‌ی پلی پپتیدی منفرد تشکیل شده ویک پروتئین کاتیونی با pH ایزو الکتریک نزدیک ۹ است. لاکتوفرین شیر شتر در مقایسه با لاکتوفرین گونه‌های دیگر در برخی خصوصیات ساختمانی و عملکردی متفاوت است. به علت توزیع وسیع لاکتوفرین و حضور شبکه‌ای از بارهای مثبت، این پروتئین یک پروتئین چند عملکردی بوده و دارای فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدانگلی، ضدقارچی و ضدویروسی، افزایش استخوان‌زایی و پاسخ‌های ایمنی، خواص آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی می باشد (۱۱،۲۱،۲۳ و ۲۷). هدف از این مطالعه بررسی هم افزایی اثرات ضد باکتریایی لاکتو فرین و لاکتو پر اکسیداز استخراج شده از شیر شتر بر روی باکتری *استافیلو کوکوس اورئوس* می باشد.

مواد و روش کار:

مراحل استخراج لاکتوفرین ولاکتو پراکسیداز از شیر شتر:

برای جدا سازی و خالص کردن لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز، از شیرشترهای نژاد ترکمن (شیری) استفاده گردید.

جهت چربی زدایی از سانتریفیوژ (۴۵۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه) شیر طی دو مرحله و سپس صاف کردن با کاغذ صافی واتمن شماره ۷ استفاده شد. سپس با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی از رزین CM Sephadex C-50 استفاده گردید. این رزین یک نوع cation exchanger بوده که عمل تبادل پروتئین ها با بار مثبت را انجام می دهد. عمل متعادل سازی رزین ها با بافر فسفات سدیم (۱۰ mM) ۱۰ میلی مولارو pH=۶/۸ انجام گردید. مراحل شامل وارد کردن رزین، خروج نمونه و ورود مجدد آن در ستون و ایجاد فرصت برای متصل شدن پروتئین ها به رزین بمدت ۳۰ دقیقه، شستشو با بافرفسفات سدیم ذکر شده دو بار، جمع آوری فراکسیون های حاوی پروتئین های جدا شده با شستشو توسط بافرفسفات سدیم محتوی نمک خالص حاوی گرادیان های مختلف غلظت (۱-۰/۱ مولار NaCl)، نگهداری فراکسیون های جمع آوری شده در فریزر ۲۰- تا زمان اندازه گیری پروتئین و آزمایش SDS-PAGE استفاده شد. به منظور وجود پروتئین فراکسیون ها در طول موج ۲۸۰ nm مورد تایید قرار گرفتند. جهت تعیین میزان خلوص پروتئین و مشخص کردن محدوده وزن مولکولی آن، از ازمایش SDS-PAGE و ژل آکریل آمید ۱۲/۵ درصدهمراه با رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید (۳ و ۴،۵).

از آنجائیکه باند حدود ۸۰ کیلودالتون برای لاکتو پراکسیداز و لاکتوفرین دراین بررسی وجود دارد از آزمایش اکسیداسیون فراکسیون ها بمنظور تفکیک این دو پروتئین استفاده گردید. با شروع واکنش اکسیداسیون رنگی تترا متیل بنزیدین TMB با پراکسید هیدروژن در حضور آنزیم لاکتوپراکسیداز، رنگ آبی ایجاد می گردد و با اضافه کردن اسید سولفوریک ۲ نرمال واکنش متوقف شده و رنگ زرد ایجاد می شود، اما فراکسیون حاوی لاکتوفرین فاقد این واکنش می باشد (۳ و ۴،۵). غلظت پروتئین بوسیله آزمایش براد فورد تعیین، همچنین سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

پس از جمع آوری فراکسیون های حاوی لاکتوفرین و لاکتو پراکسیداز، این پروتئین هاجدا شده با استفاده ازآمونیوم سولفات ۹۰٪ و سپس دیالیز در مقابل بافر فسفات سدیم ۰/۵ مولاربا pH= ۶ تغلیظ شدند.

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق دریافت شد(**Staphylococcus aureus ATCC 25923**) و آزمایش های تاییدی نیزانجام گرفته است. نتایج حاصل ازمحیط حرکت، اکسیداز استفاده از قند های سالیسین، رافینوز منفی و نتایج حاصل از کاتالاز، کوآگولاز، همولیزین، رشد برروی محیط های چاپمن، رشد بر روی محیط حاوی ۷/۵ و ۱۰ درصدنمک، اوره، مانیتول و استفاده از قند های مالتوز، ترهالوز، گالاکتوز وگلوکز و واکنش DNase مثبت ارزیابی شدند.

طراحی سیستم بررسی اثر غلظت های مختلف لاکتوفرین ولاکتوپراکسیداز بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*:

بدین منظور از پلیت های استریل برای انجام آزمایش استفاده گردید. آزمایش به گونه ای طراحی گردید که هر چاهک دارای ۲۰۰ میکرولیتر محلول مورد آزمایش شامل محیط کشت(MHB(Mueller Hinton Broth-HiMedia به میزان ۱۰۰ ماکرولیتر، ۵۰ ماکرولیترمحلول PBS حاوی 10^6 باکتری و ۵۰ ماکرولیتر PBS حاوی آنزیم (به تنهایی یا بطور مخلوط با هم) استفاده شد.

جهت بررسی از غلظت های لاکتوفرین در سه سطح لاکتو فرین ۱۰۰،۲۰۰،۳۰۰µg/mL با سه تکرار، سیستم لاکتوپراکسیداز با غلظت های پراکسید هیدروژن ۰/۰۳ میلی مول، تیوسیانات یک میلی مول برای هر سه سطح و لاکتوپراکسیداز با سه سطح(µg/mL ۰،۰۱،۰،۰۲،۰،۰۳) و نیزاز ترکیب دو پروتئین در نه سطح هر کدام در سه تکرار استفاده شدند. جهت انتخاب کنترل منفی (-CO)از ترکیب پروتئین ها (لاکتوفرین و لاکتو پراکسیداز) در سطح سه (با بیشترین غلظت) و ۵۰ ماکرولیتر بافر فسفات بعنوان جایگزین باکتری وبرای طراحی کنترل مثبت ((+CO از بافر فسفات جایگزین پروتئین هااستفاده شد. بقیه محلول شبیه آنچه درآزمایش استفاده شده (تمامی محلول ها به حجم کلی ۲۰۰ ماکرولیتر در چاهک های مربوطه) مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۴- زمان بررسی اثر غلظت های مختلف لاکتوفرین ولاکتوپراکسیداز بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*:

پس از طراحی آزمایش، پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و در زمان های مختلف ساعت های (۰،۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۱۴،۱۷،۲۳،۲۵) پس از آزمایش، میزان جذب چاهک ها بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر پلیت الیزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری شد.

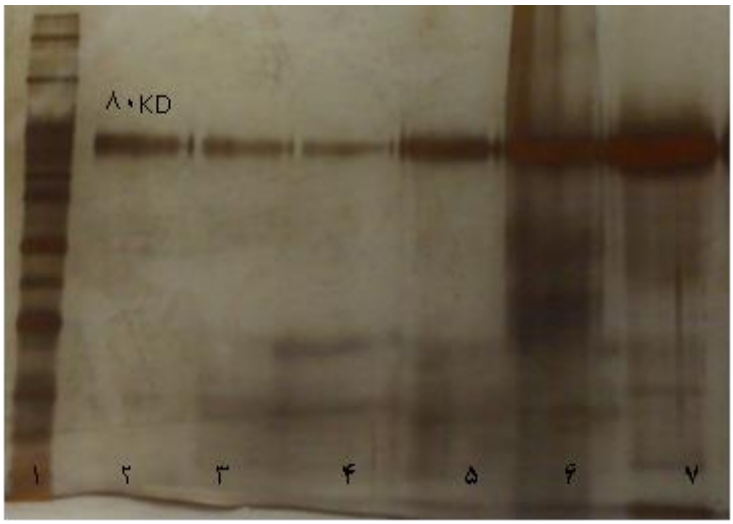
۲-۵- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج حاصل از بررسی آماری به روش آزمایشات فاکتریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام گردید و میانگین تیمارها به روش دانکن مقایسه شدند.

نتایج

۱-۳-نتایج حاصل از استخراج، خالص سازی لاکتوفرین و لاکتو پراکسیداز از شیر شتر:

فراکسیون های حاصل از شستشوی ستون کروماتوگرافی با غلظت های مختلف نمک، که در لوله های آزمایش مجزا جمع آوری شده بودند نشان دادکه فراکسیون های ۰/۹، ۰/۸، ۰/۷، ۰/۶، ۰/۵ مولار NaCl در ۲۸۰ نانومتر در اسپکتروفتومتری جذب خوبی داشته و در آزمایش SDS-Page، وجود تک باند با وزن مولکولی حدود ۸۰ کیلو دالتون درغلظت های ۰/۹، ۰/۸، ۰/۷، ۰/۶، ۰/۵ مولاررا نشان دادند.

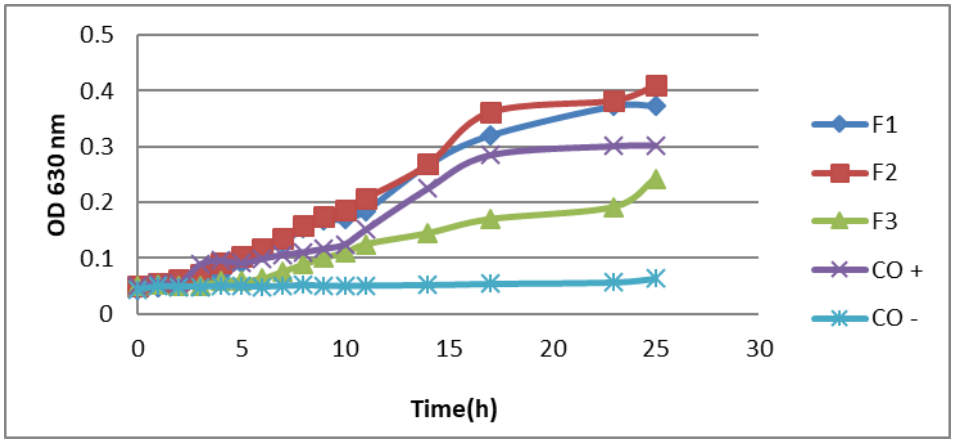


تصویر ۱- نتایج حاصل از تایید وجود لاکتوفرین ولاکتوپراکسیداز در فراکسیون ها با استفاده از آزمایش SDS-PAGE
شماره ۱- مارکر - شماره ۲- فراکسیون ۵/ مولار ۰ NaCl - شماره ۳- فراکسیون ۰/٦ - شماره ٤- فراکسیون ۰/۷ - شماره ٥- فراکسیون ۰/۸ - شماره ٦- فراکسیون ۰/٤ - شماره ۷- فراکسیون ۰/۹

تایید لاکتو فرین و لاکتو پراکسیداز توسط TMB نتایج نشان داد که در فراکسیون های ۰/۹، ۰/۸، مولار NaCl در برخی موارد لاکتو پراکسیداز در فراکسیون های، ۰/۸، ۰/۷ ۰/۶، ۰/۵، مولار دربیشتر موارد لاکتوفرین وجود دارد.

نتایج بدست آمده حاصل ازتجمیع و تغلیظ فراکسیون ها عدد ۷۱۴/۲۳ میکرو گرم بر میلی لیتر را برای لاکتوفرین و عدد ۷۷۴/۴ میکرو گرم بر میلی لیتر برای لاکتوپراکسیداز نشان داد.

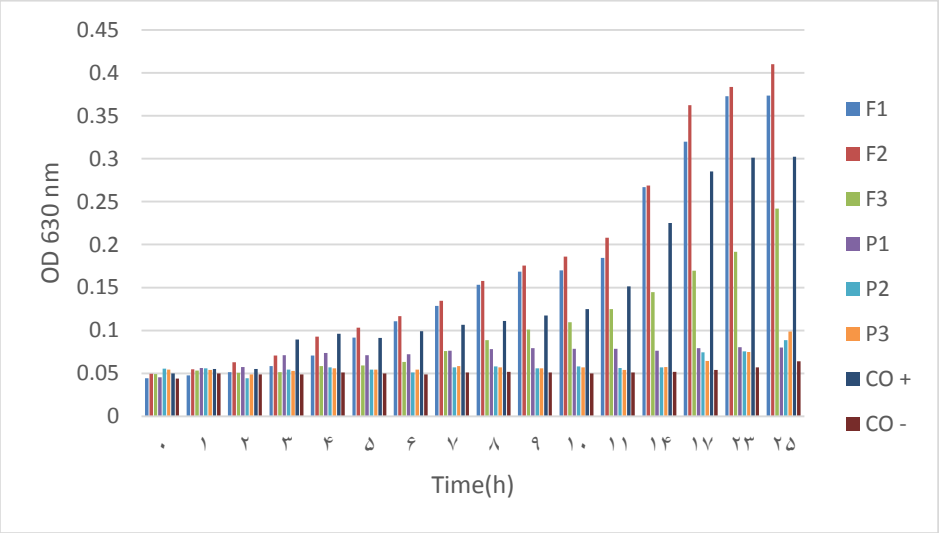
۲-۳-نتایج حاصل از اثر ضد باکتری لاکتوفرین و لاکتو پراکسیداز بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* :



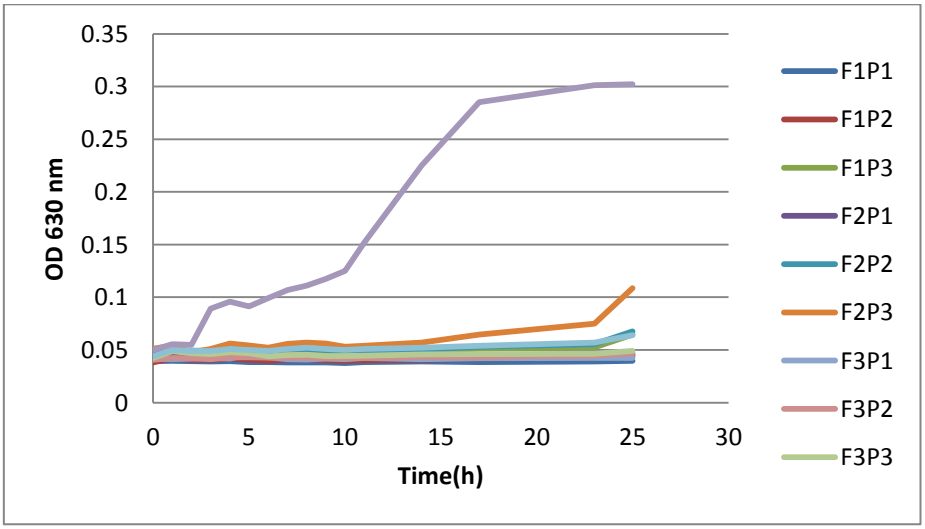
تصویر۲- مقایسه اثر غلظت های مختلف لاکتو فرین (F1:100,F2 :200,F3:300µ g/mL) بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در زمان های مختلف.

در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به کنترل مثبت در ساعت ۶ پس از شروع آزمایش ۳۷ درصد کاهش رشد نشان داده است .نتایج نشان می دهد که در غلظت های کم ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نه تنها لاکتوفرین سبب کاهش رشد نشده است بلکه در مقایسه با کنترل مثبت رشد بهتری نیز نشان داده است.

اما در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به کنترل مثبت در ساعت ۶ پس از شروع آزمایش ۳۷ درصد و در زمان ۱۴ (۳۶ درصد) و در زمان ۲۳ (۳۷ درصد) کاهش رشد نشان داده است. مقایسه اثر غلظت های مختلف لاکتو پراکسیداز (P2: µg/mL 0.02, P3: 0.04 , P1:0.01, بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در زمان های مختلف نشان می دهد که در هر سه غلظت سیستم لاکتوپراکسیداز توانسته است که جلوی رشد باکتری را بگیرد و این میزان برای غلظت P1 در ساعت ۶ (۵۳/۷ درصد) و در ساعت ۱۴(۸۶ درصد) و برای ساعت ۲۳(۹۰/۱ درصد) بوده است (اختلاف با کنترل های معنی دار می باشد$\alpha<5\%$). همچنین نتایج نشان می دهد که اثر غلظت های P2وP3 بیشتر از غلظت P1می باشد اما بین این دو غلظت P2وP3 تفاوت زیادی وجود ندارد($\alpha<5\%$).



تصویر۳-مقایسه ستونی اثر غلظت های مختلف لاکتوفرین(F) ،لاکتوپراکسیداز(P) ، کنترل منفی (CO-) وکنترل مثبت(CO+) برروی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در زمان های مختلف. در هر سه غلظت سیستم لاکتوپراکسیداز توانسته است که جلوی رشد باکتری را بگیرد.



تصویر٤-مقایسه رشد حاصل از اثر غلظت های ترکیبی (FP) مختلف لاکتوفرین(F1,F2,F3)

ولاکتوپراکسیداز(P1,P2,P3) وکنترل مثبت(+CO) برروی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در زمان های مختلف نتایج نشان می دهد که در هر سه غلظت ترکیبی سیستم لاکتوپراکسیداز توانسته است از رشد باکتری در ساعات های مختلف جلوگیری نماید. نتایج نشان می دهد که در هر سه غلظت ترکیبی سیستم لاکتوپراکسیداز توانسته است بطور کامل از رشد باکتری در ساعات های مختلف جلوگیری نماید (اختلاف با کنترل های معنی دار می باشد$\alpha<1\%$) بنابراین لاکتوفرین اثر ضد باکترایی لاکتوپراکسیداز را افزایش می دهد . اما تنها در غلظتF2P3 اثر ممانعت از رشد بطور ۱۰۰ درصد کامل نبوده است. همچنین در ساعات ۶،۱۴و۲۳ پس از شروع آزمایش درصد افزایش اثر ضد باکتری توسط لاکتوفرین تشدید شده است که این اثر به ترتیب ۴۶،۱۴/۳ و ۹/۹ درصد برای غلظت لاکتوپراکسیداز یک و ۵/۳و۷ درصد برای غلظت لاکتوپراکسیداز۲و نیز ۱۱/۵ و ۷ درصد برای غلظت لاکتوپراکسیداز۳ می باشد.

بحث

شیر جدای از نقش معمولی خود، بعنوان غذای فراسودمند نیز مطرح می باشد. در بین بیواکتیوهای شیر لاکتوفرین ولاکتوپراکسیدازاز جایگاه ویژه ای برخوردار می باشند.در پژوهش حاضر اثر ضد *استافیلوکوکی* این دو پروتئین به تنهایی و ترکیبی آنها مورد بررسی قرار گرفته است.برای خالص کردن لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز استفاده شده در این مطالعه از کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از رزین CM Sephadex C-50 استفاده گردید. سایر محققین نیز از این روش برای جداسازی مناسب این پروتئین ها استفاده نموده اند (۳،۳۵،۲۸،۱۷،۱۴) که عملیاتی نظیر pH محیط و استفاده ازغلظت های نمکی بهینه گردید.

در بررسی لاکتوپراکسیداز شیر شتر بوم شناخت ترکمن نتایج نشان می دهد که در هر سه غلظت مورد استفاده لاکتوپراکسیداز توانسته است که جلوی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را بگیرد و این میزان برای غلظت (P1 0.01µg/mL) در ساعت ۶ (۵۳/۷ درصد) و در ساعت ۱۴(۸۶ درصد) و برای ساعت ۲۳(۹۰/۱ درصد) بوده است، بنابراین می توان دریافت که MIC50 در ساعت ۵ و ۳۰ دقیقه و MIC90 در ساعت ۲۳ رخ داده است. بلوری و همکاران در سال ۱۳۹۰ نشان دادند که اثر سیستم لاکتوپراکسیداز بر روی *استافیلولوکوکوس اورئوس* پس از ۶ ساعت ۷۰ درصد بوده است (۴). در مقایسه این عدد برای مطالعه حاضر (۵۳/۷ درصد) بوده است. در سال ۱۹۵۸محققین دریافتند که بین میزان استرپتوکوکوس شیر و میزان لاکتو پر اکسیداز (LP) آن ارتباط وجود دارد (۱۰)زیبائی و همکاران ۱۳۹۴، با استفاده از سیستم لاکتوپراکسیداز طی ۶ ساعت انکوباسیون باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* و *کلستریدیوم سپتیکوم* میزان تشکیل کلنی بر میلی لیتر به ترتیب به ۳۷ در صد و صفر برآورد کردند(۴). با بررسی اثرسیستم لاکتو پراکسیداز بر روی باکتری *Pseudomonas fluorescens*، نتیجه گرفته شد که طی ۴ ساعت انکوباسیون بیش از ۹۰ در صد باکتریها از بین می روند (۲۰).همانگونه که نتایج نشان می دهد اثر غلظت های (P3: µg/mL 0.02, : P2 0.04) بیشتر از غلظتP1می باشد اما بین دو غلظت P2وP3 تفاوت زیادی وجود ندارد.بنابراین می توان نتیجه گرفت که اگر از هریک از دو غلظت یاد شده استفاده گردد نتایج مشابه ای بدست خواهد آمد. این در حالی است که دو واکنش گر مهم دیگر در سیستم

لاکتوپراکسیداز یعنی پراکسید ئیدروژن و تیوسیانات برای هر سه غلظت یکسان بوده است.غلظت استفاده شده برای سیستم لاکتوپراکسیداز با تحقیق Soukka و همکاران ۱۹۹۰ هم خوانی دارد(۳۶).Ihallin و همکاران (۱۹۹۸) اثر سیستم لاکتو پراکسیداز را بر روی *استیتوباسیلوس* در ۳۷-درجه سانتی گراد بمدت یکساعت بین ۷۰-تا۴۰ درصد برآورد کرده است (۱۹). لاکتوفرین عملکرد های کلیدی و متنوع ای دارد(۲۱). لاکتوفرین شیر شتر در مقایسه با لاکتوفرین گونه های دیگر در برخی خصوصیات ساختمانی و عملکردی متفاوت می باشد. بعنوان مثال، مکان گلیکوزیله شدن لاکتوفرین در شیر شتر با بقیه حیوانات تفاوت دارد. این پروتئین و پپتیدهای حاصل از آن خاصیت ضد باکتریای بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی دارندفعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین ناشی از چند مکانیسم است، از دسترس خارج کردن آهن مورد نیاز باکتری و میانکنش مستقیم با میکرو ارگانیسم(میانکنش با اسید لیپوتیکوئیک باکتری های گرم مثبت و لیپوپلی ساکارید باکتری های گرم منفی) ، افزایش خاصیت آنتی بیوتیک در مقابله با بعضی از باکتری ها، افزایش خاصیت ضد باکتریایی لیزوزیم از اثرات آن می باشد. همچنین لاکتوفرین قادر است با خاصیت دور کردن آهن از تشکیل بیوفیلم در باکتری جلوگیری نموده که این امر سبب حساس تر شدن با کتری های مقاوم نظیر *سودوموناس آئروجینوزا* شود. از خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی لاکتوفرین می توان جهت تولید لوسیون و کرم استفاده نمود(۳۳و ۲۹،۲۶،۲۲،۱۲).

برخی از محققین معتقدند که لاکتوفرین قادر است از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و برخی از باکتری های دیگر نظیر *اشرشیاکولی(E. Coli O157)* جلوگیری نماید (۳۱).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می هد که لاکتوفرین در غلظت های کم ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نه تنها سبب کاهش رشد نشده بلکه در مقایسه با کنترل مثبت رشد بهتررا نیز نشان داده است. اما در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به کنترل مثبت در ساعت ۶ پس از شروع آزمایش ۳۷ درصد و در زمان ۱۴ (۳۶ درصد) و در زمان ۲۳ (۳۷ درصد) کاهش رشد نشان داده است .خاصیت ضد باکتریایی شیر شتر بر علیه باکتری های *استرپتوکوکوس اگالاکتیه Streptococcus agalactiae*، *استافیلوکوکوس اورئوس Staphylococcus aureus* ، *اشرشیا کولی Escherichia coli* و *سودوموناس آئروجینوزا Pseudomonas aeruginosa* به اثبات رسیده است(۳۲). Alaa B. Ismael و همکاران ۲۰۱۳، نشان دادند که لاکتوفرین شیر شتر در غلظت یک میلی گرم برمیلی لیتر پس از سه ساعت و در غلظت سه میلی گرم بر میلی لیتر پس از یک ساعت بر اشریشیا کولی اثرممانعت کنندگی بر رشد در مقایسه با گروه کنترل از خود نشان داده است. همچنین این اثر برای *سودوموناس آئروجینوزا* ۳ میلی گرم بر میلی لیتر پس از ۶ساعت و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و*استرپتوکوکوس اگالاکتیه* با این غلظت پس از۱۲ ساعت انکوباسیون می باشد(۷). این نتایج با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت دارد .Arnold ، ۱۹۸۶ بیان می دارد که آنیون های فسفات،سیترات، سولفات وگلیسین با اشغال سایت باند شونده به لاکتوفرین که بر روی *استرپتوکوکوس موتانس* قرار دارد سبب کاهش اثر مهارکنندگی رشد لاکتوفرین بر این باکتری می شود(۸). ایا این اثر در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز دیده می شود باید موردبررسی قرار گیرد، اما نتایج حاصل از این مطالعه نشان می هد که لاکتوفرین در غلظت های کم ۱۰۰ و

۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به تنها یی سبب کاهش رشد نشده است بلکه در مقایسه با کنترل مثبت رشد بهتری نیز نشان داده است. پس از بالا رفتن غلظت ،لاکتوفرین توانسته اثر جلوگیری از رشد باکتر خود را اعمال نماید.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان می دهد که دو پروتئین مورد استفاده در این تحقیق اثر هم افزایی برای مقابله با *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته است. بدین معنی که لاکتوفرین اثر لاکتوپراکسیداز را افزایش داده است . اما تنها در غلظتF2P3 اثر ممانعت از رشد ۱۰۰ درصد نبوده است و این مورد را می توان با توجه به اثر تشدید کنندگی رشد باکتری توسط لاکتوفرین در غلظت F2 توجیه نمود .بدلیل اینکه این دو پروتئین بمنظور تحریک سیستم دفاعی استفاده می شوند پیشنهاد می گردد تحقیقات بیشتری برای استفاده ترکیبی ازاین پروتئین ها انجام پذیرید.

منابع

۱) جاکلیک، پ. (۱۳۸۲). میکروب شناسی زینسر. ترجمه رحیمی . م . صفحه ۴۸-۲۵

۲) زیبائی،س. (۱۳۷۹). پتانسیل ساخت واکسن subunit بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس .مجموعه مقالات همایش بیوتکنولوژی و آینده مشهد .بهمن ۷۹.۱۶۲-۱۵۶

۳) زیبائی،س.رجب زاده،ق.محمدی ثانی،ع. راعی،ع.(۱۳۹۲). نانوانکپسوله نمودن لاکتوفرین استخراج شده از شیر شتر توسط آلژینات کلسیم. مجله ی نوآوری در علوم و فناوری غذایی/ ویژه نامه دومین همایش ملی علوم وصنایع غذایی/ دانشگاه آزاد واحد قوچان (آبان ۱۳۹۲) ۵۸-۴۹

۴) زیبائی،س. بلوری مقدم،م. نوروزی مقدم،ح. (۱۳۹۴). خالص سازی آنزیم لاکتو پراکسیداز از شیر شتر و بررسی اثرات آن بر علیه باکتری های سودوموناس آئروجینوزا و کلستریدیوم سپتیکوم.نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/دوره یازدهم،شماره اول،۱۳۹۴، پیاپی ۶۷:۳۰-۵۹

۵) زیبائی،س. برازنده،ر.اسحاقی،ز. جعفری،س،م. (۱۳۹۵). خالص سازی و تثبیت آنزیم لاکتوپراکسیداز استخراج شده از شیر شتر توسط آلژینات سدیم. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵. دوره ۷۱ ، شماره ۳، ۳۲۷-۳۲۱ .

6) Abdallah, M.IM (2005). A New Trial for Preservation of Raw Cow's Milk at 30 c and 5c By Activation of The Natural Lactoperoxidase system. *4th International Scientific Conference*.**Mansoura, Egypt:** 1-10

7) Alaa B. Ismael. Salama M. Abd El Hafez. Manal B. Mahmoud .Abdel-Kader A. Elaraby. Hany M. Hassan. (2013). Development of New Strategy for Non-Antibiotic Therapy: Dromedary Camel Lactoferrin Has a Potent Antimicrobial and Immunomodulatory Effects. *Advances in Infectious Diseases*. **3:** 231-237

8) Arnold, R.R. Cole M.F., McGhee J.R. (1977). A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* **197:** 263–265

9) Ashby, M.T. van Eldik, R. Ivana I.B. (Eds.). (2012) *Advances in Inorganic Chemistry*. Academic Press, New York, NY, USA, **chapter 8:** 263–303

10) Bjorck, L.Rosen.G, Shall, V.Mreiter, (1975) Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonas and other gram –negative bacteria. *Applied Microbiology*. **30:**199-204.

11) Bruni ,N. Capucchio, M.T. Biasibetti, E. Pessione, E. Cirrincione, S. Giraudo, L. Corona,A. Dosio,F.(2016) Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules*. **21:** 752.2-25

12) Burrow HK, Kanwar RR, Kanwar J. (2011). Antioxidant enzyme activities of iron-saturated bovine lactoferrin (Fe-

blf) in human gut epithelial cells under oxidative stress. *Medicinal Chemistry*. **7:** 224-230.

13) Colowick, Kaplan. (1955). Methods in Enzymology: *Diffraction Methods for Biological Macromolecules* .**115:** 770-773

14) Dashe,D.Hansen,E B, Kurtu,M Y. Berhe,Y. Eshetu,M. Hailu,Y.Waktola,A. Shegaw, A. (2020). Preservation of Raw Camel Milk by Lactoperoxidase System Using Hydrogen Peroxide Producing Lactic Acid Bacteria. *Open Journal of Animal Sciences*. **10:** 387-401

15) Flemmig, J.; Gau, J.; Schlorke, D. Arnhold, J. (2016). Lactoperoxidase as a potential drug target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. **20:** 447–461

16) Foster, T.J. (1991).Ptential for vaccine against infection caused by staphylococcus aureus .*Vaccine.* **9:** 221-228

17) Gerberding, S.; Byers, C. (1998). Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *Journal of Chromatography A.* **808:** 141–151

18) Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzoli, 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

19) 19-Ihallin, R., Loimaranta, V., Lumikari, M.L., Tenovuo, J. (1998). The effects of different halide substrates on peroxides mediated killing of Acintobacillus Aactinomycetemcomitans. *Journal of Periodontal Research.***33:** 421-427

20) Indyk, H.E. and Filonzi, E. L. (2005). Determination of Lactoferrin in bovine milk, Colostrum and infant formulas by optical biosensor analysis. *International Dairy Journal*, **15:** 429-438

21) Isui, A., García, M., Siqueiros, T. C., Arévalo, G.S., Rascón-Cruz, Q. (2011). Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et biophysica Acta* .**1820:**226–236

22) Jagish Kour Reen, P. Suman, M. Kannegundla, U. Thakur. Kumar, R. (2018). A multifunctional bioactive protein: Lactoferrin. *The Pharma Innovation Journal*. **7:** 75-79

23) Jenssen, H .Hancock RE. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*. **91:**19-29

24) 24- Karen, J.L., Hong, W., Mueen, A., Zou, S. and Walter, L.H. (1996). Antimicrobial proteins in milk. *Illinois Daily Report*. 308

25) Korhonen, H. (1977). Antimicrobial factors in ovine colostrum's. *Agricultural and Food Science*. **49:** 434

26) Leitch EC, Willcox MD. (1999). Lactoferrin increases the susceptibility of s. Epidermidis biofilms to lysozyme and vancomycin. Current Eye Research. **19:** 12-19

27) Mahdi, L. (2017). Immunomodulatory of bifidobacterium breve and inhibitory effect of bifidobrevicin -LHM on streptococcus agalactiae and its B-hemolysin. *Iraqi journal of agricultural sciences*. **48:** 156–170

28) Mahdi, L. Abd-Alkareem, S. Musafer, H. (2016). Immunomodulatory and antagonistic effect of Lactobacillus reuteri and its purified characterized bacteriocin against Salmonella enterica and Shigella flexnerii. *Advances in Natural Sciences.* **10:** 155–1674

29) Mahdi, L. Musafer, H. Zwain,L. Salman, I. Al-Joofy,I. Rasool, K. (2017)Two Novel Roles of Buffalo Milk Lactoperoxidase, Antibiofilm Agent and Immunomodulatory against Multidrug Resistant Salmonella enterica Serovar Typhi and Listeria Monocytogenes. *Microbial Pathogenesis***. 109:** 221–227

30) Mahdi, L. Mahdi, N. Al-kakei, S. Musafer, H.Al-Joofy, L Essa, R. Zwain.L. Salman, I. Mater, H. Al-Alak,

S. Al-Oqaili, R. (2018) Treatment strategy by lactoperoxidase and lactoferrin combination: Immunomodulatory and antibacterial activity against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Microbial Pathogenesis*, **114:** 147-152

31) Matijaši´c ,B B. Oberˇckal ,J. Lorbeg ,P M. Paveljšek ,D. Skale ,N. , Kolenc ,B. Gruden ,S. Ulrih ,N P . Marko Kete, M & Justin, M Z. (2020). Characterisation of Lactoferrin Isolated from Acid Whey Using Pilot-Scale Monolithic Ion-Exchange Chromatography. *Processes. 8,* **804:**1-19

32) Roseanu, A.Damian, M.Evans, R, W. (2010) Mechanisms of the antibacterial activity of lactofferin and lactofferin – derived peptides. *Romanian Journal of Biochemistry*.**47:** 203-209

33) Superti, F (2020).Lactoferrin from Bovine Milk: A Protective Companion for Life. *Nutrients*, **12:** 2-25

34) Thomas, E.L. Fishman, M. (1986). Oxidation of Chloride and Thiocyanate by Isolate Leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*. **261:** 9694-702

35) Uguz, M.T., Ozdemir, H. (2005). Purification of bovine milk lactoperoxidase and investigation of antibacterial properties at different thiocyanate mediated. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **41:** 397-41

36) Welk, A. Meller, Ch. Schubert, R. Schwahn, Ch. Kramer, A. Below, H. (2009). Effect of lactoperoxidase on the antimicrobial effectiveness of the thiocyanate hydrogen peroxide combination in a quantitative suspension test. *BMC Microbiology*. **9:** 1-8