JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره یازدهم، شماره اول، ۱۳۹۴، پیاپی ۳۰: ۶۷-۵۹

خالص‌سازی آنزیم لاکتوپراکسیداز از شیر شتر و بررسی اثرات آن برعلیه باکتری های *سودوموناس آئروجینوزا* و *کلستریدیوم سپتیکوم*

سعید زیبایی[1*]، مهرین بلوری مقدم[2]، حسین نوروزی مقدم[3]

۱- استادیار بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن 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 واکسن های بی هوازی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد ، ایران

تاریخ دریافت: ۱۵ دی ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱۲ خرداد ۱۳۹۳

چکیده

لاکتو پراکسیداز آنزیمی است از خانواده اکسیدوردوکتاز که خاصیت ضدمیکروبی قوی دارد. بنابراین بعنوان نگهدارنده طبیعی مواد غذایی و آرایشی بهداشتی بکار می‌رود. در این تحقیق آنزیم لاکتوپراکسیدازی شیر شتر با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با ستون سفادکس جی ۱۰۰ وکروماتوگرافی 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 آنجام 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 می‌باشند. پس از انجام آزمایش، تعداد باکتری ها در زمان های صفر، ۶۰ و ۳۶۰ دقیقه با استفاده از ازروش 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 معنی‌داری وجود دارد ($P<0/0001$). نتایج حاکی از ۴۶ درصد کاهش رشد پس از ۳۶۰ دقیقه برای باکتری سودوموناس آئروجینوزا و ۱۰۰ درصد کاهش رشد پس از ۳۶۰ دقیقه برای باکتری کلستریدیوم سپتیکوم می‌باشد. برای اساس نتایج بدست آمده لاکتو پراکسیداز استخراج شده از شیر شتر خاصیت آنتی باکتریایی موثری بر دو باکتری سودوموناس آئروجینوزا و کلستریدیوم سپتیکوم دارد.

کلمات کلیدی: *لاکتوپراکسیداز، سودوموناس آئروجینوزا ، کلستریدیوم سپتیکوم*

**نویسنده مسئول: سعید زیبایی*

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

پست الکترونیک: s.zibaee@mrazi.ac.ir

مقدمه

شیر شتر دارای بیواکتیوهایی 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 حدودا ۷۸ کیلو دالتون بوده که نقطه ایزوالکتریک آن برابر ۹/۶ می‌باشد. لاکتوپراکسیداز از آنزیم های مقاوم به حرارت است که به عنوان شاخص پاستوریزاسیون محسوب می‌گردد دارای یک گروه هم (آهن) و حدود ۱۰ درصد کربوهیدرات می‌باشد (۱۵). لاکتوپراکسیداز، تیوسیانات را در حضور پراکسید هیدروژن اکسید نموده و هیپوتیوسیانات باخاصیت ضدمیکروبی قوی تولید می‌نماید، این ترکیب با گروه سولفیدریل (SH) پروتئین‌های میکروبی پیوند برقرار کرده و اثر بازدارندگی خود را بر ویروس ها، قارچ‌ها و باکتری ها اعمال می‌نماید (۱۵). مقایسه توالی اسیدهای آمینه آنزیم لاکتوپراکسیداز انسان با لاکتوپراکسیداز گاو، گاومیش، 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 می‌دهد 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 برعلیه باکتری ها، از *سودوموناس آئروجینوزا* استفاده گردید 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 سپتیکوم* 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 می‌گردد. *کلستریدیوم سپتیکوم* از عوامل گاز گانگرن آتروماتیک و انتروکولیت نکروتیک است. در اکثر موارد عفونت های *کلستریدیوم سپتیکوم* 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 تترامتیل 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، نیترات نقره، کربنات سدیم، متانول از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. آلبومین سرم گاو ، سفادکس- سی ۵۰ (CM sephadex C-50) ، سفادکس جی ۱۰۰، آکریل آمید، بیس آکریل آمید از شرکت سیگما آلدریچ 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 لاکتو پراکسیداز

در این تحقیق لاکتوپراکسیدازی بر اساس روش تغییر یافته (۲۳) از شیر شتر بوم‌شناخت ترکمن استخراج

و خالص‌سازی گردید. بطورخلاصه پس از چربی‌زدایی و جدا سازی کازئین از آب پنیر و صاف کردن بمنظور کروماتوگرافی تعویض یونی از رزین سفادکس سی ۵۰ و ستونی به ابعاد (۳ cm ×۱۰) 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 کروماتو گرافی تعویض یونی جمع آوری فراکسیون های حاوی پروتئین های با شستشو توسط بافرفسفات 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 نیترات 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 باتترا متیل 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 می‌نماید. یک واحد (1.0 U) فعالیت آنزیم لاکتوپراکسیداز، مقدار آنزیمی است که اکسیداسیون ۱ µmol/min از سوبسترای ترامتیل بنزیدین را در دمای ۲۵ ^{o}C و pH ۶ در محصول رنگی (ε 59000 M-1 cm-1=) کاتالیز می‌نماید. بمنظور محاسبه ثابت های سنتیکی آنزیم، فعالیت آنزیم لاکتوپراکسیداز در غلظت های ۲-۰/۰۱ میلی مولار TMB اندازه گیری شد و سرعت واکنش در هر مورد محاسبه گردید. ثابت های سینتیکی آنزیم به کمک رسم نمودار لینویور-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 باکتری‌های *سودوموناس آئروجینوزا* و *کلستریدیوم سپتیکوم*، ۲۴ ساعت قبل از رقت سازی و در محیط کشت Brain heart infusion broth (Difco Laboratories) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی برای *سودوموناس آئروجینوزا* و در شرایط بی هوازی برای *کلستریدیوم سپتیکوم* 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 به۴ گروه مورد بررسی و یک گروه شاهد تقسیم شدند که در هرگروه چهار تکرار وجود داشت. اثر باکتری کشی هر یک از واکنش گرها 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 لیترآنزیم) 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 برروی پلیت‌های حاوی آگار خوندار کشت داده شد.

بررسی آماری

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

نتایج

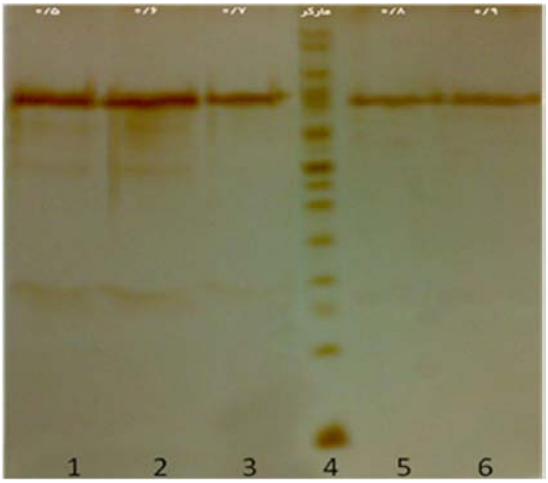
نتایج حاصل از استخراج و خالص سازی آنزیم لاکتوپراکسیداز

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 برمیلی لیتر برای هر یک از فراکسیون ها بدست آمد (شکل ۱).

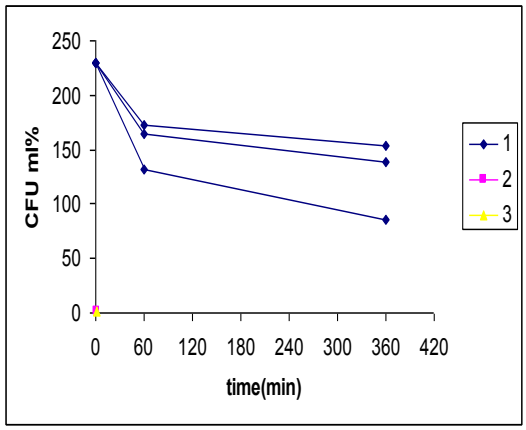
همچنین مقدار Vmax و Km برای آنزیم محلول به ترتیب ۰/۰۴۵ µmol ml-1 min-1 و ۰/۵۷ mM -1 برای آنزیم بدست آمد. نتایج حاصل از تعیین pH اپتیمم فعالیت لاکتوپراکسیداز نشان داد که بیشترین فعالیت آن در حضور بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار pH ۶ می‌باشد.

نتایج حاصل از فعالیت ضدباکتری آنزیم لاکتوپراکسیداز روی باکتری *سودوموناس آئروجینوزا*

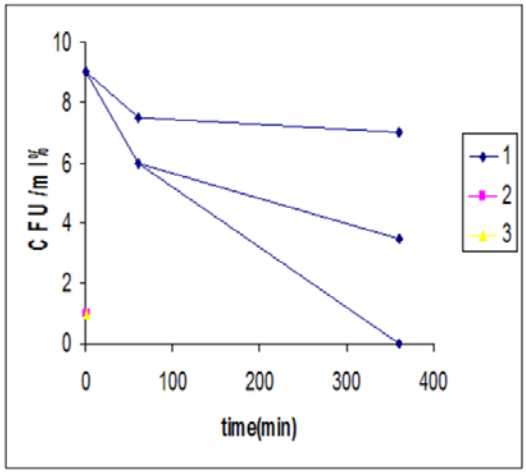
نتایج نشان داد که اگرچه هر یک از واکنش گرها بمیزان کمی از تعداد باکتری در زمان های متفاوت کم کردند، اما اثر سیستم کامل در کاهش باکتری پس از ۳۶۰ دقیقه معنی‌دار می‌باشد. براساس آزمون آنالیز واریانس دو طرفه اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۰۰۱) بین اثر سیستم کامل (با ۶۳ درصد کاهش در دقیقه ۳۶۰) با اثر سایر مواد شرکت کننده در واکنش جهت کاهش تعداد باکتری ها دیده شد. بنابر آنزیم لاکتوپراکسیداز استخراج شده از شیر شتر اثر ضدباکتریایی معنی‌داری روی *سودوموناس آئروجینوزا* نشان داده است (نمودار ۱).



شکل۱ – 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 *کلستریدیوم سپتیکوم* در طی زمان های ۶۰ و ۳۶۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد

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

بررسی نتایج نشان می‌دهد که اگر چه هریک از واکنش گرها بمیزان کمی از تعداد باکتری در زمان‌های متفاوت کم کردند، اما اثر سیستم کامل در کاهش باکتری پس از ۳۶۰ دقیقه معنی‌دار می‌باشد. براساس آزمون آنالیز واریانس دو طرفه اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۰۰۱) 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 معنی‌داری بر روی *کلستریدیوم 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 می‌گردد که خاصیت ضدباکتریایی (بخصوص برای پاتوژن هایی که از راه خوراکی سبب عفونت دستگاه گوارش می‌شوند) 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 و۵۰ و نیز کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با ستون سفادکس جی ۱۰۰ خا لص گردید. گروه های کربوکسی متیل Carboxy Methyl (CM) دارای بار منفی می‌باشند که به پروتئین با بار مثبت متصل می‌شوند. از آنجا که 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 ازگرایان 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. دراین تحقیق با استفاده از سیستم لاکتوپراکسیداز طی ۶ ساعت انکوباسیون میزان تشکیل کلنی بر میلی لیتر (CFU/ml) باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* به ۳۷ درصد میزان اولیه و تشکیل کلنی بر میلی لیتر باکتری (CFU/ml) *کلستریدیوم سپتیکوم* به صفر رسید (۲۰). خاصیت ضدباکتریایی سیستم لاکتوپراکسیداز (LPOS) Lactoperoxidase system روی باکتری های گرم منفی نظیر *سودوموناس* ها، کلی فرم ها، *سالمونلا* و *شیگلا* 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 می‌کند (۲، ۳و۱۳). 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 *کلستریدیوم سپتیکوم* و هم برای باکتری گرم منفی مثل *سودوموناس آئروجینوزا* پس از ۶ ساعت اثر گذاری شده است که این اثر در مورد باکتری گرم مثبت

بیهوازی *کلستریدیوم سپتیکوم* بسیار شدید بوده است. Bjorck و همکاران (۱۹۷۵) با اثردادن سیستم لاکتوپراکسیداز روی باکتری *Pseudomonas fluorescens*، نشان داد که طی ۴ ساعت انکوباسیون، بیش از ۹۰ درصد باکتری ها از بین می‌روند (۲). Jacob و همکاران (۱۹۷۲) نشان دادند که۱۰۰ درصد *مایکوپلاسما 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 لیترآن 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 (۱۵دقیقه) 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 لاکتو پراکسیداز 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 می‌دانند. براساس گزارش مشترکی که بین کارشناسان FAO و WHO 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 نمی‌باشد می‌توان نام برد. همچنین می‌توان از این سیستم در ترکیب با سایر روش های ضدمیکروبی غیرحرارتی نظیر استفاده از فشار هیدرواستاتیکی بالا و یا میدان الکتریکی پالسی و نیز ترکیب با سایر مواد طبیعی ضدمیکروبی نظیر باکتریوسین و یا لاکتوفرین استفاده نمود (۱۷).

لذا پیشنهاد می‌گردد که از لاکتو پراکسیداز 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 آنتی باکتریال آن بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*. *نشریه میکربیولوژی 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.

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 liporotein lipase activities in industrial ewe's milk and cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 2926-32.
6. Elagamy, E.I., Ruppanne, 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_fsanz.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 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-H_2O_2-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). Lactoproxidase binding to Streptocci. *Infection and Immunity* **25**: 304-9.

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.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 11, Issue 1, 2015

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

Zibaee, 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 choromogenic 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 (H2O2, tiocyanate) and one group containing H2O2 and tiocyanate together and one complete system {H2O2 (0.03Mm), tiocyanate (1Mm), LPO (0.02µg/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: Zibaee, S.*
Address: Assistant Professor, Department of Veterinary Research and Biothecnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, North East Branch, Mashhad, Iran. Tel:
Email: s.zibaee@mrazi.ac.ir