

خالص سازی و تثبیت آنزیم لاکتوپراکسیداز استخراج شده از شیر شتر توسط آلزینات سدیم

سعیدزبانی^۱، رضا برازنده^۲، زهریناسحاقی^۳، سید مهدی جعفری^۴

(۱) بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد- ایران

(۲) دانش آموخته دانشگاه پیام نور خراسان رضوی، گروه شیمی، مشهد- ایران

(۳) گروه شیمی، دانشگاه پیام نور خراسان رضوی، مشهد- ایران

(۴) گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان- ایران

(دریافت مقاله: ۱۸ فروردین ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۲۳ خرداد ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: لاکتوپراکسیداز آنزیمی از خانواده اکسیدوردوکتاز می باشد؛ که عامل مهم ضد باکتری محسوب می گردد. بدین علت بعنوان نگهدارنده مواد غذایی و آرایشی بهداشتی کاربرد دارد. تثبیت لاکتوپراکسیداز مزیت های زیادی از قبیل، جدا سازی آسان، کاهش هزینه تولید از طریق به کار گیری مجدد و نیز کنترل اثر آنزیم دارد. **هدف:** خالص سازی و تثبیت آنزیم لاکتوپراکسیداز استخراج شده از شیر شتر توسط پلیمر آلزینات سدیم. **روش کار:** در این پژوهش آنزیم لاکتوپراکسیداز با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با ستون سفادکس G-۱۰۰ و کروماتوگرافی تعویض یونی با ستون کربوکسی متیل سفادکس C-۵۰ از شیر شتر استخراج و خالص سازی شد. سپس با استفاده از آلزینات سدیم، گلیسرول و توتوئین ۸۰ انکپسوله گردید. کارائی ریز پوشانی محاسبه گردید و اندازه ذرات و نحوه پراکنش آن ها توسط دستگاه پارتیکل سنج اندازه گیری شد. مرفولوژی ذرات و مشاهده میکروکپسول ها تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت. پایداری آنزیم محلول و انکپسوله شده در دمای ۴۰C طی ۷۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج: پس از خالص سازی و تعیین خلوص توسط SD-SPAGE غلظتی معادل ۰/۲۸ μg/ml برای هر یک از فراکسیون ها بدست آمد. همچنین کارائی ریز پوشانی ۸۴٪ تعیین و کپسول هایی کمتر از ۲۰۰nm تشکیل شد. در بررسی بامیکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داده شد که میکروکپسول ها دارای سطحی نسبتاً صاف، کروی دارای بهم چسبیدگی کم می باشند. پایداری لاکتوپراکسیداز انکپسوله در عرض ۷۰ روز ۸۱٪ بدست آمد. نتیجه گیری نهایی: روش انکپسوله کردن آنزیم لاکتوپراکسیداز استخراج شده از شیر شتر توسط آلزینات سدیم روشی مناسب برای افزایش کارائی آنزیم می باشد.

واژه های کلیدی: آلزینات، تثبیت آنزیم، انکپسوله کردن، لاکتوپراکسیداز

مقدمه

بازدارندگی خود را بر ویروس ها، قارچ ها و باکتری ها اعمال می نماید (۱۰). مقایسه توالی اسیدهای آمینه آنزیم لاکتوپراکسیداز انسان با لاکتوپراکسیداز گاو، گاو میش، گوسفند، بز و شتر نشان داد که تشابه ای حدوداً ۸۵٪ وجود دارد و این در حالی است که این مقایسه در بین حیوانات به استثنای شتر نشان می دهد که بین ۹۵ تا ۹۸٪ تشابه وجود دارد بنا بر این لاکتوپراکسیداز شتر با سایر حیوانات تفاوت دارد (۱۹).

جهت افزایش کارائی آنزیم ها از تکنیک تثبیت آن ها استفاده می کنند. دو مزیت اصلی تثبیت آنزیم جداسازی آسان از محصولات و استفاده مجدد از آنزیم می باشد. بطور کلی از سه روش اتصال با حامل (Cross-linking method)، تثبیت با اتصال پل های عرضی (Cross-linking method) و بدم انداختن (Entrapping method) می توان برای تثبیت آنزیم ها استفاده نمود. انکپسوله کردن لاکتوپراکسیداز توسط آلزینات، روش سوم تثبیت آنزیم ها می باشد (۲). آلزینات یک صمغ هترو پلی ساکارید خطی است که در دیواره سلولی و فضای بین سلولی جلبک قهوه ای یافت می شود و قابلیت انعطاف و استحکام ساختمانی را برای گیاه فراهم می کند. از نقطه نظر ساختمانی آلزینات ها از واحدهای اسید - مانورونیک (M) و اسید I - گلوکونیک (G) تشکیل شده اند که از طریق پیوندهای گلیکوزیدی

شیر شتر با دارا بودن بیواکتیوها نظیر لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز و برخی ترکیبات خاص نظیر پروتئین اسیدی آب پنیر Whey Acidic Protein (WAP) و پپتیدهای شبه انسولینی همچنین بدلیل فقدان بنا دو لاکتوگلوبولین می تواند بعنوان غذای فراسودمند محسوب گردد. این محصول مهم دارای بیواکتیوایی است که هر کدام بنوبه خود بسیار با ارزش بوده و عملکرد بیولوژیکی خاصی دارند (۸). 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 ۷۸KD بوده که نقطه ایزوالکتریک آن برابر ۹/۶ می باشد. لاکتوپراکسیداز از آنزیم های مقاوم به حرارت است که به عنوان شاخص باستوریزاسیون محسوب می گردد دارای یک گروه هم (آهن) و حدود ۱۰٪ کربوهیدرات می باشد (۱۰). سیستم ضد میکروبی لاکتوپراکسیداز، با افزایش دو ترکیب فعال کننده تیوسیانات و پراکسید هیدروژن اعمال می گردد. لاکتوپراکسیداز، تیوسیانات را در حضور پراکسید هیدروژن اکسید می کند و به این ترتیب هیپوتیوسیانات با خاصیت ضد میکروبی قوی تولید می گردد، این ترکیب با SH پروتئین های باکتریایی پیوند برقرار کرده و اثر



واکنش فراهم می‌گردد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در ۳۷°C با اضافه کردن مقدار ۵۰۰ μl اسیدسولفوریک ۲N واکنش متوقف شده، پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در این شرایط جذب در طول موج ۴۵۰ nm اندازه‌گیری شد. در این سنجش از HRP (Horseradish Peroxidase) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. یک واحد (U) فعالیت آنزیم لاکتوپراکسیداز، مقدار آنزیمی است که اکسیداسیون ۱ μmol/min از سوبسترای تترامتیل بنزیدین را در دمای ۲۵°C و pH ۶ در محصول رنگی (۱-cm-۱ M-۵۹۰۰۰ ε) کاتالیز می‌کند. جهت بررسی سنتیک فعالیت آنزیم از غلظت‌های مختلف (۰/۱ mM تا ۲/۵ TMB)، در برابر مقدار مشخص آنزیم (۵۰ μg آنزیم) استفاده گردید. سنتیکی آنزیم (Km, Vmax) فعالیت آنزیم در برابر غلظت‌های مختلف TMB سنجش شد. بر پایه ۱/[S] (عکس غلظت سوبسترا) و ۱/[V] (منحنی لینویر-برک (Lineweaver-Burk) رسم گردید.

تهیه محلول لاکتوپراکسیداز-آلژینات: لاکتوپراکسیداز در حجم نهایی ۲/۰٪ و نیز آلژینات سدیم در حجم نهایی ۲/۰٪ استفاده گردید. بدین منظور لاکتوپراکسیداز محلول در بافر فسفات ۲۰۰ mM با pH ۶/۵ بتدریج در دمای محیط به محلول آلژینات افزوده و با همزدن در شرایط (۸۵۰ rpm - بمدت ۳۰ دقیقه و درجه حرارت ۲۵°C) محلول لاکتوپراکسیداز-آلژینات تهیه گردید.

تهیه محلول گلیسرول-توئین ۸۰: برای تهیه میزان ۲۵٪ حجمی/حجمی گلیسرول و ۴٪ W/W توئین ۸۰ (بعنوان سورفاکتانت) مخلوط و بمدت ۱۵ دقیقه با استفاده از حرارت مرطوب تا ۷۰°C حرارت داده شد و جهت استفاده، دمای محلول به دمای اتاق رسانیده شد.

تهیه امولسیون: برای تهیه امولسیون، محلول لاکتوپراکسیداز-آلژینات تهیه شده با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شده (۷۵۰ rpm - درجه حرارت ۲۵°C) به تدریج به محلول گلیسرول-توئین ۸۰ افزوده و در شرایط (۹۵۰ rpm - درجه حرارت ۲۵°C - ۴۵ دقیقه) هم زده شد.

تثبیت توسط یون کلسیم یک درصد: محلول کلرید کلسیم (CaCl₂/۶H₂O) با غلظت یک درصد W/V تهیه و به آرامی (قطره قطره) داخل ۱۰ ml امولسیون چکانده شد. بعد از مدت ۴۵ دقیقه (۹۵۰ rpm - درجه حرارت ۲۵°C) که محلول حاصل هم زده شد، ۶۰ دقیقه فرصت داده می‌شود تا کپسول‌های آلژینات کلسیم در کف رسوب نمایند، بعد از صاف کردن کپسول‌ها با اتانل شستشو داده شدند. سپس کپسول‌ها توسط سانتریفوژ (۱۵۰۰ rpm) بمدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شدند. در آخر کپسول‌ها تهیه شده سه بار با سرم فیزیولوژی شستو و تا قبل از استفاده در دمای ۴°C نگهداری شدند.

بررسی کارائی ریز پوشانی: مقدار لاکتوپراکسیداز قبل و پس از انکپسوله شدن با استفاده از روش برادفورد، اندازه‌گیری شد. جذب تمام نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری

به یکدیگر متصل شده‌اند آلژینات یک بیو پلیمر ارزان، در دسترس و غیر سمی و مؤثر در حذف آلاینده‌ها از محیط آبی می‌باشد. این بیو پلیمر بدلیل داشتن ویژگی‌های چون تجزیه پذیری زیستی، خصوصیات هیدروفیلیکی و ماهیت طبیعی بیشتر مورد توجه قرار گرفته و از آن در جهت حذف رنگ و برخی فلزات سنگین استفاده شده است (۱۳) بدلیل اهمیت ضد باکتریایی لاکتوپراکسیداز استفاده از آن بعنوان نگهدارنده طبیعی موارد غذایی مطرح می‌باشد. لذا جهت نگهداری و فعالیت بهینه آنزیم انکپسوله کردن آن می‌تواند حائز اهمیت باشد.

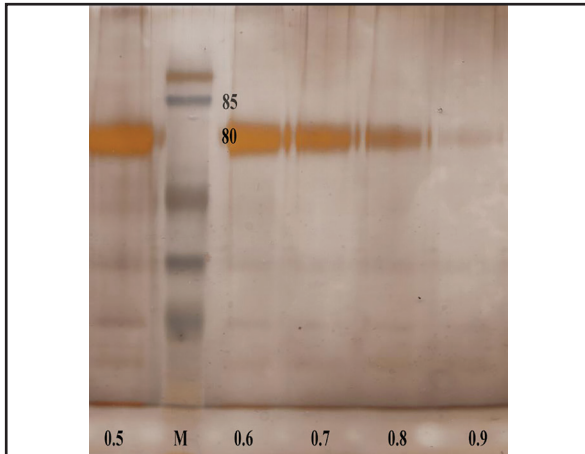
مواد و روش کار

مواد مورد استفاده: شیر شتر از شتر تک کوهانه بوم شناخت ترکمن (استان گلستان)، مواد تترامتیل بنزیدین (از شرکت AppliChem)، آلژینات کلسیم (از شرکت Fluka)، کلرید سدیم، کلرید کلسیم، سولفات آمونیوم، پراکسید هیدروژن ۳٪، گلیسرین، دی متیل سولفو کساید، اسید کلریدریک، توئین ۸۰، تریس، گلیسین، آمونیوم پرسولفات، سدیم دودسیل سولفات، نیترات نقره، کربنات سدیم، متانول و از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. آلومین سرم گاو، سفادکس-۵۰، سفادکس-G-۱۰۰، آکریل آمید، بیس آکریل آمید از شرکت سیگما آلدریج تهیه شدند.

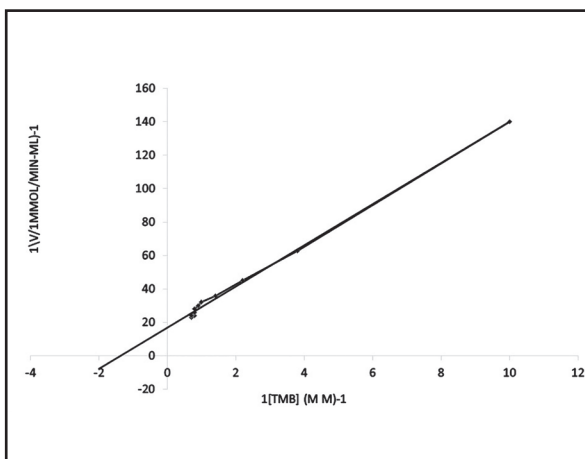
استخراج و خالص سازی آنزیم لاکتوپراکسیداز: در این تحقیق لاکتوپراکسیدازی براساس روش تغییر یافته (۱۴)، از شیر شتر بوم شناخت ترکمن استخراج، خالص سازی گردید. بطور خلاصه پس از چربی زدایی و جدا سازی کازئین از آب پنیر و صاف کردن بمنظور کروماتوگرافی تعویض یونی از رزین سفادکس سی ۵۰ (CM sephadex C-۵۰) و ستونی به ابعاد (۱۰×۳ cm) و برای ژل فیلتراسیون از سفادکس-G-۱۰۰ استفاده گردید. عمل متعادل سازی با بافر فسفات سدیم ۱۰ mM با (pH=۶/۸) انجام گرفت. در کروماتوگرافی تعویض یونی جمع‌آوری فراکسیون‌های حاوی پروتئین‌های با شستشو توسط بافر فسفات سدیم محتوی مقادیر مختلف کلرید سدیم (۰/۲ تا ۱) انجام شد. میزان خلوص پروتئین در فراکسیون‌های جمع‌آوری شده به روش SDS-PAGE بررسی گردید. از رنگ آمیزی نیترات نقره برای دیدن باند حاوی پروتئین در ژل آکریل آمید ۱۲/۵٪ استفاده گردید. به منظور تأیید وجود لاکتوپراکسیداز از در فراکسیون‌ها، از آزمایش واکنش رنگی لاکتوپراکسیداز با تترامتیل بنزیدین (TMB) استفاده شد.

سنجش فعالیت و بررسی سنتیک آنزیم لاکتوپراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم براساس روش تغییر یافته (۴) انجام گرفت. لاکتوپراکسیداز در حضور پراکسید هیدروژن با (۳، ۳، ۵-tetramethylbenzidine) TMB واکنش رنگی نشان ایجاد می‌نماید. برای انجام آزمایش مقدار ۱ ml، ۲ TMBmmol به مقدار ۳۰۰ μl نمونه اضافه شد. با اضافه کردن مقدار ۵۰۰ μl پراکسید هیدروژن (۰/۳ mM H₂O₂) شرایط انجام





تصویر ۱. تصویر ژل پلی آمایید حاصل الکتروفورز از با استفاده از SDS-PAGE نتایج حاصل از خالص سازی لاکتوپراکسیداز، وجود باند حدوداً ۸۰ KD فراکسیون‌های مختلف.



تصویر ۲. نمودار لینیویر-برک آنزیم لاکتوپراکسیداز در حضور غلظت‌های مختلف TMB.

نتایج

نتایج حاصل از خالص سازی لاکتوپراکسیداز: نتایج حاصل از سنجش پروتئین در فراکشن‌ها استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون بر روی سفادکس G-۱۰۰ (تصویر ۱) نشان داد که در می‌توان از فراکسیون‌های ۱۸ تا ۳۸ برای انجام مراحل بعد استفاده نمود. نتایج حاصل از SDS_PAGE و نیز واکنش رنگی با TMB خالص بودن لاکتوپراکسیداز را در فراکسیون‌های جمع‌آوری شده با غلظت نمکی M ۰/۸ و ۰/۹ نشان داد همچنین غلظتی معادل ۰/۲۸ μg/ml برای هر یک از فراکسیون‌ها بدست آمد (تصویر ۱).

نتایج حاصل از تعیین pH اپتیمم فعالیت لاکتوپراکسیداز نشان داد که بیشترین فعالیت آن در حضور بافر فسفات سدیم با pH ۶ می‌باشد.

نتایج حاصل از سنجش فعالیت و بررسی سنتتیک آنزیم لاکتوپراکسیداز: مقدار Vmax و Km برای آنزیم محلول به ترتیب ml-۱min-۱ ۰/۱ μmol و ۰/۱ mM ۵۷- و برای آنزیم بدست آمد (تصویر ۲).

از آنجایی که در این روش جهت تعیین مقدار پروتئین، آلزینات کلسیم تداخل نموده و دارای جذب می‌باشد، در تعیین مقدار، جذب یک محلول از کپسول آلزینات بدون لاکتوففرین با غلظت مشابه (شاهد) نیز خواند می‌شود و جذب شاهد از جذب محلول نهایی پس از انکپسوله شدن کسر می‌گردد. برای محاسبه بازده مقادیر پروتئین موجود در محلول اولیه (قبل از تشکیل محلول) و میزان پروتئین باقی مانده در محلول ناشی از شستوی نهایی در نمونه و شاهد اندازه‌گیری گردید. جهت افزایش صحت و دقت آزمایش سه تکرار شد. جهت محاسبه کارآئی ریز پوشانی از معادله ۱ استفاده گردید.

$$E\% = C - 1 C_0 / C_1 \times 100$$

در این معادله E کارآئی ریز پوشانی لاکتوففرین، C_۱ و C_۰ مقدار پروتئین موجود در محلول قبل و بعد از فرآیند انکپسوله کردن بر حسب میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد.

تعیین اندازه ذرات ونحوه پراکنش آن‌ها: اندازه کپسول‌ها و فراوانی هر یک از آن‌ها با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری قطر ذرات (Particle Size Analyser) مدل (SHIMADZU Japan ۲۱۰۱-SALD-) تعیین گردید. بدین منظور کپسول‌ها در آب یونزدایی شده (Milli Q Millipore USA) با ضریب هدایت ۰/۰۵۴ μS پراکنده و نتایج براساس قطر حجم میانگین گزارش گردید.

تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده ریز ساختار تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (LEO ۱۴۵۰ VP Germany): جهت تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده شکل ظاهری نانو کپسوله‌ای ایجاد شده از میکروسکوپ SEM استفاده گردید. استاب نمونه‌ها پس از آماده سازی و پوشش به اتافک نمونه تحت خلاء منتقل شدند. مشاهده کپسول‌ها بوسیله تابش الکترونی با ولتاژ ۲۰ Kv انجام گرفت و تصویر براساس شعاع الکترونی برگشتی از نمونه‌ها بدست آمد. بدین منظور پس از آماده سازی کپسول‌های شسته شده در مرحله نهایی توسط سرم فیزیولوژی همراه ۰/۰۹ W/W گلیسرول استریل دو بار (سانتریفیوژ ۱۰۰۰ rpm، ۱۰ دقیقه) و در مرحله آخر شستشو با آب مقطر فاقد یون استریل دو بار انجام گرفت سپس تثبیت ذرات با گلوئارالدئید ۲٪ انجام گرفت. نمونه‌ها بر روی یک استاب آلومینیومی (SC ۷۶۲۰ England) پوشیده شده با لایه‌ای از کربن به قطر ۱۲mm پخش و بوسیله یک لایه نازک رسنا از جنس طلا و پالادیم بمدت پوشش داده شدند.

بررسی پایداری آنزیم لاکتوپراکسیداز محلول و انکپسوله در زمان‌های مختلف: بدین منظور محلول لاکتوپراکسیداز و لاکتوپراکسیداز انکپسوله بمدت ۷۰ روز در دمای ۴°C گردید طی این مدت با فاصله زمانی ۱۰ روز، فعالیت آنزیم لاکتوپراکسیداز در هر دو محلول با استفاده از واکنش رنگی با TMB مورد ارزیابی قرار گرفت.

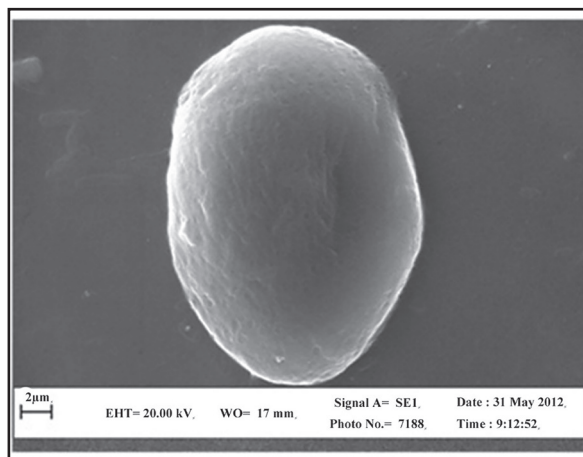


ندارد. تثبیت آنزیم اجازه استفاده مکرر از آنزیم و جداسازی راحت آنرا از محیط واکنش، داد. فعالیت آنزیم انکپسوله شده در PH ۶ به حداکثر رسید. آزمایش‌ها نشان داد که این بیوکاتالیست تثبیت شده با آلزینات سدیم تا ۷۰٪ روز پس از نگهداری در 4°C توانسته است ۸۱٪ فعالیت خود را حفظ نماید در این در حالی است که با این شرایط تنها ۲۰٪ فعالیت آنزیم بدون تثبیت شدن، حفظ شده است (تصویر ۴).

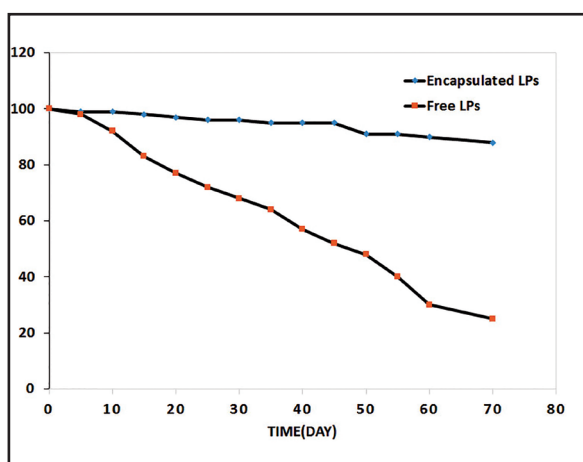
بحث

شیر شتر در نقاطی از دنیا دارای اهمیت اقتصادی زیادی است. بیواکتیوهای شیر نظیر لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز و ایمونوگلوبولین‌ها به میزان قابل توجهی در قسمت آب پنیری شیر یافت می‌شوند. فدراسیون جهانی محصولات لبنی توصیه می‌کند که از سیستم LPOS برای نگهداری شیر خام بمنظور افزایش کیفیت حمل و نقل و برای کنترل باکتریایی بیماری‌زای ایجاد کننده اسپور در شیر پاستوریزه استفاده شود. همچنین استفاده از این سیستم برای افزایش کیفیت فرمولاسیون شیر خشک کودکان، آب میوه، آب سبزیجات بسته بندی گوشت نیز توصیه شده است (۱۳، ۲۲). استفاده از این سیستم هیچگونه اثر منفی بر روی خواص ارگانو لپتیکی و خواص فیزیکی شیمیایی مواد غذایی ایجاد نمی‌نماید. انکپسوله کردن آنزیم روشی برای افزایش کارایی آن می‌شد.

در این مطالعه که در نوع خود برای اولین بار انجام می‌گیرد، جهت خالص سازی لاکتوپراکسیداز از روش کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از رزین کربوکسی متیل سفادکس C-۵۰ و نیز کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با ستون سفادکس G-۱۰۰ استفاده گردید. گروه‌های کربوکسی متیل (CM) Carboxy Methyl دارای بار منفی می‌باشند که به پروتئین با بار مثبت متصل می‌شوند. از آنجائیکه لاکتوپراکسیداز دارای بار مثبت است به این رزین متصل شده و در غلظت‌های مختلف نمکی می‌توان این اتصال را جدا نمود. از سایر روش‌ها کروماتوگرافی تمایل یونی توسط آگارز هیپارین (heparin-agarose affinity chromatography) و نیز روش‌های ژل فیلتراسیون (gel filtration)، کروماتوگرافی تبادل یونی و سپس استفاده از ژل فیلتراسیون نیز برای خالص سازی لاکتوپراکسیداز می‌توان استفاده نمود. Elagamyand و Ruppande در سال ۱۹۹۹ از روش تبادل یونی توسط کربوکسی متیل سلولز جهت خالص سازی لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز از شیر شتر استفاده کرده‌اند. آن‌ها از گرایان‌های 0.1 M Kinkadeand و kendarmiller در سال ۱۹۷۶ از کربوکسی متیل سفادکس برای خالص سازی لاکتوپراکسیداز استفاده نموده و نتایج خوبی بدست آوردند (۱۲). Bolori Moghaddam و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از رزین کربوکسی متیل سفادکس C-۵۰ و نیز کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با ستون سفادکس G-۱۰۰



تصویر ۳. تصویر SEM از یک میکروکپسول آلزینات حاوی آنزیم لاکتوپراکسیداز.



تصویر ۴. نمودار پایداری آنزیم لاکتوپراکسیداز محلول و انکپسوله در دمای 4°C در زمان‌های مختلف.

نتایج حاصل از تعیین pH اپتیمم فعالیت لاکتوپراکسیداز نشان داد که بیشترین فعالیت آن در حضور بافر فسفات سدیم 100 mM و 6 pH می‌باشد.

نتایج حاصل از انکپسوله کردن لاکتوپراکسیداز: بررسی نتایج حاصل از تشکیل میکروکپسول‌ها و نتایج حاصل از کارایی ریز پوشانی و مدت زمان نگهداری آنزیم بیان کننده این مطلب است که روش مورد استفاده روشی مناسب بوده و توانسته است کپسول‌هایی با اندازه ذرات کمتر از 200 mic ایجاد نماید.

نتایج حاصل از کارایی ریز پوشانی نشان داد که بازده 84% می‌باشد. تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده ریز ساختار تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ (SEM): نتایج نشان داد که قطر کپسول‌های تشکیل شده کمتر از $200\text{ }\mu\text{m}$ ، سطح کپسول‌ها نسبتاً صاف، با بهم چسبیدگی کم و دارای شکلی نسبتاً کروی می‌باشند (تصویر ۳). باتوجه به نتایج به دست آمده از آزمایشات می‌توان نتیجه گرفت که پلیمر آلزینات حاملی مناسب برای تثبیت آنزیم لاکتوپراکسیداز می‌باشد. زیرا آلزینات یک پلیمر طبیعی است که فاقد هرگونه مواد سمی می‌باشد و تأثیری بر روی ساختار آنزیم



که توسط گلوکار آلدئید فعال شده بود برای تثبیت آنزیم لاکتوپراکسیداز استفاده نمودند. در این روش میزان بازده را ۹۱٪ برآورد نموده همچنین آنزیم پس از ۶۰ روز بعد از تثبیت توانسته است ۸۰٪ کارائی خود را حفظ نماید (۱۱). در مقایسه این تحقیق با مطالعه انجام گرفته، بازده ۸۴٪ و آنزیم تا ۷۰ روز پس از نگهداری در ۴°C توانسته است ۸۱٪ فعالیت خود را حفظ نماید (تصویر ۵). Miroliaei و همکاران در سال ۲۰۰۷ از کونکاناوالین A همراه با سفارز ۴B (CCon A-Sepharose ۴B) برای تثبیت آنزیم لاکتوپراکسیداز استفاده نموده‌اند این محققین نشان دادند که با استفاده از روش یاد شده پس از ۱۴ روز در دمای ۴°C، ۶۰٪ از کارائی آنزیم حفظ شده است (۱۵). همچنین Al-Baarri و همکاران در سال ۲۰۱۲ از ترکیبات مختلف سفارز، SP Sepharose Big Beads (BB-SP) and SP Sepharose Fast Flow CNBr active (SP-CNBR) (SPFF) SP Sepharose Fast Flow برای تثبیت لاکتوپراکسیداز استفاده نموده‌اند. تحقیق یاد شده نشان داد که از ترکیبات متفاوت می‌توان برای تثبیت لاکتوپراکسیداز استفاده نمود (۱). بطور کلی با انجام این مطالعه نتیجه گرفته می‌شود که روش انکپسوله کردن آنزیم لاکتوپراکسیداز توسط آلزینات سدیم را می‌توان یک روش سریع و ارزان و کاربردی دانست که بدون نیاز به تجهیزات پیچیده آزمایشگاهی قابل انجام می‌باشد. این روش منجر به تسهیل و افزایش کاربرد آنزیم و نیز کاهش زمان انجام فرآیند تثبیت شده، امکان استفاده چندین باره از آنزیم و افزایش قابل توجه در ماندگاری آنزیم را فراهم می‌آورد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری اعضاء محترم بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق بخصوص سرکار خانم مجیدی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- Al-Baarri, A.N., Ogawa, M., Visalsok, T., Hayakawa, S. (2012) Lactoperoxidase immobilized onto various beads for producing natural preservatives solution. *J Applied Technol.* 1: 4-6
- Bickerstaff, G.F. (1997) Immobilization of enzyme and cells. In: *Methods in Biotechnology* Bickerstaff, G. F. Humana Press, Totowa New Jersey. p. 1-20.
- Bolori Moghaddam, M., Bahmanpoor, S., Zibae, S., Izadi, M., Lal Alizade, S. (2012) Isolation of lactoperoxidase enzyme from camels' milk and survey Its antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*. *J Vet Microbiol.* 7: 17-24.
- Chávarri, F., Santisbean, A., Virto, M., Renobales, M. (1998) Alkaline Phosphatase. *Acid*

لاکتوپراکسیداز شیر شتر را خالص نمودند که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. این محققین پس از خالص سازی اثر لاکتوپراکسیداز را بر روی باکتری استفیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار دادند (۳).

نتایج تحقیق حاضر با نتایج این محققین هم خوانی دارد. پس از خالص سازی سنتتیک فعالیت آنزیم (Km, Vmax) در برابر غلظت‌های مختلف TMB سنجش شد. کیلومتر یک آنزیم، نشان دهنده تمایل آنزیم به سوستر است. بدیهی است هرچه کیلومتر یک آنزیم کوچکتر باشد، این آنزیم به غلظت کمتر سوستر در محلول حساس تر است. و همینطور از این طریق می‌توان به وجود سوسترای مناسب برای هر آنزیم پی برد (۲۱). آنزیم لاکتوپراکسیداز استخراج شده با استفاده از آلزینات سدیم، گلیسرول و توئین ۸۰ انکپسوله گردید. امکان تثبیت آنزیم‌ها با حامل‌های مختلف توسط روش‌های، مختلفی صورت می‌گیرد. معمولاً ارجحیت با روشی است که کمترین صدمه را به آنزیم وارد می‌نماید و در این میان سیستم‌هایی با سهولت و امنیت بیشتر و هزینه کمتر ایده آل می‌باشند (۱۷). در تثبیت آنزیم‌ها، پلیمر مورد استفاده می‌بایست غیر سمی باشد و پلیمرهای طبیعی از این نظر مناسب‌ترند. علاوه بر آن طبیعی بودن منبع تهیه این پلیمرها، امکان دستیابی به آن‌ها را راحت‌تر می‌کند (۷). یکی از پلیمرهای طبیعی که برای عمل تثبیت آنزیم مناسب می‌باشد آلزینات است. نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که از آلزینات که کربوهیدراتی مناسب برای استفاده در سیستم‌های بیولوژیک است می‌توان بخوبی برای تثبیت آنزیم لاکتوپراکسیداز استفاده نمود. از آلزینات برای تثبیت آنزیم‌های دیگر نیز استفاده شده است (۲۴). آلزینات خواصی مانند قوام دهندگی، تعلیق، تشکیل فیلم، تثبیت، تولید ژل و پایدارسازی امولسیون را دارد (در این تحقیق همچنین جهت ایجاد استحکام بهتر کپسول‌های تشکیل شده از کلرید کلسیم استفاده شد تا پیوند متقاطع القا شود (۱۸). Olivas و همکاران در سال ۲۰۰۸ اعتقاد دارند که فیلم‌های آبدوست آلزینات، عایق ضعیف رطوبت هستند اما استفاده از کلسیم در فرمول، نفوذپذیری به بخار آب این فیلم‌ها را کاهش داده و آن‌ها را در آب نامحلول می‌سازد (۱۶). همچنین در مطالعه حاضر جهت بهبود خواص فیزیکی کپسول‌های تشکیل شده از گلیسرول و توئین ۸۰ استفاده گردید. نرم کننده‌ها (پلاستی سایزرها) جهت اصلاح خواص فیزیکی و مکانیکی به کار رفته و موجب کاهش شکنندگی، پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌های پلیمر و افزایش فضاها بین ملکولی آن‌ها می‌شوند (۲۰). نتایج حاصل از بازده تشکیل کپسول‌هایی با سطح نسبتاً صاف، شکلی کروی و به هم چسبیدگی کم و نگهداری آنزیم در طول زمان نشان داد که از این روش بخوبی می‌توان برای انکپسوله نمودن و تثبیت آنزیم لاکتوپراکسیداز استفاده نمود. Ye و همکاران در سال ۲۰۰۰ برای تهیه پوشش‌های ضد باکتریایی بمنظور استفاده در بسته بندی گوشت قرمز، گوشت مرغ و ماهی از لاکتوپراکسیداز تثبیت شده بر روی فیلم آلزینات استفاده نمودند (۲۳). Jafary و همکاران در سال ۲۰۱۳ از پلر پلی آلانین



- Phosphates, Lactoperoxidase, and Lipoprotein Lipase Activities in Industrial Ewe's Milk and Cheese. *J Agric Food Chem.* 46: 2926-2932.
5. Elagamy, E.I., Ruppen, R. (1996) Purification and Characterization of Lactoferrin actoperoxidase, Lysozyme and Immunoglobulins from Camel's Milk. *Int Dairy J.* 6: 129-145.
 6. Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., Chi, Y. (2009) Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chem.* 115: 66-70.
 7. Fogarty, W.M., Kelly, C.T. (1983) Enzymic developments in the production of Maltose and glucose. In: *Enzyme Technology.* Lafferty, R.M. Maier, E. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, Tokyo. p.149-163.
 8. Gobetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.G. (2007) Bioactive peptides in dairy products. In: *Food Products Manufacturing.* Hui, Y.H. (ed). John Wiley & Sons. p. 489-517.
 9. Jacquot, M., Donato, Ph., De. Barres, O., Pons, M., Scher, N., Miclo, J., Poncele, A. (2002) Physicochemical characterization of the lactoperoxidase system powders: comparison of two drying techniques. *Powder Technol.* 128: 205- 212.
 10. Jacquot, M., Poncelet, D. (2003) Multienzymatic system encaosulation: Application to the lactoperoxidase system. *Chemistry & industry.* 57: 581-584.
 11. Jafary, F., Kashanian, S., Samsam Sharieat, S.Z. (2013) Purification, Immobilization, and Characterization of Bovine Lactoperoxidase. *Int J Food Prop.* 16: 905-916.
 12. Kinkade, Jr., kendarmiller, W. (1976) Isolation and characterization of murine lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* 446: 407-418.
 13. Lagoa, R., Rodrigues, J.R. (2007) Evaluation of dry protonated calcium alginate beads for biosorption applications and studies of lead uptake. *Appl Biochem Biotechnol.* 143: 115-128.
 14. Lindstrom, T.R., Morimoto, K., Cante, C.J. (1992) Edible films and coatings. In: *Encyclopedia of food Science and Technology (Vol. 2).* Hui, Y.H. (ed.). New York: John Wiley and Sons. p. 59-663.
 15. Miroliaei, M., Nayeri, H., Samsam -Shariat, S.Z., Movahedian, A. (2007) Biospecific Immobilization of Lactoperoxidase on Con A-Sepharose 4B. *Scientia Iranica.* 14: 303-307.
 16. Olivas, G.I., Barbosa-Cánovas, G.V. (2008) Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT-Food Sci Technol.* 41: 359-366.
 17. Raviyan, P., Tang, J., Orellana, L., Rasco, B. (2003) Physicochemical properties of a time-temperature indicator based on immobilization of *aspergillus oryzae* α -amylase in polyacrylamide gel as affected by degree of cross-linking agent and salt content. *J Food Sci.* 68: 2302-2308.
 18. Rhim, J.W. (2004) Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensm Wiss Technol.* 37: 323-330.
 19. 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. *Int J Biochem Mol Biol.* 4: 108-128.
 20. Sothornvit, R., Krochta, J.M. (2000) Plasticizer effect on oxygen permeability of β -lactoglobulin films. *J Agric Food Chem.* 48: 6298-6302.
 21. Sucklking, C.J. (1990) *Enzyme chemistry, Impact & applications.* (2nd ed.) Chapman & Hall. London, UK.
 22. Uguz, M.T., Ozdemir, H. (2005) Purification of bovin milk lactoperoxidase and investigation of antibacterial properties at different thiocyanate mediated. *Appl Biochem.* 41: 397-41.
 23. Ye, X., Yoshida, S., Ng, T.B. (2000) Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin B and β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *Int J Biochem Mol Biol.* 32: 1143-1150.
 24. Zhang, M., Shang, W., Yang, X., Zhang, S., Zhang, X., Chen, J. (2013) Immobilization of lipase using alginate hydrogel beads and enzymatic evaluation in hydrolysis of p-Nitrophenol butyrate. *Bull Korean Chem Soc.* 34: 2741-6.



Purification and immobilization of Lactoperoxidase extracted from camel milk using sodium alginate

Zibaei, S.^{1*}, Barazandeh, R.², Eshaghi, Z.³, Jafariy, S.M.⁴

¹Department of Veterinary Research and Biotechnology, Razi vaccine and Serum Research Institute, North East Branch, Mashhad- Iran

²Graduated from the Payam-e-Noor University of Mashhad, Mashhad- Iran

³Department of Chemistry, Payam-e-Noor University of Mashhad, Mashhad- Iran

⁴Department Materials Engineering and Industrial Design, Gorgan University, Gorgan- Iran

(Received 6 April 2016, Accepted 12 June 2016)

Abstract:

BACKGROUND: 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. **OBJECTIVES:** Purification and immobilization of lactoperoxidase extracted from camel milk using sodium alginate polymer. **METHODS:** The lactoperoxidase was purified from camel milk by using sephadex G-100 gel filtration CM and sephadex C-50 ion-exchange chromatography. Encapsulation was carried out by using LPO, sodium alginate, glycerol and Tween 80. Afterward, the microcapsules were stabilized by calcium ion (1%). Efficiency of encapsulation was calculated. The particle size and distribution were measured with particle size analyzer. Morphology and formation of the particles were studied using Scanning Electron Microscope (SEM). Stability of encapsulated and unencapsulated LPO was studied at 4 °C during 70 days. **RESULTS:** After purification and purity measurement by SD-SPAGE, concentration of 0/28 micrograms per liter for each of the fractions was obtained. Microencapsulation efficiency was 84% and microcapsules less than 200 nm were formed. Observation by SEM confirmed the formation of microparticles. Microcapsules have a relatively smooth surface, spherical with low tenacity as well. Stability of encapsulated enzyme at 70 days was obtained 81%. **CONCLUSIONS:** Immobilization of Lactoperoxidase extracted from camel milk using sodium alginate is a good method to increase performance of the enzyme. **Keyword:** alginate, encapsulation, enzyme immobilization, Lactoperoxidase

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. The image of polyacrylamide gel electrophoresis results using SDS-PAGE, obtained from purification of lactoperoxidase, existence of approximately 80 kD a band in the different fractions.

Figure 2. Line weaver-Burk Diagram of lactoperoxidase in different concentration of TMB.

Figure 3. SEM image, one alginate microcapsules containing lactoperoxidase.

Figure 4. Diagram of lactoperoxidase solution and encapsulated stability in 4 °C at different times.

